



**HAL**  
open science

# Régulation de la synthèse des protéoglycanes et du phénotype chondrocytaire par l'interleukine 1 et Wnt-3a : rôle clé de la xylosyltransférase I et du syndécan 4

Mostafa Khair

► **To cite this version:**

Mostafa Khair. Régulation de la synthèse des protéoglycanes et du phénotype chondrocytaire par l'interleukine 1 et Wnt-3a : rôle clé de la xylosyltransférase I et du syndécan 4. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0005 . tel-01750666

**HAL Id: tel-01750666**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750666v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : «Sciences de la Vie et de la Santé»**

**Par**

**Mostafa KHAIR**

**Régulation de la synthèse des protéoglycanes et du phénotype chondrocytaire par l'interleukine 1 $\beta$  et Wnt-3a : Rôle clé de la xylosyltransférase I et du syndécan 4**

**Soutenance prévue le 22 Janvier 2014**

**Membres du jury**

**Rapporteurs: Monsieur Philippe Galera, Professeur, EA4652 (MILPAT), Caen**

**Monsieur Yanusz Wegrowski, Docteur, CNRS FRE 3481, Reims**

**Examineurs: Monsieur Marc Diederich, Professeur, (LBMCC), Luxembourg**

**Monsieur Mohamed Ouzzine, Directeur de recherche INSERM, UMR 7365 CNRS, Nancy (directeur de thèse)**

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude au Dr Mohammed Ouzzine, directeur de thèse, pour son accueil, sa direction avisée, consciencieuse et fidèle. Je le remercie de m'avoir soutenu et encouragé tout au long de cette thèse avec patience.

Je remercie Monsieur Philippe Galera et Monsieur Yanusz Wegrowski d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'évaluer mon travail.

Monsieur Marc Diederich, je vous remercie pour votre participation au jury de comité de thèse, ma soutenance de thèse et son évaluation.

Je remercie Madame Lydia Barre pour ses bons conseils et sa disponibilité.

Je tiens à remercier Monsieur Mustapha Bourhim pour sa gentillesse, sa patience, ses bons conseils et pour tous ce qu'il m'a appris pendant mon stage de Master 2.

Un grand merci aux secrétaires de l'UMR 7365 pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur patience.

Un grand merci à tous mes amis du labo Dong, Irfan, Xavier, Chaza, Reine, Emilie, Gabi, Caroline, Mineem et Jun pour tous les bons moments passés ensemble, leur bonne humeur et leur soutien.

Je remercie Mathieu et David pour leur gentillesse et pour leurs diponibilités surtout quand je ne trouvais personne pour m'aider pour imprimer ma thèse.

Un très grand merci pour tou(te)s mes ami(e)s au labo et en dehors du labo, pour l'affectueuse amitié, leur grand support et pour les excellents moments partagés ensemble. Mon séjour à Nancy ne pouvait pas être pareil sans vous.

Merci pour Rammal, Racha, Melhem et Ali pour tous les bons moments qu'on a partagés ensemble. On restera des amis pour toute la vie.

Rasrouse habibi!! Je ne serais sûrement pas là aujourd'hui sans toi ! Merci pour tout. Ma chance c'est de t'avoir. Je t'aime.

Ma famille, papa, maman, Majd, Mira, Aya, les parents de Rose, je dédie cette thèse pour vous. Vous êtes mon bonheur. Je remercie votre grande présence malgré la distance qui nous sépare. Je vous aime énormément.

# Sommaire

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	7
<b>INTRODUCTION</b> .....	13
<b>Le Cartilage</b> .....	14
I. LE CARTILAGE .....	15
I.1. Le cartilage articulaire .....	15
I.2. La composition du cartilage .....	16
I.3. Organisation du cartilage .....	16
II. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE .....	17
II.1. La composition de la matrice extracellulaire .....	18
II.1.1. L'eau .....	18
II.1.2. Les collagènes .....	18
II.1.3. Les protéoglycanes .....	20
II.1.3.1. PGs essentiels de la MEC .....	21
II.1.3.1.1. L'agrécan .....	21
II.1.3.1.2. Les petits protéoglycans et protéines riches en leucine (SLRP) .....	22
II.1.3.1.3. L'acide hyaluronique .....	23
II.1.3.1.4. Les PGs membranaires .....	23
III. HOMEOSTASIE DU CARTILAGE .....	26
<b>Glycosyltransferases Et Anomalies De Synthèse Des Protéoglycanes</b> .....	28
I. Synthèse des PGs .....	29
II. Mutations géniques des GTs et pathologies associées .....	30
<b>La Pathologie Arthrosique</b> .....	34
I. L'ARTHROSE .....	35
I.1. Perturbations de la synthèse de la MEC au cours de l'arthrose .....	35
I.2. Effets de l'inflammation sur La MEC durant l'arthrose .....	36
I.3. Implications thérapeutiques : Les possibilités de traitements .....	37
<b>Wnt Et Cartilage</b> .....	41
I. Famille Wnt et cartilage .....	42
II. Voie de signalisation Wnt .....	42
III. Wnt et phénotype chondrocytaire .....	48
IV. Signalisation wnt dans la dégénérescence du cartilage .....	50
<b>Matériel Et Méthodes</b> .....	53
I. MATERIEL .....	53
I.1. Réactifs de biologie cellulaire .....	53

I.2. Réactifs de biologie moléculaire.....	53
I.3. Réactifs biochimiques .....	53
II. METHODES .....	54
II.1. Préparation des cellules .....	54
II.2. Culture en monocouche .....	54
II.3. Traitements des Chondrocytes.....	55
II.4. Transfection des Chondrocytes .....	55
II.5. Anabolisme des GAGs .....	55
II.6. Extraction des ARN totaux.....	56
II.7. Transcription inverse et réaction de Polymérisation en Chaîne en temps réel RT-PCR..	56
II.8. Clonage du promoteur de la XT-I et mutagenèse dirigée.....	57
II.8.1. Délétion successive des séquences 5' du promoteur de la XT-I .....	57
II.8.2. Mutagenèse dirigée.....	58
II.8.3. Purification des plasmides .....	59
II.8.4. Transfection des chondrocytes par les différentes constructions du promoteur de la XT-I.....	60
II.9. Essai luciférase .....	60
II.10. Extraction des protéines.....	60
II.11. Western Blot.....	61
II.12. Immunoprécipitation de la chromatine.....	61
II.12.1. Préparation de la chromatine .....	61
II.12.2. Immunoprécipitation .....	62
II.13. Pull-Down.....	63
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	64
<b>RESULTATS</b> .....	67
<b><i>Régulation de l'expression du gène de la Xylosyltransferase-I par l'interleukine 1 <math>\beta</math> dans les chondrocytes humains : mécanismes et impact sur la synthèse des protéoglycanes</i></b> .....	68
I. L'expression du gène de la XT-I est régulée par l'IL-1 $\beta$ dans les chondrocytes primaires humains .....	69
II. Caractérisation fonctionnelle du promoteur du gène humain de la XT-1 .....	71
III. Le facteur de transcription Sp1 régule l'activité basale du promoteur de la XT-I.....	74
IV. Les sites Sp1 ne sont pas impliqués dans l'induction du promoteur de la XT-I par l'IL-1 $\beta$ .....	74
V. l'activité basale et l'activité induite par l'IL-1 $\beta$ sont médiées par AP-1 .....	77
VI. le facteur de transcription AP-1 est un <i>trans</i> activateur du promoteur de la XT-I .....	79
VII. AP-1 endogène se lie directement aux sites AP-1 au niveau du promoteur du gène de la XT-I .....	79

VIII. L'activation du promoteur de la XT-I par l'IL-1 $\beta$ est mediée par les kinases JNK et p38MAPK .....	81
IX. Sp1 active et sp3 inhibe l'activité promotrice de La XT-I.....	83
X. L'inhibition de l'expression de la XT-I par l'IL-1 $\beta$ durant la phase tardive est mediée par Sp3.....	84
<b><i>Le Syndécan 4 Régule La Voie De Signalisation Non Canonique De Wnt-3a Et La Dédifférenciation Chondrocytaire</i></b> .....	87
I. WNT-3A active les voies non canoniques via le SDC4. ....	88
II. Wnt-3a régule l'expression du collagène II et d'autres marqueurs chondrocytaires via le SDC4 .....	90
III. Wnt-3a Inhibe l'activité du promoteur du SDC4 dans les chondrocytes Humains	96
IV. L'inhibition de la MMP13 et de l'ADAMTs4 par Wnt-3a est $\beta$ -caténine-dépendante alors que l'inhibition du SDC4 et du collagène II est ERK1/2 dépendante. ....	97
V. Wnt-3a inhibe l'expression de la MMP13 et ADAMTs4 <i>via</i> Dvl1 et Dvl3 et le collagène II <i>via</i> Dvl2 .....	102
<b>Discussion</b> .....	109
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	119



# ***LISTE DES ABREVIATIONS***

ADAMTS :	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
AINS :	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AKT :	Protéine kinase B
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 :	Activator protein 1
ARHGEF7 :	<i>RHO guanine nucleotide exchange factor 7</i>
ATF :	<i>Activating transcription factor</i>
BCA :	Acide bicinchoninique
BCIP/N BT :	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate-nitrotetrazolium blue</i>
BCL9 :	<i>B-cell CLL/lymphoma 9</i>
bFGF :	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP :	<i>Bone morphogenetic protein</i>
CAMKII :	Calcium / protéine kinase II calmoduline-dépendante
CDC42 :	Protéine de division cellulaire 42
ChIP:	Immunoprécipitation de la chromatine
ChPF :	Facteur de polymérisation de la chromatine
CMV :	Cytomégalovirus
COL2A1 :	Collagène type II alpha I
COMP :	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>
COX-2 :	Cyclooxygénase-2
CPC :	Chlorure de cétylpyrimidium
CRE :	<i>cAMP-responsive element</i>
CS/DS :	Chondroïtine-sulfates/dermatane-sulfates
CS:	Chondroïtine-sulfate
CSM :	Cellules souches mésenchymateuses
CTNNB1 :	Gène codant pour la $\beta$ -caténine
DAAM1 :	<i>Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1</i>
DKK1:	Dikkopf1
DMEM :	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMOADs:	<i>Disease-modifying OA drugs</i>
Dvl :	Protéine Dishevelled
EDTA :	Acide éthylènediamine tétraacétique

EGF:	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Elk-1 :	<i>ETS domain-containing protein</i>
ERK:	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EXT :	Exostoses
FACIT:	<i>Fibril associated collagens with interrupted triple helices</i>
FGF :	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
Fra :	<i>Fos related Antigen</i>
Fzd :	Récepteur frizzled
GAGs :	Glycosaminoglycanes
GalNAc :	<i>N-acétylgalactosamine</i>
GalT-I ( $\beta$ 4GalT7) :	$\beta$ 1,4-galactosyltransférase 7
GalT-II ( $\beta$ 3GalT6) :	$\beta$ 1,3-galactosyltransférase 6
GIT :	<i>G protein-coupled receptor kinase-interactor 1</i>
GlcA :	Acide glucuronique
GlcAT-I:	$\beta$ 1,3-glucuronosyltransférase I
GlcNAc :	N-Acétyl-D-glucosamine
GPI :	Glycosyl-phosphatidylinositol
GREM1 :	Gremlin 1
GSK-3 $\beta$ :	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GTs :	Glycosyltransférases
HA :	Acide hyaluronique
HDACs :	Histone désacétylase
Hep/HS :	Héparine/héparane-sulfates
HGF :	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HS :	Héparane-sulfate
IdoA :	Acide L-iduronique
IGD :	<i>Interglobular domain</i>
IGF :	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IKK :	IKB Kinase
IL- 1 $\beta$ :	Interleukine-1 $\beta$
IL-1RAcP :	<i>IL-1 receptor accessory protein</i>
iNOS :	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IRAK :	Kinase associé au récepteur de l'interleukin-1

JNK:	<i>Jun NH2-terminal Kinase</i>
KS :	Kérotane sulfate
LRP5/6:	<i>Low density lipoprotein receptor-related receptor5/6</i>
LRRs :	<i>Leucine Rich Repeat</i>
MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MAPKK :	MAPK kinase
MCP-1 :	<i>Monocyte chymotactic protein-1</i>
MEC :	Matrice extracellulaire
MEK :	MAPK/ERK
MMP :	Métalloprotéinases matricielles
mTOR:	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MyD88 :	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
N-CAM :	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
NEMO :	<i>NF <math>\kappa</math> B essential modulator</i>
NFAT :	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF $\kappa$ B :	Facteur nucléaire kappa B
NIK:	<i>NFKB inducing kinase</i>
OA :	Arthrose
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PAK :	<i>p21 activated kinase</i>
PCP :	Polarité cellulaire planaire
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDK1 :	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PDZ :	<i>Postsynaptic density-95/ disc large protein/zonula occludens-1</i>
PEI :	Polymère d'éthylène-imine
PG :	Protéoglycanes
PGE2:	Prostaglandine E2
PIP2 :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC :	Protéines kinases C
PLC :	Phospholipase C
PMSF :	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PR :	Polyarthrite rhumatoïde
PTK7 :	Protéine tyrosine kinase 7

PXE :	Pseudoxanthoma élastine
RA:	Polyarthrite rhumatoïde
Rac1 :	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAGE :	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
RCF :	<i>Relative centrifugal force</i>
RE :	Réticulum endolasmique
Rho :	Famille des GTPases
RHOA :	Arthrose de la hanche radiographique
ROR :	Récepteur apparenté au récepteur des rétinoïdes
RPS29 :	Protéine ribosomique small 29
Runx2 :	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
RYK :	<i>Receptor related to tyrosine kinase</i>
SAPK/JNK :	<i>Stress-activated protein kinase/c-Jun NH(2)-terminal kinase</i>
SAP-1 :	<i>Stress-activated protein-1</i>
SCRIB :	<i>Scribbled homolog (Drosophila)</i>
SDC:	Syndécans
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
sFRP:	<i>Secreted Frizzled-related protein</i>
SG ou Ser-Gly :	Sérine- glycine
shRNA :	<i>Small hairpin RNA</i>
SNP :	Polymorphisme d'un nucléotide unique
SPCs :	Cellules précurseurs du squelette
SRLPs :	<i>Small rich leucine proteoglycans</i>
TCF/LEF:	<i>T cell factor/lymphoid enhancer-binding factor</i>
TGF- $\beta$ :	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIMP :	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TM :	Domaine transmembranaire
TNF- $\alpha$ :	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TRAF6:	<i>TNF-receptor associated protein</i>
TRE :	<i>TPA responsive element</i>
VANGL :	<i>Strabismus (STB)/Vang-like</i>
VEGF :	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WIF :	<i>Wnt inhibitory factor</i>

WIF-1: *Wnt-inhibitory factor 1*  
Wnt : Wg (*wingless*, en français « sans aile ») et Int (site d'intégration)  
XT-I : Xylosyltransférase I  
XylT : Xylosyltransférase

# ***INTRODUCTION***

## *Le cartilage*

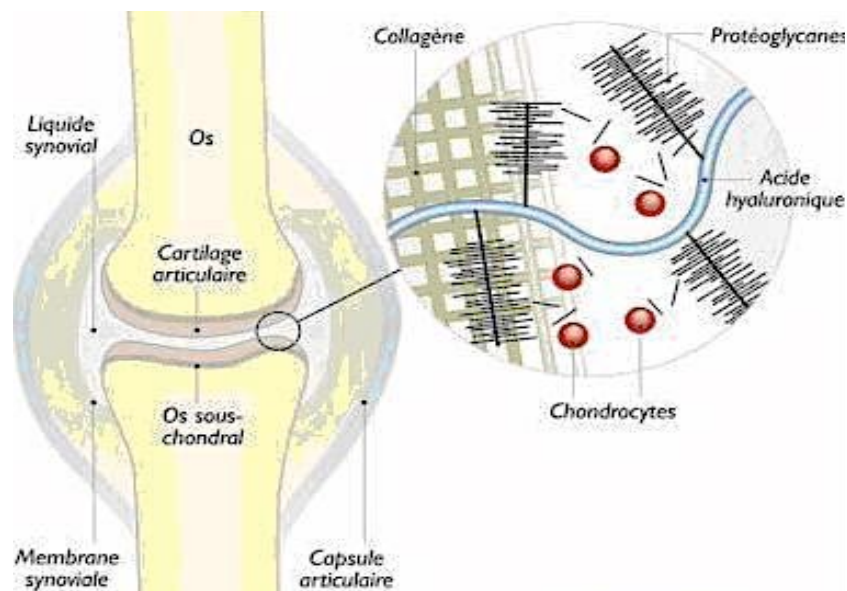


# I. LE CARTILAGE

## I.1. Le cartilage articulaire

L'articulation est une entité fonctionnelle comportant trois composants essentiels : le cartilage, la synovial et l'os sous-chondral (figure 1). L'articulation est formée de deux extrémités osseuses recouvertes d'un cartilage hyalin enchâssées dans un sac ou capsule articulaire dont la face interne, intra-articulaire, est tapissée par la membrane synovial. Une articulation a deux fonction principales : d'une part elle assure le maintien de la posture en mode compression et, d'autre part, elle facilite le mouvement en favorisant le glissement des surfaces articulaires l'une par rapport à l'autre avec un coefficient de friction extrêmement bas grâce aux propriétés biomécaniques du cartilage.

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse à la fois solide et élastique qui garde la particularité d'être non vascularisé et non innervé (Peyron et al. 1994 ; Hamerman D. 1989). Le cartilage recouvre les surfaces osseuses au niveau des articulations, c'est de son aspect translucide que vient son nom de cartilage «hyalin». L'épaisseur du cartilage varie selon l'articulation, elle est plus importante dans les articulations les plus chargées (articulations des membres inférieurs) et maximale sur la rotule.



**Figure 1 : Représentation schématique du cartilage articulaire.** *Le cartilage recouvre les surfaces osseuses. Il contient un seul type de cellules, les chondrocytes. La matrice*

*extracellulaire cartilagineuse est formée de collagène de type II, d'acide hyaluronique, de protéoglycanes et de protéines non collagéniques.*

## **I.2. La composition du cartilage**

Le cartilage hyalin est composé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, situés au sein d'une matrice extracellulaire (MEC) dense composée essentiellement d'eau (60 à 80%) et de macromolécules (20 à 40%). Le rôle essentiel du cartilage articulaire est d'assurer un bon glissement entre les pièces osseuses articulaires avec un coefficient de friction très bas. Cela tout en amortissant et en répartissant les pressions, rendant les stress de contact les plus faibles possibles. La capacité d'amortissement du cartilage qui le rend capable de résister aux forces de compression est due à l'eau, qui présente de 60 à 80% du poids hydraté de ce tissu, et aux protéoglycanes (PGs) auxquels cette eau est associée (Buckwalter et al. 1988). La teneur en PGs varie en fonction de la profondeur et des régions anatomiques du cartilage, elle est d'environ 30 à 35% du poids sec du cartilage. Les collagènes constituent une trame dans laquelle les PGs sont piégés, ils présentent 50% du poids sec du cartilage et forment un véritable réseau nécessaire au maintien de l'agrégat au sein de la MEC (Buckwalter et al. 1988). D'autres molécules protéiques plus petites participent à l'architecture du tissu en assurant des interactions entre les principaux constituants, renforçant ainsi sa structure, ou établissent des interactions entre la matrice et les chondrocytes, leur permettant d'obtenir des informations quant à l'état de la MEC (Buckwalter et Mankin 1998b).

## **I.3. Organisation du cartilage**

Le cartilage normal est constitué de 4 zones histologiques (Buckwalter et al. 1988) qui varient selon les critères de morphologie, de densité cellulaire et selon la nature et la concentration des différents composants :

- **La zone superficielle**, la plus sollicitée par les contraintes mécaniques, et la plus fine contient de fines fibres de collagène orientées d'une façon parallèle à la surface articulaire. Elle constitue 2 à 3% de l'épaisseur totale du cartilage. La perturbation de cette zone modifie les propriétés mécaniques du cartilage et contribue ainsi au développement de l'arthrose (Bhosale et al. 2008).
- **La zone intermédiaire**, possède des fibres de collagène plus épaisses orientées plus aléatoirement. Elle représente 5% de l'épaisseur totale du cartilage. Les chondrocytes dans cette couche sont plus volumineux, sphériques et non orientés (Modl et al. 1991).

- **La zone profonde**, riche en fibres de collagène de type II orientées perpendiculairement à la surface. C'est la couche qui présente la teneur la plus faible en eau et la plus forte en PGs (Buckwalter et al. 1998a). Elle représente 90% de l'épaisseur du cartilage et renferme des chondrocytes abondants et ronds avec un aspect prolifératif dans la partie supérieure de cette couche (Peyron et al. 1994 ; Trattinig et al. 1997).
- **La zone calcifiée**, synthétise du collagène de type X, lui permettant de jouer le rôle d'amortisseur de choc le long de l'os sous-chondral. Les chondrocytes dans cette zone ont un phénotype hypertrophique. Cette zone sert également d'ancrage aux fibres de collagène sur l'os. La jonction entre le cartilage calcifié et l'os sous-chondral est très irrégulière. Cette ligne de jonction a une résistance considérable. Elle est perforée par de rares vaisseaux venant des cavités de la moelle osseuse sous-adjacente.

## II. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

La MEC est constituée principalement d'eau (65-80%), de collagènes (10-30%), de protéoglycanes (5-10%), d'acide hyaluronique, et en quantité moins importante, de protéines non-collagéniques et de lipides (Kuettner et al. 1991). Elle est organisée en trois zones différentes:

- **La matrice péricellulaire**, composée d'un fin rebord de matrice organisée en relation directe avec la membrane cellulaire elle est composée essentiellement de PGs et de protéines non collagéniques comme les molécules associées à la membrane telles l'*anchorin CII* (annexin V) ou la décorine (Buckwalter et al. 1997 ; Buckwalter et al. 1998a). Elle contient également du collagène non fibrillaire, le collagène de type VI (Bhosale et al. 2008).
- **La matrice territoriale** entoure la matrice péricellulaire et est présente tout au long du cartilage (Buckwalter et al. 1997 ; Buckwalter et al. 1998a). Elle entoure un chondrocyte tout seul ou un groupe de chondrocytes y compris leurs matrices péricellulaires. Les fibres de collagène dans cette région sont organisées d'une manière croisée pour former un panier qui entoure les clusters de chondrocytes pour les protéger des contraintes mécaniques (Bhosale et al. 2008).
- **La matrice interterritoriale** couvre tout le volume restant de tous les types de matrices, elle comporte des fibres de collagène de diamètre plus grand (Bhosale et al. 2008).

## **II.1. La composition de la matrice extracellulaire**

### **II.1.1. L'eau**

Le cartilage possède un contingent hydrique très important. L'eau existe sous forme libre et liée aux PGs. L'interaction entre l'eau et les macromolécules de la matrice influence les propriétés mécaniques du tissu. Du fait de l'absence de vascularisation, le chondrocyte vit en hypoxie et est nourri par l'apport de nutriments de faible poids moléculaire, en provenance du liquide synovial et qui diffusent au travers de la MEC grâce aux propriétés visco-élastiques du tissu. L'apport de ces métabolites se fait grâce aux mouvements de l'eau entre le cartilage et la cavité synovial. Sous l'effet d'une charge, l'eau est chassée dans les régions du cartilage hors charge et vers la cavité articulaire, entraînant à l'extérieur du tissu les déchets métaboliques des chondrocytes, notamment l'acide lactique. Le phénomène étant réversible, lorsque la charge cesse, un flux inverse se crée de la cavité articulaire vers le cartilage, ramenant le cartilage à son hydratation basale, et amenant avec lui les nutriments nécessaires au fonctionnement cellulaire, en particulier le glucose. Un échange continu se fait entre les molécules d'eau fixées par les charges négatives des PGs et la phase libre circulant en dehors du champ d'attraction des PGs, ce qui contribue à sa régénération.

### **II.1.2. Les collagènes**

Les collagènes sont des protéines fibreuses insolubles de la MEC et du tissu conjonctif. Ils sont classés en collagènes fibrillaires et non fibrillaires. Les collagènes fibrillaires confèrent aux tissus la capacité de résister aux pressions mécaniques et aux tensions. Cette classe regroupe les collagènes de types I, II, III, V et XI. La structure primaire du collagène est caractérisée par une très grande abondance en glycine et en proline.

Les collagènes non fibrillaires, quant à eux, sont constitués de petits domaines hélicoïdaux interrompus par des séquences non collagéniques, nommées FACIT pour «fibril associated collagens with interrupted triple helices » (Gordon et al. 1991). Ces domaines permettent de lier les fibres de collagène de type II avec les collagènes non fibrillaires et d'autres composants matriciels (Bruckner et al. 1985 ; Eyre et al. 1987).

Diverses fonctions sont assurées par les différents types de collagènes présents dans le cartilage articulaire:

**Le collagène de type II** : il représente 90% des collagènes présents dans le cartilage articulaire adulte. Il forme un réseau dense dont les mailles emprisonnent les agrégats de PGs limitant ainsi l'entrée d'eau dans le tissu. Le réseau de fibres de collagène de type II est responsable de la résistance à la traction et au maintien de la forme et du volume tissulaires. Cette résistance est renforcée par des liaisons intermoléculaires covalentes, appelées «cross-link », entre les fibres de collagènes de type II (Eyre et al. 1988). La copolymérisation de quelques molécules de collagènes de type XI avec le collagène de type II jouerait un rôle dans le contrôle du diamètre des fibres par encombrement stérique (Olsen D.R. 1995). En effet, une délétion nucléotidique dans la chaîne  $\alpha 1$  du collagène XI chez la souris conduit à la formation de fibres de collagènes de type II de diamètre anormalement élevé. Cette mutation est à l'origine d'une chondroplasie caractérisée par une fragilité importante du cartilage vis-à-vis des contraintes mécaniques (Li *et al.* 1995). Les fines fibrilles de collagène de type XI forment en fait le centre des fibres de collagène de type II (Mendler *et al.* 1989).

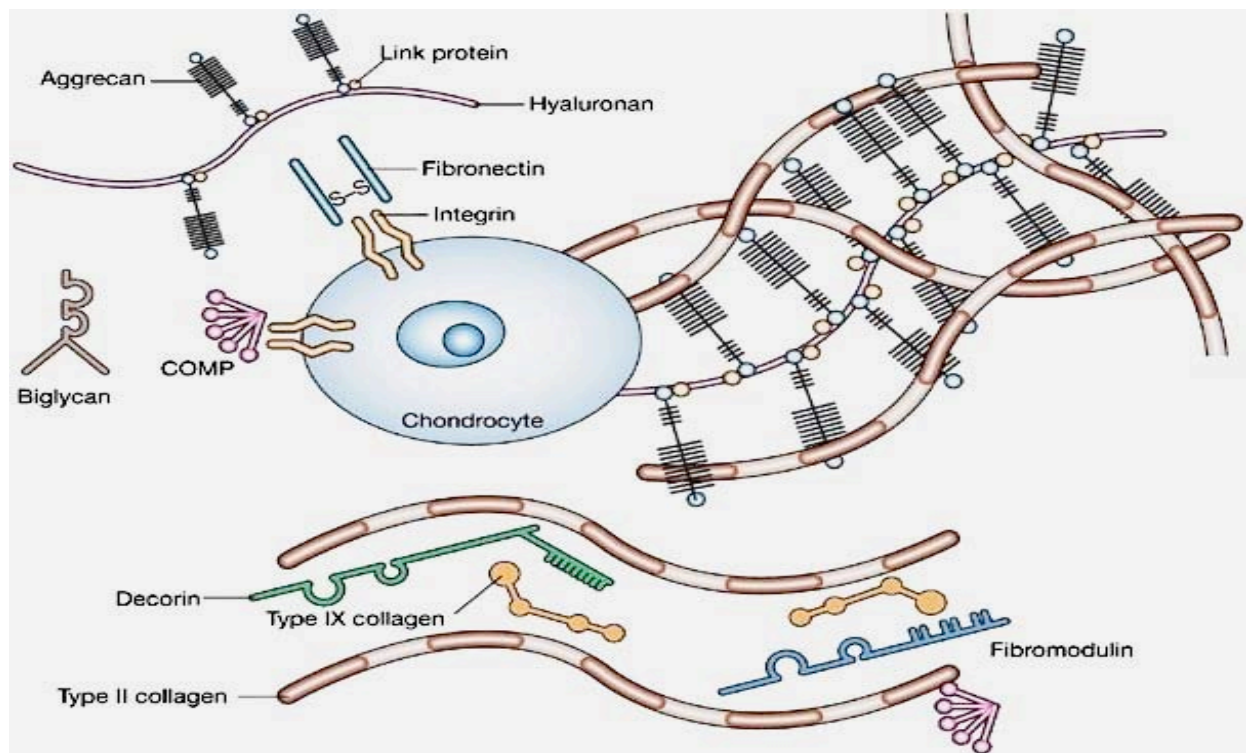
**Le collagène de type IX** : il représente environ 1% des protéines collagéniques du cartilage articulaire adulte (Bruckner et van der Rest 1994) et se lie de façon covalente à la surface des fibres de collagènes de type II avec une orientation parallèle limitant ainsi leur croissance latérale (Eyre D.R., 1987). Sa présence à la surface des fibres de collagène de type II pourrait être un facteur de régulation de l'agrégation fibrillaire, contrôlant le diamètre des fibres (Mayne R., 1989).

**Le collagène de type X** : il est présent en faible quantité dans la zone superficielle du cartilage (Linsenmayer et al. 1988). Ce dernier jouerait un rôle dans la résorption du cartilage hypertrophique ou un rôle fonctionnel dans l'organisation de la matrice. Il serait aussi impliqué dans la minéralisation du cartilage. Le collagène de type X est synthétisé, dans le cartilage articulaire, par les chondrocytes hypertrophiques de la zone calcifiée. Il joue un rôle important dans le développement du cartilage de croissance et dans la calcification du cartilage (Eyre et al. 1992 ; Mayne R., 1993).

**Le collagène de type I** est présent en faible quantité à la surface du cartilage (Peyron et al. 1994) et **les collagènes de type V, VI et VII** sont à proximité des chondrocytes où ils confèrent au cartilage sa rigidité (Buckwalter et al. 1998a).

### II.1.3. Les protéoglycans

Les PGs sont une famille de macromolécules complexes présentes dans la MEC (agrécan, versican, biglycan) et sur la surface cellulaire (syndécane, glypicane, CD44). Les PGs sont constitués d'une protéine centrale sur laquelle sont attachées plusieurs chaînes de glycosaminoglycane (GAGs) (Muir H. 1978). Ils sont présents dans le cartilage et peuvent être de faible masse moléculaire comme biglycans, la décorine ou la fibromoduline, mais aussi de haut poids moléculaire comme l'agrécan. La matrice cartilagineuse est constituée d'une variété de PGs essentiels aux propriétés physique/mécanique et biochimique du cartilage (Figure 2).



**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'agrécan) et de petite taille (biglycan, décorine, fibromoduline, syndécans), 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.

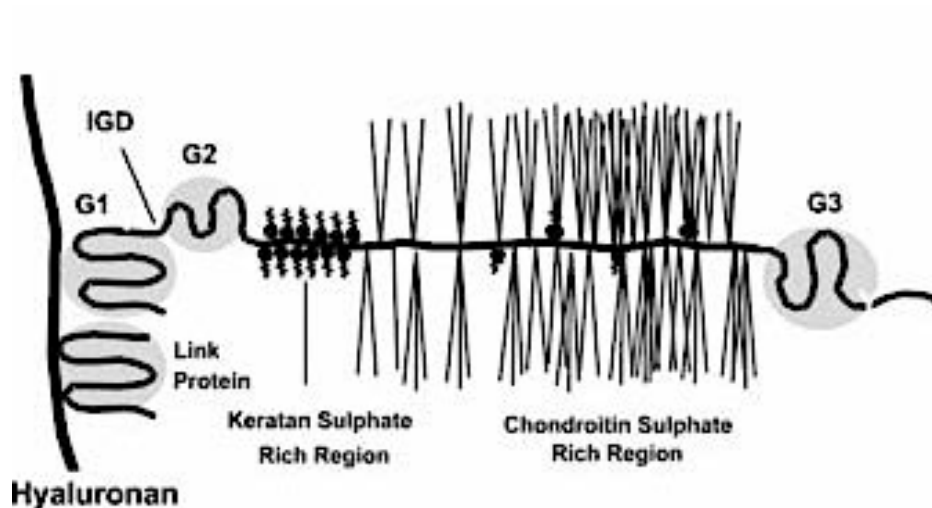
### **II.1.3.1. PGs ESSENTIELS DE LA MEC**

#### **II.1.3.1.1. L'agrécane**

L'agrécane est le PG prédominant dans le cartilage. Il représente environ 90% de la masse des PGs dans le tissu. L'agrécane est composé d'une protéine porteuse de 210 kDa sur laquelle se fixe de manière covalente plus d'une centaine de chaînes de CS, 20 à 50 chaînes de kératane sulfate (figure 3). Plusieurs agrécans peuvent se lier de façon non covalente, par l'intermédiaire de protéines de liaison, à une chaîne d'acide hyaluronique. Ils forment alors des agrégats de très haut poids moléculaire (Hardingham T.E. et Fosang AJ. 1995 ; Muir H. 1978). Ces larges agrégats hydrodynamiques sont maintenus dans le réseau de fibres de collagène.

La structure de l'agrécane, notamment les chaînes de GAG, varie quantitativement et qualitativement en fonction de l'âge (nombre, longueur, degré de sulfatation) (Roughley P. J. 2006). La perte de l'intégrité du cartilage au cours de l'arthrose est associée à une déficience en agrécane provenant d'un clivage protéolytique et une déficience de synthèse (induisant une diminution de la présence de charges négatives). Au cours du vieillissement, et lors de l'arthrose, 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 (Dudhia et al. 1996 ; Praillet et al. 1998).

Des mutations au niveau du gène codant l'agrécane conduisent à des 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-épimétaphysaire (Roughley P. J. 2006). De plus, il est décrit que l'absence de la région G3 de l'agrécane empêcherait probablement la sécrétion des molécules d'agrécans mutés dans la MEC.



**Figure 3 : Agrécan.** La partie protéique de l'agrécan est composée de trois domaines globulaires nommés G1, G2 et G3. 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 le HA. 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'agrécan.

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

### II.1.3.1.2. Les petits protéoglycans et protéines riches en leucine (SLRP)

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 P.J. 2006). 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,



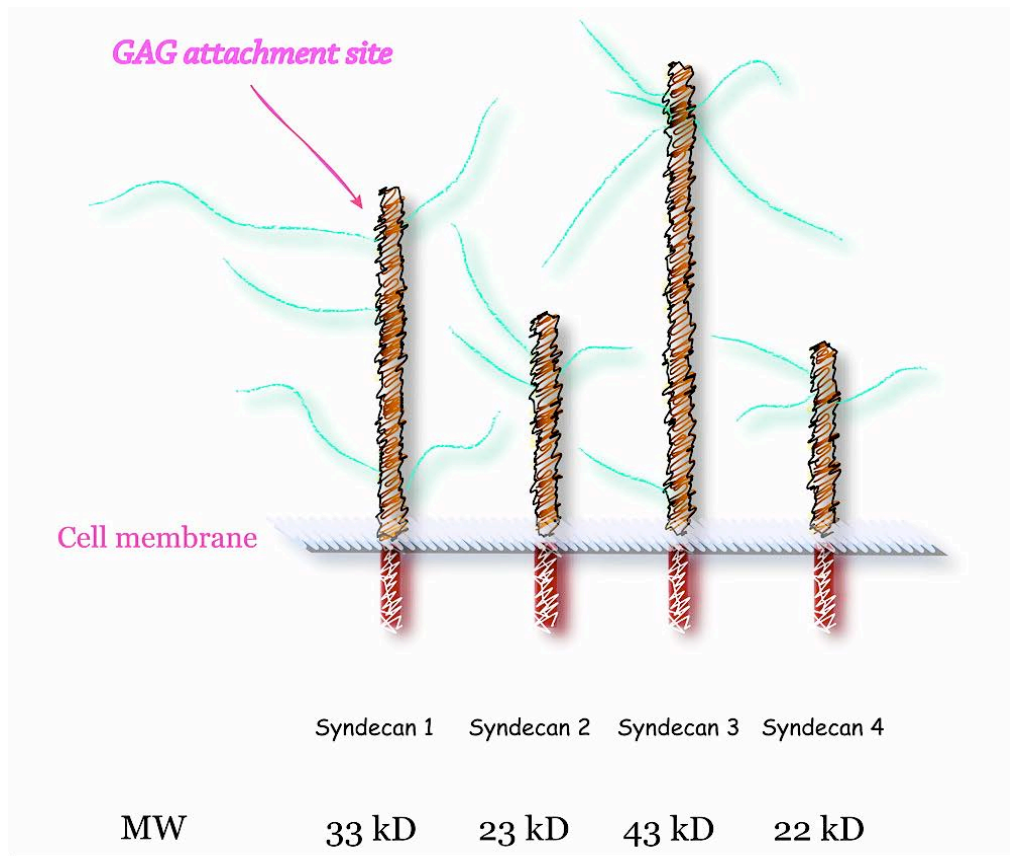
XII, XIV) et d'autres composants matriciels tels que la fibronectine ou l'élastine (Scott et al. 1996). Ils assurent également un rôle de protection des fibrilles de collagène contre l'action des collagénases. Ils sont capables d'interagir avec des facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) et le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha).

#### **II.1.3.1.3. L'acide hyaluronique**

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 centaines de disaccharides composés de résidus d'acide glucuronique et de la N-acetylglucosamine totalement dépourvus de groupements sulfates.

#### **II.1.3.1.4. Les PGs membranaires**

Les PGs membranaires sont pour la plupart, des PGs à HS (HS-PGs). 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 majeurs tels que les interactions cellule-cellule, cellule-matrice, la prolifération cellulaire et sont également capables de jouer le rôle de co-récepteur membranaire.



**Figure 4 : Structure des syndécans chez les vertébrés.**

Les syndécans sont une famille de PGs transmembranaires majoritairement à HS. Alors que les invertébrés possèdent un seul syndécan, quatre gènes ie. syndécan 1, 2, 3 et 4 sont présents chez les vertébrés. Chaque syndécan dispose d'un court domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire, et un domaine extracellulaire avec trois à cinq sites de fixation des chaînes de HS ou de CS (Figure 4). La présence des chaînes d'HS leur permet d'interagir avec un grand nombre de protéines, y compris les facteurs de croissance tels que le FGF, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), et le TGF (Transforming Growth Factor)). En outre, les chaînes d'HS facilitent les interactions avec diverses protéines de la MEC, notamment la fibronectine. Le rôle des chaînes de CS est moins clair.

Bien que le degré de conservation dans le domaine extracellulaire des syndécans soit assez faible, le domaine transmembranaire (TM) est très conservé. Comme dans l'architecture des protéines membranaires de type-I, les syndécans ont un seul TM. Le TM et la séquence adjacente assurent l'auto-association, qui, dans le cas du syndécan-4, est requis pour l'activation de la protéine kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) (Oh et al. 1997). Le domaine cytoplasmique est divisé en trois régions : les régions conservées 1 et 2 (C1 et C2) et une région variable (V).

Le domaine C1, immédiatement adjacent à la membrane de la cellule, est quasiment identique dans les quatre syndécans de mammifères. Il est impliqué dans la dimérisation des syndécans et dans la liaison de plusieurs protéines intracellulaires (Granes et al. 2003). Le domaine C2 universellement conservé contient un site de liaison à PDZ (postsynaptic density-95/ disc large protein/zonula occludens-1) à l'extrémité C-terminale et deux résidus tyrosine. Il y'a quatre protéines identifiées comme interagissant au domaine PDZ : la synténine (Grootjans et al. 1997), la synectine (Gao et al. 2000), la synbindine (Ethell et al. 2000), et la CAMKII (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) (Cohen et al. 1998 ; Hsueh et al. 1998). Le domaine V est très hétérogène entre les quatre syndécans de mammifères. Cette région a été plus étudiée dans le syndécan-4 (SDC4) en raison de ses caractéristiques uniques. Elle comprend un site de liaison à la phosphatidylinositol4,5-bisphosphate (PIP2) qui est impliqué dans la dimérisation du syndécan-4, dans lequel deux domaines cytoplasmique du SDC4 sont reliés par deux molécules PIP2 (Shin et al. 2001).

En outre, PIP2 joue un rôle essentiel dans la liaison et l'activation de la PKC- $\alpha$ , une kinase qui joue un rôle clé dans la signalisation du SDC4 (Horowitz et al. 1998 ; Horowitz et al. 1999).

L'expression du SDC4 est induite dans plusieurs pathologies (Geary et al. 1995). Le syndécan-3 est exprimé de manière transitoire au cours de la période de condensation mésenchymateuse (Gould et al. 1995).

La carence en SDC4 a suscité beaucoup d'intérêt. Les souris SDC4  $-/-$  sont viables et fertiles, mais présentent un certain nombre d'anomalies. Les embryons SDC4  $-/-$  montrent beaucoup plus de formation de thrombus dans les vaisseaux du labyrinthe placentaire que les souris contrôles, entraînant une perte plus élevée des embryons et impliquant le SDC4 dans la régulation de la coagulation du sang (Ishiguro et al. 2000). Les souris SDC4  $-/-$  ont plus de mortalité après injection de lipopolysaccharide, ce qui suggère leur incapacité à éliminer les pathogènes (shiguro et al. 2001). Selon d'autres études, les souris SDC4  $-/-$  présenteraient une mauvaise cicatrisation des plaies cutanées suite à un défaut d'angiogenèse, cependant, aucun autre phénotype de défaut d'angiogenèse n'a été rapporté à ce jour. Enfin, les cellules satellites des souris SDC4  $-/-$  ne parviennent pas à reconstituer les muscles endommagés, ce qui suggère que la présence du SDC4 est requise pour la migration des cellules progénitrices du muscle squelettique (Cornelison et al. 2004), Cela peut être en partie attribuable à une activation défectueuse de ERK1/2 par le FGF2 et le HGF (Cornelison et al. 2004). Le SDC4 semble être régulé au cours du développement et de la différenciation cellulaire, ainsi qu'en

association avec les changements pathologiques des tissus (Tkachenko et al. 2005). Au cours des dernières années, un nombre croissant de preuves s'est accumulé concernant la relation entre le SDC4 et l'arthrose. Dans le cartilage, le SDC4 semble être induit, spécifiquement dans les chondrocytes hypertrophiques et son expression est élevée dans le cartilage arthrosique humain et dans des modèles animaux d'arthrose (Barre et al. 2000 ; Echtermeyer et al. 2009). Une étude récente a montré que le SDC4 joue un rôle crucial dans le contrôle de l'activité de l'ADAMTs5 par le biais d'interactions directes ou indirectes. Les souris knock-out pour le SDC4 ou des souris traitées par injections intra-articulaires locaux d'anticorps spécifiques du SDC4 sont protégées contre la dégradation du cartilage par l'ADAMTs5 (Echtermeyer et al. 2009).

2- **Les glypicans :** La protéine porteuse (60-70 kDa) des glypicans possède une région globulaire extracellulaire comportant trois à quatre sites d'attachement des chaînes d'HSLa séquence consensus DSGSGSG, sur lequel s'attachent les chaînes de GAGs, est située entre le domaine central et l'extrémité C-terminale. La partie C-terminale possède la séquence signal nécessaire à l'insertion des glypicans au niveau de la membrane plasmique *via* l'ancrage GPI. Les glypicans sont capables, grâce à leurs chaînes 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 dans le milieu extracellulaire 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 du transport des facteurs de croissance.

### **III. HOMEOSTASIE DU CARTILAGE**

Les chondrocytes maintiennent l'homéostasie du cartilage et assurent à la fois la synthèse et la dégradation des composants de la matrice. Les mécanismes physiologiques assurant la régulation de la synthèse de la MEC sont influencés par deux facteurs : (1) les contraintes mécaniques subies par les chondrocytes. En effet, il a été montré que la soumission des explants de cartilage à des compressions cycliques de 0,5 Hz induit la biosynthèse des PGs par les chondrocytes (Parkkinen et al. 1993) et (2) le contrôle exercé par des médiateurs solubles comme les cytokines et les facteurs de croissance. Les facteurs de croissance synthétisés par les chondrocytes favorisent leur activité anabolique (Franchimont et al. 1991). Il s'agit principalement du FGF (Fibroblast Growth Factor), de L'IGF (Insulin-like Growth

Factor) et du TGF $\beta$  (Trippel S.B. 1995). Ces facteurs sont localisés dans la MEC et en fonction de leur combinaison et de l'état de la cellule, ils exercent une régulation fine de la différenciation et de l'activité chondrocytaires (Trippel S.B. 1995).

Le renouvellement des constituants matriciels fait intervenir les métalloprotéases (MMPs) agissant à pH neutre dans la MEC. Les MMPs sont essentielles au renouvellement du cartilage articulaire. Les principales familles de MMPs se distinguent par leur spécificité de substrat :

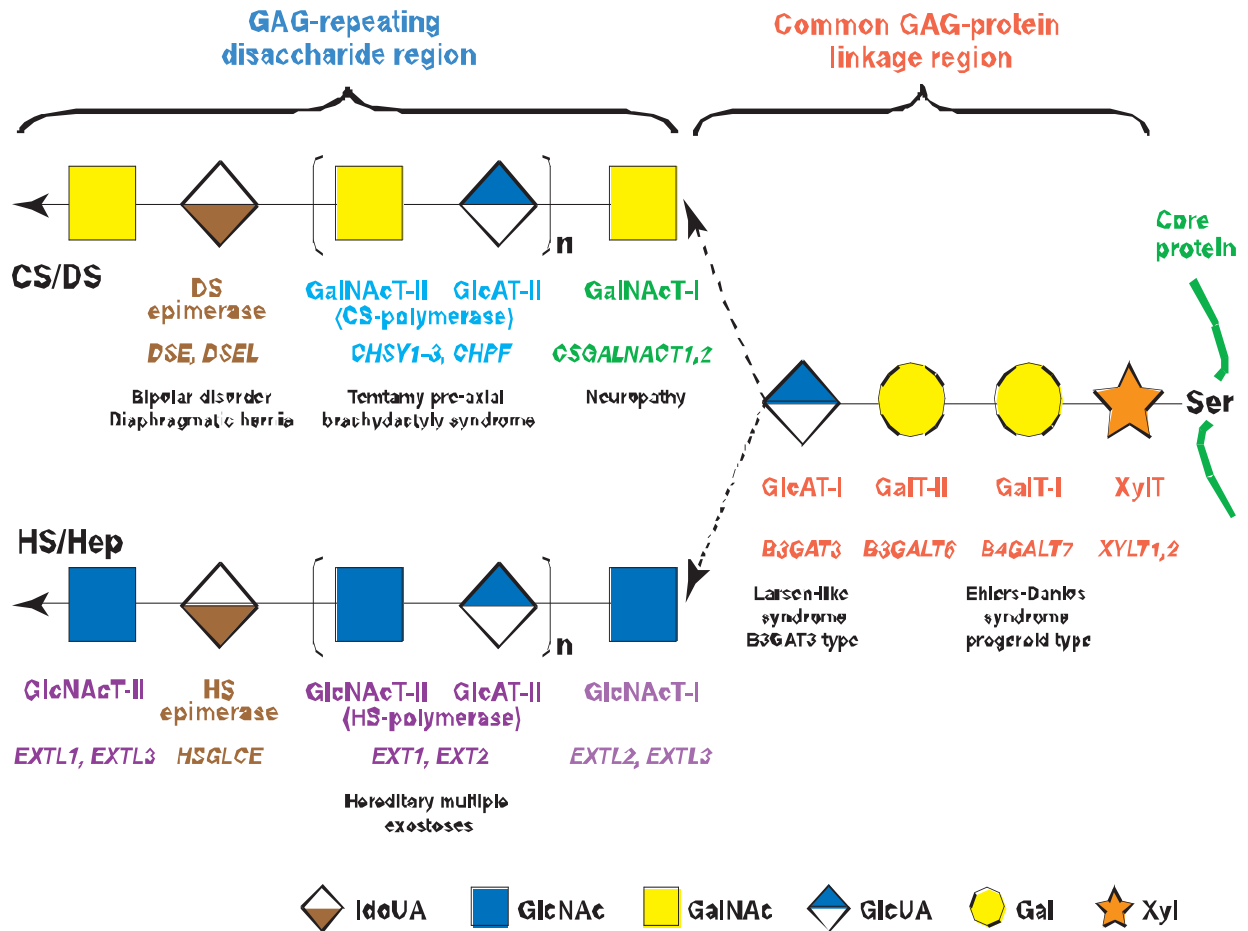
**Les collagénases** : MMP-1 et MMP-13 (spécifiques du cartilage) sont capables de dégrader les trois chaînes des collagènes (Aimes R. T. et Quigley J. P. 1995). **Les gélatinases** MMP-2 et MMP-9 dégradent les collagènes dénaturés (Strongin et al. 1995). **Les stromélysines** constituent la troisième classe de MMP, la MMP-3 et la MMP-10 étant exprimées par les chondrocytes. Ces enzymes se caractérisent par leur large spécificité vis-à-vis de leur substrat. Les stromélysines une fois activées, peuvent à leur tour activer les formes latentes des collagénases. **Les agrécanases** : ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*) hydrolysent l'agrécane en 5 sites (Tortorella et al. 2002) qui se situent dans une région riche en chondroïtines sulfates entre les domaines globulaires G1 et G2 (Malfait et al. 2002).

Les MMPs sont inhibées par des inhibiteurs endogènes non spécifiques (TIMPs). Quatre types différents ont été identifiés. TIMP-1 est une glycoprotéine de 28 kDa. Cet inhibiteur est très similaire au TIMP-2. Ces deux protéines se lient aux MMPs dans un rapport 1 : 1. Leur activité inhibitrice se situe dans le domaine *N*-terminal. Un troisième membre de cette famille d'inhibiteurs de protéases existe, le TIMP-3 (Silbiger et al. 1994). C'est un inhibiteur puissant de l'ADAMTs-4 et de l'ADAMTs-5, exprimé dans les chondrocytes et les fibroblastes synoviaux (Su et al. 1999).

*Glycosyltransferases et anomalies de  
synthèse des protéoglycanes*

## I. SYNTHÈSE DES PGs

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 glycosaminoglycane (GAGs). Les GAGs sont des polymères hétéropolysaccharidiques linéaires, fortement polaires, et chargés négativement. Ils sont constitués de répétitions d'unités disaccharidiques formées par un sucre aminé et un acide uronique. Ils diffèrent par la composition de leur unité disaccharidique élémentaire, les liaisons entre ces unités, la longueur des chaînes, la présence et la position des groupements sulfates et/ou N-acétyles. Le sucre aminé est une *N*-Acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) ou une *N*-Acétyl-D-galactosamine (GalNAc) et 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 héparine/héparane-sulfates (Hep/HS) et GalNAc-acide uronique dans le cas des chondroïtine-sulfates/dermatane-sulfates (CS/DS). La synthèse des GAGs fait intervenir un grand nombre de glycosyltransférases (GTs) et nécessite au préalable la formation d'une amorce tétrasaccharidique (GlcA  $\beta$  1,3Gal  $\beta$  1,3Gal  $\beta$  1,4Xyl-O-sérine) permettant l'ancrage de la chaîne glycosaminoglycanique à la protéine "core" via un résidu sérine. La formation de cette amorce fait intervenir une xylosyltransférase (XT) qui fixe un résidu xylose à partir du nucléotide sucre UDP-Xylose sur certaines sérines de la protéine "core". Ensuite, deux galactosyltransférases, GalT-I (b4GalT7) et GalT-II (b3GalT6), assurent la fixation de deux résidus galactose sur le xylose. Enfin, la galactose  $\beta$  1,3-glucuronosyltransférase-I (GlcAT-I) catalyse l'étape finale de la synthèse de l'amorce tétrasaccharidique par addition d'un acide glucuronique (GlcA). La polymérisation des chaînes de GAGs à HS est assurée par les enzymes EXT1/EXT2 alors que celle des CS est réalisée par les CS-polymérase (figure 5) (Prydz et Dalen 2000).



**Figure 5 : Représentation schématique de la biosynthèse des chaînes de GAGs par les glycosyltransférases.** La synthèse des PGs débute par la production de la protéine core sur laquelle la région de liaison protéine-GAG,  $\text{GlcA } \beta 1,3\text{Gal } \beta 1,3\text{Gal } \beta 1,4\text{Xyl-O-sérine}$ , commune aux chaînes CS et HS, est initiée par la XylT (XT-I et XT-II). Ensuite, le premier résidu GalNAc est transféré sur le résidu GlcUA par la GalNAcT-I, qui initie l'assemblage des chondroïtine. Par la suite, la région de disaccharides répétitifs,  $(-3\text{GalNAc } \beta 1-4\text{GlcUA } \beta 1-)$ , est allongée par l'addition alternative des résidus GlcUA et GalNAc à partir des UDP-GlcUA et UDP-GalNAc par les enzymes GlcAT-II et GalNAcT-II, respectivement. D'autre part, l'addition du résidu GlcNAc à la région de liaison par la GlcNAcT-I initie l'assemblage des HS. Ensuite, la polymérisation des chaînes HS est catalysée par les enzymes EXT1 et EXT2. (D'après Mizomoto et al. 2013)

## II. MUTATIONS GENIQUES DES GTs ET PATHOLOGIES ASSOCIEES



L'importance des GTs dans le développement ostéoarticulaire est révélée par les mutations au niveau de leurs gènes. En effet, des mutations de la  $\beta$ 4GalT7 (GalT-1) ont été mises en évidence dans des fibroblastes de patients atteints du syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos conduisant à des altérations de la synthèse de PGs matriciels. La diminution quantitative de décorine et l'absence de son unique chaîne de GAG 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). Les fibroblastes provenant de ces patients, porteurs de la mutation R270C, montrent une activité galactosyltransférase réduite par rapport aux sujets témoins et une synthèse de décorine et de biglycane dépourvues de chaînes de GAGs (Seidler et al. 2006). Il a également été montré que la mutation A186D réduit sensiblement l'activité de la GalT-I *in vitro*, alors que ses effets sur la biosynthèse de CS/DS et HS sont beaucoup moins prononcés (Gotte M. et Kresse H. 2005). En outre, une diminution drastique de l'activité GalT-I associée à une déficience de biosynthèse des GAGs a été rapportée pour les mutants L206P et R270C (Bui et al. 2010.a ; Rahuel-Clermont et al. 2010). De plus, la réduction de l'activité GalT-I suite à la mutation R270C conduit à une réduction de la sulfatation des chaînes d'HS, et un retard de fermeture des plaies *in vitro* (Gotte et al. 2008). L'ensemble de ces résultats montre que les phénotypes du syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos, causé par des mutations de la GalT-I, sont attribuables principalement à des défauts dans la synthèse des chaînes de GAGs.

La carence en GlcAT-I, conduit à des dislocations articulaires touchant principalement le coude et des malformations cardiaques congénitales. Une mutation R277Q dans le gène codant pour la GlcAT-I a été identifiée chez une famille porteuse du syndrome nommé syndrome de Larsen (Baasanjav et al. 2011). Il est caractérisé par des dislocations de la hanche, du genou et des articulations du coude, du pied et une dysmorphie cranio-faciale, la proéminence du front, un pont nasal déprimé, et un visage aplati (Larsen et al. 1950 ; Steel et al. 1972). La mutation R277Q entraîne une forte réduction de l'activité GlcAT-I dans les fibroblastes des patients et une diminution de la biosynthèse des PGs (Baasanjav et al. 2011). Les fibroblastes provenant de patients porteurs de la mutation produisent une forme de décorine à une seule chaîne de DS avec une amorce trisaccharidique Gal $\alpha$ 1-3-Gal $\alpha$ 1-4-Xyl au lieu d'une amorce tétrasaccharidique (Baasanjav et al. 2011). Plus récemment, une autre mutation (P140L) a été identifiée dans une famille consanguine de l'île de Nias (Budde et al. 2012). Ces patients présentent des phénotypes squelettiques caractérisés par une petite taille disproportionnée. D'autres part, des études basées sur la surexpression du gène codant

pour 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 dans la synthèse des PGs au niveau du cartilage (Venkatesan et al. 2004).

Au cours de nos travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la xylosyltransférase-I (XT-I). La XT-I est une glycosyltransférase membranaire qui adopte une topologie de type II. Elle est localisée au niveau de l'appareil de Golgi (Götting et al. 2000). Cette protéine de masse moléculaire apparente d'environ 100 kDa présente une séquence peptide signal *N*-terminale suivie d'une région stem responsable de l'adressage et de la rétention de l'enzyme au niveau de la membrane. La partie *C*-terminale contient le domaine catalytique (Götting et al. 2000). L'analyse de l'expression de la XT-I dans les tissus humains indique que l'enzyme est exprimée dans le pancréas, le rein et le placenta, avec une très faible expression dans le poumon, le cerveau, le cœur et le foie. Aucune expression n'est détectée dans le muscle squelettique (Götting et al. 2007). Des études récentes ont montré que l'augmentation de la production des GAGs observée lors de processus pathologiques est associée à une activité élevée de la XT dans les tissus et/ou dans le sérum, par exemple au cours de la cardiomyopathie dilatée et du syndrome de pseudoxanthoma élastine PXE (perte d'élasticité du tissu conjonctif) respectivement (Götting et al. 2007). En revanche, la XT-I semble jouer un rôle important dans le cartilage (Venkatesan et al 2012) et dans la régénération neuronale (Hurtado et al. 2008). Récemment, un double mutant XT-I et *fam20b* (enzyme phosphorylant le xylose de l'amorce tétrasaccharidique) a été identifié chez la *zebrafish* qui présente un phénotype squelettique avec une formation prématurée de l'os péri-chondrale dû à une maturation précoce des chondrocytes (Eames et al. 2011).

Au niveau du cartilage, notre groupe a étudié l'importance de la XT-I dans le processus de dégradation et de réparation du cartilage dans un modèle animal expérimental de polyarthrite rhumatoïde induite à l'antigène chez le rat, et dans un modèle de réparation, le modèle de régénération du cartilage après dégradation modérée par injection intra-articulaire de la papaïne. Nous avons ainsi montré que l'expression du gène de la XT-I est inhibée au cours du processus de dégradation du cartilage de façon concomitante à la baisse de l'anabolisme des GAGs. En revanche, l'expression du gène de la XT-I est induite dans les phases précoces de la réparation du cartilage. Cette induction est accompagnée d'une augmentation significative de la synthèse et du dépôt des PGs (Venkatesan et al. 2009). Le

rôle clé de la XT-I dans le processus de réparation du cartilage en termes d'anabolisme des PGs a été ensuite confirmé par l'utilisation des shRNA permettant l'inhibition de l'expression de cette enzyme lors de la phase de réparation du cartilage chez le rat (Venkatesan et al. 2009). La XT-I pourrait ainsi constituer une cible capable de contrecarrer la perte des GAGs lors des pathologies articulaires.

## *la pathologie arthrosique*

## **I. L'ARTHROSE**

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'arthrose (OA) est la résultante de phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage pour conduire finalement à la destruction du cartilage articulaire.

L'arthrose est une maladie très fréquente et le pourcentage de la population touchée par cette maladie augmente avec l'âge (Hamerman, 1993). L'arthrose est une maladie qui affecte principalement les articulations, parmi lesquelles le genou (gonarthrose = 35 %), la hanche (coxarthrose = 20 %) ou encore les doigts. L'arthrose constitue la seconde cause d'invalidité après les maladies cardio-vasculaires et représente ainsi un véritable enjeu en terme de santé publique.

Actuellement, il n'y a pas de thérapie efficace contre la progression de la maladie. Les principaux facteurs qui déterminent la progression de l'arthrose sont l'inflammation chronique et des changements structurels progressifs dans les tissus articulaires (Nam et al. 2011). Contrairement à l'idée générale selon laquelle l'arthrose est une maladie dégénérative, les processus de remodelage sont très actifs tout au long de chaque étape de la maladie (Pearle et al. 2005).

Parmi les nombreux facteurs impliqués dans cette pathologie, les cytokines pro-inflammatoires et les protéases sont les principaux contributeurs qui interviennent dans les changements qualitatifs de la MEC (Pearle et al. 2005). La synthèse altérée de la MEC lors de l'inflammation perturbe à son tour le fonctionnement des chondrocytes. Par conséquent, un cycle s'établit entre les cellules et leur MEC nouvellement synthétisée, formant une boucle de rétroaction positive qui entraîne la progression de l'arthrose.

### **I.1. Perturbations de la synthèse de la MEC au cours de l'arthrose**

La progression de l'arthrose peut être caractérisée par des changements dans la composition et la structure MEC. Le cartilage sain est composé principalement de collagène de type II, qui assure la résistance aux forces de tension. L'agrécane, qui apporte des charges négatives qui attirent les molécules d'eau, fournit la résistance à la compression et la capacité d'absorption

des chocs du cartilage sous pression (Pearle et al. 2005). Il a été montré que pendant l'arthrose, il existe des événements successifs qui affectent l'intégrité et l'homéostasie de la MEC. Le contenu en agrécane est diminué, tandis que la teneur en collagène I est augmentée (Pearle et al. 2005 ; Martel-Pelletier et al. 2008). Ce changement dans la composition de la MEC prédispose le tissu à des altérations mécaniques résultant des modifications de l'environnement mécanique des cellules au sein de la matrice du cartilage. Il a été montré dans un modèle animal chez la rat une diminution significative de l'expression de l'agrécane durant la première étape de l'apparition de l'arthrose (Nam et al. 2011). Cette observation est en accord avec la faible synthèse des PGs, observée dans des échantillons de cartilage humains de patients souffrant de l'arthrose (Lorenzo et al. 2004). Ces changements modifient la perméabilité et par conséquent les capacités mécaniques de la matrice (Pearle et al. 2005 ; Sun et al. 2012). La teneur réduite en PGs affaiblit la capacité de compression du cartilage et expose le tissu à des contraintes accrues lorsqu'il est exposé à un stress mécanique.

Contrairement à la diminution de la production de PGs, le taux de synthèse de collagène augmente et passe du collagène de type II au collagène de type I (Lahm et al. 2010). Ce changement de composition affecte la stabilité mécanique de la MEC (Poole et al. 2002). En effet, les chaînes de type II contiennent une teneur plus élevée en hydroxylysine et en résidus glucosyle et galactosyle, qui interviennent dans l'interaction avec les PGs, que les chaînes de collagène de type I (Gelse et al. 2003). Par conséquent, la diminution du collagène de type II au cours de l'arthrose compromet l'intégrité de la matrice formée par le collagène II et les PGs. Ces changements dans la structure et la composition de la MEC modifient progressivement l'environnement biologique et mécanique qui module de façon significative l'activité cellulaire des chondrocytes.

## **1.2. Effets de l'inflammation sur la MEC durant l'arthrose**

Les changements de la MEC du cartilage au cours de la progression de l'arthrose peuvent être attribués à plusieurs facteurs. Parmi ceux-ci, l'inflammation joue un rôle actif qui affecte à la fois la quantité et la qualité des composants de la MEC. Les dommages mécaniques et/ou usure liés à l'âge déclenchent des réactions inflammatoires dans les tissus entourant l'articulation, y compris le cartilage articulaire, la membrane synoviale, l'os sous-chondral et les ligaments (Pearle et al. 2005 ; Goldring, 2012). Les chondrocytes répondent à ces conditions inflammatoires et participent aux activités cataboliques qui conduisent finalement à la dégradation de la MEC du cartilage (Hoff et al. 2013). Les facteurs qui contribuent aux

processus cataboliques dans l'arthrose comprennent principalement l'IL-1 $\beta$  (Pfander et al. 2004 ; Meulenbelt et al. 2004), et le TNF- $\alpha$  d'autres cytokines sont également impliquées (l'IL-6, l'IL-12, l'IL-15) (Sakkas et al. 1998 ; Scanzello et al. 2009).

Il a été montré que l'inflammation chronique durant l'arthrose induit directement les activités cataboliques des chondrocytes. L'IL-1 $\beta$ , une cytokine fortement induite au cours de l'arthrose, est responsable de l'activation des enzymes de dégradation de matrice, comme la MMP- 1, 3, et 13 (Tung et al. 2002). Le TNF- $\alpha$ , une autre cytokine qui est fortement surexprimé dans l'arthrose, induit l'expression de la MMP-13, par l'activité de ERK, p38, JNK MAP kinases, et les facteurs de transcription AP-1 et NF $\kappa$ B (Liacini et al. 2003 ; Appleton et al. 2010).

Parallèlement à la dégradation de la matrice, l'inhibition par l'inflammation des facteurs qui induisent la synthèse des composants de la MEC, comme le TGF- $\beta$  (Davidson et al. 2005), SOX9, l'IGF et le facteur de croissance du tissu conjonctif CTGF, est également responsable de la diminution des activités anaboliques des chondrocytes (Nam et al. 2011 ; Davidson et al. 2006). Il a été montré que l'IL-1 $\beta$  inhibe la synthèse de la MEC en particulier le collagène de type II et l'agrécan par une régulation négative de l'expression de SOX9 (Dai et al. 2012). Lorsque les chondrocytes sains sont simulés par des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ , ils présentent un phénotype hypertrophique (Merz et al. 2003). Cette différenciation peut être induite par la signalisation RAGE via la voie p38 MAPK (Cecil et al. 2005). En plus de l'induction de la synthèse d'une MEC atypique et de l'augmentation de la dégradation de la MEC, l'inflammation chronique provoque également la mort cellulaire (Hoff et al. 2013).

### **I.3. Implications thérapeutiques : les possibilités de traitement**

La chirurgie est souvent utilisée pour traiter une lésion du cartilage localisée. Les petites fractures, créées dans l'os sous-chondral, provoquent la formation de nouveaux cartilages principalement due aux activités régénératrices des CSM de la moelle osseuse (Williams III et al. 2007). Bien que cette technique a montré certains avantages pour la réparation du cartilage endommagé, le néo-tissu contient un fibrocartilage qui présente des propriétés mécaniques différentes, ce qui laisse douter de sa stabilité à long terme (Bae et al. 2006 ; Orth et al. 2012). Les thérapies actuelles de l'arthrose se divisent en 2 groupes : a) médicaments qui visent à soulager la douleur comme les analgésiques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). b) thérapie qui vise à remplacer l'articulation par chirurgie (Zhang et al., 2008).

Comme le rôle des cytokines pro-inflammatoires a été reconnu dans l'induction du phénotype catabolique des chondrocytes et étant donné le succès de la thérapie anticytokine dans l'arthrite inflammatoire, plusieurs études ont été menées et un certain nombre d'essais sont toujours en cours chez des patients atteints d'arthrose qui utilisent des antagonistes des cytokines. L'IL-1 $\beta$  exerce ses diverses actions en engageant le récepteur de type I, IL-1RI. (Le récepteur de type II est incapable de transmettre le signal) (Ricote et al. 2004). Le complexe IL-1/IL-1R recrute la protéine accessoire de récepteur (IL-1RAcP) pour former un complexe de haute affinité, qui est capable d'initier la cascade de signalisation intracellulaire (Wesche et al. 1997). Ainsi, l'action de l'IL-1 peut être bloquée par le ciblage des différentes molécules en utilisant l'antagoniste de IL-1 (IL-1 Ra), les anticorps anti-IL-1 ou anti-IL-1R, ou enfin le complexe soluble (*membrane shedded*) IL-1R/IL-1RAcP.

L'étude sur l'effet de l'IL-1 Ra à l'aide d'injections intra-articulaires montre qu'il produit des résultats contradictoires chez les patients atteints d'arthrose du genou (Chevalier et al. 2009), alors que certains bons résultats préliminaires ont été obtenus (concernant la douleur et le handicap global) avec des injections sous-cutanées chaque jour pendant 3 mois chez les patients souffrant d'une arthrose érosive de la main (Bacconnier et al. 2009).

AMG 108, un anticorps monoclonal humain qui lie le récepteur de type I IL-1R (bloquant ainsi l'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) est en cours d'évaluation chez les patients atteints de gonarthrose (essai clinique de phase II) (Cohen et al. 2011).

L'INFLIXIMAB est le premier anticorps anti-TNF partiellement humanisé enregistré pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde : une étude de 12 mois a montré des effets significatifs sur la douleur et sur le score radiologique de progression chez les patients atteints de l'arthrose érosive de main (Fioravanti et al. 2009).

## **FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF $\kappa$ B.**

Le facteur de transcription NF $\kappa$ B intervient dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires (Sha W.C., 1998). Le complexe NF $\kappa$ B est constitué d'un dimère de protéines, qui possèdent toutes du côté N-terminal une région homologue de 300 acides aminés appelée Rel, qui permet la dimérisation, la translocation vers le noyau et la liaison à l'ADN. Ces protéines sont regroupées en deux classes en fonction de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles (Baeuerle P.A. et Baltimore D., 1996, O'Neill L.A et Kaltschmidt C., 1997). Les protéines p50 et p52 (protéines de classe 1)



dérivent des précurseurs cytoplasmiques p100 (NF- $\kappa$ R2) et p105 (NF- $\kappa$ R1) après clivage du côté C-terminal. Ces précurseurs renferment des motifs ankyrines répétés dans les domaines carboxy-terminaux. Les protéines p6S (RelA), RelB et cRel (p7S) (protéines de classe II) renferment un ou deux sites d'activation de la transcription dans leurs domaines carboxy-terminaux. Les dimères NF $\kappa$ B sont formés le plus souvent d'une protéine de classe I et d'une protéine de classe II. Mais il existe des homodimères pSO/pSO ou pS2/pS2, qui n'engendrent pas d'activation de la transcription. La protéine p6S est en fait indispensable car elle contient le domaine de transactivation (Schmitz M.L. et Bauerle P.A., 1991) alors que les protéines pSO et pS2 possèdent le domaine de liaison à l'ADN. C'est pourquoi l'hétérodimère p6S/pSO peut induire la transcription contrairement aux homodimères pSO/pSO ou pS2/pS2. Enfin, la région C de la sous-unité p6S contient la séquence d'adressage nucléaire masquée par IKRa dans le complexe que cette protéine forme avec NF $\kappa$ B (Phelps C.B., 2000).

Dans la cellule, le complexe NF $\kappa$ B existe sous forme inactive cytoplasmique, liée à une protéine inhibitrice IKRa (Baldwin A.S., 1996). L'activation du complexe NF $\kappa$ B résulte d'une cascade d'activation de différentes kinases lorsque les cellules sont stimulées par l'IL-1 ou le TNF $\alpha$  par exemple. Une première kinase à sérine-thréonine, appelée NIK pour «NF $\kappa$ B inducing kinase» est activée, puis à son tour elle va phosphoryler un complexe nommé IKK pour «IKB Kinase» (Ling L., 1998, Nakano H., 1998). Ce complexe IKK est constitué de trois sous-unités: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , qui sont des unités catalytiques et NEMO ou IKK $\gamma$ , qui correspond à la sous-unité régulatrice. Associé à NIK, il forme un complexe de haut poids moléculaire, appelé signalosome. Le complexe IKK activé phosphoryle les sérines 32 et 36 d'IKRa (DiDonato J.A., 1997, Regnier C.H., 1997, Woronicz J.D., 1997, Zandi E., 1997). Cette phosphorylation est suivie du recrutement d'une ubiquitine ligase responsable de la polyubiquitinylation d'IKRa sur les lysines 21 et 22. Sous cette forme, IKRa est ensuite dégradée par un complexe enzymatique, le protéasome (Karin M., 1999) et libère ainsi la séquence de localisation nucléaire de NF- $\kappa$ B. Par conséquent, il rentre rapidement dans le noyau et régule la transcription de gènes cibles possédant un élément de réponse dans leur région promotrice.

## **FACTEUR DE TRANSCRIPTION AP-1.**

Le complexe AP-1 correspond à un complexe de protéines codées par des proto-oncogènes de la famille Jun, Fos et ATF, «activating transcription factor ». La famille Jun comprend les

protéines c-Jun, Jun-B, Jun-D et v-Jun (Vogt P.X. et Bos T.I., 1990). La famille Fos inclue les protéines c-Fos, Fra-1 et-2 (Fos related Antigen), Fos-B et v-Fos et la famille ATF, ATF2, ATF3, B-ATF (Angel P. et Karin M., 1991). Le complexe AP-1 peut être formé d'homodimères d'ATF, d'un homodimère de protéines Jun, d'hétérodimères (Jun/Fos ou Jun/ATF), capables de se lier à l'ADN ou d'hétérodimères de protéines fos, qui forment des complexes stables avec les protéines jun. En effet, les membres de la famille fos ne forment pas d'homodimère. c-Fos et c-Jun ont des rôles bien distincts ; ainsi c-Fos génère l'initiation de l'activité transcriptionnelle tandis que c-Jun est responsable du maintien de l'activité du facteur AP-1 (Sen C.X. et Parker L., 1996). Les dimères Jun-Jun et Jun-Fos se fixent préférentiellement sur des éléments de réponse TRE (« TPA responsive element ») au phorbol 12-0-tétradécanoate-13 acétate tandis que les dimères Jun-ATF ou ATF-ATF se lient sur des éléments CRE, «cAMP-responsive element» (Hai T. et Curran T., 1991). Ces complexes contrôlent ainsi l'expression de nombreux gènes cibles comme ceux des MMPs, de certaines cytokines et du TGF $\beta$  (Angel P. et Karin M., 1991, Firestein G.S., 1999). Ils régulent également la croissance, la différenciation et la prolifération cellulaire (Karin M., 1997).

Le complexe AP-1 est localisé préférentiellement dans le noyau plutôt que dans le cytoplasme des cellules, suggérant qu'il est actif et lié à l'ADN. La régulation d'AP-1 est complexe et est effectuée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel (Karin M., 1997). Les MAPK p38, ERK et JNK peuvent augmenter la transcription du gène *c-fos* par activation d'Elk-1, facteur de transcription appartenant à la famille Ets, et de SAP-1, «stress-activated protein-1 » (Whitmarsh A.J. et Davis R.J., 1996). La transcription du gène *c-jun* est régulée par c-Jun lui-même dans une boucle d'autorégulation positive (Angel P., 1988). En effet, la phosphorylation des sérines 63 et 73 de c-Jun par JNK augmente son activité transcriptionnelle. De plus, cette modification post-traductionnelle permet de diminuer l'ubiquitination de cette protéine augmentant ainsi sa stabilité (Musti A.M., 1997).

L'expression d'ATF2 est constitutive, seule son activité est régulée de façon post-traductionnelle après phosphorylation.

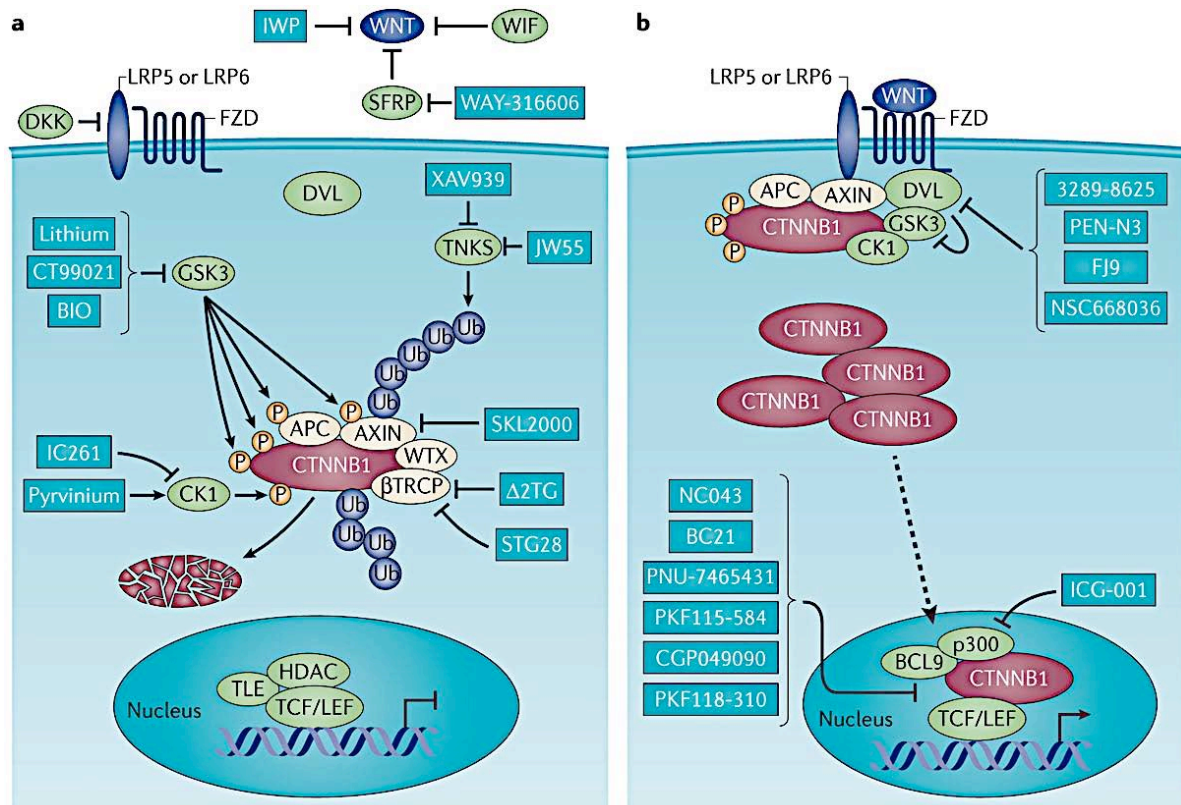
## *Wnt et cartilage*

## I. FAMILLE Wnt ET CARTILAGE

WNT est une famille de glycoprotéines secrétées, caractérisées par plusieurs résidus cystéines conservés. Elle contient 19 membres qui sont issus d'un même gène par épissage alternatif. Ces glycoprotéines sont impliquées dans la régulation de différentes voies de signalisation. Différentes études ont montré une implication de la famille Wnt dans le développement, la croissance et l'homéostasie de différents tissus et organes y compris l'articulation, l'os et le cartilage (Chun et al. 2008 ; Nalesso et al. 2011).

## II. VOIE DE SIGNALISATION Wnt

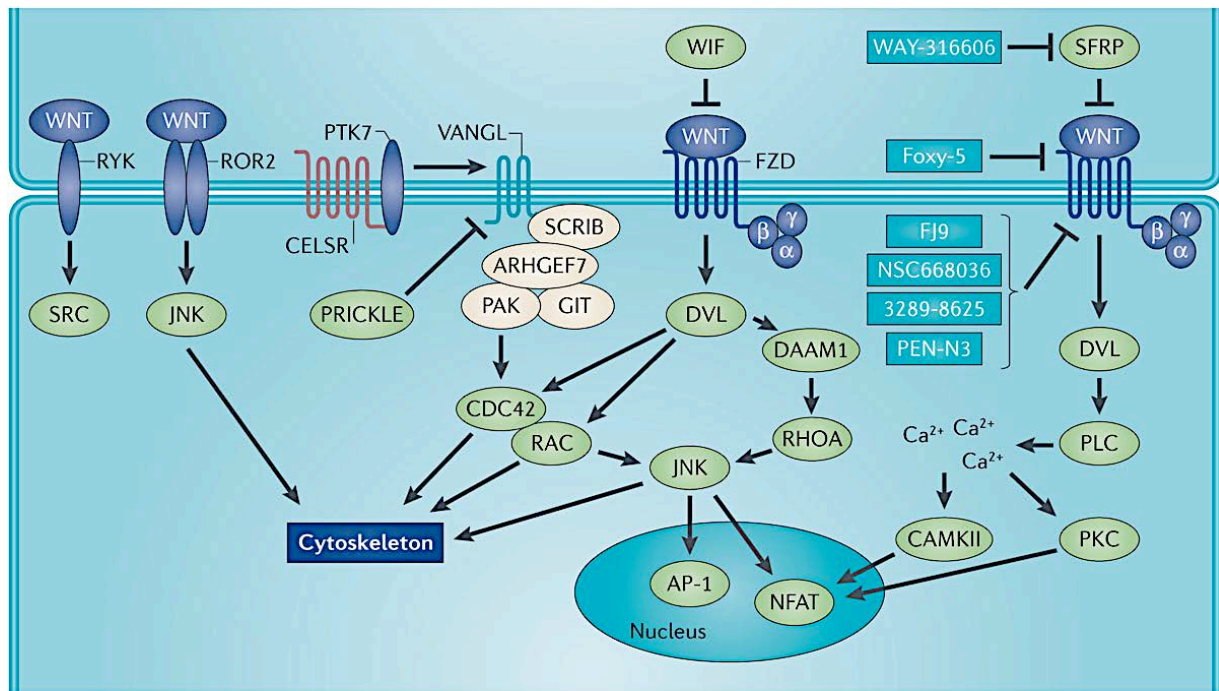
La voie Wnt est composée de différents composants essentiels et joue un rôle fondamental dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la survie, la migration, la polarité, l'adressage cellulaire, et l'auto-renouvellement des cellules souches (Logan et al. 2004). La famille Wnt exerce ses effets à travers différentes voies de signalisation (Macdonald et al. 2007), la plus caractérisée étant la voie Wnt/ $\beta$ -caténine nommée voie canonique. Dans cette voie, en absence du ligand Wnt, la kinase GSK-3 $\beta$  phosphoryle la  $\beta$ -caténine grâce à un complexe de destruction conduisant à sa dégradation par le protéasome (Logan and Nusse, 2004). La liaison de ligands, comme Wnt-1 et Wnt-3a sur le récepteur frizzled (Fzd) et le corécepteur LRP5/6 (*Low density lipoprotein receptor-related receptor5/6*) conduit à la dissociation du complexe de destruction, à l'accumulation de la  $\beta$ -caténine dans le cytosol et à sa migration vers le noyau où elle interagit avec les facteurs de transcription TCF/LEF (*T cell factor/lymphoid enhancer-binding factor*), induisant la transcription des gènes cibles (Macdonald et al. 2007) (Figure 6).



**Figure 6 : La voie Wnt/  $\beta$ -caténine.** En absence du ligand Wnt, un complexe de destruction contenant la protéine APC (proteins adenomatous polyposis coli), la kinase GSK3 $\beta$ ) et l'Axine phosphoryle la  $\beta$ -caténine ce qui conduit à son ubiquitination et par la suite à sa dégradation par le protéasome. En absence du ligand Wnt, les facteurs de transcription TCF/LEF sont associés à un complexe d'inhibition contenant le corécepteur TLE (transducin-like enhancer protein) ce qui conduit au recrutement de l'histone desacétylase (HDACs) et à l'inhibition de la transcription des gènes cibles de la  $\beta$ -caténine. B- La liaison de certaines protéines de la famille Wnt tel que Wnt-3a et Wnt-11 au récepteur Fzd et au corécepteur LRP5/6 aboutit à l'activation de la protéine Dishevelled (Dvl) et à l'inhibition du complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine induisant l'accumulation de cette dernière dans le cytoplasme. La  $\beta$ -caténine traverse ensuite la membrane nucléaire et agit en tant que cofacteur du facteur de transcription TCF/LEF. La liaison entre la  $\beta$ -caténine et TCF/LEF inhibe l'association de l'inhibiteur TLE et recrute des cofacteurs transcriptionnels comme le BCL9. (D'après Anastas et al. 2013)

D'autres voies de signalisation induites par d'autres membres de la famille Wnt comme Wnt-5a et Wnt-11, indépendantes de la  $\beta$ -caténine ont été découvertes chez la Drosophile (Van

Amerongen et al. 2008). Ces voies sont nommées non-canoniques. Elles régulent la polarité planaire des cellules. Malgré le rôle joué par le récepteur Fzd et les protéines dishevelled (Dvl) dans cette voie, il n'existe aucune évidence de l'implication de la  $\beta$ -caténine, du récepteur LRP ou des facteurs de transcription TCF/LEF dans la régulation de la polarité cellulaire. Le récepteur Fzd est aussi impliqué dans la voie Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ , une autre voie non canonique régulée par Wnt-5a et Wnt-11 (Miller et al. 1999 ; Kuhl et al. 2000) (Figure 7).



Nature Reviews | Cancer

**Figure 7 : Les voies de signalisation indépendantes de la  $\beta$ -caténine.** Certains membres de la famille Wnt comme Wnt-5a et Wnt-11 n'arrivent pas à stabiliser la  $\beta$ -caténine (CTNNB1). En effet, elles régulent d'autres voies de signalisation dites non-canonique. Celles-ci débutent par la liaison d'une protéine Wnt sur le récepteur Fzd dans le but d'activer Dvl. Ce dernier activera un certain nombre d'effecteurs en aval et régulera des voies de signalisation dépendantes du calcium et des petites GTPase. Les voies non-canoniques régulent également la voie de signalisation de la polarité cellulaire planaire (PCP). En plus des récepteurs FZD, d'autres protéines transmembranaires, comme VANGL, PTK7 et CELSR, peuvent interagir avec WNTS et FZDS pour réguler la signalisation PCP chez les vertébrés (Wansleeben et al. 2011). Les récepteurs à tyrosine kinase comme RYK et ROR peuvent également agir en tant que récepteurs WNT pour activer les voies non-canoniques. Comme d'autres voies WNT, PCP exige aussi l'activité d'autres facteurs cytoplasmiques, y compris SCRIB et PRICKLE (Wansleeben et al. 2011). Dans certains contextes, les voies non-

canoniques de Wnt régulent les petites GTPases, comme RHOA, RAC et CDC42, d'une manière Dvl-dépendante. WNT5a et Wnt11 peuvent également induire un flux de calcium, ce qui entraîne l'activation des différentes voies de signalisation, telles que la protéine kinase C (PKC), Calcium / protéine kinase II calmoduline-dépendante (CAMKII) et Jun N-terminal kinase (JNK) (Kohn et al. 2005). Des inhibiteurs pharmacologiques sont indiqués dans les boîtes bleues. « AP-1 : activator protein 1; ARHGEF7 : RHO guanine nucleotide exchange factor 7; DAAM1 : Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1; GIT : G protein-coupled receptor kinase-interactor 1; NFAT : nuclear factor of activated T cells; PAK : p21-activated kinase; PLC : phospholipase C; SFRP : secreted frizzled-related protein; WIF : WNT inhibitory factor. ».

D'après Anastas et al. 2013

La spécificité de l'activation des voies de signalisation en aval des différents agonistes Wnt dépend de l'activation du récepteur sélectif et de l'endocytose de ce récepteur en présence de certains cofacteurs comme les HSPG (Kikuchi et al. 2009). Des études récentes ont montré que les protéines Wnt peuvent activer des voies multiples suite à la liaison à plusieurs récepteurs (van Amerongen et al. 2008). Wnt-5a, activateur de la voie non-canonique peut aussi activer la voie canonique (Mikels et al. 2006). D'autre part, Wnt-3a ``canonique`` est capable d'activer la voie  $Ca^{2+}$  non-canonique (Nalesso et al. 2011).

Des antagonistes divers sont capables de réguler de manière extracellulaire les voies de signalisation Wnt. Ces antagonistes incluent les membres de la famille sFRP (*secreted Frizzled-related protein*), WIF-1 (*Wnt-inhibitory factor 1*), Cerberus, SOST et DKK1 (Dkkopf 1). sFRP, WIF-1 et Cerebrus se lient directement à Wnt et préviennent sa liaison au récepteur, bien que les sFRPs peuvent aussi se lier directement au récepteur Fzd pour former un complexe non fonctionnel (Miller 2002 ; Kawano et al. 2003). SOST et DKK1 inhibent la signalisation de Wnt en se liant au co-récepteur LRP5/6 et préviennent sa liaison à Wnt (Hoepfner et al. 2009). Dans la partie intracellulaire, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine peut être inhibée par l'inhibiteur ICAT, ce dernier bloque la liaison  $\beta$ -caténine/TCF-LEF et par suite la régulation transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine (Zhu et al. 2008 ; Daniels et al. 2002).

Les différentes composantes de la voie de signalisation Wnt impliquées dans le développement du cartilage et diverses pathologies sont présentées dans le tableau 1.

Facteur	Développement		Pathologie	
	Expression	Action	Expression	Action
Wnt-1	Absence d'expression endogène (Rudnicki et Brown 1997)	Inhibe la formation du cartilage (Parr et al. 1993)	Expression dans le tissu synovial des patients RA (Sen et al. 2000)	Induit l'expression de la fibronectine et de la MMP3 dans les synoviocytes fibroblastes-like (Sen et al. 2000)
Wnt-3a	Expression durant les stages précoces de la chondrogenèse, inhibée après la fin de la différenciation des chondrocytes (Hwang et al. 2005)	Favorise l'auto-renouvellement cellulaire. (Cho et al. 2006) Inhibe l'apoptose des MSCs. (Boland et al. 2004) Inhibe l'expression du collagène de type II et du dépôt de PGs. (Hwang et al. 2005)		Favorise la prolifération des chondrocytes et induit leur dédifférenciation (Nalesso et al. 2011) (Hwang et al. 2005)
Wnt-4	Expression par les chondrocytes hypertrophiques. (Church et al. 2002) (Hartman et al. 2002)	Accélère la maturation des chondrocytes (Church et al. 2002) (Hartmann et al. 2002) (Hartmann et al. 2000)		
Wnt-5a	Expression dans le péri-chondre. (Church et al. 2002) (Hartman et al. 2002)	Induit le recrutement des CSM. (Kawakami et al. 1999) Retarde la différenciation des chondrocytes. (Church et al. 2002) (Hartman et al. 2002)	Expression par les chondrocytes. (Ma et al. 2012) Expression dans le tissu synovial des patients RA. (Sen et al. 2000)	Induit l'expression des MMPs. (Ge et al. 2009) Induit la dédifférenciation des chondrocytes chez le lapin. (Ryu et al. 2006)
Wnt-5b	Expression dans les chondrocytes pré-hypertrophiques et dans le péri-chondre. (Hwang et al. 2005)	Favorise les étapes initiales de la chondrogenèse dans les cultures micro-masse. Retarde la différenciation terminale invivo (Church et al. 2002)		
Wnt-7a	Expression dans l'ectoderme dorsale. (Stott et al. 1999)	Inhibe la différenciation chondrocytaire invivo et invitro. (Rudnicki	Expression dans les chondrocytes du lapin. Expression induite	Induit la dédifférenciation des chondrocytes de lapin.



		et al. 1997)	en réponse à l'IL-1 $\beta$ . (Hwang et al. 2004)	(Hwang et al. 2004)
Wnt-7b			Expression induite dans le cartilage des patients OA et dans la synovial des patients RA. Expression dans les chondrocytes humains. Expression induite en réponse à l'IL-1 $\beta$ . (Ma et al. 2012)	Inhibe l'expression des MMPs dans les chondrocytes humain. (Ma et al. 2012)
Wnt-14	Expression dans l'interzone commune de développement. (Hoang et al. 1996)	Arrête la différenciation chondrocytaire. (Hartmann C. 2002)		
$\beta$ -caténine	Expression faible dans les condensations des MSCs à futur chondrocytes. (Day et al. 2005)	Induit l'expression de sox9. Favorise la différenciation chondrocytaire. (Day et al. 2005) (Hill et al. 2005)	Expression élevée dans le cartilage des patients OA. (Zhu et al. 2009) Induction de la dédifférenciation des chondrocytes. (Yuasa et al. 2009) (Ryu et al. 2002)	Induit le phénotype OA dans des modèles de souris exprimant constitutivement la $\beta$ -caténine. (Zhu et al. 2009) (Yuasa et al. 2009) Inhibe l'activité NF- $\kappa$ B. Expression des MMPs dans les chondrocytes humaines. (Ma et al. 2012)
Fzd	Expression dans les condensations mésenchymateuses pré-chondrogéniques et dans les chondrocytes épiphysaires pré-articulaires. (Hoang et al. 1996) (Gaur et al. 2006)	Bloque la maturation des chondrocytes. Empêche l'ossification endochondrale in vivo (Enomoto-Iwamoto et al. 2002) (Gaur et al. 2006). Favorise la synthèse des glycosaminoglycanes et de l'expression du	Plusieurs variants sont exprimés chez l'homme (Valdes et al. 2007 ; Lane et al. 2006 ; Min et al. 2005).	Facteur de risque pour l'arthrose (Valdes et al. 2007 ; Lane et al. 2006 ; Min et al. 2005). Les souris knock-out FRZB sont plus sensibles aux facteurs induisant l'arthrose (Bodine et al. 2004 ;

		Sox9 et du Collagène II invitro (Im et al. 2010).		Lories et al. 2007).
DKK-1	Expression dans les sites de mort cellulaire programmée dans la crête ectodermique apicale (Grotewold et al. 2002). Expression plus importante dans le cartilage articulaire que dans les plaques de culture (Leijten et al. 2012).	Favorise la synthèse des glycosaminoglycanes. Expression de Sox9 et du Collagène de type II invitro (Grotewold et al. 2002). Inhibe l'hypertrophie des chondrocytes (Leijten et al. 2012).	Expression induite dans la polyarthrite rhumatoïde et inhibée dans le cas de l'arthrose (Voorzanger-Rousselot et al. 2009).	La surexpression améliore la destruction du cartilage dans des modèles animaux (Weng et al. 2010 ; Oh et al. 2012).
WIF-1	Expression dans le mésenchyme entourant le cartilage et du cartilage articulaire (Surmann-Schmitt et al. 2009).	Favorise la différenciation chondrocytaire (Surmann-Schmitt et al. 2009).		

**Tableau 1 : Famille Wnt.** Expression et pathologies associées

### III. Wnt ET PHENOTYPE CHONDROCYTAIRE

En plus de sa fonction dans la chondrogenèse et dans la maturation des chondrocytes, la voie Wnt est également impliquée dans le maintien du phénotype des chondrocytes différenciés et peut donc jouer un rôle crucial dans l'homéostasie du cartilage tout au long de la vie adulte. Lorsque les chondrocytes sont exposés à des facteurs inflammatoires tels que l'IL-1 et l'acide rétinolique ou lorsqu'ils sont cultivés en monocouche, leur phénotype est rapidement perdu et les cellules deviennent de type fibroblastique. Ce processus est connu sous le nom de dédifférenciation et il est accompagné d'une expression élevée de la  $\beta$ -caténine (Ryu et al. 2002). L'accumulation de la  $\beta$ -caténine après l'induction de son expression ou l'inhibition de sa dégradation entraîne l'activation des facteurs de transcription TCF/LEF dans les chondrocytes de lapin (Ryu et al. 2002). De plus, Wnt-3a et Wnt-7a induisent une inhibition de la synthèse du collagène de type II via l'activation des facteurs de transcription TCF/LEF dans les chondrocytes de lapin (Hwang et al. 2005). D'autre part, Wnt-3a induit l'expression

de c-Jun et sa phosphorylation par c-Jun N-terminal kinase (JNK), ce qui résulte en l'activation du facteur de transcription AP-1 qui peut inhiber l'expression de Sox9, un facteur de transcription majeur dans la régulation de l'expression de COL2A1 (Hwang et al. 2005). Wnt3a inhibe également la chondrogenèse des cellules mésenchymateuses en stabilisant l'adhésion cellule-cellule d'une manière indépendante de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine (Hwang et al. 2005). Tous ces résultats suggèrent que les protéines Wnt régulent les fonctions chondrocytaires via différents mécanismes et différentes voies.

Cependant, toutes ces études ont été réalisées dans des chondrocytes animaux et la fonction de la voie Wnt dans les chondrocytes humains a été peu étudiée jusqu'à ce jour. Une étude récente a montré que Wnt-3a induit la prolifération des chondrocytes via la voie canonique alors qu'elle inhibe la synthèse des marqueurs chondrocytaire via la voie non canonique (Nalesso et al. 2011). D'autre part, la dédifférenciation *in vitro* des chondrocytes humains ne peut pas être inversée par inhibition de la voie canonique ni par le *knock-down* de la  $\beta$ -caténine ni par l'addition d'un inhibiteur des facteurs de transcription TCF/LEF (Ma et al. 2012). Pendant la dédifférenciation des chondrocytes humains l'expression du Wnt-5a (déjà cité comme activateur de la voie non canonique de Wnt) est induite ce qui coïncide avec une inhibition de l'expression du collagène de type II. Le *Knock-down* de Wnt-5a peut inverser l'inhibition de l'expression du collagène de type II suggérant que la dédifférenciation des chondrocytes humains est indépendante de la  $\beta$ -caténine. Les dernières observations dans les chondrocytes de lapin, montrent que l'induction de l'activité transcriptionnelle TCF/LEF contribue à la dédifférenciation de ces chondrocytes. La divergence de résultats entre les chondrocytes humains et ceux d'origine animale montrent que la fonction exacte de la voie Wnt canonique dans le cartilage articulaire peut être espèce-dépendante. Une telle différence entre espèces a été également observée dans la régulation de l'expression des MMPs dans les chondrocytes humains et animaux (Ma et al. 2012).

Contrairement à Wnt-3a et Wnt-7a, Wnt-5a et Wnt-11 sont connues comme utilisant la voie non-canonique. Ils régulent la synthèse spécifique des molécules de la MEC du cartilage (Ryu et al. 2006). La stimulation des chondrocytes de lapin par l'IL-1 $\beta$  induit l'expression de Wnt-5a et inhibe celle de Wnt-11. Wnt-5a inhibe l'expression de COL2A1 par la voie JNK, alors que Wnt-11 stimule l'expression de COL2A1 par la voie PKC, ce qui montre que Wnt-5a et Wnt-11 ont des effets opposés sur l'expression du COL2A1 par des voies non-canoniques distinctes dans les chondrocytes de lapin (Ryu et al. 2006). Dans les chondrocytes humains, Wnt-5a bloque également l'expression de COL2A1, ce qui est en accord avec ses effets dans

les chondrocytes de lapin (Ma et al. 2012). Il serait intéressant aussi de savoir si Wnt-3a est également capable d'inhiber l'expression de COL2A1 et de SOX9 par des voies non-canonique. Tous ces résultats éclairent le rôle de la voie non-canonique dans la dérégulation de la fonction chondrocytaire. Enfin, aucun rôle direct de la voie canonique n'est suggéré dans la dédifférenciation des chondrocytes humains.

#### **IV. SIGNALISATION Wnt DANS LA DEGENERESCENCE DU CARTILAGE**

A la lumière de l'implication de la voie Wnt dans le développement du cartilage, le maintien du phénotype des chondrocytes adultes et l'homéostasie du cartilage, le dysfonctionnement de la voie Wnt peut conduire à une pathologie du tissu cartilagineux. En effet, l'expression des composants de la voie Wnt a été documentée dans des pathologies articulaires comme l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde. Dans plusieurs études, l'antagoniste de Wnt, FRZB a émergé comme un gène candidat associé à un risque accru d'arthrose (Valdes et al. 2007 ; Loughlin et al. 2004 ; Lane et al. 2006 ; Min et al. 2005). Un polymorphisme d'un nucléotide unique dans FRZB entraînant une substitution R324G, qui montre une faible capacité à bloquer la voie Wnt invitro, a été associé à un risque d'arthrose chez la femme (Loughlin et al. 2004). La corrélation entre les taux circulants élevés de DKK-1, un autre antagoniste de Wnt, avec une progression réduite de l'arthrose de la hanche radiographique (RHOA) chez les femmes âgées a également été suggérée (Lane et al. 2007). Une analyse systématique de la voie de signalisation Wnt a montré qu'il y a une induction de Wnt-16, une inhibition de FRZB, une induction de l'expression des gènes cibles de Wnt, et une localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine dans les cartilages lésés (Dell'Accio et al. 2008). En outre, durant l'arthrose, Wnt-16 et la  $\beta$ -caténine, qui sont à peine détectables dans les zones saines du cartilage, sont considérablement induits dans les régions sévèrement endommagées des cartilages des patients arthrosiques (Dell'Accio et al. 2008). Ces études indiquent que la dégénérescence du cartilage est associée à une augmentation de la signalisation Wnt.

Pris ensemble, tous ces résultats conduisent à l'hypothèse selon laquelle les faibles niveaux Wnt/ $\beta$ -caténine sont nécessaires pour le maintien de la fonction du cartilage normal et que les troubles de cette voie conduisent au développement et à la progression de la dégénérescence du cartilage. Cette hypothèse est confirmée par des preuves expérimentales dans des modèles animaux. L'existence d'un tel rôle dans l'arthrose humaine est cependant moins évidente et est principalement basée sur des analyses montrant des associations entre des niveaux élevés de

$\beta$ -caténine et un phénotype arthrosique dans des échantillons de cartilage. La preuve d'un lien de causalité entre la voie Wnt et l'arthrose chez l'homme n'est actuellement pas faite.

Contrairement à son rôle pro-catabolique dans les cartilages d'animaux, l'activation de la voie de signalisation Wnt dans les chondrocytes humains inhibe l'expression des MMPs par un mécanisme indépendant de l'activation des facteurs de transcription TCF/LEF (Ma et al. 2012). Au contraire, dans les cellules animales, la voie Wnt régule l'expression des MMPs par un mécanisme dépendant de la  $\beta$ -caténine et des facteurs de transcription TCF/LEF (Ma et al. 2012, Yun et al. 2007). Dans les chondrocytes humains, l'activation de la voie canonique inhibe l'expression des MMPs par une interaction inhibitrice de la  $\beta$ -caténine et de NF- $\kappa$ B (Ma et al. 2012).

Un rôle de la voie Wnt non canonique dans la dégénérescence du cartilage est suggéré par l'induction de l'expression des MMPs par Wnt-5a dans les chondrocytes de lapin (Ge et al. 2009) et la répression médiée par la voie  $Ca^{2+}$  des gènes marqueurs du phénotype chondrocytaire par Wnt-5a ou Wnt-3a (Nalesso et al. 2011). Il a été suggéré que les voies canoniques et non canoniques s'inhibent réciproquement l'une l'autre (Nalesso et al. 2011). Par conséquent, le blocage de la voie canonique peut entraîner également une dédifférenciation des chondrocytes en réprimant les voies de  $Ca^{2+}$ . Des stimuli comme l'IL-1 (Pritchard et al. 2006) et les charges biomécaniques (Shimazaki et al. 2006) qui régulent la voie CaMKII peuvent influencer la signalisation Wnt en changeant l'équilibre entre  $\beta$ -caténine et CaMKII. A cause de la complexité des voies activées par la famille Wnt et les fonctions diverses que ces voies peuvent jouer, plus de thérapies ciblées devrait être développée en ce qui concerne le traitement des pathologies articulaires humaine par la manipulation de la voie de signalisation Wnt.

# ***MATERIEL ET METHODES***

# ***Matériel et méthodes***

## **I. MATERIEL**

### **I.1. Réactifs de biologie cellulaire**

Les milieux de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) et DMEM-F12, le sérum de veau fœtal (SVF), les solutions de Pénicilline-Streptomycine (10000 U/ml), de glutamine (200 mM), de trypsine-EDTA, le tampon phosphate (PBS) proviennent de Life Technologies-Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA) et l'agent de transfection ExGen 500 provient de chez Euromedex (Souffelweyersheim, France).

### **I.2. Réactifs de biologie moléculaire**

Les enzymes de restriction sont fournies par New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Les anticorps anti-IgG de souris et de lapin proviennent de Sigma. Les vecteurs pGL3 Basic, pRL-TK, le kit de Dual Luciferase sont fournis par promega (Madison, WI, USA). Le SYBR Green et le kit RNAeasy par Qiagen (Cologne, Germany), le vecteur pcDNA3.1, le vecteur TOPO TA cloning et la SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit par Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), le kit NUCLEAR extraction kit provient de Active Motif, les oligonucléotides ont été synthétisés par MWG-Biotech (Ebersberg, Allemagne). Le kit Quick Change Mutagenesis provient de Stratagène (La Jolla, CA, USA). Les kits de mini-préparation "QIAprep<sup>®</sup> Spin – miniprep" et de maxi-préparation d'ADN plasmidique "QIAGEN<sup>®</sup> plasmid midi kit" sont fournis par QIAGEN (Courtaboeuf, France).

### **I.3. Réactifs biochimiques**

Les billes d'agarose couplées à la streptavidine, l'I $\alpha$ 1, le paraformaldéhyde, le cétylpyridinium, la protéinase K et la papaïne proviennent de Sigma. Wnt-3a et DKK-1 proviennent de *R&D systems*. La membrane de transfert Immobilon<sup>™</sup>-P par Millipore (Saint-Quentin en Yvelines, France). L'albumine sérique bovine (BSA), les anticorps anti-PKC

(pan), anti-ERK1/2, anti-SAPK/JNK, anti-p38, anti-p-c-Jun, proviennent de Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA). Les anticorps anti-c-jun, anti-Sp1 et anti-sp3 proviennent de Santa Cruz biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Le radiolélément  $\text{Na}_2[^{35}\text{S}]\text{-SO}_4$  (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ), provient de Perkin Elmer (Courtaboeuf, France).

## **II. METHODES**

### **II.1. Préparation des cellules**

Le chondrocytes ont été préparé à partir d'échantillons de cartilage provenant de pièces opératoire issues de remplacement chirurgical de genoux de patients atteints d'arthrose. Les chondrocytes sont obtenus par digestion enzymatique séquentielle de la façon qui suit : Après un rinçage dans une solution de NaCl à 0,9% contenant des antibiotiques (pénicilline et streptomycine 1%), les prélèvements de cartilage sont placés pendant 2 heures dans une solution de pronase (2 mg/ml dans 0,15M NaCl), puis une nuit dans une solution de collagénase B (1,5 mg/ml dans DMEM/F-12 sans SVF). Les culots cellulaires sont recueillis par centrifugation du surnageant à 1200 tours/min pendant 6 minutes. Les chondrocytes fraîchement isolés sont mis en culture en monocouche pendant 10 à 12 jours (stade P0). Une fois la confluence atteinte, une partie du culot cellulaire obtenu après action de la trypsine est stockée à  $-80^\circ\text{C}$ , une autre est remise en culture en monocouche (stade P1).

### **II.2. Culture en monocouche**

Les chondrocytes obtenus après digestion enzymatique d'échantillons de cartilage sont mis en culture dans du milieu complet DMEM/F12 (1/1) supplémenté en glutamine (2 mM), en pénicilline (100 IU/ml), en streptomycine (100  $\mu\text{g/ml}$ ), et en sérum de veau fœtal (SVF) (10%, v/v) (Invitrogen). Ils sont placés à  $37^\circ\text{C}$  et en atmosphère humide contenant 5% de  $\text{CO}_2$ . Lorsque la confluence est atteinte, le passage des cellules s'effectue après utilisation d'une solution de trypsine-EDTA (0,02%) (Invitrogen). Le tapis cellulaire est préalablement rincé au PBS (sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) et mis en présence de trypsine. L'action enzymatique est ensuite neutralisée à l'aide du milieu complet. Les cellules sont récupérées après centrifugation à 500 tours/min pendant 5 min etensemencées à raison de 1,5 millions de cellules par flacon de  $75\text{ cm}^2$  ou dans des plaques six puits à raison de  $5 \times 10^5$  cellules par puits.



Dans le cas des explants de cartilage, ils sont prélevés puis maintenues en culture pendant 72h dans le milieu DMEM-F12 complet dans les mêmes conditions que les chondrocytes avant d'être traitées.

### **II.3. Traitements des chondrocytes**

Les chondrocytes primaires ont étéensemencés dans des plaques de six puits à  $5 \times 10^5$  cellules/puits et cultivées jusqu'à 80% de confluence dans un milieu DMEM/F12 (1/1) contenant 10% (v/v) de SVF. Les cellules sont ensuite privées de sérum pendant 24 h et traitées avec de l'IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) ou Wnt-3a (100 ng/ml) ou avec du PBS (contrôle) dans un milieu DMEM/F12 sans SVF pendant 12h et 24h.

### **II.4. Transfection des chondrocytes**

Les chondrocytes primairesensemencés à  $4 \times 10^4$  cellules/puits dans une plaques de 24 puits et à  $5 \times 10^5$  cellules/puits dans une plaques de 6 puits ont été cultivés dans le milieu DMEM-F12 contenant 10% (v/v) de SVF jusqu'à 80% de confluence. La transfection des chondrocytes est réalisée au moyen d'ExGen 500 (Euromedex). Le mélange est mis en contact dans une solution de NaCl 9‰ (p/v) stérile et incubé 10 min à température ambiante avant dépôt sur les cellules en présence de milieu de culture sans SVF. Après 2h, le milieu est remplacé par du DMEM-F12 contenant 10% de SVF. Dans le cas des traitements à l'IL-1 $\beta$  ou le Wnt-3a, les cellules transfectéssont mises en culture dans le milieu DMEM-F12 contenant 2% SVF toute la nuit puis traitées pendant 12h et 24h.

### **II.5. Anabolisme des GAGs**

Les chondrocytes sont cultivés en plaques 6 puits jusqu'à 90% de confluence puis incubés pendant 6h dans 1 ml de milieu DMEM-F12 (supplémenté par 2% (v/v) de SVF) en présence de 10  $\mu$ Ci/ml de Na<sub>2</sub>[<sup>35</sup>S]SO<sub>4</sub>. Le milieu de culture est récupéré et les GAGs radiomarqués sont précipités au chlorure de cétylpyrimidium (CPC) selon la méthode décrite par De Vries et al. (1986). Cette méthode consiste à digérer le milieu récupéré par une solution de papaine (1mg/ml) pendant une nuit à 60°C. Après digestion, la papaine est désactivée par chauffage à 100 °C pendant 10min. Ensuite, le milieu est centrifugé pendant 10min à 13000g pour se débarrasser des débris cellulaires. Les GAGs radiomarqués présents dans 500  $\mu$ l du milieu

sont précipités à température ambiante par 500 µl de chlorure de cétypyrimidium (CPC) 2,5% (p/v). Après 4h, le mélange est centrifugé 15 min à 10000g et le culot contenant les GAGs radiomarquées est resuspendu dans 500 µl de CPC 1%. Deux heures après, le mélange est centrifugé 15 min à 10000g et le culot est resuspendu dans 500 µl de CPC 0,5%. Deux heures après, le mélange est centrifugé pendant 15 min à 10000g et le culot contenant les GAGs radiomarquées est solubilisé dans le solvène-350 (Perkin Elmer) pendant une nuit à 40°C. Le lendemain, le mélange est dissout dans du liquide de scintillation (Ultima Gold, Perkin Elmer, MA, USA) et la radioactivité associée aux GAGs est quantifiée par comptage dans un compteur à scintillation liquide (Packard, Rungis, France).

## **II.6. Extraction des ARN totaux**

L'extraction des ARN totaux a été effectuée à l'aide du kit RNeasy plus mini Kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Les chondrocytes sont lysés dans les puits des plaques de 6 puits par 600 µl du tampon RLT contenant du thiocyanate de guanidinium et du β-mercaptoéthanol. Un volume d'éthanol 70% est ensuite ajouté et le mélange est déposé sur une mini-colonne de silice. La colonne est centrifugée 15s à 12000 rpm. La colonne est lavée par 700 µl du tampon RW1 et centrifugée pendant 15s à 12000 rpm. La colonne est lavée deux fois par 500 µl du tampon RPE et centrifugée à 16000 rpm pendant 2min. Enfin, les ARNm totaux sont élués de la colonne par 30 µl d'eau "RNase-free". La qualité et la quantité d'ARN sont évaluées par spectrophotométrie sur un appareil Nanodrop (Labtech, France).

## **II.7. Transcription inverse et Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel RT-PCR quantitative**

La RT a été réalisée à l'aide du kit SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit. 500 ng d'ARN totaux, du tampon de réaction VILO (VILO<sup>TM</sup> Reaction Mix) et l'enzyme superscript VILO sont mélangés et placés à 25°C pendant 10 min , puis à 42°C pendant 1h et enfin à 85°C pendant 5 min. Les ADNc synthétisés sont utilisés pour la PCR directement ou congelés à -20°C.

La PCR en temps réel est effectuée grâce à la technologie SYBR Green et l'utilisation d'un système de détection StepOne (Applied Biosystems). Deux amplifications sont réalisées en parallèle, d'une part avec des oligonucléotides spécifiques du gène étudié, d'autre part avec

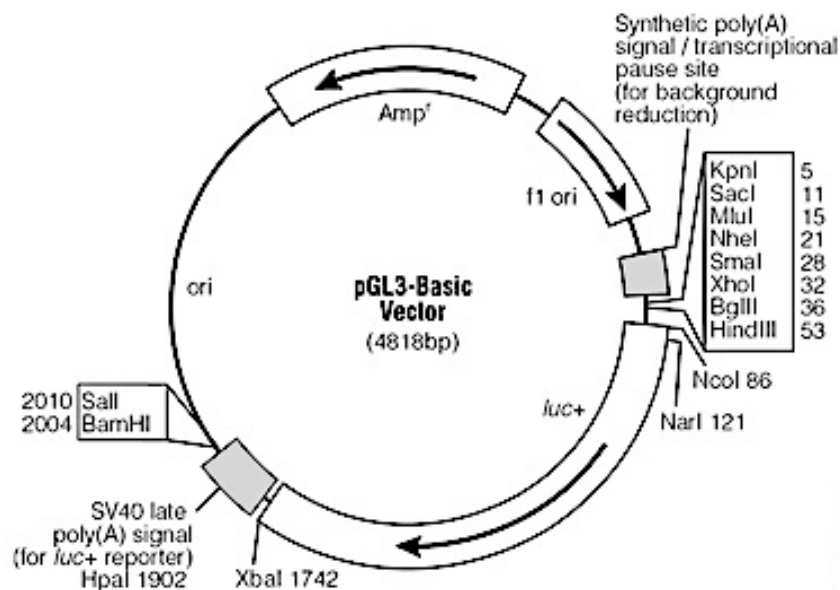
des oligonucléotides correspondant à une séquence du gène de la protéine ribosomale S29 utilisée comme contrôle interne.

L'amplification est réalisée à l'aide du kit SYBR Green Master Mix (Qiagen, Cologne, Allemagne) avec des ADNc dilués au 1/10<sup>ème</sup> en présence du mix de SYBR Green 1X et 10 pmoles de chaque oligonucléotide. La PCR se déroule selon les cycles suivants : la dénaturation à 94°C pendant 30s, l'hybridation à 60°C pendant 30s, l'élongation à 72°C pendant 30s. L'analyse des courbes de fusion est effectuée après amplification afin de déterminer la température de fusion des produits de PCR et la spécificité de ces produits est examinée par électrophorèse sur gel d'agarose. L'expression du gène cible est normalisée par rapport à l'expression des ARNm de la protéine S29 pour chaque échantillon. Les taux d'induction et d'inhibition sont calculés à l'aide de la méthode comparative Ct. Les taux de variation ont été calculés à partir des valeurs des  $\Delta\Delta CT$  à l'aide de la formule  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

## II.8. Clonage du promoteur de la XT-I et mutagenèse dirigée

### II.8.1. Délétions successives des séquences 5' du promoteur de la XT-I

La séquence de 1800 pb du promoteur de la XT-I a été clonée dans le plasmide pGL3 (Promega, France) en amont du gène codant pour la luciférase FireFly au niveau des sites de restriction *NheI* et *BglIII* (figure 8).



**Figure 8 : vecteur pGL3-Basic.** Différentes troncations successives de la partie 5' du promoteur ont été réalisées par la technique de PCR en utilisant des oligonucléotides 5' correspondant à la troncation et contenant un site de restriction *NheI* et un oligonucléotide 3' correspondant à l'extrémité 3' du promoteur et contenant un site de restriction *BgIII*. Les produits de PCR ont été digérés par les enzymes de restriction et sous-clonés dans le vecteur pGL3 basic préalablement digéré par les mêmes enzymes en amont du gène codant pour la luciférase. Ainsi les plasmides pGLXT-1800/+85 pGLXT-1230/+85, pGLXT-850/+85, pGLXT-450/+85, pGLXT-270/+85, pGLXT-100/+85 ont été construits.

### II.8.2. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée des sites AP-1 et Sp1 a été effectuée dans le plasmide pGLXT-1800/+85 à l'aide du kit QuickChange (Stratagene). Cette technique a été réalisée par PCR en présence de 125 ng d'oligonucléotides sens et antisens portant la mutation (Tableau 2), 200  $\mu$ M de dNTP, 5  $\mu$ l de tampon concentré 10x, 100 ng de plasmide, 2,5 U de *PfuTurbo*<sup>®</sup> DNA polymérase dans un volume final de 50 $\mu$ l. L'amplification par PCR a été effectuée dans les conditions suivantes : un cycle à 95°C pendant 30s puis 16 cycles à 95°C pendant 30s, 55°C pendant 1min puis 68°C pendant 8 min. Les produits de PCR ont été soumis à une digestion par l'enzyme de restriction *DpnI* afin d'éliminer les brins parentaux non mutés. Ensuite, 25  $\mu$ l de bactéries compétentes TOP 10<sup>®</sup> (Invitrogen, France) ont été transformés par 3  $\mu$ l de produit de digestion pendant 25 min dans la glace. Cette transformation a été effectuée par un choc thermique de 45s à 42°C puis 2 min dans la glace. Les bactéries ont été ensuite cultivées dans 200  $\mu$ l de milieu SOC pendant 45 min à 37°C sous agitation puis étalées sur boîtes contenant du milieu de culture Luria-Bertani (LB)-agar (Difco, France) et de l'ampicilline 100  $\mu$ g/ml. Les colonies ont été cultivées dans 2 ml de milieu LB contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline. La présence de l'insert et de la mutation a été vérifiée par purification de l'ADN plasmidique et digestion enzymatique puis par séquençage (Cogenics, France). Les bactéries recombinantes ont été amplifiées dans 50 ml de milieu LB contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline et le plasmide muté a été purifié à l'aide du kit Plasmid Midi Kit (Qiagen, France).

mAP1-590	Sens	5'- ACCGGGGATTGTGTGTGGTTCAGGAGTC ACTCAC-3'
	Antisens	5'-GTGAGTGACTCCTGA ACCACACACAATC CCCGGT-3'
mAP1-640	Sens	5'-GGACCAGAGAAGTGG TTCAGTGAACACTTAG-3'
	Antisens	5'-CTAA GTGTTCACTGAACCACTTCTCTGGTCC-3'
mAP1-1020	Sens	5'-ATCCCGAGCCTT CTCTGAACCAGTCTTTCTGGT-3'
	Antisens	5'- ACCAGAAAGACTGGTTCAGAGAAGGCT- 3'
mSp1-125	Sens	5'- TCCCCCAGGCCCCCAACTCTCCGCCTCGG CCCG-3'
	Antisens	5'- CGGGCCGAGGCGGAGA GTTGGGGGCCTGGGGGA-3'
mSp1-40	Sens	5' GGTGTGGGGAGGGGTTGGG CGGCGGCGGCCCG-3'
	Antisens	5'- CGGGCCGCCGCGCCCAAC CCCTCCCCA CACC-3'

**Tableau 2 : Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.**

### II.8.3. Purification des plasmides

Après centrifugation des bactéries recombinantes (50 ml de culture) pendant 20 min à 20,000 rpm à 4°C, le culot bactérien est resuspendu dans une solution de P1 (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8) puis lysé pendant 5 min dans une solution de P2 (200 mM NaOH, 1% SDS (p/v)). L'ADN génomique est précipité par addition de P3 (3 M acétate de potassium, pH 5,5) et centrifugation à 16000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est déposé sur une colonne Qiagen TIP100 équilibrée au préalable par une solution de QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% isopropanol (v/v), 0,15% Triton<sup>®</sup> X-100 (v/v)). Après lavage par une solution de QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% isopropanol (v/v), pH 7), le plasmide est élué par une solution de QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15% isopropanol (v/v), pH 8,5). Le plasmide ainsi obtenu est précipité par 0,7 volumes d'isopropanol et récupéré par centrifugation à 15000 rpm durant 20 min et à 4°C. Après lavage du culot à l'éthanol 70% et séchage, le plasmide est repris dans de l'eau ultrapure. La qualité et la quantité d'ADN sont évaluées par spectrophotométrie sur un appareil Nanodrop.

#### **II.8.4. Transfection des chondrocytes par les différentes constructions du promoteur de la XT-I**

Les chondrocytes sont cultivés dans le milieu DMEM-F12 contenant 10% (v/v) de SVF en plaque 24 puits jusqu'à 80% de confluence avant d'être transfectés avec 2 µg d'ADN correspondant à la construction du promoteur étudiée et 100 ng du vecteur pGL4.70 (Promega) exprimant la luciférase Rénilla (témoin de transfection). Lors de l'étude de l'effet de facteurs de transcription sur l'activité transcriptionnelle, 100 ng du plasmide exprimant ce facteur ou le vecteur vide correspondant sont co-transfectés avec le promoteur. La transfection des chondrocytes est réalisée au moyen de l'ExGen 500 (Euromedex). L'agent de transfection et les plasmides sont mis en contact dans une solution de NaCl 9‰ (p/v) stérile pendant 10 min à température ambiante avant dépôt sur les cellules en présence de milieu de culture sans SVF. Après 2h, le milieu est remplacé par du DMEM-F12 contenant 10% de SVF. L'activité luciférase est mesurée 24h après transfection. Dans le cas des traitements à l'IL1β, les cellules transfectées sont mises en culture dans le milieu DMEM-F12 contenant 2% SVF toute la nuit puis traitées par IL1β (10 ng/ml) pendant 12h.

#### **II.9. Essai luciférase**

L'essai luciférase est réalisé avec le kit Dual Luciferase Assay (Promega) qui permet d'estimer à la fois l'activité luciférase Firefly du promoteur étudié et l'activité Renilla du contrôle interne. Les cellules sont lysées par addition du tampon "Passive Lysis Buffer" et incubées 15 min à température ambiante sous agitation. Le lysat est centrifugé pendant 30s à 18000g et à 4°C, ensuite. L'activité luciférase Firefly est mesurée par addition du substrat de la luciférase Firefly, la "Beetle luciferin", et la luminescence produite est estimée grâce à un luminomètre (Berthold). Le substrat de la Renilla luciférase, la coelenterazine, est ensuite ajouté et l'activité du contrôle est estimée comme précédemment. L'activité du promoteur étudié est normalisée par rapport à celle du contrôle interne.

#### **II.10. Extraction des protéines**

Les cellules sont rincées deux fois par le PBS puis récoltées dans ce même tampon et centrifugées pendant 10 min à 3000g et à 4°C. Le culot est repris dans un tampon contenant 5 mM HEPES (pH 7,4) et 250 mM de saccharose. Après 3 sonications de 10s chacune dans la

glace, le lysat est centrifugé à 10000 x g pendant 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (1976) et stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

## **II.11. Western Blot**

L'analyse de l'expression protéique est évaluée par la technique SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (1970) suivie d'un électrotransfert des protéines sur membrane et immunorévélation. Brièvement, les échantillons protéiques sont dilués (v/v) dans le tampon de Laemmli (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% (p/v)SDS, 20% (v/v) glycérol, 10% (p/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,004% (p/v) bleu de bromophénol) et bouillis 2 à 3 min avant d'être déposés sur le gel. La migration s'effectue dans une mini-cuve (Novex, Paris, France) sous un ampérage constant de 15 à 20 mA par gel. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon<sup>®</sup>-P (Millipore, Bedford, MA) dans un appareil d'électrotransfert Trans-Blot (Bio-Rad) à un voltage constant de 12V pendant 1h par gel. La membrane est préalablement rincée au méthanol puis équilibrée dans le tampon de transfert (25 mM Tris-Base, 200 mM glycine, 20% (v/v) méthanol). Après électrotransfert, la membrane est tout d'abord saturée dans une solution contenant 3% (p/v) de BSA ou 5% de lait écrémé dans du tampon TBST (*Tris Buffer Saline Tween* : 150 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20, 0,02% (p/v) azide de sodium) puis mise au contact avec l'anticorps spécifique. Après plusieurs rinçages au TBST, la membrane est ensuite incubée avec une solution contenant un second anticorps couplé à la peroxidase. La révélation se fait grâce au LumiGLO<sup>™</sup> (Cell Signaling).

## **II.12. Immunoprécipitation de la chromatine**

### **II.12.1. Préparation de la chromatine**

L'isolement et la précipitation de la chromatine ont été réalisés en utilisant le kit ChiP-it (Active motif) suivant les recommandations du kit. Brièvement, les chondrocytes sont cultivées jusqu'à 80% de confluence, ensuite traités par l'IL1  $\beta$  pendant 4h avant d'être fixés avec une solution de formaldéhyde à 37% dans du milieu de culture DMEM sans sérum pendant 10min à température ambiante. Les cellules sont lavées par une solution de PBS

contenant 125 mM de Glycine, durant 5 min à température ambiante et récupérées par grattage dans la même solution contenant 2  $\mu$  M de PMSF et centrifugation à 720g pendant 10min à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon de lyse contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC) et 2  $\mu$  M de PMSF. Les cellules en suspension sont lysées par plusieurs passages dans un dounce, et le lysat obtenu est centrifugé à 2400 x g pendant 10 min à 4°C. Les noyaux sont ensuite resuspendus dans un tampon de digestion contenant 2% de PIC et 2  $\mu$  M de PMSF. Après une pré-incubation du mélange à 37°C, pendant 5min, le cocktail enzymatique de digestion de la chromatine, est ajouté à raison de 100 U/ml et laissé en contact avec les noyaux pendant 10min à 37°C pour obtenir des fragments de chromatine de 200 à 1000 pb. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,5 M d'EDTA. Une centrifugation de 10min à 12000g et à 4°C permet de récupérer la chromatine fragmentée dans le surnageant, qui est immédiatement congelée à -80°C jusqu'à utilisation.

### **II.12.2. Immunoprécipitation**

L'immunoprécipitation est réalisée avec 10  $\mu$  g d'ADN et 3  $\mu$  g d'anticorps anti-c-Jun ou d'immunoglobulines contrôles non spécifiques. Brièvement, le mélange pour chaque réaction est réalisé dans un volume final de 100  $\mu$ l, contenant 25  $\mu$ l de billes magnétiques portant la protéine G, un volume correspondant à 10  $\mu$ g de chromatine fragmentée, 10  $\mu$ l de tampon d'incubation (ChIP Buffer 1), 1  $\mu$ l de PIC, 3  $\mu$ g d'anticorps anti-c-Jun, ou encore des immunoglobulines contrôles non spécifiques servant de témoin négatif. L'ensemble est ensuite placé à 4°C pendant la nuit sous rotation. Après 3 lavages à l'aide des tampons de ChIP 1 et 2, l'ensemble correspondant aux anticorps ayant reconnu leur protéine spécifique sur la chromatine, et retenu sur les billes magnétiques de protéine G, est élué par 50  $\mu$ l de tampon d'éluion fourni dans le kit commercial, durant 15min à température ambiante. Avant l'analyse par PCR, la chromatine immunoprécipitée est digérée avec 1  $\mu$ g de protéinase K pendant 1h à 37°C. L'ADN ainsi obtenu est utilisé pour l'analyse par PCR. Les amorces utilisées pour l'analyse du site AP1-590 et le site voisin AP1-640 sont : Sens 5'-CGGGGCCAGCCTTTGGGGCTTGCATCC-3, Anti-sens, 5'-AGACCGGTTGGCAGGTGGACACGTGAG-3' (reconnaissent la région -774 à -447 pb du promoteur XT-I). Les amorces utilisées pour l'analyse du site AP1-1020 sont : Sens, 5'-AAAGCACAGCAGACAAGATGCGAAGCA-3, Anti-sens, 5'-TCCTGAAGTCCCCCTTCTGTCTGCAC-3' (reconnaissent la région -1185 à -805 pb du promoteur XT-I). Les Produits de PCR ont été analysés sur un gel d'agarose 2% (p/v).



### **II.13. Pull-Down**

Les protéines nucléaires ont été isolées à l'aide du kit d'extraction nucléaire (*Nuclear extract kit* Active Motif), en suivant les instructions du fabricant. 50µg de protéines nucléaires provenant de chondrocytes traités ou non avec de l'IL1β pendant 12h et 24h ont été incubées avec 100 pmol de sondes biotinylés Sp1-125 (oligonucléotide -137 à -107), SP1-40 (oligonucléotide -55 à -24), AP1-640 (oligonucléotide -654 à -624) ou une sonde contrôle dans un tampon de réaction (0,05 mg/ml de poly(dI-dC) , 10mM de Tris-HCl, pH 7,5 , 0,5mM de dithiothréitol, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 0,5mM , glycérol 4%, NaCl 50 mM). Après 1h d'incubation à température ambiante, 100µL de billes de streptavidine-agarose (Sigma) sont ajoutés au mélange puis placé sous agitation rotative pendant la nuit à 4°C. Les billes sont ensuite récupérées par centrifugation à 12000g pendant 5 min à 4°C et lavées avec 100µL de PBS contenant 0,5% de TritonX-100 et de l'EDTA 5mM. Les protéines liées à la sonde d'ADN sont récupérées par addition de 30µL de tampon de Laemmli et dénaturation à 100°C. L'identification des protéines est effectuée par *Western blot* à l'aide des anticorps spécifiques.

## ***OBJECTIFS DE L'ETUDE***

## *Objectifs de l'étude*

L'arthrose est caractérisée par la perte des constituants de la matrice du cartilage, qui se traduit essentiellement au niveau des PGs par une altération quantitative et qualitative de leurs chaînes de GAGs. Ces perturbations sont initiées et entretenues par les cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL1  $\beta$ , et conduisent à la détérioration progressive et finalement irréversible de la matrice cartilagineuse. En effet, l'IL1  $\beta$  produit une libération accrue de protéases ainsi qu'une inhibition de la biosynthèse des PGs et de leurs chaînes de GAGs, suggérant que cette cytokine pourrait réguler les enzymes de biosynthèse des PGs.

Notre groupe a montré que l'expression du gène de la XT-I, enzyme responsable de l'initiation de la biosynthèse des chaînes de GAGs qui est une étape limitante dans la voie de biosynthèse des PGs, est inhibée au cours du processus de dégradation du cartilage de façon concomitante à la baisse de l'anabolisme des GAGs chez le rat. En revanche, l'expression du gène de la XT-I est induite dans les phases précoces de réparation du cartilage. Cette induction est accompagnée d'une augmentation de la synthèse et du dépôt des PGs. La XT-I pourrait ainsi constituer une cible capable de contrecarrer la perte des GAGs lors des pathologies articulaires comme l'arthrose.

L'objectif de la première partie du travail de thèse est de déterminer l'effet de l'IL1  $\beta$  sur l'expression de la XT-I dans les explants de cartilage et les chondrocytes humains en culture et étudier la régulation du promoteur du gène humain par l'IL1  $\beta$  et identifier les éléments du promoteur responsables et les mécanismes moléculaire impliqués.

La deuxième partie du travail porte sur le syndécan 4 et la voie de signalisation Wnt dans le cartilage

Le syndécan 4 (SDC4) est un PG transmembranaire agissant comme un co-facteur de certains récepteur comme FGF et celui de Wnt. Le rôle du SDC4 est de concentrer et de présenter des ligands tels que Wnt-3a à leurs récepteurs membranaires. Ainsi le SDC4 participe à la régulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire. Au cours des dernières années, un nombre croissant de preuves s'est accumulé concernant la relation entre le SDC4 et l'arthrose. Dans le cartilage, le SDC4 semble être induit, spécifiquement dans les chondrocytes hypertrophiques et son expression est élevée dans le cartilage arthrosique humain et dans des modèles animaux d'arthrose. De façon intéressante, des souris invalidées

pour le gène du SCD4 sont résistantes au développement de l'arthrose comparées aux souris normales.

Différentes études ont montré l'implication du SDC4 dans la voie de signalisation de Wnt. Cette voie est impliquée dans le développement, la croissance et l'homéostasie de différents tissus et organes y compris l'articulation, l'os et le cartilage. En plus de sa fonction dans la chondrogenèse et dans la maturation des chondrocytes, la voie Wnt est également impliquée dans le maintien du phénotype des chondrocytes différenciés et peut donc jouer un rôle crucial dans l'homéostasie du cartilage tout au long de la vie adulte. Le rôle de Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'arthrose est principalement basé sur des observations faites dans des modèles animaux. Cependant, la fonction de la voie Wnt dans les chondrocytes humains et le rôle du SDC4 ont été peu étudiés jusqu'à ce jour.

L'objectif principal de cette partie du travail de thèse est d'étudier la voie de signalisation Wnt-3a dans les chondrocytes primaires humains en culture et le rôle du SDC4 dans cette voie. En particulier, déterminer le rôle de Wnt-3a et du SDC4 sur l'expression des gènes du phénotype chondrocytaire.

Enfin déterminer l'effet de Wnt3-a sur l'anabolisme des PGs en présence et en absence de l'IL-1 $\beta$ .

# ***RESULTATS***

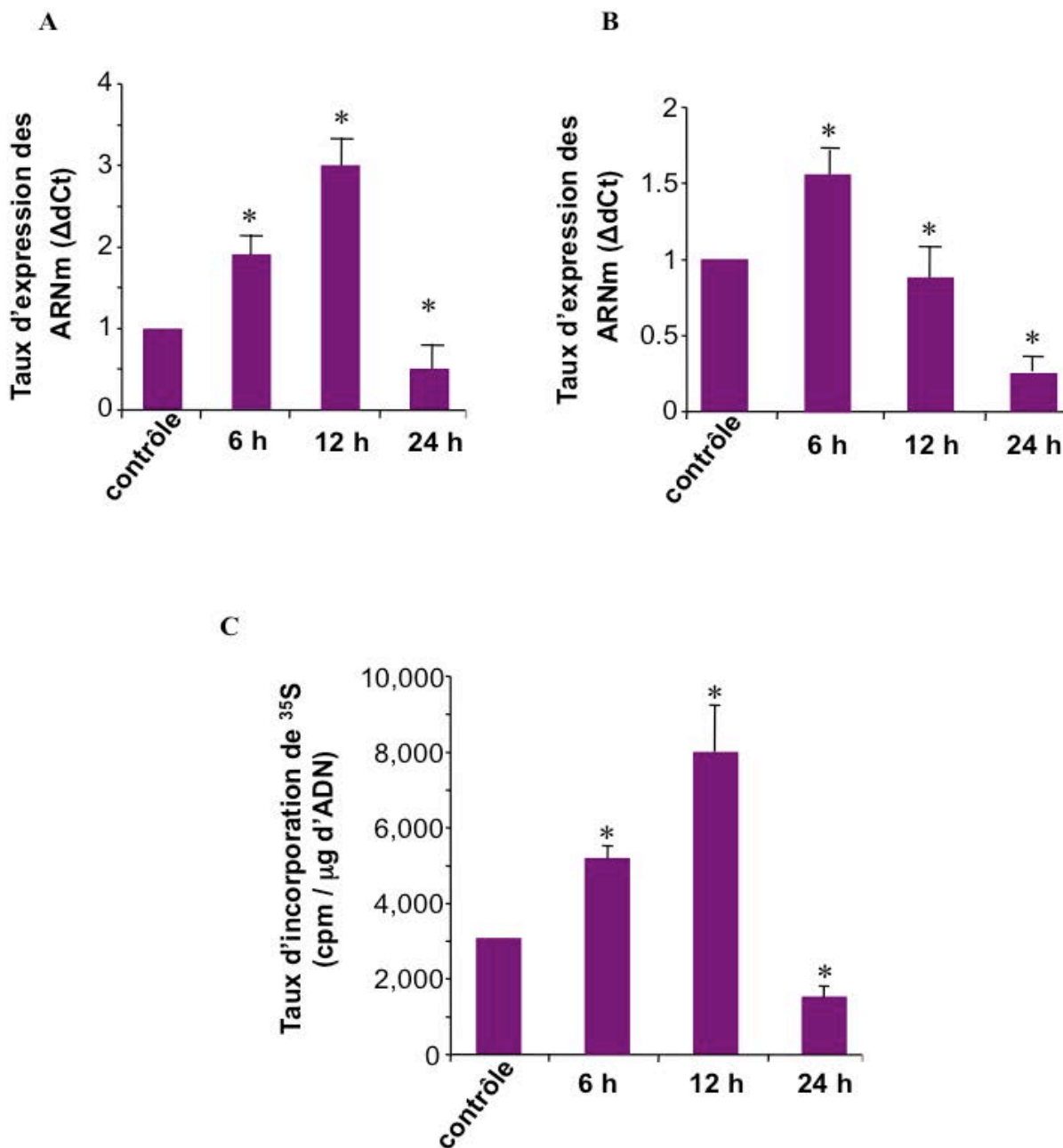
*Régulation de l'expression du gène de la xylosyltransferase-I par l'interleukine 1 $\beta$  dans les chondrocytes humains: mécanismes et impact sur la synthèse des protéoglycanes*

## **I. L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA XT-I EST RÉGULÉE PAR L'IL-1 $\beta$ DANS LES CHONDROCYTES PRIMAIRES HUMAINS**

Afin de comprendre les mécanismes d'altération de la synthèse des PGs médiés par l'IL-1 $\beta$  durant l'arthrose et en particulier le rôle de la XT-I dans ce processus, nous avons étudié l'effet de cette cytokine sur l'expression du gène de la XT-I dans les chondrocytes primaires humains en culture.

Les chondrocytes en culture sont traités à 80 % de confluence avec l'IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) pendant 6h, 12h et 24h et l'expression de la XT-I est analysée par RT-PCR. Les résultats obtenus montrent que le traitement des chondrocytes par l'IL-1 $\beta$  pendant 6h et 12h augmente de 1,8- et 3-fois, respectivement, l'expression de l'ARNm du gène XT-I, tandis qu'une diminution de 50% est produite par la cytokine lorsque les cellules sont traitées pendant 24h (figure 9A). Ceci indique que l'IL-1 $\beta$  régule l'expression du gène de la XT-I d'une manière biphasique : une phase précoce d'induction et une phase tardive d'inhibition.

En parallèle, nous avons analysé l'expression de l'agrécane, PG majeur de la MEC du cartilage et substrat de la XT-I. De façon similaire à l'expression de la XT-I, l'expression de l'agrécane est régulée de manière biphasique par l'IL-1 $\beta$ . En effet, le traitement des chondrocytes avec l'IL-1 $\beta$  pendant 6h augmente de 1,5-fois le taux d'expression des ARNm de l'agrécane, tandis qu'une diminution de 20% est observée à 12h et atteint 63% à 24h, ce qui indique une inhibition précoce de l'expression d'agrécane comparée à celle de la XT-I (figure 9B). L'analyse de l'effet de l'IL-1 $\beta$  sur l'anabolisme des PGs montre une augmentation de 1,6- et 2,6-fois à 6h et 12h, respectivement, et une diminution de 55% après 24h de traitement (Figure 9C). L'augmentation de l'expression de XT-I et de l'agrécane et la stimulation de l'anabolisme des PGs pendant la phase précoce du traitement par IL-1 $\beta$  suggère un effort des chondrocytes pour lutter contre la perte des PGs produite par la dégradation.



**Figure 9 : IL-1 $\beta$  régule l'expression de XT-I et de l'agrécane ainsi que la synthèse des PGs.** Les chondrocytes humains sont traités avec 10 ng/mL IL-1 $\beta$  pendant 6, 12 et 24h. Le taux d'ARNm de la XT-I (A) et de l'agrécane (B) est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les cellules contrôles. (C), la synthèse des PGs est analysée par l'incorporation de sulfate [ $^{35}\text{S}$ ] dans les chondrocytes traités avec l'IL-1 $\beta$  pendant 6, 12 et 24h. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$ S.D de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student (\*,  $p < 0,05$ ).



## II. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DU PROMOTEUR DU GENE HUMAIN DE LA XT-I

Dans le but de définir le mécanisme d'action de l'IL-1 $\beta$ , nous avons étudié la régulation du promoteur du gène XT-I dans les chondrocytes primaires humains.

Pour cela, nous avons cloné la séquence -1740 à +85pb de la région promotrice du gène de la XT-I à partir de l'ADN génomique humain par PCR. L'analyse *in silico* de cette séquence, en utilisant le logiciel TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) a révélé la présence de plusieurs sites de liaison des facteurs de transcription Sp1 et AP-1 qui peuvent être des régulateurs potentiels de l'expression du gène de la XT-I (Figure 10).

Afin d'étudier l'activité promotrice de la séquence clonée et déterminer la séquence minimale active du promoteur, la séquence -1740/+85 et une série de délétions successives de la partie 5' du promoteur (-1230/+85, -850/+85, -450/+85, -270/+85 et -100/+85) ont été sous-clonées en amont du gène luciférase (gène rapporteur) dans le vecteur pGL3-basic et transfectées dans les chondrocytes primaires humains en culture.

Les résultats obtenus montrent que les séquences -100/+85, -270/+85 et -450/+85 présentent de très faibles activités promotrices. Toutefois, lorsque la longueur de la séquence du promoteur est étendue à -850 pb, une forte activité de promoteur est observée suggérant que la séquence entre -850 et -450 pb contient des éléments essentiels pour l'activité basale du promoteur du gène de la XT-I (figure 11A). De même, une forte activité du promoteur est observée pour la construction -1230/+85. Cependant, la séquence -1740/+85 présente une activité promotrice inférieure à celle des séquences -850/+85 et -1230/+85 suggérant la présence d'un élément de régulation négative dans la région entre -850 et -1230 (figure 11A). Ces résultats montrent que la séquence minimale active du promoteur de la XT-I est la séquence -850/+85.

Afin d'identifier les éléments responsables de la régulation de la XT-I par l'IL-1 $\beta$ , l'activité transcriptionnelle des différentes constructions citées ci-dessus a été évaluée en présence de cette cytokine dans les chondrocytes. Les résultats obtenus montrent que le traitement des chondrocytes par l'IL-1 $\beta$  pendant 12h augmente significativement ( $3 \pm 0,2$  fois) l'activité transcriptionnelle de la construction -1740/+85, indiquant que l'activité du promoteur XT-I est régulée par l'IL-1 $\beta$  (figure 11B). L'effet inducteur de l'IL-1 $\beta$  est également observé pour les constructions -1230/+85 ( $2,2 \pm 0,2$  fois) et -850/+85 ( $3 \pm 0,3$  fois), alors qu'il est totalement absent dans le cas de la construction -450/+85. Ces résultats montrent que la délétion de l'extrémité 5' du promoteur jusqu'à -450 pb abolit complètement l'induction du promoteur par

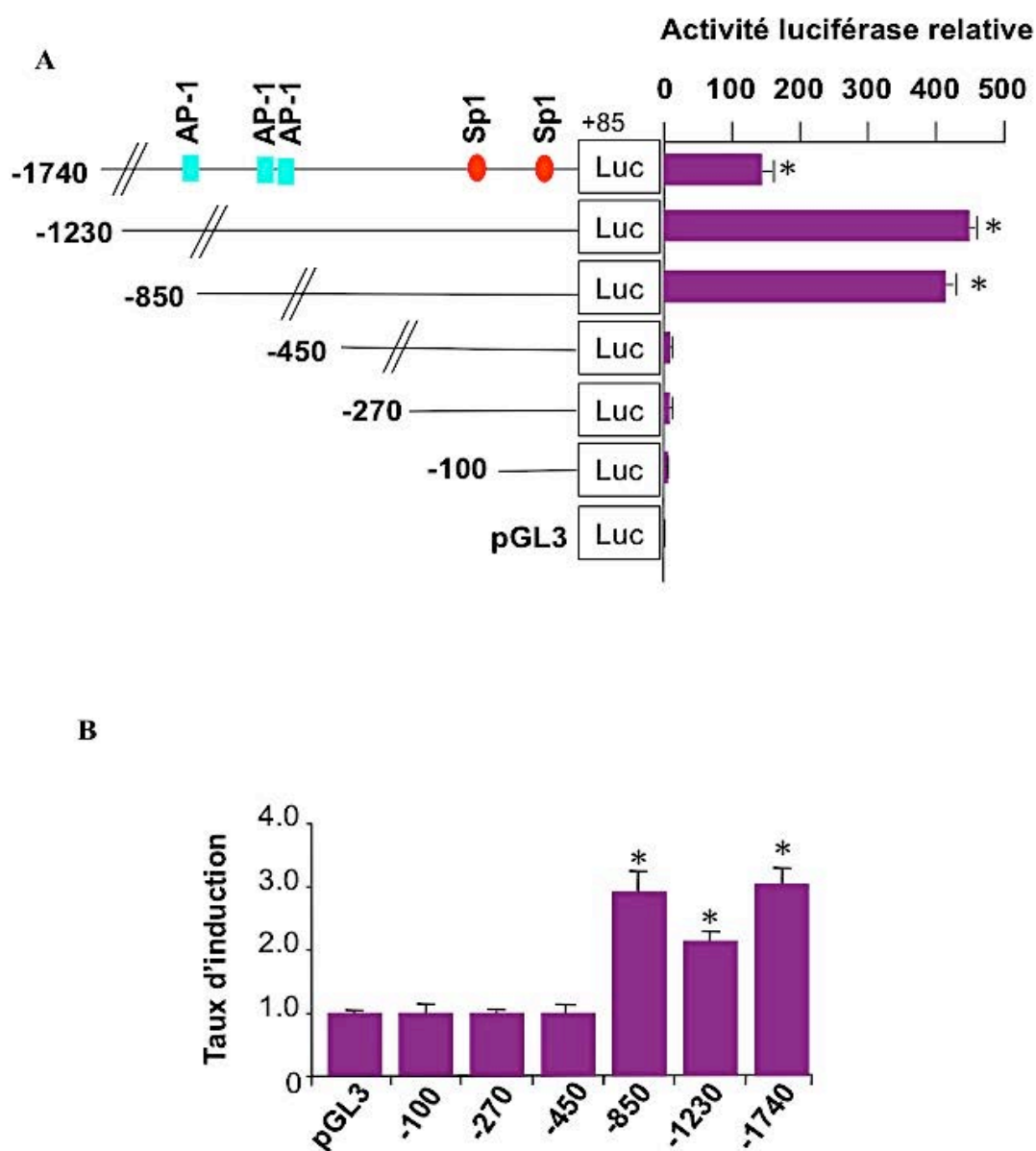
l'IL-1 $\beta$  (Figure 11B). Ils suggèrent que les éléments responsables de l'induction du promoteur par l'IL-1 $\beta$  sont présents en amont de la région -450/+85.

```

-1740 CGTTTTTTAGATGGAGTCTTGCTCTGTAACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGTGATCTCGGCTCACTGC
-1679 AGCCTCTGCCTCCTGGGTCAAGAGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATCAGGGGTGT
-1611 GTGCCACCATGCCCGGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCATGTTGGCAAGGCTG
-1543 ATCTCGAACTTCTGACCTCAGGTGATCCTCCTGTCTTGGCCTCCCAAAGTGTGCGATTACAGGCATG
-1475 AGCCACC CGCCAGGCTATCTCACTATATTTAATGATTAACATCCACATCAGGCTTCTCTAGACC
-1407 TCAGGCTTGTGAAGATGAGATTAACCTCATTACCTTTGGATGCGTGCACCTGGCCCAGTGTCTGA
-1339 CACAAGCTTTGTATTACGGATGCTTGTGGAGTGGATGAAACAATCTCTTCCCACCTCCCTGCCTCATT
-1271 GTCTGATGAGCCTTCATTACACTCCACTTTCTTCTCTTTGTAAATTAGGATGAGGTGAAAAAGCACAG
-1203 CAGACAAGATGCGAAGCATTACGCCAAGTCTCAATTCACAAACTGATTTGATCTGCTGTTGTATTTC
-1135 CCAGAGTGCCTAGGTCCTGATGGGACACCAACGCCATCCCATATGCTCACTGTTCTGCGCTGCTGTGT
-1067 ATAAAGCCCTGGGCAAGAGGACAAGGGAGGGAAAAACCAGAAAGA CTGAGTCAGAGAAGGCTCGGGAT
                                     AP1-1020
-999 GAAATTTGAGTCCATTGGGATCATTCTGCCTAAACGACAGAGGAGAAAGCTTGGGCTCAGGGAGGAGT
-931 CCTCCTCCTCCTGGCTCAAGGTCACCGGACAGACCAGTCAGGATGGGAAAGAATCCACTTTCAAGA
-863 GCAAGACCTGTTTCCCAGGACCTGGGCCCTGTGCAGACAGGAAGGGGACTTCAGGATGGATGGGGA
-795 AAAGGACACGCTGGGAGGCTGCGGGGCCAGCCTTTGGGGCTTGCATCCTGCGAAGTTGAGTAACCTCC
-727 ACGGGTCTCCCTTTTGCCGCTATAACCACCTGCCAAGTGGGTTTGGAGTCTCTTGGCTTGTGAGTCCCTC
-659 AGGGACCAGAGA AGTGACTCAGTGAACACTTAGTACATCGTTGGCACCGGGGATTGTGT GTGATTCAG
                                     AP1-640                                     AP1-590
-591 GAGTCACTCACAGAGCTTGTGCTGATTAATCCAGAAACTCACCCAAAGCCTCCTCCCCACCCCTTCA
-523 AGCCCAGGATGAAGGGATCAGACTGTGGCTCTGACACTCCTGAAATGTTTCTCACGTGTCCACCTGCC
-455 AACCGGTCTGGTACCGACAGAAGATCCCTGGACCGGAACTCCGGGGCTAGGAGCTTCTCCACGCAC
-387 TGCCTCCTTCCAGCGGCCACAGGGAAAACAGGACCTCGGGACCCCTCTCTTCTGACCTCCCTTGG
-319 ATTCTGAGCGGGCCACCCCTCAACCAAAGTCCCTGTTTTCGCGGGCCCTGCCTCTCTTTTTCCGCCCT
-251 TGGGAATTGTCCCCCTCGCCCCCATCTACTCCACTACGTCTGAGGGGTGTCTGTCTTCTCTGAT
-183 CGCCCCACCCCTTCTTTCCCTCCTCTTTTCTCCT CGGCTCCTCCCCACGGCCCCGCCCTCTC
                                     sp-1-125
-115 CGCCTCGGCCCGCTCCCCCGGCGCCTTCCCCATCACCCTCCCTCCAGCGGGACAGGGGTGTGGG
                                     +1
-47 GAG GGGGGGCGGGCGGGGCCCCGAGCGGGAGCCCGAGCGGCAGCCGGGGGGCGGGGAGCTGCGGGG
                                     sp-1-40
+22 AGCGGGGGGGCGGCCGGAGCGTGC CGGGTCCCCGCGCCTCGCTCGCCGGCCGCGCTCCGAAGATG

```

**Figure 10 :** La séquence nucléotidique de la région 5' du gène XT-I humain. La région promotrice du gène XT-I est clonée à partir de l'ADN génomique humain et séquencée. Le site d'initiation de la transcription (+1) est indiqué par une flèche. Le codon d'initiation de la traduction ATG est encadré. Les séquences Sp1 et AP-1 sont soulignées et en caractères gras.



**Figure 11 : Effet des délétions successives en 5' sur l'activité promotrice.** *A.* Les plasmides pGL3-basic contenant les séquences correspondant aux fragments (-1740/+85, -850/+85, -450/+85, -270/+85 et -100/+85 pb du promoteur ont été transfectés dans les chondrocytes primaires en culture. L'activité de chaque construction a été mesurée par luminescence. L'activité luciférase relative est le rapport de l'activité du plasmide contenant le promoteur sur l'activité du vecteur pGL3-Basic après normalisation. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test *t* de Student. *B.* Les chondrocytes humains transfectés avec les différentes constructions ont été traités par l'IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)

ou du PBS (contrôle) pendant 12h. L'activité luciférase relative a été déterminée comme décrite ci-dessus. Le taux d'induction est le rapport : activité luciférase relative dans les chondrocytes traités par IL-1 $\beta$  sur l'activité luciférase relative dans les chondrocytes traités par du PBS (contrôle). Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .

### **III. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION Sp1 RÉGULE L'ACTIVITÉ BASALE DU PROMOTEUR DE LA XT-I HUMAINE**

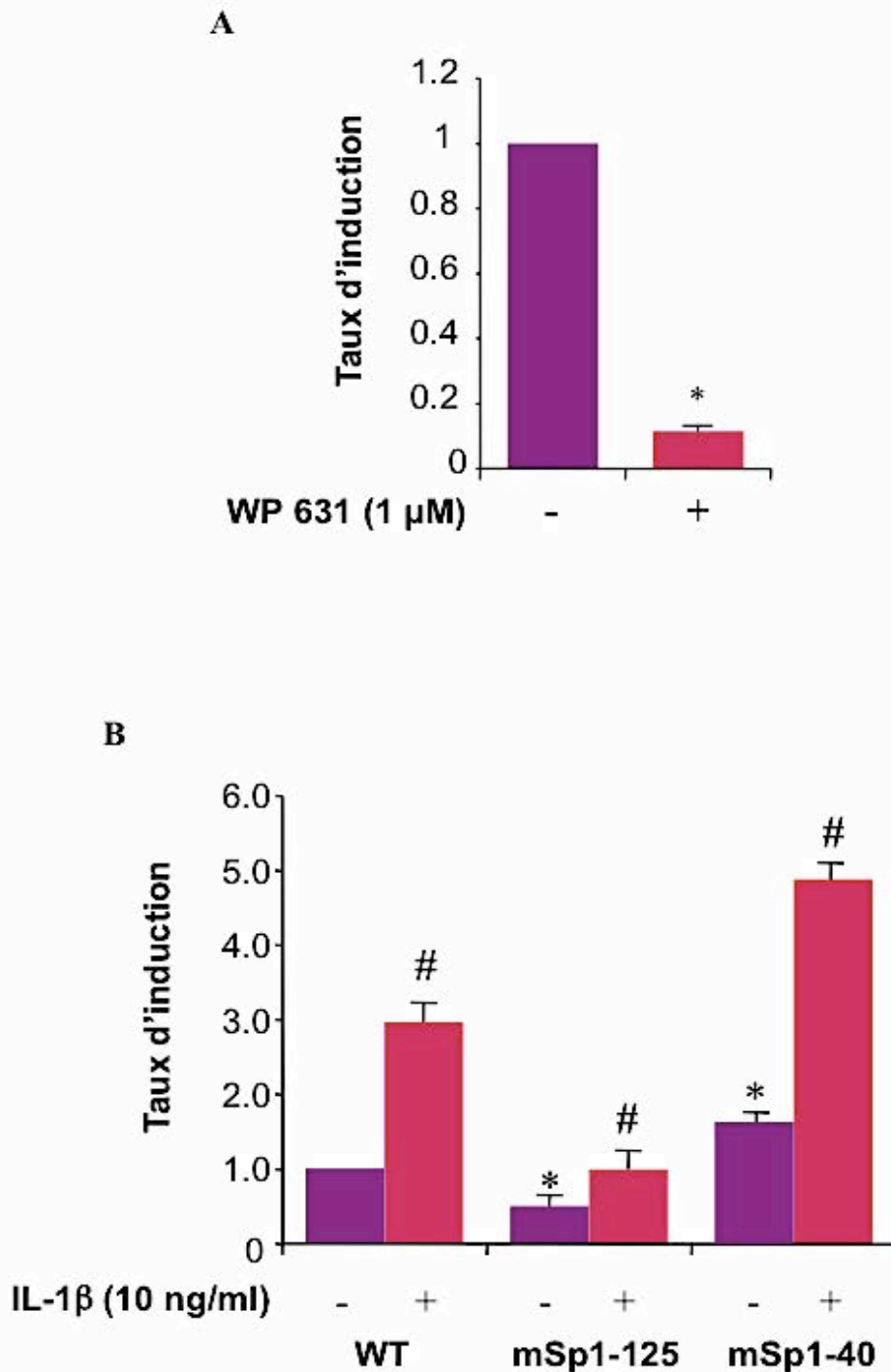
La séquence -1740/+85 du promoteur de la XT-I renferme des sites de fixation des facteurs de transcription Sp1. Ces sites sont présents à la position -125pb (Sp1-125) et -40pb (Sp1-40) (figure 10). Afin d'étudier le rôle potentiel du facteur Sp1 dans l'activité du promoteur XT-I, nous avons utilisé le bisanthracycline (WP631), agent intercalant se fixant spécifiquement sur les sites Sp1 et qui de ce fait inhibe la fixation du facteur Sp1. Le traitement des chondrocytes transfectés par le promoteur -1740/+85 par le WP631 à une concentration de 1  $\mu$ M inhibe de manière significative (90%) l'activité du promoteur (figure 12A), suggérant un rôle crucial des facteurs Sp1 dans l'activité basale de promoteur de la XT-I.

Afin de déterminer l'importance de chacun des sites Sp1, Sp1-125 et -40pb Sp1-40 dans l'activité basale du promoteur, nous avons généré des mutants de chacun de ces sites par mutagenèse dirigée et nous avons déterminé l'effet de ces mutations sur l'activité du promoteur. La figure 12B montre que la perturbation de la séquence Sp1-125 entraîne une perte de plus de 60% de l'activité du promoteur, ce qui indique que le site Sp1-125 est critique pour l'activité basale du promoteur. En revanche, la mutation du Sp1-40 stimule l'activité promotrice de la XT-I de 66%, ce qui suggère que ce site pourrait jouer un rôle dans la répression ou l'atténuation de l'expression du gène XT-I (figure 12B).

### **IV. LES SITES Sp1 NE SONT PAS IMPLIQUES DANS L'INDUCTION DU PROMOTEUR DE LA XT-I PAR L'IL-1 $\beta$**

Afin d'évaluer l'implication potentielle des sites Sp1 dans l'induction de l'activité du promoteur de la XT-I par l'IL-1 $\beta$ , nous avons transfecté les cellules chondrocytaires avec la

séquence du promoteur -1740/+85 mutée au niveau des sites Sp1-125 et SP1-40, respectivement. Les résultats obtenus montrent clairement qu'aucune des mutations n'empêche l'effet stimulant de la cytokine (figure 12B). En effet, le promoteur muté au niveau de chacun des sites Sp1 présente un niveau d'induction par l'IL-1 $\beta$  (3 fois) similaire à celui du promoteur sauvage (Figure 12B). Ainsi, ces résultats montrent que les sites Sp1 ne sont pas impliqués dans l'induction du promoteur par cette cytokine.



**Figure 12 : Analyse du rôle des sites Sp1 dans l'activité basale du promoteur et son induction par l'IL-1 $\beta$ .** A Les chondrocytes transfectés par la séquence -1740/+85 du promoteur de la XT-I ont été traités par 1  $\mu$ M de WP631 ou le DMSO (contrôle) pendant 12h. Le taux d'induction est le rapport de l'activité du plasmide contenant le promoteur sur l'activité du vecteur pGL3-Basic après normalisation. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est

évaluée en utilisant le test *t* de Student. \* =  $p < 0.05$ , # =  $p < 0.05$ . **B.** Analyse de l'effet des mutations ponctuelles des sites *Sp1* sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de la *XT-I*. L'activité luciférase relative de la séquence -1740/+85 du promoteur sauvage et mutées (*mSp1-125* et *mSp1-40*) ont été mesurées dans les chondrocytes traités pendant 12h par *IL-1 $\beta$*  (10 ng/ml) ou par le PBS (contrôle). Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test *t* de Student (\*,  $p < 0.05$ ; #,  $p < 0.05$ ).

\* : par rapport à la séquence WT

# : par rapport aux cellules non traités

## **V. L'ACTIVITÉ BASALE ET L'ACTIVITÉ INDUITE PAR L'IL-1 $\beta$ SONT MEDIATEES PAR AP-1**

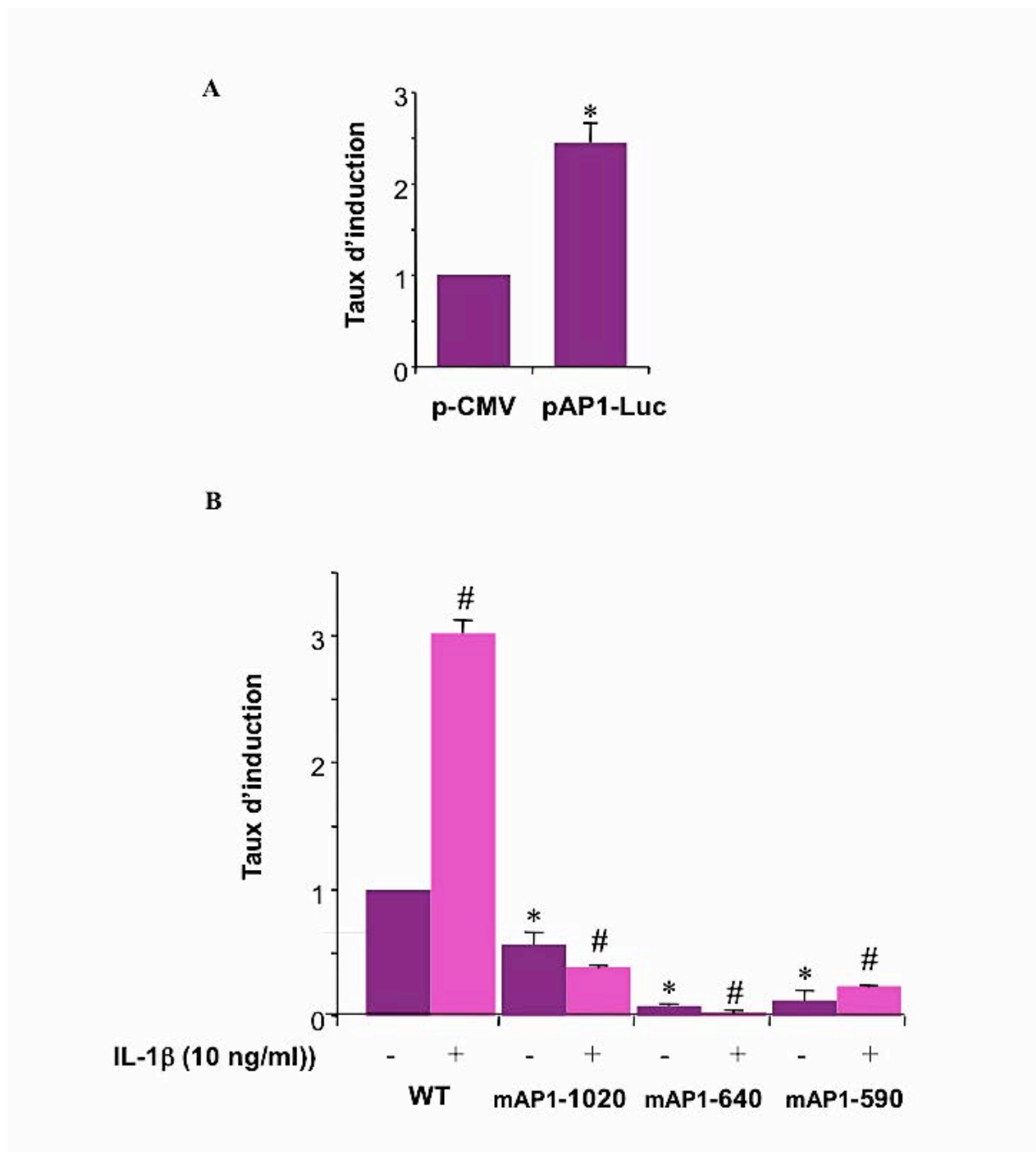
Plusieurs travaux ont montré que la cytokine proinflammatoire *IL-1 $\beta$*  active la voie de signalisation AP-1 dans les chondrocytes. Ceci a été confirmé dans notre cas par l'utilisation du plasmide rapporteur pAP-1-Luc contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur renfermant plusieurs copie de la séquence consensus de fixation du facteur AP-1. En effet, le traitement des chondrocytes transfectés par pAP-1-Luc par l'*IL-1 $\beta$*  augmente de trois fois l'activité luciférase par rapport aux chondrocyte non traités (figure 13A).

La séquence -1740/-85 du promoteur *XT-I* contient trois sites potentiels de fixation du facteur de transcription AP-1, qui sont situés en positions : -1020 (AP-1-1020), -640 (AP-1-640), et -590 (AP-1-590) (figure 10). Afin d'étudier l'implication potentielle de ces sites dans l'activité basale et/ou dans la réponse du promoteur à l'*IL-1 $\beta$* , nous avons analysé l'effet de leur mutation respective sur l'activité basale et l'activité induite par l'*IL-1 $\beta$* .

La mutation du site AP-1-590 (*mAP-1-590*) ou AP-1-640 (*mAP-1-640*) réduit de façon drastique (81 et 90%, respectivement) l'activité basale du promoteur, tandis que la mutation du site AP-1-1020 (*mAP-1-1020*) produit une inhibition modérée (36%) (figure 13B). Ces résultats suggèrent qu'AP-1-590 et AP-1-640 sont critiques pour l'activité basale du promoteur du gène *XT-I* humain.

Nous avons ensuite analysé l'effet des mutations des sites AP-1 sur l'induction de l'activité du promoteur par l'*IL-1 $\beta$*  après transfection des chondrocytes par les séquences mutées et traitement avec la cytokine. Les résultats obtenus montrent clairement que la mutation du site AP-1-590 n'empêche pas l'effet stimulateur de l'*IL-1 $\beta$*  sur le promoteur de la *XT-I* (figure

13B). Malgré la réduction importante de l'activité basale, l'IL-1 $\beta$  induit significativement (2 fois) l'activité du promoteur. Cependant, la mutation du site AP-1-640 ou AP-1-1020 abolit complètement l'effet stimulateur de l'IL-1 $\beta$  (figure 13B). Ces résultats suggèrent que l'induction de l'activité de promoteur de la XT-I par l'IL-1 $\beta$  est médiée par les deux sites de fixation des facteurs AP-1, AP-1-640 et AP-1-1020.





**Figure 13 : Le facteur de transcription AP-1 régule l'activité basale et l'induction par IL-1 $\beta$  du promoteur de la XT-I.** *A. Les chondrocytes primaires transfectés par le plasmide pAP-1-Luc (pCMV-(AP-1)<sub>3</sub>) ont été traités par l'IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) ou par le PBS (contrôle) pendant 12h. Le taux d'induction de l'activité luciférase relative a été calculé par rapport aux cellules transfectés par le plasmide contrôle p-CMV. B. Analyse de l'effet des mutations ponctuelles des sites AP-1 sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de la XT-I. L'activité luciférase relative de la séquence -1740/+85 du promoteur sauvage et muté (mAP-1-1020, mAP-1-640, et mAP-1-590) ont été mesurées dans les chondrocytes traités pendant 12h par IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) ou par le PBS (contrôle). Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student (\*,  $p < 0.05$ ; #,  $p < 0.05$ ).*

## **VI. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION AP-1 EST UN TRANSACTIVATEUR DU PROMOTEUR DE LA XT-I**

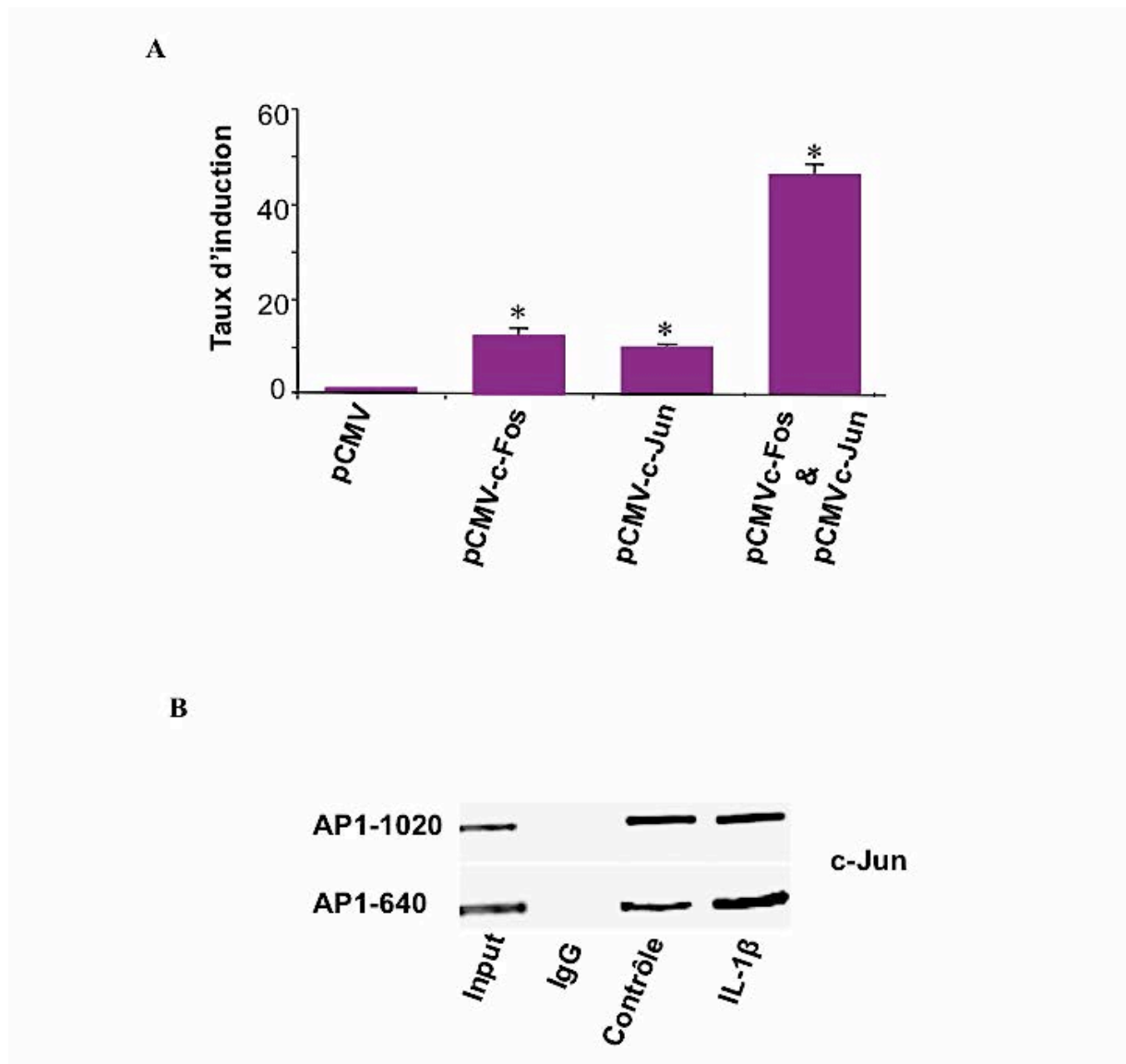
Pour s'assurer de l'importance du facteur de transcription AP-1 dans l'activation du promoteur XT-I, nous avons co-transfecté la séquence -1740/-85 du promoteur avec pCMV-c-Jun, pCMV-c-Fos et les deux vecteurs à la fois, respectivement, et nous avons analysé leurs effets sur l'activité du promoteur. Le plasmide pCMV vide est utilisé comme contrôle. La figure 14 montre clairement que la surexpression de c-Fos et c-Jun dans les chondrocytes primaires stimule l'activité du promoteur de 11 et 10 fois, respectivement. La surexpression simultanée de c-Fos et c-Jun produit une forte activation (47 fois) du promoteur humain de XT-I (figure 14A). Ces résultats montrent que le facteur de transcription AP-1<sup>c-Jun/c-Fos</sup> est un puissant transactivateur du promoteur humain de XT-I.

## **VII. AP-1 ENDOGENE SE LIE DIRECTEMENT AUX SITES AP-1 AU NIVEAU DU PROMOTEUR DU GENE DE LA XT-I**

Suite aux résultats précédents, nous avons voulu savoir si le facteur de transcription AP-1 endogène se lie directement à la région du promoteur de la XT-I et si le traitement à l'IL-1 $\beta$  affecte sa liaison à l'ADN. Pour cela, nous avons examiné la liaison de c-Jun endogène aux sites AP-1 du promoteur par la technique de CHIP. Les résultats obtenus montrent que le fragment du promoteur de la XT-I (-774 à -447) comportant les sites AP-1-640 et AP-1-590

est détectés à partir de la chromatine précipitée avec un anticorps c-Jun endogène, mais pas avec les IgG contrôle. Des résultats similaires ont été observés pour le fragment du promoteur -1185 à -805 comportant le site AP-1-1020 (figure 14B). L'ensemble de ces résultats indique que le facteur de transcription AP-1 se lie directement à la région promotrice de la XT-I ex vivo.

De façon intéressante, la liaison de c-Jun au fragment du promoteur comportant les éléments de réponse AP-1-640 et AP-1-590 est significativement augmentée dans les cellules traitées par l'IL-1 $\beta$  (figure 14B), indiquant que l'activité de liaison du facteur de transcription AP-1 au promoteur de la XT-I est stimulée par cette cytokine.



**Figure 14 : c-Fos et c-Jun induisent l'activité du promoteur de la XT-I et l'IL-1 $\beta$  augmente le recrutement du facteur de transcription AP-1 au niveau du promoteur.** **A.** *Les chondrocytes primaires ont été transfectés par la séquence -1740/+85 du promoteur de la XT-I et par des plasmides pCMV-c-Fos et pCMV-c-Jun. Le p-CMV vide est utilisé comme contrôle. Le taux d'induction est calculé par rapport à l'activité luciférase des cellules transfectées par le vecteur pCMV-vide. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .* **B.** *Les chondrocytes primaires ont été traitées par l'IL-1 $\beta$  (10ng/ml) pendant 4h. Les ChIP ont été réalisées avec un anticorps anti-c-Jun ou bien un anti-IgG de lapin (contrôle). Un gel coloré par GelRed représentatif de trois expériences indépendantes est montré dans cette figure.*

## **VIII. L'ACTIVATION DU PROMOTEUR DE LA XT-1 PAR L'IL-1 $\beta$ EST MEDIÉE PAR LES KINASES JNK ET p38 MAPK**

Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans l'activation du promoteur XT-I par l'IL-1 $\beta$ , nous avons analysé l'état de phosphorylation de JNK, ERK et p38 dans les chondrocytes primaires humains avant et après traitement par l'IL-1 $\beta$  par immunoblot. La figure 15B montre que le traitement par l'IL-1 $\beta$  induit une phosphorylation importante des kinases ERK et p38 après 5min de traitement. Le niveau de phosphorylation atteint son pic à 15min et persiste pendant 2h après le traitement. La phosphorylation de JNK est importante à 15min, elle atteint un pic à 30 min, et elle est fortement atténuée après 1h de traitement. La cytokine augmente également la phosphorylation de c-Jun après 15min de traitement et cette augmentation persiste après 2h de traitement. Ces résultats montrent que l'IL-1 $\beta$  est capable d'activer plusieurs voies de signalisation dans les chondrocytes.

Afin d'identifier quelle(s) voie(s) est responsable de la médiation de l'effet de l'IL-1 $\beta$ , des inhibiteurs pharmacologiques des kinases PKC (GÖ9676), ERK1/2 (PD184161), JNK (SP60012) et p38 (SB203580) ont été utilisés. Ces inhibiteurs sont ajoutés 30 min avant le traitement des chondrocytes par IL-1 $\beta$ . La figure 15A montre que l'inhibiteur de PKC (GÖ9676) et d'ERK1/2 (PD184161) n'affectent pas l'induction de l'activité du promoteur de la XT-I par la l'IL-1 $\beta$ . En revanche, l'inhibiteur de JNK (SP60012) et de p38 (SB203580) abolit l'activation du promoteur par l'IL-1 $\beta$ . Ces résultats montrent également que l'inhibition de MEK1/2 et de JNK réduit l'activité basale du promoteur de 40% et 25%, respectivement

(figure 15A). Ces données indiquent que JNK et p38 MAPK, mais pas PKC et ERK jouent un rôle essentiel dans l'activation du promoteur XT-I par l'IL-1 $\beta$ . Elles montrent aussi l'importance de MEK1/2 et de JNK dans l'activité basale du promoteur. Il est intéressant de noter que l'analyse de la toxicité cellulaire des inhibiteurs de MAPK, en utilisant un test MTT, montre que l'inhibiteur de PKC, le GÖ6976 produit 25% de létalité alors que les inhibiteurs de JNK, ERK, p38 et Sp1 n'ont pas d'effet significatif sur la viabilité des chondrocytes.

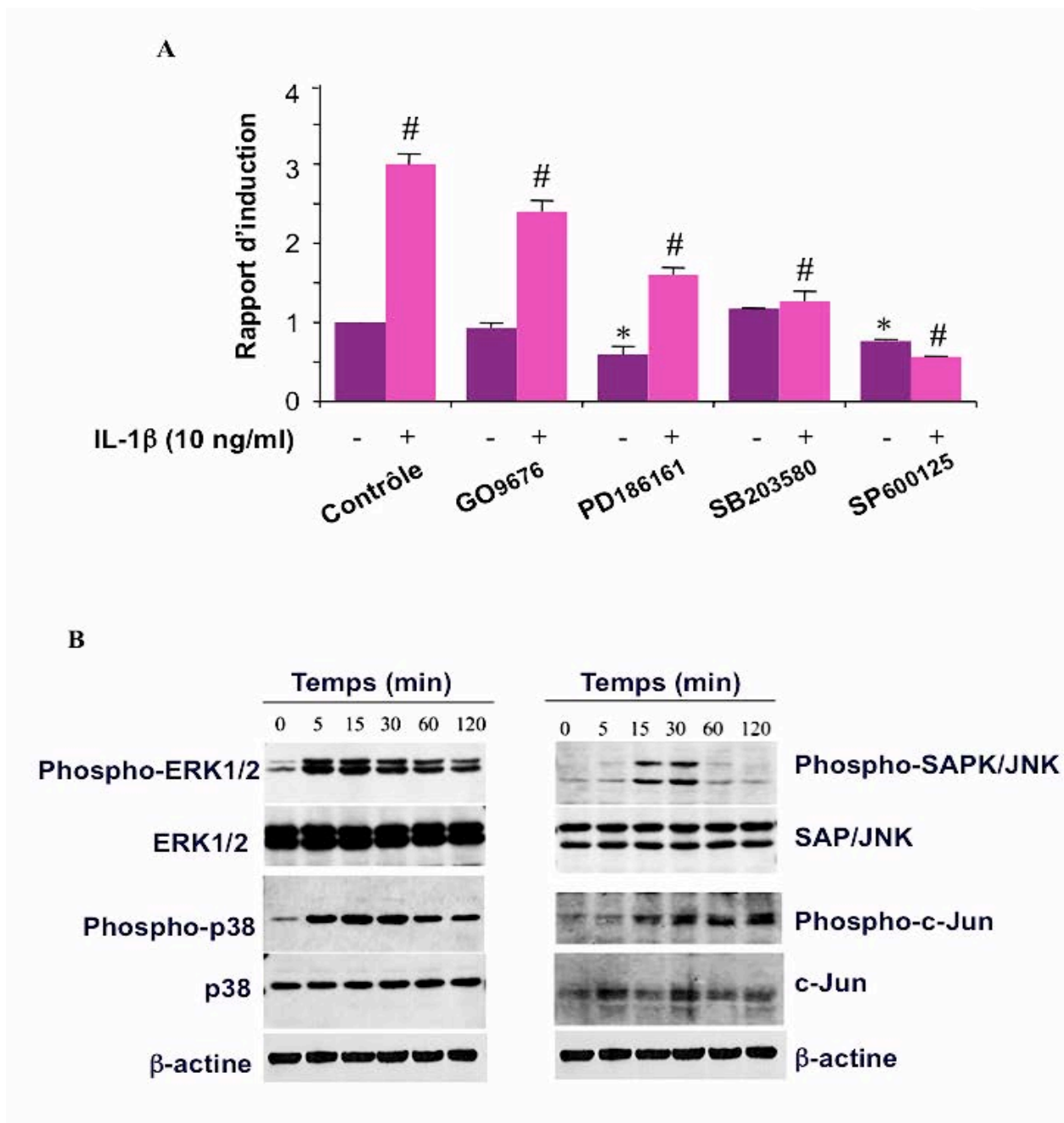


Figure 15: L'induction de l'activité du promoteur de la XT-I par l'IL-1 $\beta$  est SAPK/JNK

**et p38 dépendante. A.** Les chondrocytes transfectés par la séquence -1740/+85 du promoteur XT-I ont été incubés avec un des inhibiteurs spécifiques des kinases PKC (GÖ9676), ERK1/2 (PD186161), p38 (SB203580), ou SAP/JNK (SP600125) pendant 30min. Le DMSO a été utilisé comme contrôle. Les chondrocytes sont ensuite traités par IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) ou le PBS (contrôle) pendant 12h. Le rapport d'induction est déterminé par le rapport de l'activité luciférase relative dans les chondrocytes traités par IL-1 $\beta$  par rapport à l'activité luciférase relative dans les chondrocytes traitées par PBS (contrôle). L'effet propre des inhibiteurs a été également évalué sur l'activité basale du promoteur. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ . **B.** Les chondrocytes primaires ont été traités par l'IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) pendant 0 à 120 minutes, les protéines ont été préparées et séparées par SDS-PAGE. La  $\beta$ -actine est utilisée pour normaliser la quantité des protéines dans chaque échantillon. L'immunoblot est réalisé à l'aide d'anticorps qui reconnaissent soit la forme phosphorylée soit les formes non phosphorylées pour chacune des kinases ERK1/2, p38, SAP/JNK et c-Jun.

## **IX. Sp1 ACTIVE ET Sp3 INHIBE L'ACTIVITÉ PROMOTRICE DE LA XT-I**

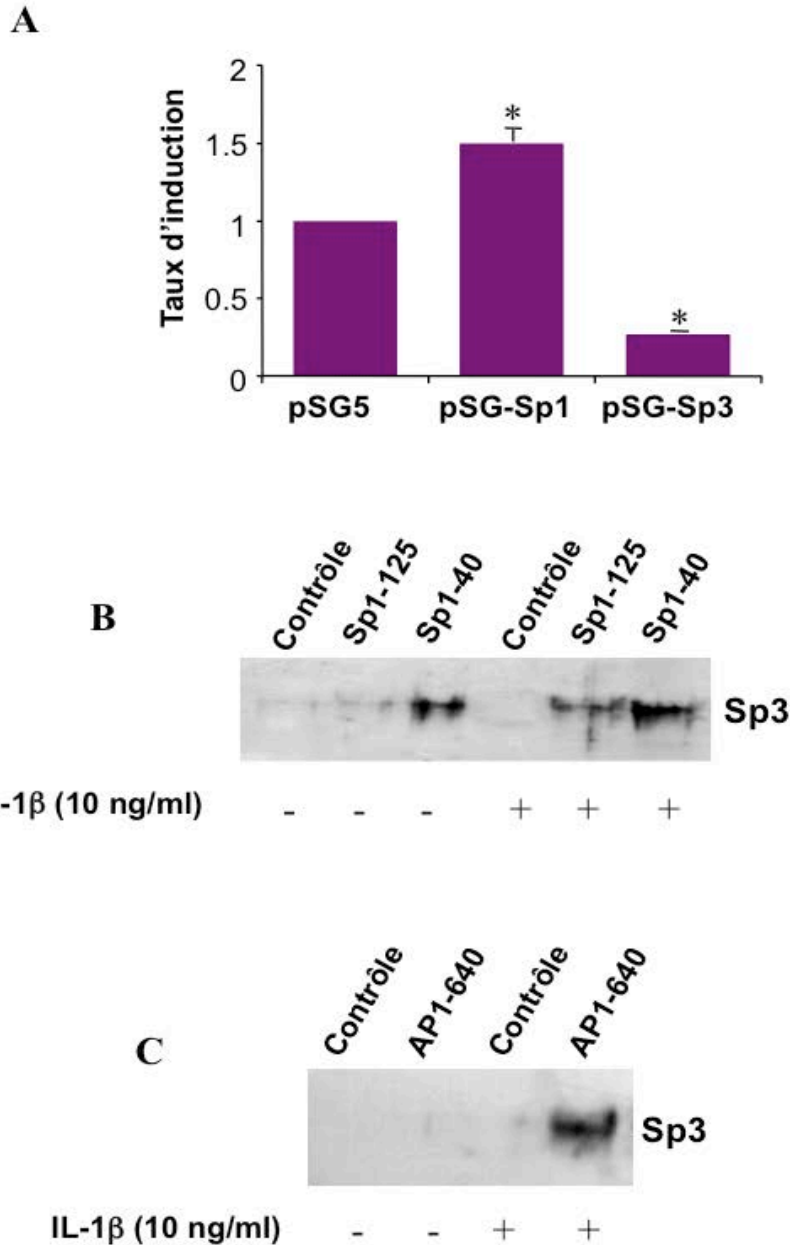
Sp1 et Sp3 sont des protéines transcriptionnelles ubiquitaires, elles sont hautement homologues et présentent une concurrence pour les mêmes sites sur l'ADN. Après avoir démontré l'importance des sites de liaison Sp1 (Sp-40 et Sp-125) dans l'activité du promoteur XT-I, nous avons examiné les effets des facteurs Sp1 et Sp3 sur l'activité transcriptionnelle du promoteur. Les chondrocytes ont été co-transfectés par la séquence -1740/+85 du promoteur de la XT-I et les plasmides pSG5-Sp1 ou pSG5-Sp3 exprimant les facteurs de transcription Sp1 et Sp3. pSG5 natif est utilisé comme contrôle. Les résultats obtenus montrent que la surexpression de Sp1 dans les chondrocytes induit de 1,6-fois l'activité du promoteur XT-I (figure 16A). En revanche, la surexpression de Sp3 provoque une forte réduction (4,4 fois) de l'activité promotrice (figure 16A) indiquant que Sp3 agit comme un répresseur transcriptionnel du promoteur de la XT-I.

## **X. L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE LA XT-I PAR L'IL-1 $\beta$ DURANT LA PHASE TARDIVE EST MEDIATEE PAR Sp3**

Sachant que Sp3 agit comme un répresseur de l'activité du promoteur XT-I, nous voulions étudier son implication dans l'inhibition de la transcription du gène XT-I par l'IL-1 $\beta$  après traitement des chondrocyte par cette cytokine pendant 24h. Nous avons donc évalué la liaison du facteur de transcription Sp3 aux sites Sp1 du promoteur de la XT-I par la technique du "pull-down assay" en utilisant des sondes oligonucléotidiques biotinylées. Le "pull-down" a été réalisé en utilisant des extraits nucléaires préparés à partir de cellules chondrocytaires traitées ou non par l'IL-1 $\beta$  pendant 24h et avec des sondes biotinylées contenant les séquences des sites Sp-125 et Sp-40, respectivement. La révélation a été réalisée par des anticorps anti-Sp1 et anti-Sp3, respectivement. Les résultats obtenus montrent que le facteur Sp3 se lie au site Sp-40 dans les extraits de cellules non traitées par l'IL-1 $\beta$ , suggérant un rôle dans l'atténuation de l'activité basale du promoteur précédemment démontré pour ce site (figure 16B).

De plus, les résultats montrent que le traitement par l'IL-1 $\beta$  conduit au recrutement de Sp3 sur le site Sp-125 et augmente son activité de liaison sur le site Sp-40 (Figure 16B). Ceci indique que l'inhibition de l'expression de la XT-I par IL-1 $\beta$  est médiée par la liaison du facteur inhibiteur Sp3 sur les sites Sp-125 et Sp-40 du promoteur.

Nous avons ensuite analysé la présence potentielle d'interactions entre Sp3 et AP-1 par la technique du "pull-down assay" en utilisant une sonde biotinylé contenant la séquence du site AP-1-640 et des extraits nucléaires de chondrocytes traités ou non avec l'IL-1 $\beta$  pendant 24h. Les résultats obtenus montrent que Sp3 se fixe à la sonde AP-1-640 uniquement en présence des extraits nucléaires des cellules traitées par l'IL-1 $\beta$ , mais pas avec les extraits nucléaires des cellules non traitées (Figure 16C) indiquant que Sp3 interagit avec AP-1 suite à au traitement des cellules avec la cytokine, IL-1 $\beta$ . Ces résultats montrent que l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur l'expression des gènes XT-I est médié par la liaison de Sp3 aux sites Sp1 et son interaction avec le facteur de transcription AP-1.



**Figure 16 : Rôle des facteurs Sp1 et Sp3 dans la régulation du promoteur de la XT-I.** **A.** Les chondrocytes primaires sont co-transfectés par la séquence -1740/+85 du promoteur de la XT-I et les vecteurs d'expression pSG5 natif (contrôle), pSG-Sp1, ou pSG-Sp3. Le taux d'induction est calculé par rapport à l'activité luciférase des cellules transfectées par le vecteur pSG5 natif. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ . **B.** Les extraits nucléaires des chondrocytes primaires traités par IL-1  $\beta$  (10 ng/ml) ou par le PBS (contrôle) pendant 4h ont été incubés (B) avec les amorces biotinylées Sp1-125 ou Sp1-40, **C** avec l'amorce AP1-640. Une séquence non appariée a

*été utilisée comme contrôle. La réaction de pull-Down a été effectuée comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes en utilisant un anticorps anti-Sp3.*



*Le syndécan 4 régule la voie de signalisation  
non canonique de Wnt-3a et la  
dédifférenciation chondrocytaire*

## **I. WNT-3A ACTIVE LES VOIES NON CANONIQUES VIA LE SDC4.**

Il a été montré que l'expression du SDC4 est augmentée dans les chondrocytes hypertrophiques et dans le cartilage arthrosique. En outre, les souris invalidées pour le gène du SDC4 sont résistantes au développement de l'arthrose. D'autre part, les travaux sur xenopus ont montré que le SDC4 joue un rôle essentiel dans la signalisation de Wnt en interagissant avec le récepteur FRZ et les protéines Dvl. Cependant, le rôle du SCD4 dans la signalisation de Wnt-3a et dans le processus arthrosique dans le cartilage humain n'est pas encore élucidé.

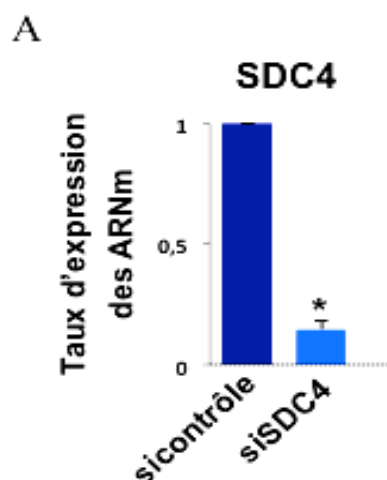
Afin d'étudier le rôle potentiel de SDC4 dans la régulation des voies de signalisation de Wnt dans les chondrocytes primaires humains, son expression a été inhibée par la technique d'ARN interférence. Dans un premier temps, l'efficacité des siRNA dirigés contre le SDC4 (siSDC4) a été testée. Les chondrocytes en culture ont été transfectés par les siSDC4 ou les si-contrôle, le taux d'expression des ARNm du SDC4 et de RPS29 a été quantifié 72h après la transfection par RT-PCR en temps réel. Les résultats obtenus montrent que le taux d'ARNm du SDC4 est réduit de 85% après transfection des chondrocytes par les siSDC4, alors que la transfection par les siRNA contrôle n'induit pas de changement significatif (Figure 17A). Ces résultats montrent que les siSDC4 sont efficaces.

Nous avons ensuite analysé l'effet de l'inhibition du SDC4 sur les voies de signalisation induites par Wnt-3a. Les chondrocytes non transfectés ou transfectés par le siSDC4 ou le si-contrôle ont été traités par Wnt-3a ou le PBS (contrôle) pendant 2h et l'analyse des voies de signalisation canoniques et non canoniques de wnt a été réalisée par immunoblot.

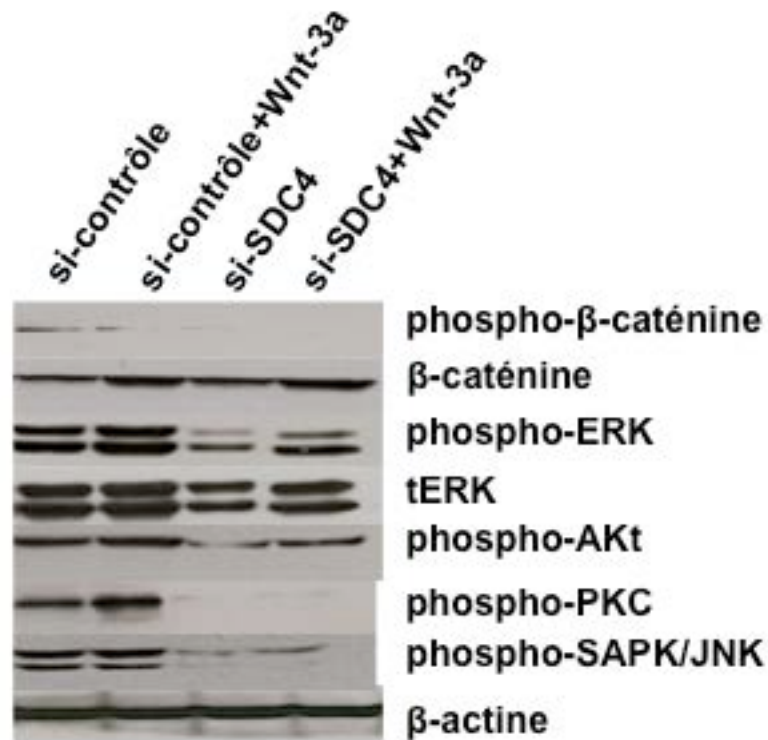
L'analyse par Immuno-blot des extraits protéiques des cellules traitées par Wnt-3a montre une induction de la phosphorylation de ERK1/2, de PKC et de SAPK/JNK par rapport aux chondrocytes traités par le PBS contrôle (figure 17B) indiquant l'activation de voies non canoniques. Afin de vérifier si la voie canonique dépendante de la  $\beta$ -caténine est activée parallèlement à la voie non canonique, nous avons analysé par immunoblot la  $\beta$ -caténine phosphorylée et non phosphorylée. Nous avons observé que le traitement par Wnt-3a inhibe la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine et induit son accumulation. Ces résultats montrent pour la première fois que le traitement des chondrocytes primaires par Wnt-3a induit la phosphorylation des protéines kinase C, des MAPK, ERK1/2 et de SAPK/JNK en plus de l'activation de la  $\beta$ -caténine.

De façon intéressante, l'analyse de l'effet de l'inhibition de l'expression du SCD4 sur les

voies de signalisation dans les chondrocytes montre que cette inhibition induit la disparition des formes phosphorylées de PKC et de SAPK/JNK dans les extraits protéiques des cellules transfectées par le siSDC4 mais pas dans les extraits de cellules transfectées par le si-contrôle (figure 17B). On note également une diminution significative des formes phosphorylées de ERK1/2 et de Akt dans les extraits protéiques des cellules transfectées par le si-SDC4 (figure 17B). La quantité de  $\beta$ -caténine semble ne pas varier dans les extraits protéiques des chondrocytes transfectées par le siSDC4 par rapport aux cellules transfectées par le si-contrôle. D'autre part, l'analyse des extraits protéiques après traitement par Wnt-3a montre que ce dernier n'est plus capable d'induire la phosphorylation de PKC et de SAPK/JNK dans les cellules transfectées par le siSDC4, et que l'activation de ERK1/2 et de Akt est diminuée d'une façon significative dans ces cellules par rapport aux cellules transfectées par le si-contrôle (figure 17B). D'autre part, le traitement par Wnt-3a induit l'accumulation de la  $\beta$ -caténine et inhibe sa phosphorylation dans les cellules transfectées par le siSDC4 ou par le si-contrôle (figure 17B). Ces résultats montrent que le SDC4 est indispensable à la phosphorylation de PKC, de SAPK/JNK, de Akt et de ERK1/2 dans les chondrocytes. Nous pouvons en conclure que l'inhibition du SDC4 dans les chondrocytes conduit à une dérégulation des voies de signalisation dépendantes de PKC, de SAPK/JNK, de Akt et de ERK1/2 et par la suite à une dérégulation probable de l'expression des gènes dépendants de ces voies de signalisation. Nous avons montré que Wnt-3a induit la phosphorylation des kinases PKC, ERK1/2 et SAPK/JNK et que le SDC4 est indispensable pour cette activation. En effet, le SDC4 est surexprimé dans les chondrocytes hypertrophiques et en réponse à des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ .



B



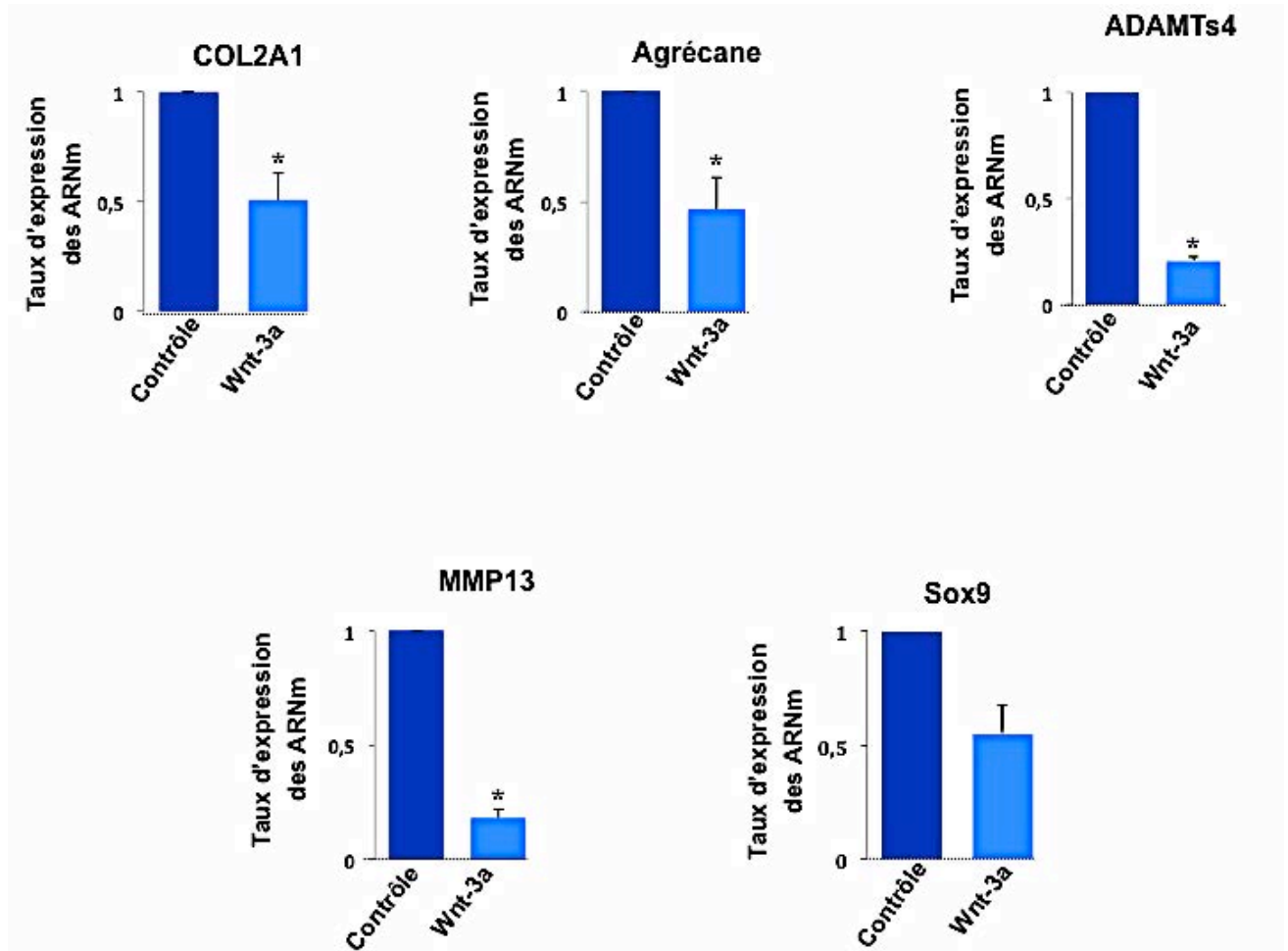
**Figure 17: Wnt-3a induit les voies non canoniques via le SDC4.** *A. Les chondrocytes transfectés par les siSDC4 ou si-contrôle, Le taux d'expression d'ARNm de SDC4 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage RPS29 et sont présentés par rapport à l'expression des contrôles. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ . B. Les chondrocytes en culture transfectés par siSDC4 ou si-contrôle ont été traités par Wnt-3a (100 $\mu$ M) ou le PBS (contrôle) pendant 2h, Les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE et l'immunoblot a été réalisé avec les anticorps reconnaissant les formes phosphorylées ou non phosphorylées de  $\beta$ -caténine, de ERK, de AKT, de PKC et de SAP/JNK.  $\beta$ -actine est utilisée pour normaliser la quantité de protéines dans chaque échantillon.*

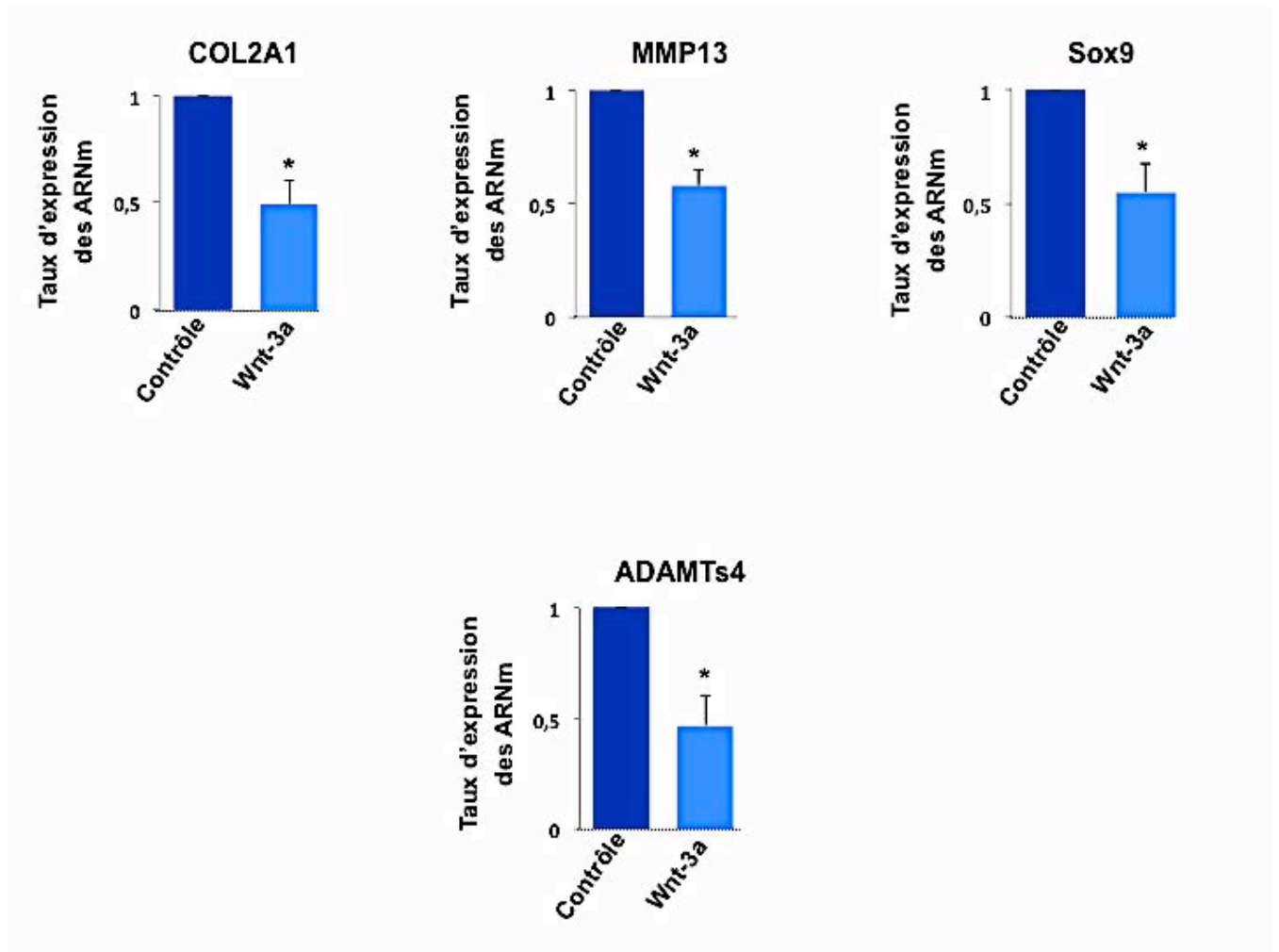
## II. WNT-3A RÉGULE L'EXPRESSION DU COLLAGÈNE II ET D'AUTRES MARQUEURS CHONDROCYTAIRES VIA LE SDC4

Nous avons dans un premier temps analysé l'effet de Wnt-3a sur l'expression des gènes marqueurs du phénotype chondrocytaire en particulier le collagène de type II, l'agrécan, l'ADAMTs4, la MMP13 et Sox9 dans les chondrocytes primaires et les explants de cartilage humains en culture. Les résultats obtenus montrent que Wnt-3a inhibe l'expression de ces gènes de 49, 54, 78, 82 et de 50%, respectivement dans les chondrocytes (figure 18A). Le

traitement des explants de cartilage par Wnt-3a inhibe également l'expression de la MMP13, du collagène II, de Sox9 et de l'ADAMTs4 de 42, 51, 54 et de 49%, respectivement (figure 18B).

A

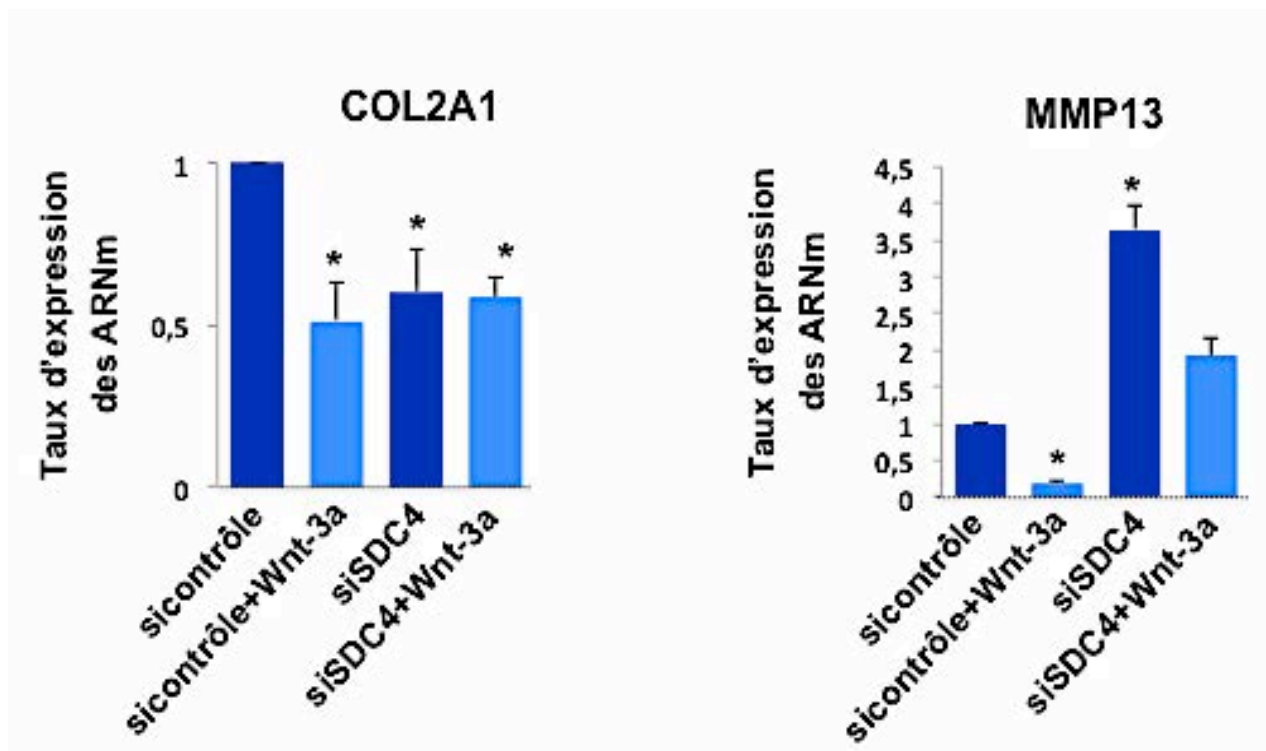


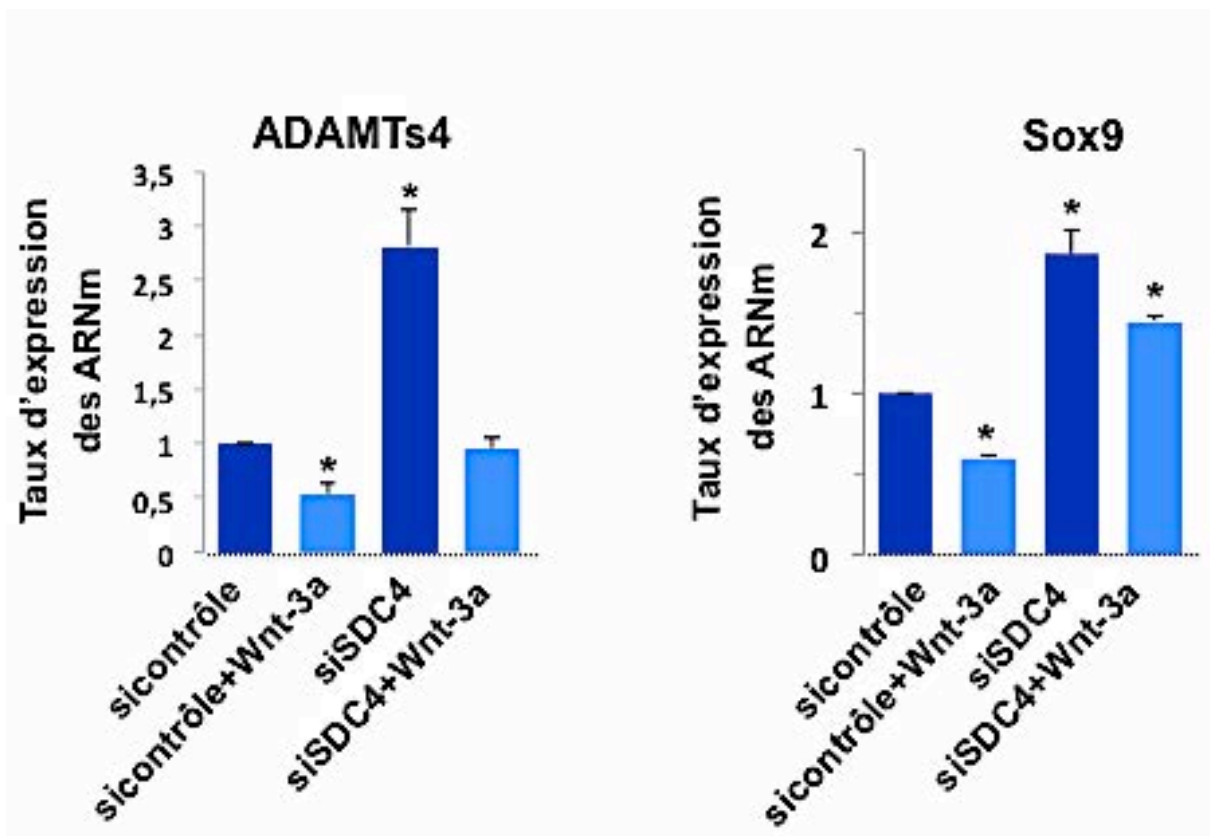
**B**

**Figure 18 : Wnt-3a induit la dédifférenciation des chondrocytes en culture. A.** Les chondrocytes **B.** les explants en culture sont traités par Wnt-3a (100µM) ou le PBS (contrôle) pendant 24h, Le taux d'expression d'ARNm de MMP13, ADAMTs4, COL2A1, Agrécan (AGC) et Sox9 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage de la protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les chondrocytes contrôles. . Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .

Afin d'étudier l'effet de l'inhibition du SDC4 sur la dédifférenciation chondrocytaire induite par Wnt-3a, les chondrocytes ont été transfectés par les siSDC4 ou si-contrôle et traités 72h après la transfection par Wnt-3a (100µM) ou le PBS (contrôle) pendant 24h. Nous avons analysé par RT-PCR en temps réel l'expression des ARNm des marqueurs de différenciation des chondrocytes comme le collagène II, la MMP13 et de l'ADAMTs4. Les résultats obtenus montrent que la transfection par le siSDC4 induit une diminution de 45% de l'expression des

ARNm de collagène II et une augmentation de 3,5 et 2,8 fois de l'expression des ARNm de la MMP13 et de l'ADAMTs4, respectivement (figure 19). Le traitement des cellules transfectées par le siSDC4 par Wnt-3a n'induit aucun changement dans l'expression des ARNm du collagène II par rapport aux cellules traitées par le PBS (contrôle) (figure 19). Cependant, il réduit l'expression de la MMP13 et de l'ADAMTs4 de 2- et 3-fois, respectivement (figure 19). De façon intéressante, l'inhibition du SDC4 entraîne une augmentation de 2-fois de l'expression du facteur de transcription chondrocytaire, le Sox9. Le traitement par Wnt-3a, après inhibition du SDC4, réduit faiblement l'expression de Sox9 (0,25-fois) et le taux de son expression reste élevé par rapport aux chondrocytes transfectés par les si-Contrôle et traités par Wnt-3a (figure 19).



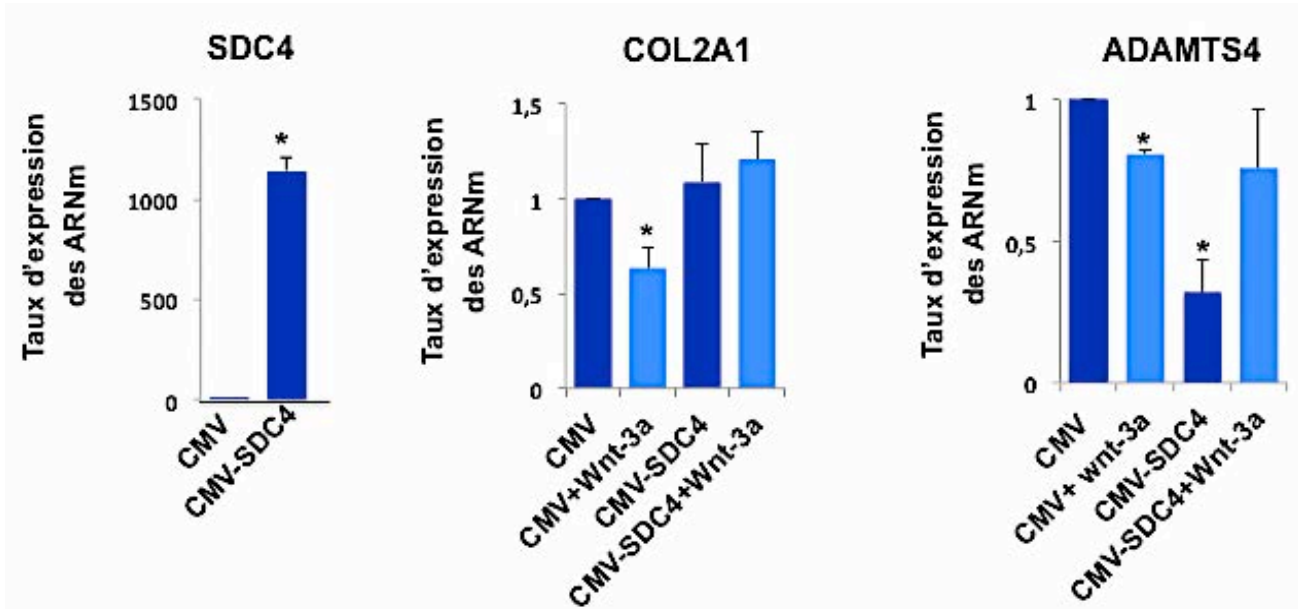


**Figure 19 : Wnt-3a régule l'expression du collagène et des marqueurs chondrocytaires via le SDC4.** Les chondrocytes en culture transfectés par les siSDC4 ou si-contrôle ont été traités par Wnt-3a (100µM) ou le PBS contrôle pendant 24 heures, Le taux d'expression d'ARNm de MMP13, ADAMTs4, COL2A1, et Sox9 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage de la protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les chondrocytes contrôles. Les données sont représentées sous la forme de moyenne ± écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .

Afin de confirmer ces résultats, un vecteur pCMV-SDC4 contenant le gène codant pour le SDC4 en aval du promoteur CMV a été utilisé pour surexprimer le SDC4 dans les chondrocytes en culture. L'efficacité de ce vecteur a été testée dans un premier temps; la transfection des chondrocytes par le pCMV-SDC4 induit de plus de 1000 fois l'expression des ARNm du SDC4 dans les chondrocytes transfectés par ce vecteur par rapport à ceux transfectés par le vecteur contrôle, pCMV-natif (figure 20). L'analyse de l'effet de la surexpression du SDC4 dans les chondrocytes primaires humains sur les effets induits par Wnt-3a, en particulier l'inhibition de l'expression du collagène II et de l'ADAMTs4, a permis



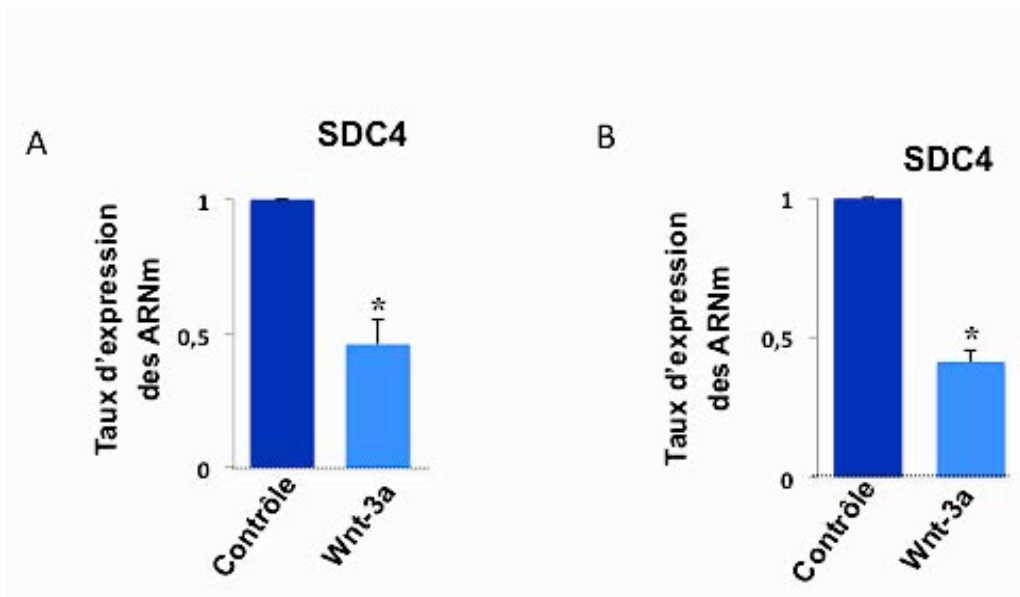
de montrer que la surexpression du SCD4 abolit l'inhibition de l'expression de collagène II par wnt-3a (figure 20). En revanche, l'expression de l'ADAMTs4 est inhibée de 4-fois suite à la surexpression du SCD4 et induite de 2-fois par Wnt-3a.



**Figure 20: Wnt-3a régule l'expression du collagène via le SDC4.** Les chondrocytes en culture transfectées par pCMV-SDC4 ou pCMV comme contrôle ont été traitées par Wnt-3a (100µM) ou le PBS contrôle pendant 24h. Le taux d'expression d'ARNm ADAMTs4 et du COL2A1 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage de la protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les chondrocytes contrôles. Les données sont représentées sous la forme de moyenne ± écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .

Les résultats précédents montrent que l'inhibition du SDC4 induit l'expression de la MMP13, l'ADAMTs4 et Sox9 qui sont des marqueurs du phénotype chondrocytaire alors que Wnt-3a induit la dédifférentiation des chondrocytes en inhibant leur expression. Ceci suggère que l'inhibition du SDC4 pourrait être un mécanisme par lequel les chondrocytes s'opposeraient à la dédifférentiation induite par la voie canonique.

Nous avons donc analysé l'expression du SCD4 dans les chondrocytes primaires et les explants de cartilage humains traités ou non par Wnt-3a pendant 24h. Les résultats obtenus montrent que Wnt-3a inhibe de 54% et 57% l'expression du SDC4 dans les chondrocytes et les explants de cartilage, respectivement (figure 21).

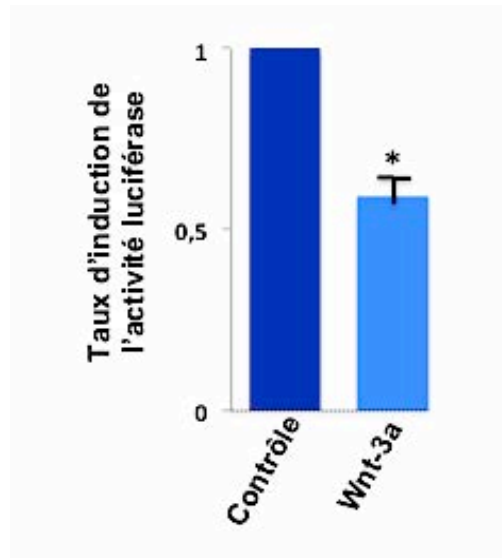


**Figure 21 : Wnt-3a inhibe l'expression du SDC4 dans les chondrocytes en culture et dans les explants de cartilage.**

*A. Les chondrocytes B. les explants en culture sont traités par Wnt-3a (100µM) ou le PBS (contrôle) pendant 24h, Le taux d'expression d'ARNm de SDC4 est déterminé par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les chondrocytes contrôles. . Les données sont représentées sous la forme de moyenne ± écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .*

### **III. WNT-3A INHIBE L'ACTIVITÉ DU PROMOTEUR DU SDC4 DANS LES CHONDROCYTES HUMAINS.**

Afin de déterminer si l'effet inhibiteur de Wnt-3a sur l'expression du gène du SDC4 provient de l'inhibition de son promoteur, nous avons cloné la séquence -1500/+50 du promoteur du gène du SDC4 humain et étudié sa régulation par Wnt-3a dans les chondrocytes primaires humains. La séquence (-1500/+50) du promoteur du SDC4 a été sous-clonée en amont du gène rapporteur luciférase dans le vecteur pGL3-basic. Les chondrocytes en culture ont été transfectés par cette construction et traités par Wnt-3a (100µM) ou par le PBS (contrôle) pendant 24h. L'analyse de l'activité promotrice montre que le traitement par Wnt-3a inhibe de 45% l'activité transcriptionnelle du promoteur du SDC4 (figure 22). Ces résultats montrent pour la première fois que Wnt-3a inhibe l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène du SDC4 et par la suite l'expression des ARNm du SDC4 dans les chondrocytes humains.



**Figure 22 : Wnt-3a inhibe l'activité du promoteur du SDC4.** *Les chondrocytes transfectés par la séquence -1500/+50 du promoteur du gène du SDC4 ont été traités par Wnt-3a (100µM) ou par le PBS (contrôle) pendant 24h. L'activité luciférase relative est le rapport de l'activité du plasmide contenant le promoteur sur l'activité du vecteur pGL3-Basic après normalisation. Les données sont représentées sous la forme de moyenne ± écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .*

#### **IV. L'INHIBITION DE LA MMP13 ET DE L'ADAMTS4 PAR WNT-3A EST $\beta$ -CATENINE-DEPENDANTE ALORS QUE L'INHIBITION DU SDC4 ET DU COLLAGENE II EST ERK1/2 DEPENDANTE.**

Etant donnée l'importance du SDC4 dans la régulation des différentes voies de signalisation dans les chondrocytes, nous avons recherché la voie de signalisation responsable de l'inhibition de l'expression de cet HSPG par Wnt-3a. Pour cela, nous avons utilisé la méthode d'ARN interférence et des inhibiteurs pharmacologiques de différentes voies de signalisation. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition de la voie canonique dans les chondrocytes par des siRNA dirigés contre la  $\beta$ -caténine (siCTNNB1) ou par l'inhibiteur biologique DKK-1 empêche la diminution de l'expression des ARNm de la MMP13 et de l'ADAMTs4 par Wnt-3a (figure 23). En revanche, elle ne prévient pas l'inhibition de l'expression du SDC4 et du collagène II par Wnt-3a (figure 23). L'efficacité des siCTNNB1 a été analysée par immunoblot qui montre une très forte diminution de la protéine  $\beta$ -caténine dans les chondrocytes traités par les siCTNNB1 par rapport aux chondrocytes traités par les sicontrôle (figure 23).

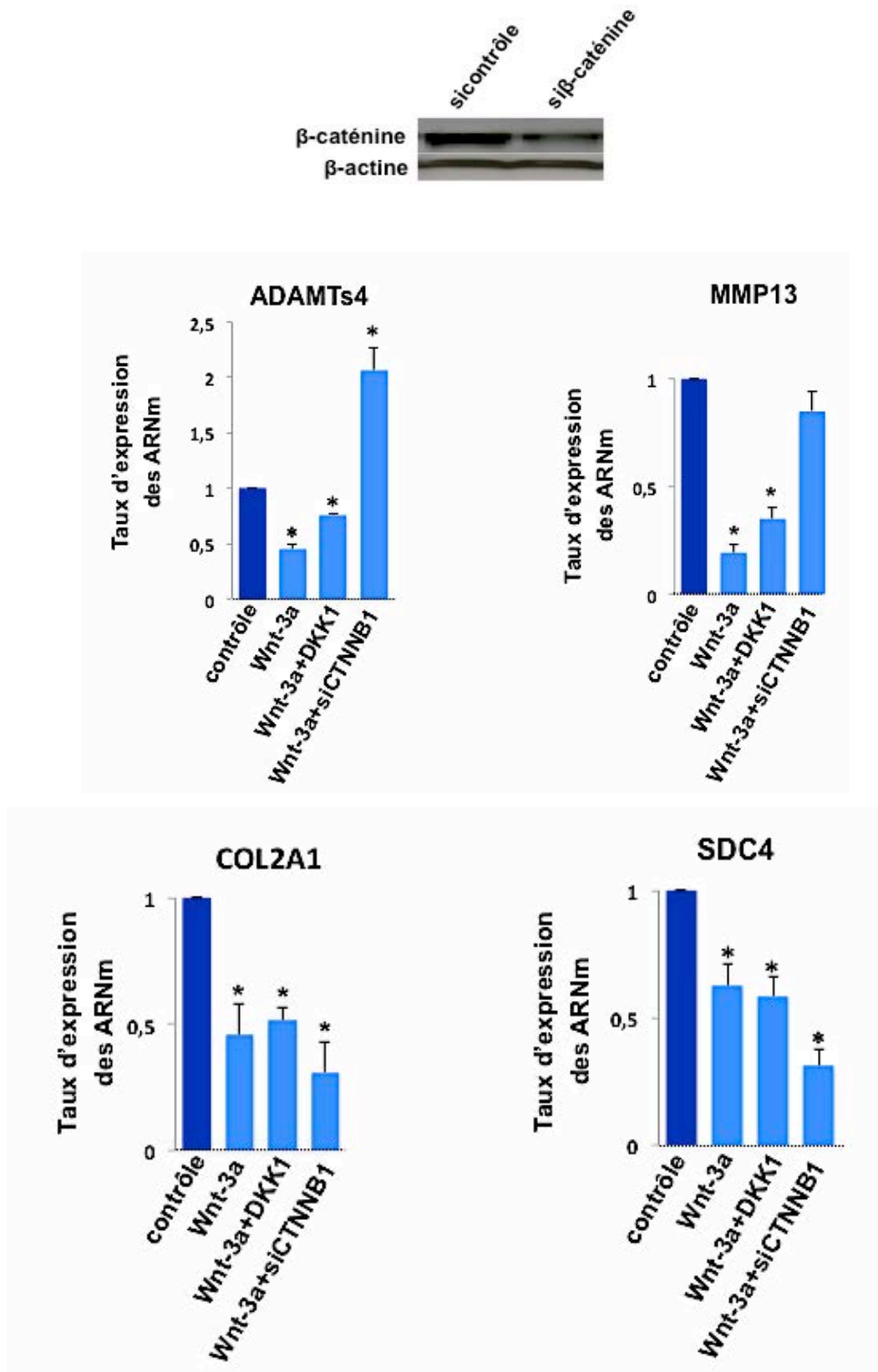
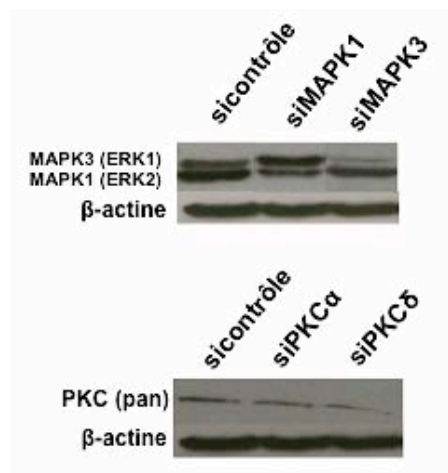


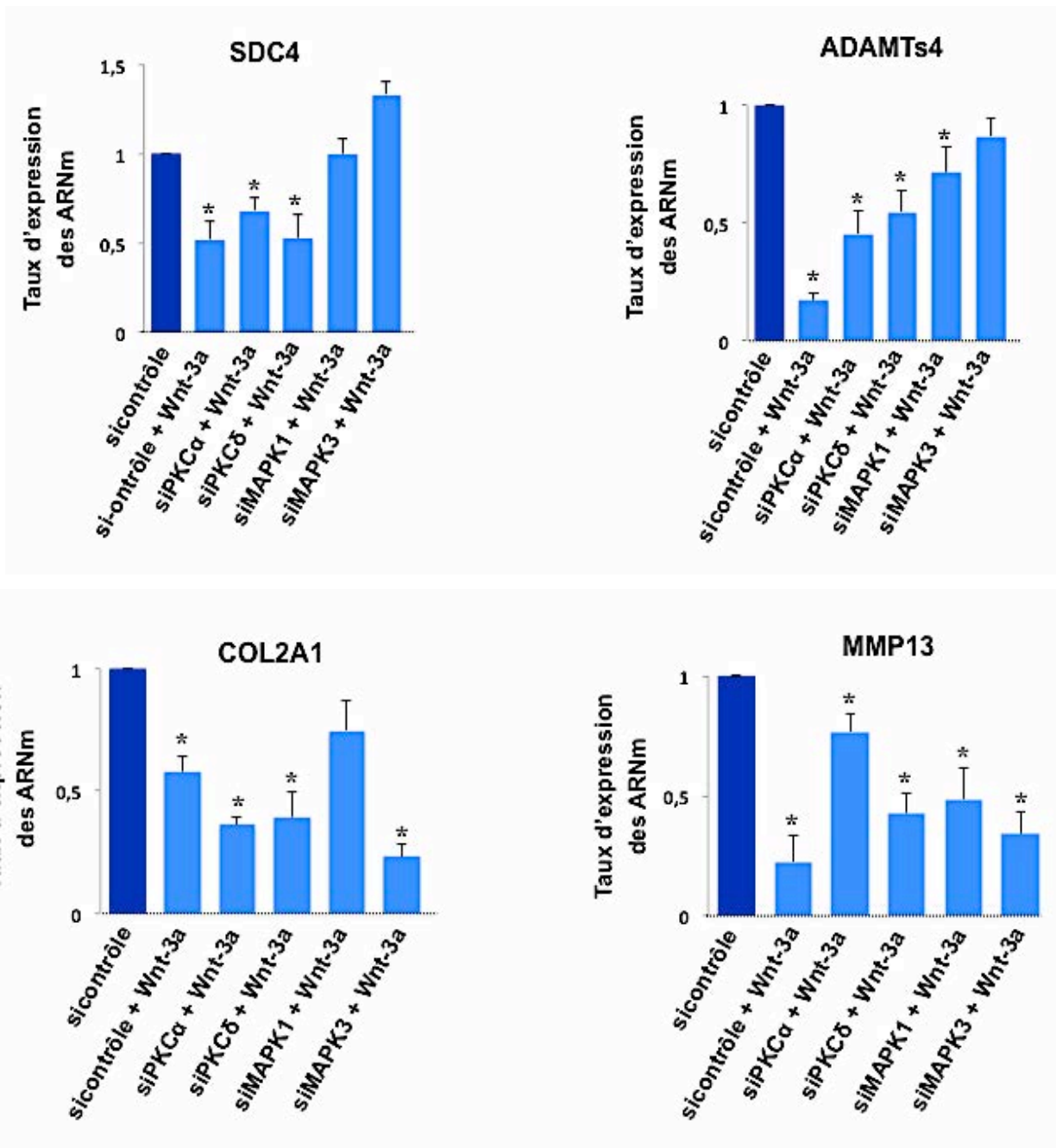
Figure 23 : L'inhibition de la MMP13 et de l'ADAMTs4 par Wnt-3a est  $\beta$ -caténine-dépendante. Les chondrocytes en culture ont été transfectés par le siRNA siCTNNB1 ( $\beta$ -

caténine) ou pré-incubés avec l'inhibiteur de la voie canonique (DKK-1) avant le traitement par Wnt-3a (100 $\mu$ M) ou le PBS (contrôle) pendant 24h. L'expression de la  $\beta$ -caténine a été analysée dans les extraits protéiques des cellules transfectées par siCTNNB1 ou si-contrôle par immunoblot en utilisant des anticorps anti- $\beta$ -caténine. Le taux d'expression d'ARNm de ADAMTs4, MMP13, COL2A1 et SDC4 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage de la protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les chondrocytes contrôles. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .

Nous avons ensuite analysé l'effet de l'inhibition de ERK1/2 et de PKC $\alpha$  et  $\delta$  par siRNA sur l'inhibition de l'expression de ces gènes par Wnt-3a. Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité des siRNA par l'analyse des protéines cibles par immunoblot en plus de la RT-PCR. Les résultats montrent que les siRNA inhibent fortement l'expression des protéines cibles (figure 24).

L'utilisation de ces siRNA montre que l'inhibition de MAPK1 (ERK2) et de MAPK3 (ERK1) par ARN interférence (siMAPK1 et siMAPK3) empêche l'inhibition de l'expression des ARNm du SDC4 par Wnt-3a (figure 24). Alors que les siMAPK1 préviennent l'inhibition de l'expression du collagène II par Wnt-3a. Ces résultats montrent que Wnt-3a inhibe l'expression des MMPs par la voie canonique, tandis qu'il inhibe l'expression de SDC4 et du collagène II via la voie ERK1/2. Nous avons également observé que l'inhibition de PKC $\alpha$  et  $\delta$  et de MAPK1 et 3 par siRNA atténue fortement l'inhibition de l'expression de la MMP13 et de l'ADAMTs4 par Wnt-3a (figure 24).

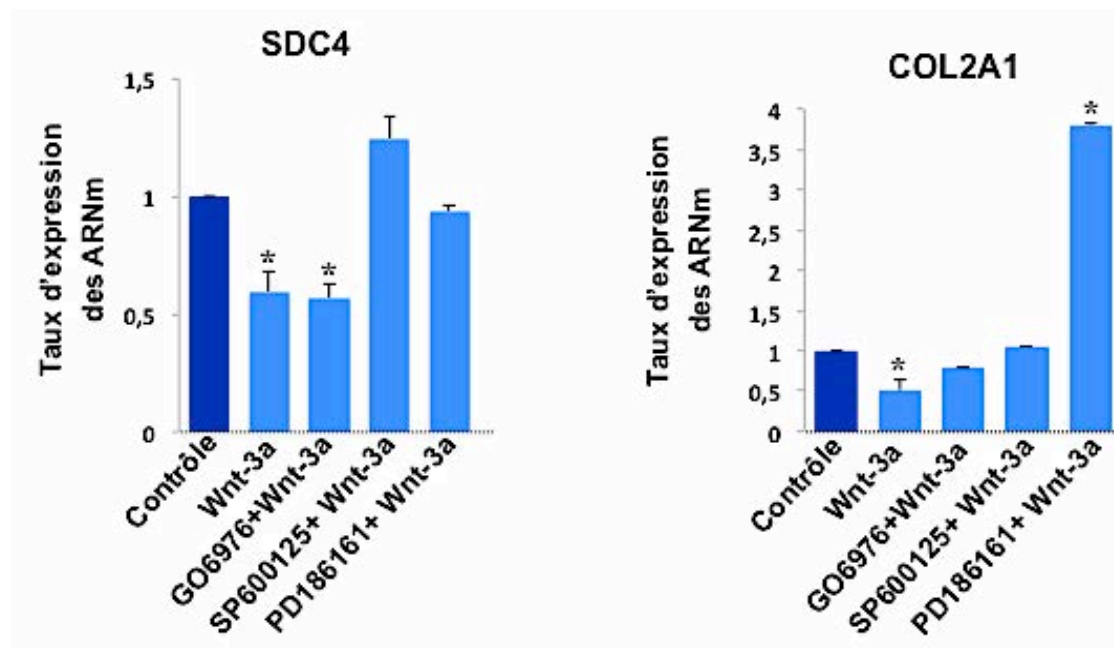


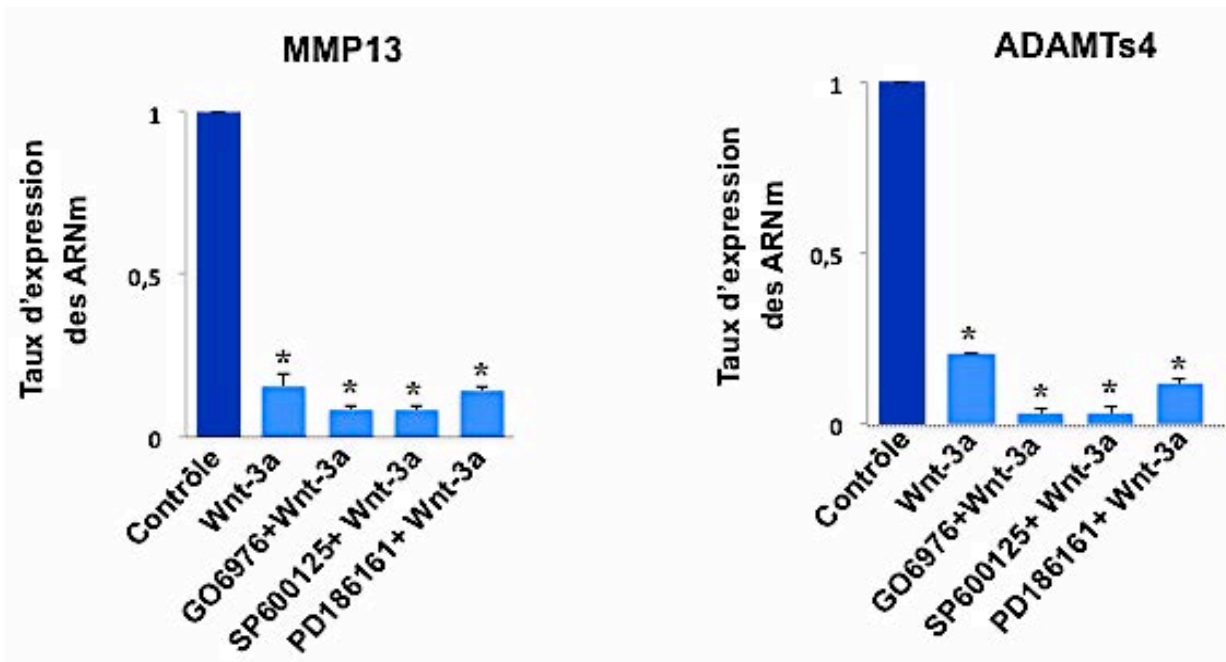


**Figure 24 : Wnt-3a inhibe le COL2A1 et le SDC4 via ERK1/2.** Les chondrocytes en culture transfectés par les siMAPK1, siMAPK3, siPKCa, siPKCδ, ou si-contrôle ont été traités par Wnt-3a (100µM) ou le PBS (contrôle) pendant 24h. L'expression des MAPK1 et 3 et de PKC a été analysée dans les extraits protéiques des cellules transfectés par siMAPK1, siMAPK3, siPKCa, siPKCδ, ou si-contrôle par immunoblot en utilisant des anticorps anti-ERK1/2 et anti-PKCpan. Le taux d'expression d'ARNm de MMP13, SDC4, ADAMTs4 et COL2A1 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage de la protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les chondrocytes contrôles. Les données sont représentées sous la forme de

moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test *t* de Student. \* =  $p < 0.05$ .

Afin de confirmer ces résultats, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation PKC (GÖ6976), ERK1/2 (PD184161) et de JNK (SP60012). Les chondrocytes en culture ont été traités par ces différents inhibiteurs 30 min avant le traitement par Wnt-3a et l'expression des ARNm a été analysée par RT-PCR en temps réel. Les résultats obtenus montrent que l'expression du SDC4 et du collagène II n'est plus inhibée par Wnt-3a en présence des inhibiteurs de ERK1/2 (PD184161) et de JNK (SP60012). Alors que, l'inhibition de la MMP13 et ADAMTs4 par Wnt-3a est maintenue quel que soit l'inhibiteur utilisé (figure 25). L'ensemble des résultats montre que l'inhibition de la MMP13 et de l'ADAMTs4 par Wnt-3a est  $\beta$ -caténine-dépendante tandis que l'inhibition de SDC4 et de collagène II est ERK1/2 dépendante.





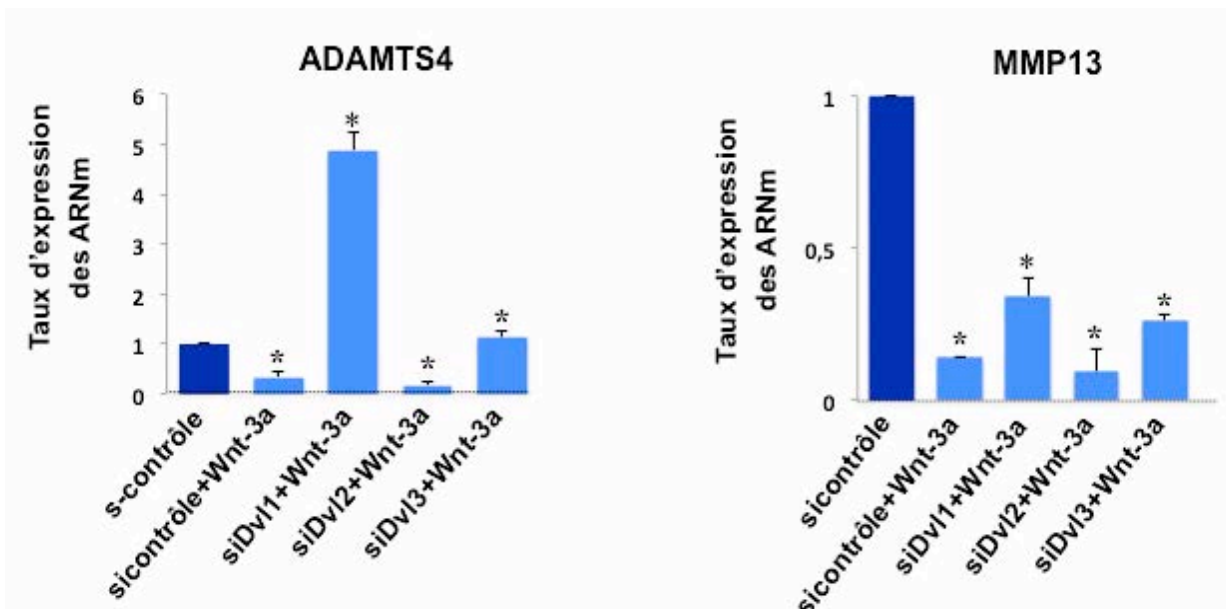
**Figure 25 : Wnt-3a inhibe le COL2A1 et le SDC4 via ERK1/2.** Les chondrocytes primaires ont été pré-incubés pendant 30 min avec un les inhibiteurs GÖ6976, PD186161, SB203580, SP600125 ou le DMSO (contrôle) avant le traitement par Wnt-3a (100µM) ou le PBS (contrôle) pendant 24h. Le taux d'expression des ARNm de MMP13, SDC4, ADAMTs4 et COL2A1 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage de la protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les chondrocytes contrôles. Les données sont représentées sous la forme de moyenne ± écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .

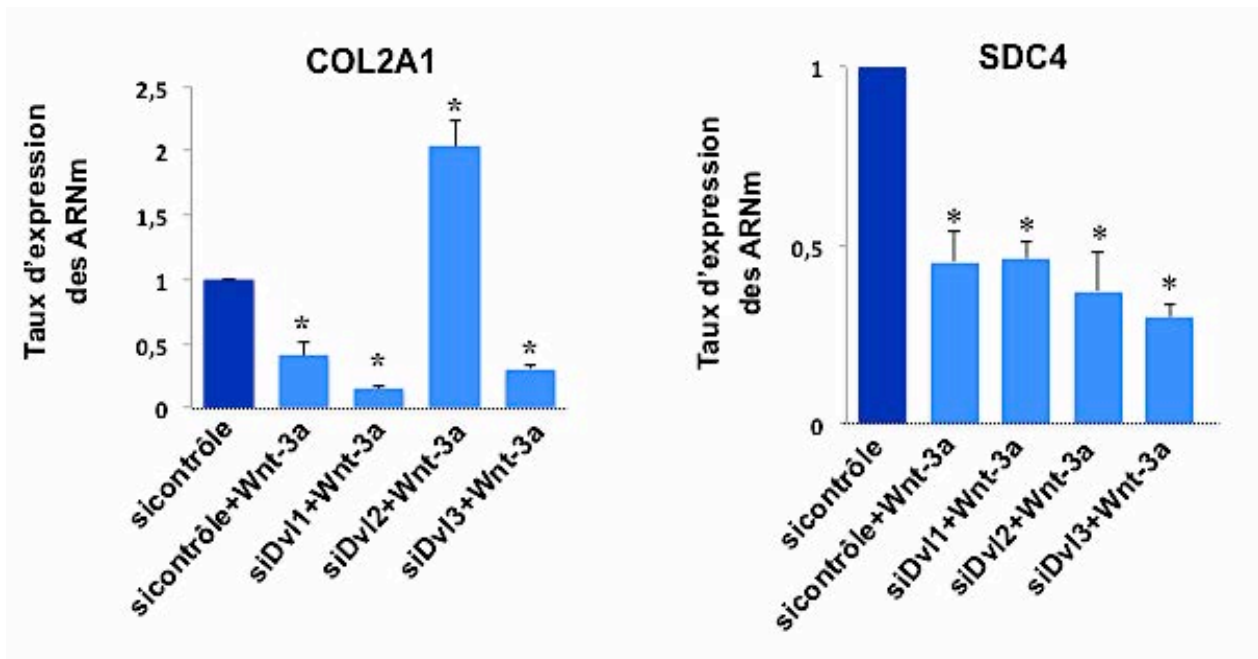
## V. WNT-3A INHIBE L'EXPRESSION DE LA MMP13 ET DE L'ADAMTS4 VIA DVL1 ET DVL3 ET LE COLLAGENE II VIA DVL2

Les protéines dishevelled (Dvl) sont des effecteurs intracellulaires de la voie Wnt et compte parmi les rares intermédiaires de signalisation communs aux deux voies de signalisation Wnt, la voie canoiques et non canoiques. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de Dvl, Dvl1, 2 et 3 qui sont des produits de gènes paralogues. Etant donnée l'importance des protéines Dvl dans la signalisation canoique et non canoique de Wnt, nous avons étudié le rôle de ces protéines dans l'inhibition de l'expression du SDC4, du collagène II, de l'ADAMTs4 et de la MMP13 par Wnt-3a. L'efficacité des siRNA dirigés contre chacun des



trois isoformes de Dvl a été testée dans un premier temps. L'analyse de l'expression des ARNm du SDC4, du collagène II, de la MMP13 et de l'ADAMTs4 par RT-PCR en temps réel dans les chondrocytes transfectés par les siRNA montre que l'inhibition de Dvl1 et de Dvl3 prévient la diminution de l'expression de l'ADAMTs4 produite par Wnt-3a, qui est de 78% dans les chondrocytes transfectés par le si-contrôle. Dans le cas de la MMP13, si-Dvl1 et si-Dvl3 empêchent partiellement l'inhibition de ce gène par Wnt-3a. En effet, le taux d'inhibition de l'expression de ce gène par Wnt-3a est de 66% et 71% en présence de siDvl1 et Dvl3, respectivement alors qu'il est de 82% dans les cellules transfectés par le si-contrôle. En ce qui concerne l'inhibition de l'expression du SDC4 par Wnt-3a, celle-ci semble être indépendante des protéines Dvl puisque le taux d'inhibition ne varie pas dans les cellules transfectés par les siDvl par rapport aux cellules transfectées par le si-contrôle (figure 26). De façon intéressante, l'inhibition de l'expression du collagène II par wnt-3a qui s'opère via la voie non canonique ERK1/2 est complètement abolie par les siDvl2 et même stimulée de 2-fois (figure 26). Le fait que Dvl1 et Dvl3 empêchent l'inhibition des gènes ADAMTs4 et MMP13 régulés via la voie canonique ( $\beta$ -caténine) et que Dvl2 abolit l'inhibition du collagène II régulée par la voie non canonique (ERK1/2) suggère que Dvl1 et Dvl3 régulent la voie canonique alors que le Dvl2 régule la voie non canonique de Wnt-3a.

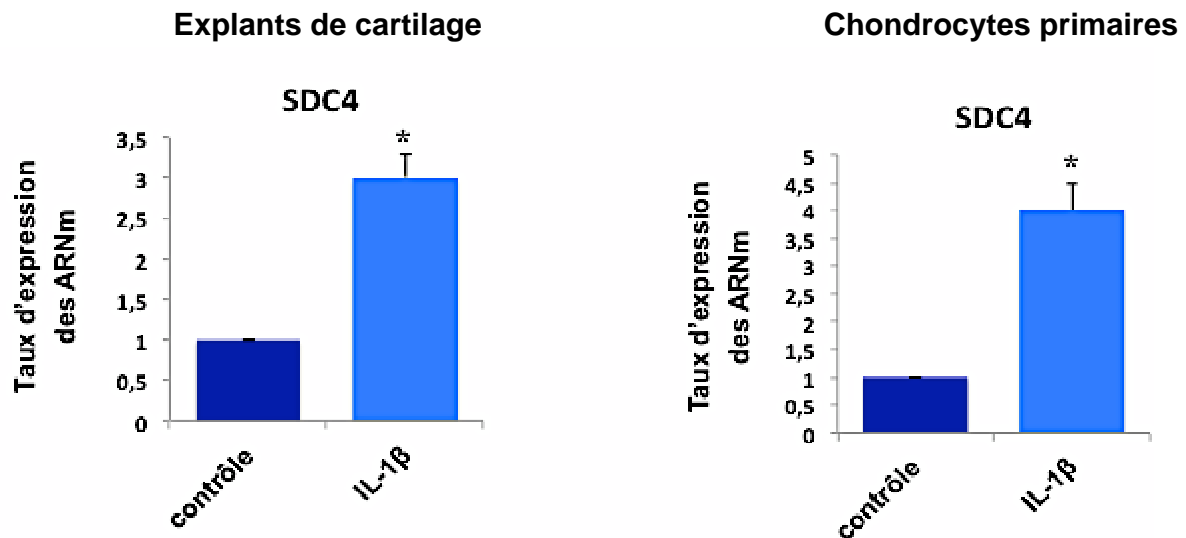




**Figure 26 : Wnt-3a inhibe la MMP13 et l'ADAMTs4 via Dvl1 et Dvl3 et le collagène II via Dvl2.** Les chondrocytes en culture transfectés par *si-Dvl1*, *si-Dvl2*, *si-Dvl3*, ou *si-contrôle* ont été traités par Wnt-3a (100µM) ou le PBS (contrôle) pendant 24h. Le taux d'expression d'ARNm de ADAMTs4, MMP13, COL2A1 et SDC4 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage de la protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les chondrocytes contrôles. . Les données sont représentées sous la forme de moyenne ± écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .

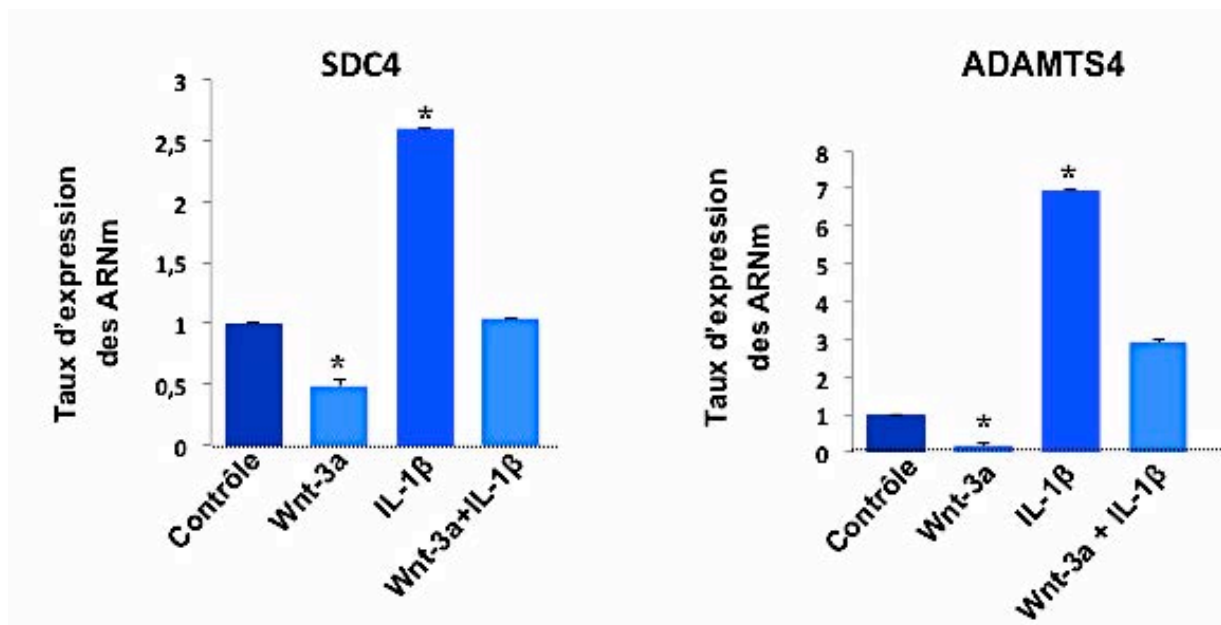
## VI. WNT-3A ARRETE LA DEGRADATION DES PGS INDUITE PAR IL-1β

Il est admis que le traitement des chondrocytes par la cytokine proinflammatoire IL-1β inhibe la synthèse des PGs matriciels et augmente leur dégradation suite à l'induction des MMPs en particulier l'ADAMTs4 qui dégrade l'agrécane. Cependant, l'effet de cette cytokine sur l'expression du SDC4 n'a pas été étudié. Nous avons donc analysé l'expression du SDC4 après traitement des explants de cartilage et des chondrocytes primaires humains par l'IL-1β. Les résultats obtenus montrent que l'expression du SDC4 est induite de 3-fois et 4-fois (figure 27) dans les explants de cartilage et dans les chondrocytes traités par l'IL-1β par rapport aux contrôles traités par le PBS.



**Figure 27 : IL-1 $\beta$  induit l'expression du SDC4 dans les explants de cartilage et dans les chondrocytes en culture.** *A. Les explants B. les chondrocytes en culture sont traités par IL-1 $\beta$  (10ng/ml) ou le PBS (contrôle) pendant 24h, Le taux d'expression d'ARNm de SDC4 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage de la protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les contrôles. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .*

Afin de déterminer si Wnt-3a peut prévenir l'induction de l'expression de SDC4 et de l'ADAMTs4, des chondrocytes en culture ont été traités par Wnt-3a, IL-1 $\beta$  ou les deux ensemble pendant 24h. L'analyse de l'expression des ARNm du SDC4 et de l'ADAMTs4 par RT-PCR en temps réel dans les chondrocytes traités et contrôles montre que Wnt-3a empêche l'augmentation de l'expression des ARNm du SDC4 et de l'ADAMTs4 induite par l'IL-1 $\beta$  (figure 28). En effet, l'IL-1 $\beta$  induit de trois fois l'expression du SDC4 dans les chondrocytes mais cette induction disparaît en présence de Wnt-3a. De même, l'IL-1 $\beta$  seule induit de six fois l'expression de l'ADAMTs4 mais cette induction n'est plus que de deux fois seulement en présence de Wnt-3a (figure 28).

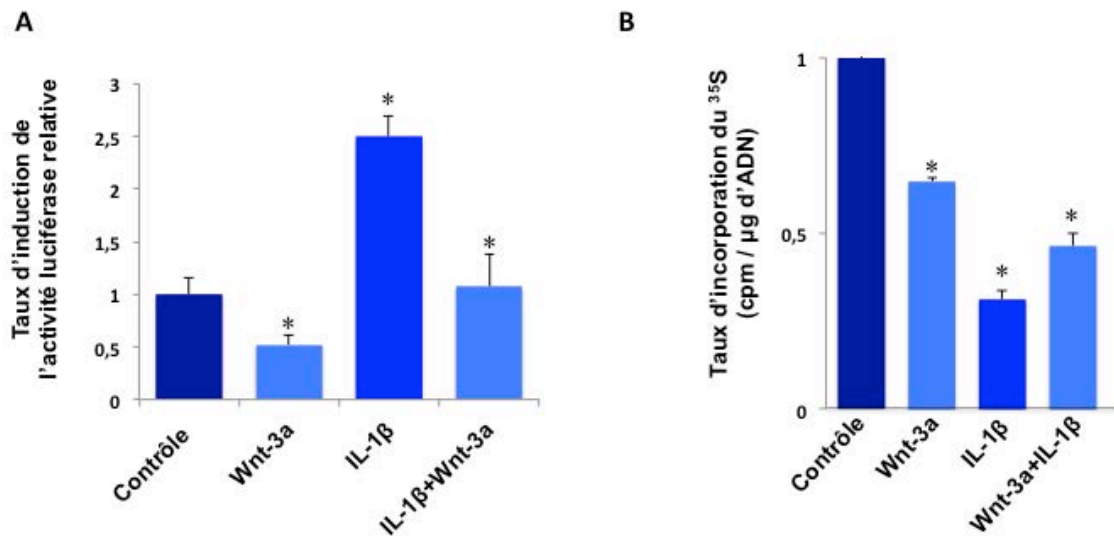


**Figure 28 : Wnt-3a prévient l'induction de l'expression du SDC4 et de l'ADAMTS4 par IL-1 $\beta$ .** Les chondrocytes primaires ont été traités par Wnt-3a (100 $\mu$ M), IL-1 $\beta$  (10ng/ml), Wnt-3a (100 $\mu$ M) plus IL-1 $\beta$  (10ng/ml) ou le PBS (contrôle) pendant 24h. Le taux d'expression des ARNm du SDC4, ADAMTS4 est déterminé par RT-PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage de la protéine ribosomale S29 et sont présentés par rapport à l'expression obtenue dans les chondrocytes contrôles.

L'analyse de l'activité du promoteur du SDC4 dans les chondrocytes traités par Wnt-3a, IL-1 $\beta$  ou les deux ensembles montre que Wnt-3a inhibe de 2-fois l'activité du promoteur, alors que l'IL-1 $\beta$  induit de 2,5-fois l'activité promotrice. De façon intéressante, Wnt-3a abolit complètement l'induction du promoteur par IL-1 $\beta$  (figure 29A).

Afin de déterminer si cet effet opposé de Wnt-3a à l'induction de l'ADAMTS4 et du SDC4 par l'IL-1 $\beta$  aurait des conséquences sur l'anabolisme des PGs, nous avons évalué la synthèse des PGs dans les chondrocytes traitées par Wnt-3a, IL-1 $\beta$  ou les deux ensemble par la méthode de marquage des GAG au soufre radiomarqué. Les chondrocytes en culture ont été cultivés pendant 24h dans un milieu de culture contenant du  $^{35}$ S en présence de Wnt-3a, IL-1 $\beta$  ou les deux ensembles. Après le traitement, les PGs du milieu extracellulaire ont été précipités par la méthode du CPC et la quantité de  $^{35}$ S a été évaluée. Les résultats obtenus montrent que Wnt-3a inhibe de 20% l'anabolisme des PGs alors que l'IL-1 $\beta$  produit une forte inhibition (75%) (figure 29B). En revanche, le traitement combiné par Wnt-3a et IL-1 $\beta$  produit une inhibition de l'anabolisme des PGs d'environ 50% indiquant que Wnt-3a est capable de

réduire l'inhibition de l'anabolisme des PGs induite par l'IL-1 $\beta$  probablement en réduisant leur dégradation via sa capacité à inhiber l'ADAMTs4 responsable de la dégradation des PGs.



**Figure 29 : Wnt-3a prévient l'induction du promoteur du SDC4 et réduit l'inhibition de l'anabolisme des PGs par IL-1 $\beta$ .** *A. Les chondrocytes transfectés par la séquence -1500/+50 du promoteur du gène du SDC4 ont été traités par Wnt-3a (100 $\mu$ M), IL-1 $\beta$  (10ng/ml), les deux ensembles ou par le PBS (contrôle) pendant 24h. L'activité luciférase relative est le rapport de l'activité du plasmide contenant le promoteur sur l'activité du vecteur pGL3-Basic après normalisation. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ . B. L'anabolisme des PG est analysé par la méthode d'incorporation du soufre radiomarqué. Les données sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de 3 expériences distinctes. La significativité statistique est évaluée en utilisant le test t de Student. \* =  $p < 0.05$ .*

## ***DISCUSSION***

## *Discussion*

XT-I joue un rôle clé dans la biosynthèse des PGs en catalysant la première étape d'assemblage des chaînes de GAGs. Cette étape est supposée être l'étape limitante et par conséquent, elle contrôlerait la synthèse des PGs : héparane - sulfate et chondroïtine - sulfate. Dans cette étude, nous avons analysé la régulation du gène XT-I dans les cellules chondrocytaires primaires humaines par la cytokine pro-inflammatoire IL-1  $\beta$ . Nous avons montré, pour la première fois, que l'IL-1  $\beta$  module l'expression du gène de la XT-I d'une manière biphasique, une phase précoce d'induction et une phase tardive d'inhibition. Une régulation biphasique similaire est observée au niveau de l'expression de l'agrécane suggérant que les gènes de la XT-I et de l'agrécane sont régulés par les mêmes facteurs de transcription. En effet, le promoteur de l'agrécane contient plusieurs sites de liaison de Sp1 et AP-1 (Valhmu et al. 1998), de même que le promoteur de la XT-I. Il faut noter que l'expression des ARNm de l'agrécane est inhibée par l'IL-1  $\beta$  à 12h alors que celle du gène de la XT-I est inhibé à 24h, ce qui suggère que le gène de l'agrécane est plus sensible aux mécanismes de répression que celui de la XT-I, ou qu'un inhibiteur spécifique de l'agrécane est activé antérieurement par l'IL-1  $\beta$ . Des études supplémentaires sur la régulation du gène de l'agrécane par l'IL-1  $\beta$  seront nécessaires pour vérifier ces hypothèses. En revanche, la synthèse des PGs est augmentée à 6h et 12h, alors que l'expression des ARNm de l'agrécane est élevée à 6h mais diminuée à 12h. Il faut noter que la synthèse des PGs est mesurée pendant les 6 dernières heures du traitement (de 6h à 12h). Donc, il est raisonnable de considérer que les différences trouvées entre la synthèse des PGs et l'expression des ARNm de l'agrécane sont dues au fait que l'expression des ARNm de l'agrécane est induite à 6h (la synthèse des PG est mesurée de ce point jusqu'à 12h). Nous ne pouvons également pas exclure que la surexpression des ARNm de la XT-1 observée à 6 et 12h peut induire une augmentation du nombre de chaînes de GAGs sur la "core" protéine de l'agrécane. En effet, la XT-I catalyse l'étape limitante de la voie de synthèse des PGs. En accord avec ces résultats, nous avons récemment montré que la surexpression de la XT-I dans les explants de cartilage et les chondrocytes induit une augmentation de la synthèse des PGs. Inversement, l'inhibition de l'expression de la XT-I par un siRNA produit une forte diminution de la synthèse des PGs (Venkatesan et al. 2012).

En théorie, la surexpression de la XT-I et la stimulation de la synthèse des PGs pendant la phase précoce du traitement par l'IL-1  $\beta$  des chondrocytes reflète une tentative par les cellules de lutte contre la dégradation et la carence des PGs produites par la cytokine. De même, la surexpression des ARNm de la XT-I et de l'agrécan est observée dans le cartilage arthrosique dans des zones proches des lésions caractérisées par une forte augmentation de la synthèse des PGs suggérant un effort effectué par les chondrocytes pour régénérer la matrice extracellulaire au sein d'un environnement dégradé (Venkatesan et al. 2012). Cet effort peut aussi expliquer le taux élevé de synthèse des PGs mesuré dans l'arthrose précoce (Thompson et al. 1990 ; Lafeber et al. 1992) ainsi que l'augmentation de l'expression de COL2A1 (Aigner et al. 2006 ; Ijiri et al. 2008).

Afin d'étudier le mécanisme moléculaire impliqué dans la régulation de l'expression du gène de la XT -I par l'IL- 1  $\beta$  dans les chondrocytes, nous avons cloné 1,74 kb de la région 5' promotrice du gène humain de la XT-I. L'analyse de la séquence en amont du site d'initiation de la transcription a révélé que le promoteur de la XT-I humain est riche en séquence CG, et dépourvu de boîtes TATA et contient des sites de liaisons Sp1.

Des promoteurs similaires sont trouvés dans un grand nombre de gènes chez les mammifères tels que ceux de la GlcAT-I (Barre et al. 2006), de VIL2 (Gao et al. 2009) et des gènes de l'UDP-glucose déshydrogénase (Bontemps et al. 2003). L'analyse des délétions montre que les 450 paires de bases à proximité de la région 5' ne sont pas suffisantes pour conférer une activité promotrice dans les cellules chondrocytaires. Cependant, cette séquence contient les sites de liaison pour Sp1 (-125 à -40) indiquant que ces sites ne sont pas suffisants pour induire une activité constitutive du promoteur et que les facteurs Sp1 peuvent interagir avec d'autres facteurs pour induire l'activité. En effet, les promoteurs dépourvus de boîtes TATA sont régulés par l'intervention des facteurs Sp1. Ces derniers recrutent et interagissent avec des facteurs de transcription généraux pour initier l'activité promotrice (Barre et al. 2006 ; Singh et al. 2012). Fait intéressant, la prolongation de la séquence du promoteur à -850 pb pour contenir les sites de liaison pour le facteur AP-1 en position -590 et -640 confère une forte activité promotrice suggérant que les sites AP-1 sont essentiels pour l'activité constitutive du promoteur et qu'AP-1 coopère avec SP1 pour assurer une activité promotrice optimale. L'analyse des rôles respectifs des différents sites Sp1 sur l'activité du promoteur par mutagenèse dirigée montre que la perturbation du site de liaison Sp1-125 induit une forte réduction de l'activité promotrice. De plus, la mutation du site Sp1-40 active le promoteur suggérant que ce site agit en tant que répresseur du promoteur. La présence des sites de



liaison Sp1 agissant comme activateurs et/ou répresseurs de l'activité du promoteur a été récemment décrite pour le gène LEDGF/p75 (Singh et al. 2012).

Parmi la famille Sp, Sp1 et Sp3 sont exprimés d'une manière ubiquitaire et ils peuvent se lier à un élément similaire au niveau de l'ADN (Li et David J.R. 2010). La surexpression de Sp3 inhibe fortement l'activité du promoteur de la XT-I et du promoteur muté au niveau du site Sp1-40. En revanche, aucun effet inhibiteur de Sp3 n'est observé lorsque le promoteur est muté au niveau du site Sp-125. Ceci suggère que les facteurs Sp1 et Sp3 se lient au même site, le site Sp1-125. Nous pouvons donc spéculer qu'il ya une compétition entre Sp1 et Sp3 pour la liaison au niveau du site Sp1-125 et que la surexpression de SP3 peut empêcher le recrutement de Sp1 sur ce site au niveau du promoteur. En effet, la précipitation des protéines liées aux sites Sp1 du promoteur par la technique de pulldown en utilisant des sondes biotinylées des sites Sp1 indique clairement que lorsque les chondrocytes sont traités par l'IL-1  $\beta$  pendant 24h, Sp3 se lie au site Sp1-125, probablement en déplaçant le facteur Sp1.

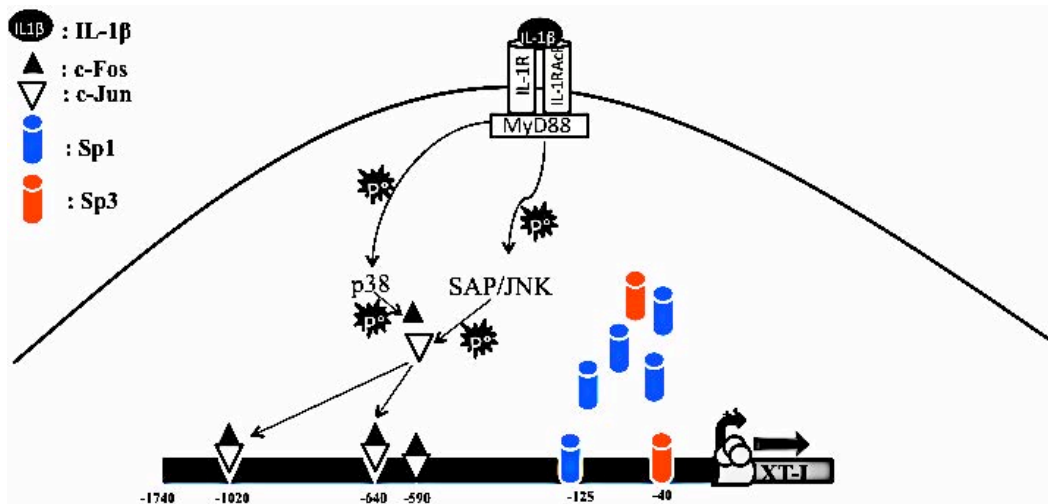
D'autre part, il a été montré que le traitement des cellules chondrocytaires par l'IL-1  $\beta$  pendant 24h induit une diminution de l'expression de Sp1 et une augmentation de celle de Sp3 (Chadjichristos et al. 2003). Cette observation peut expliquer la répression du promoteur de la XT-1 observée après 24h du traitement par l'IL-1  $\beta$ . Ceci suggère que le ratio Sp3/Sp1 détermine inhibition de la XT-I par l'IL-1  $\beta$  à 24h et expliquerait également l'inhibition de l'expression du gène de l'agrécan par cette cytokine. Un mécanisme similaire est décrit dans le cas de la régulation du gène du COL2A1 par l'IL-1  $\beta$  dans les chondrocytes (Chadjichristos et al. 2003).

Nos résultats montrent que les deux sites de liaison du facteur AP-1 (AP-1-590 et AP-1-640) et le site de liaison de Sp1 (Sp1-125) sont essentiels pour l'activité basale du promoteur, suggérant que les interactions entre les facteurs AP-1 et SP1 peuvent avoir lieu pour accomplir une activité promotrice optimale. Il a été montré que la coopération entre Sp1 et AP-1 est essentielle pour l'activité promotrice des gènes codant pour l'Ezrine (Gao et al. 2009), les intégrines leucocytaires, le CD11c (Noti et al. 1996), et la loricrine (Jang et al. 2002). Cependant, le rôle des éléments de réponse à AP-1 ne se limite pas à l'activité basale du promoteur XT-I, mais il est également essentiel pour l'activité d'induction du promoteur par l'IL-1  $\beta$ . En effet, la mutagenèse des sites de liaison AP-1 du promoteur de la XT-I montre que les sites de liaison AP-1-640 et AP-1-1020, mais pas AP-1-590, sont importants pour l'induction de l'activité promotrice par l'IL-1  $\beta$ . De plus, la surexpression du facteur de transcription AP-1 stimule fortement (50 fois) l'activité du promoteur de la XT-I.

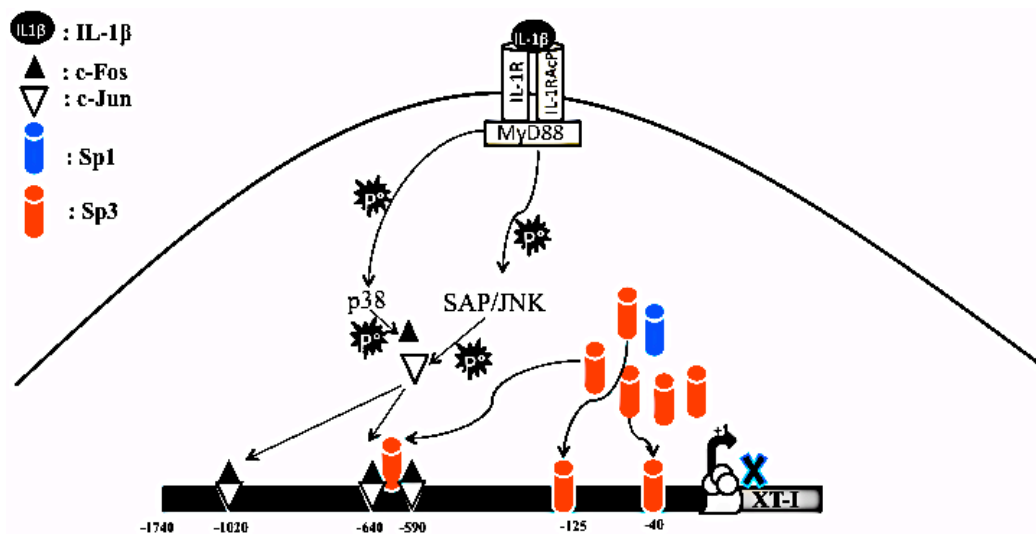
En accord avec les résultats obtenus, les expériences de ChIP montrent que le recrutement du facteur AP-1 (c-Jun) au niveau du promoteur de la XT-I augmente lors du traitement par l'IL-1  $\beta$ , indiquant que la cytokine stimule l'activité promotrice de la XT-I en favorisant la liaison du facteur AP-1. Nous avons montré que ce processus est médié par l'activation des voies SAP/JNK et p38, ainsi que le montrent leur phosphorylation suite à un traitement par l'IL-1  $\beta$  et après utilisation des inhibiteurs spécifiques. L'analyse de la toxicité potentielle des inhibiteurs des MAPK sur les chondrocytes par un test MTT montre que les inhibiteurs de JNK, p38, et SP1 n'affectent pas de façon significative la viabilité des cellules, ce qui indique que les effets produits résultent de l'inhibition des voies de signalisation. L'activation du promoteur de la XT-I par la voie de signalisation p38 est probablement due à la phosphorylation de c-Fos par la MAPKp38. En effet, il a été démontré que p38 est capable d'activer c-Fos (Monje et al. 2003, Tanos et al. 2005). Ainsi, cette voie agirait de façon concomitante avec l'activation de c-Jun par JNK.

Nos données montrent, pour la première fois, que la XT-I est une cible de la cytokine pro-inflammatoire IL-1  $\beta$  et que les effets de cette cytokine sont médiés par les voies de signalisation JNK et p38 et par les facteurs AP-1 et Sp3 dans les chondrocytes primaires humaines.

Dans les figures suivantes nous proposons un mécanisme pour l'induction et la répression de l'expression du gène de la XT-I par l'IL-1  $\beta$ .



**Le traitement des chondrocytes à l'IL-1β conduit à l'activation du facteur de transcription AP-1 par les voies de signalisation SAP/JNK et p38 et à sa fixation sur les sites AP-1-640 et AP-1-1020 du promoteur de la XT-I, ceci augmente l'activité du promoteur XT-I.**



**Le traitement des chondrocytes à l'IL-1β pendant 24 heures conduit à l'induction de l'expression du facteur de transcription SP3 et à l'inhibition de l'expression de SP1**

**La fixation du facteur de transcription SP3 sur le site SP1-125 à la place de SP1 et son interaction avec AP-1 conduit à l'inhibition de l'activité du promoteur XT-I.**

Wnt-3a est un activateur bien caractérisé de la voie canonique dépendante de la  $\beta$ -caténine (Shimizu et al. 1997). Wnt-3a est exprimé dans le cartilage articulaire et a un rôle établi dans l'arthrose (Nakamura et al. 2005). Etant donnée l'importance de l'activité de Wnt-3a dans l'arthrose et dans les mécanismes de différenciation et de dédifférenciation des chondrocytes, nous avons étudié les voies de signalisation activées par Wnt-3a dans des chondrocytes primaires en culture. Nous avons montré pour la première fois que le traitement des chondrocytes humains primaires par Wnt-3a induit la phosphorylation des protéines kinase C, des MAPK1 et 3 (ERK1/2) et de SAPK/JNK en plus de l'activation de la  $\beta$ -caténine. Ce qui est en accord avec une étude récente qui a montré que Wnt-3a est capable d'induire à la fois la voie canonique induisant la prolifération chondrocytaire et les voies non canoniques responsables de la dédifférenciation des chondrocytes (Nalesso et al. 2011).

Dans le cartilage, l'expression du SDC4 est augmentée dans les chondrocytes hypertrophiques et son expression est élevée dans le cartilage arthrosique humain et dans des modèles animaux d'arthrose (Barre et al. 2000 ; Echtermeyer et al. 2009). De plus, l'expression du SDC4 est augmentée dans les chondrocytes traités par les cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (nos résultats), via l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B.

Le SDC4 est impliqué dans la régulation de plusieurs voies de signalisation, dont la voie la plus caractérisée est la voie de PKC, grâce à son rôle de co-récepteur membranaire. Le rôle du SDC4 est bien établi dans le développement et la différenciation chondrocytaire et son implication dans les changements pathologiques du cartilage a été rapportée (Tkachenko et al. 2005).

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'effet de Wnt-3a sur l'expression du SDC4 dans des explants de cartilage et dans des chondrocytes primaires humains en culture. Nous avons observé que le traitement des explants de cartilage et des chondrocytes et par Wnt-3a pendant 24h inhibe l'expression du SDC4 de 57% et 54%, respectivement. Nous avons également montré que le traitement des chondrocytes par wnt-3a inhibe de 45% l'activité du promoteur du gène SDC4 humain. Afin d'étudier le rôle potentiel du SDC4 dans la régulation la voie de signalisation de Wnt-3a dans les chondrocytes humains, son expression a été inhibée par la technique d'ARN interférence. Nous avons montré que le SDC4 est indispensable à la phosphorylation des kinases PKC, SAPK/JNK, ERK1/2 et Akt. En effet, l'inhibition de l'expression du SDC4 induit une disparition des formes phosphorylées de PKC et de SAPK/JNK et une diminution significative des formes phosphorylées de ERK1/2 et de Akt dans les extraits protéiques des chondrocytes transfectés par le siSDC4 par rapport aux cellules transfectées par le si-contrôle. La quantité de  $\beta$ -caténine semble inchangée dans les

extraits protéiques des chondrocytes transfectés par le siSDC4 par rapport aux cellules transfectées par le si-contrôle. Nos résultats montrent également que Wnt-3a est incapable d'activer les voies non canoniques dans les chondrocytes transfectés par le siSDC4. La phosphorylation de PKC, SAPK/JNK, ERK1/2 et Akt n'est pas induite par Wnt-3a dans les cellules transfectées par le siSDC4 alors qu'elle est induite dans les chondrocytes transfectés par le si-contrôle. En revanche, le traitement par Wnt-3a induit l'accumulation de la  $\beta$ -caténine et inhibe sa phosphorylation dans les chondrocytes transfectés par le siSDC4 ou par le si-contrôle. Ces résultats montrent clairement que le SDC4 est indispensable pour la phosphorylation de PKC, SAPK/JNK, Akt et ERK1/2 dans les chondrocytes. Nous pouvons en conclure que l'inhibition du SDC4 dans les chondrocytes pourrait conduire à une dérégulation des voies de signalisation dépendantes de PKC, SAPK/JNK, Akt et ERK1/2 et par la suite à une dérégulation de l'expression des gènes dépendants de ces voies de signalisation.

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'inhibition du SDC4 sur la dédifférenciation chondrocytaire induite par Wnt-3a, nous avons analysé l'expression des marqueurs de différenciation des chondrocytes en particulier le collagène II, la MMP13 et l'ADAMTs4 dans les chondrocytes transfectés par les siSDC4 et si-contrôle, respectivement. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition du SDC4 induit une diminution de 50% de l'expression des ARNm du collagène II et augmente de 3,5 et 3 fois l'expression des ARNm de la MMP13 et de l'ADAMTs4, respectivement. Le traitement des chondrocytes transfectés par le siSDC4 par Wnt-3a n'induit aucun changement sur l'expression des ARNm du collagène II par rapport aux cellules contrôles. Au contraire, l'inhibition de SDC4 réduit l'effet inhibiteur de Wnt-3a sur l'expression de la MMP13 et de l'ADAMTs4.

Afin de confirmer l'importance du SDC4 dans les effets induits par Wnt-3a, nous avons surexprimé le SDC4 par transfection des chondrocytes par un vecteur d'expression du SDC4, le pCMV-SDC4. Nous avons observé que la transfection des chondrocytes par le pCMV-SDC4 prévient l'inhibition par Wnt-3a de l'expression du collagène II, alors qu'il est toujours inhibé dans les chondrocytes transfectés par le pCMV-natif (contrôle).

Ces résultats montrent que Wnt-3a inhibe l'expression du collagène II via l'inhibition du SDC4. D'autre part, le fait que l'inhibition du SDC4 induit l'expression de MMP13 et de l'ADAMTs4 nous a poussé à nous demander si l'inhibition du SDC4 est un mécanisme par lequel les chondrocytes s'opposent au déséquilibre entre voies canoniques et non canoniques induit par Wnt-3a.

L'activation et l'inhibition de la voie canonique de Wnt conduisent à une chondrodysplasie avec une maturation retardée des chondrocytes (Enomoto-Iwamoto et al. 2002 ; Akiyama et al. 2004) et également à une dégénération du cartilage adulte (Chen et al. 2008 ; Koyama et al. 2008 ; Zhu et al. 2008). Il a été montré que la surexpression et la mutation de Wnt-5a, qui active la voie  $Ca^{2+}/CaMKII$  chez le poisson zèbre et le xénope (Slusarski et al. 1997b ; Kühl et al. 2000), induisent une chondrodysplasie avec une prolifération réduite et une maturation hypertrophique des chondrocytes chez l'embryon de souris (Yamaguchi et al. 1999; Yang et al. 2003.). En outre, le traitement des chondrocytes par DKK-1, un inhibiteur de la voie canonique de Wnt, induit une diminution drastique dans l'expression des gènes du collagène II, de l'agrécan, de SOX9, de la MMP13, et de l'ADAMTs4 dans les chondrocytes primaires en culture (Nalesso et al. 2011), ce qui montre que la voie canonique est déjà activée dans les chondrocytes. Il a été suggéré que les voies canoniques et non canoniques s'inhibent réciproquement l'une l'autre (Nalesso et al. 2011). Par conséquent, le blocage de la voie canonique peut entraîner une dédifférenciation des chondrocytes en réprimant les voies non canoniques. Des stimuli comme l'IL-1 et les charges biomécaniques qui régulent la voie  $Ca^{2+}/CaMKII$  peuvent influencer la signalisation de Wnt en changeant l'équilibre entre  $\beta$ -caténine et CaMKII (Pritchard et al. 2006 ; Shimazaki et al. 2006). En raison de la complexité des voies activées par la famille Wnt et les fonctions diverses que ces voies peuvent jouer, des thérapies ciblées devraient être développées. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués, nous avons cherché les voies responsables de l'inhibition du SDC4, de la MMP13, du collagène II et de l'ADAMTs4 dans les chondrocytes primaires humains. Pour cela, nous avons utilisé la méthode d'ARN interférence et des inhibiteurs pharmacologiques des différentes voies de signalisation. L'inhibition de la voie canonique par des siRNA dirigées contre la  $\beta$ -caténine (siCTNNB1) ou par l'inhibiteur biologique DKK-1, prévient l'inhibition de la MMP13 et de l'ADAMTs4 par Wnt-3a mais sans effet sur l'inhibition du SDC4 et du collagène II dans les chondrocytes. D'autre part, l'inhibition de MAPK1 (ERK2) et de MAPK3 (ERK1) par ARN interférence (siMAPK1 et siMAPK3) empêche l'inhibition de l'expression du SDC4 par Wnt-3a. Ces résultats montrent que Wnt-3a inhibe l'expression des MMPs par la voie canonique, alors qu'il inhibe l'expression du SDC4 via la voie ERK1/2. Nous avons également remarqué que l'inhibition de PKC $\alpha$  et  $\delta$  et de MAPK1 et 3 réduit l'effet inhibiteur de Wnt-3a sur l'expression de la MMP13 et de l'ADAMTs4.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation PKC (GÖ6976), ERK1/2 (PD184161) et JNK (SP60012). Les chondrocytes en culture ont été traités par ces différents inhibiteurs avant le traitement par Wnt-3a. Les

résultats montrent que l'inhibition du SDC4 et du collagène II par Wnt-3a est abolie en présence des inhibiteurs des voies ERK1/2 (PD184161) et de JNK (SP60012). En ce qui concerne MMP13 et ADAMTs4, aucun de ces inhibiteurs n'empêche leur inhibition par Wnt-3a. Ces résultats montrent que l'inhibition de la MMP13 et de l'ADAMTs4 par Wnt-3a est  $\beta$ -caténine-dépendante tandis que l'inhibition du SDC4 et du collagène II est ERK1/2 dépendante.

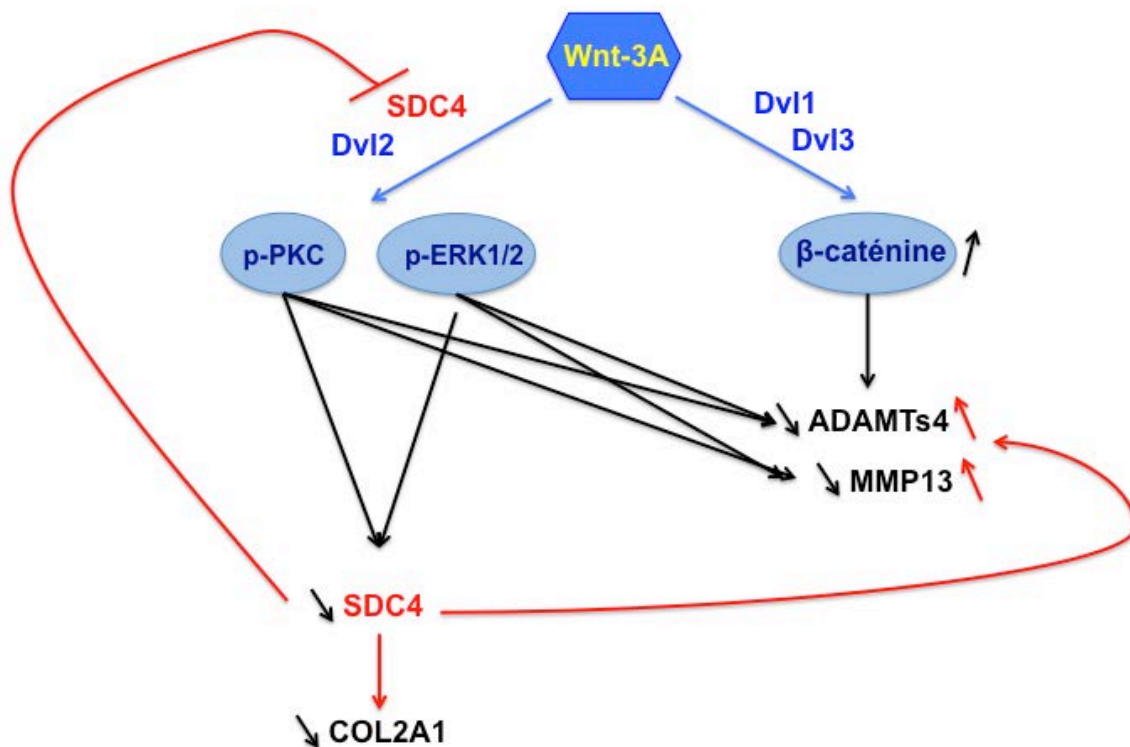
Les protéines dishevelled (Dvl) sont des effecteurs intracellulaires de la voie Wnt et sont parmi les rares intermédiaires de signalisation communs aux deux voies de signalisation Wnt, canoniques et non canoniques. Les protéines Dvl ont aussi une capacité à former des complexes multimériques, et cela peut être induit par la signalisation Wnt (Schwarz-Romond et al. 2005 ; Schwarz-Romond et al. 2007). Dans la voie canonique, ces multimères sont recrutés vers les récepteurs Wnt pour former des signalosomes, qui, à leur tour, recrutent l'Axine et d'autres protéines qui inactivent le complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine (Bilic et al. 2007 ; Taelman et al. 2010). En outre, plusieurs études ont montré que Dvl est phosphorylée non seulement en réponse à Wnt, qui stimule la voie canonique, mais aussi en réponse à ceux qui, comme Wnt-5a, ne stabilise pas la  $\beta$ -caténine (Schulte et al. 2005 ; Bryja et al. 2007). La phosphorylation de Dvl par Wnt peut se produire en l'absence d'une stabilisation de la  $\beta$ -caténine et est indépendant des composants du récepteur LRP5/6 indispensable à la signalisation canonique de Wnt. Étant donné l'importance des protéines Dvl dans la signalisation canonique et non canonique de Wnt, nous avons étudié le rôle de ces protéines sur l'inhibition de l'expression du SDC4, du collagène II, de l'ADAMTs4 et de la MMP13 par Wnt-3a. Nous avons observé que Wnt-3a inhibe MMP13 et ADAMTs4 via Dvl1 et Dvl3 et le collagène II via Dvl2. Ce qui montre que Dvl2 régule la voie non canonique dépendante du SDC4, probablement en interagissant avec ce dernier.

Nous avons montré que l'IL-1 $\beta$  induit l'expression du SDC4 et de l'ADAMTs4 (gènes régulés par la voie non canonique de Wnt-3a). Afin de déterminer si le traitement des chondrocytes par Wnt-3a peut arrêter l'induction de ces gènes par IL-1 $\beta$ , des chondrocytes en culture ont été traités par Wnt-3a, l'IL-1 $\beta$  ou les deux ensembles. L'analyse de l'expression du SDC4 et de l'ADAMTs4 montre que Wnt-3a arrête l'augmentation par l'IL-1 $\beta$  de l'expression du SDC4 et réduit fortement celle de l'ADAMTs4. L'IL-1 $\beta$  induit de trois fois l'expression du SDC4 dans les chondrocytes mais cette induction disparaît en présence de Wnt-3a. De même, l'IL-1 $\beta$  seul induit de six fois l'expression de l'ADAMTs4 mais de deux fois seulement en présence de Wnt-3a. L'analyse de l'activité du promoteur du SDC4 dans les

chondrocytes traités par l'IL-1 $\beta$  et Wnt-3a montre que Wnt-3a est capable d'arrêter l'induction par IL-1 $\beta$  de l'activité du promoteur.

Nous avons ensuite montré que Wnt-3a est capable de réduire l'effet inhibiteur de l'IL-1 $\beta$  sur l'anabolisme des PGs probablement en réduisant leur dégradation via sa capacité à inhiber l'ADAMTs4 responsable de leur dégradation.

Dans la figure suivante nous proposons un mécanisme des voies de signalisation activées par Wnt-3a dans les chondrocytes primaires humains.



Au niveau des chondrocytes Wnt-3a induit l'activation de la voie canonique via Dvl1 et Dvl3 conduisant à l'inhibition de l'ADAMTs4 et de la MMP13. L'activation de la voie non canonique via Dvl2 et SDC4 conduit la phosphorylation des kinase PKC et ERK1/2 entraînant l'inhibition de l'expression du SDC4 et du Collagène II. L'inhibition du SDC4 conduit par un mécanisme de feed back à la suppression des effet de la voie non canonique et à l'augmentation de l'expression de l'ADMTs4 et MMP13.



***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## *Références bibliographiques*

Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 2004;18:1072–1087.

Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3533–3544.

Aimes RT and Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 1995; 270: 5872-6.

Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:11-26.

Appleton CTG, Usmani SE, Mort JS, Beier F. Rho/ROCK and MEK/ERK activation by transforming growth factor- $\alpha$  induces articular cartilage degradation. *Laboratory Investigation* 2010;90:20–30.

Baasanjav S, Al-Gazali L, Hashiguchi T, Mizumoto S, Fischer B, Horn D, Seelow D, Ali BR, Aziz SA, Langer R, Saleh AA, Becker C, Nürnberg G, Cantagrel V, Gleeson JG, Gomez D, Michel JB, Stricker S, Lindner TH, Nürnberg P, Sugahara K, Mundlos S, Hoffmann K. Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects. *Am. J. Hum. Genet.* 2011;89:15–27.

Bacconnier L, Jorgensen C, Fabre S. Erosive osteoarthritis of the hand: clinical experience with anakinra. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 1078–1079.

Bae DK, Yoon KH, Song SJ. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. *Arthroscopy.* 2006;22; 367–374.

Barre PE, Redini F, Boumediene K, Vielpeau C, Pujol JP. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of syndecan-1 and -4 messages in cartilage and cultured chondrocytes from osteoarthritic joints. *Osteoarthr. Cartil. Oars Osteoarthr.* 2000. Res. Soc. 8:34–43.

Barré L, Venkatesan N, Magdalou J, Netter P, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M. Evidence of calcium-dependent pathway in the regulation of human  $\alpha$ -1,3-glucuronosyltransferase-1 (GlcAT-I) gene expression: a key enzyme in proteoglycan synthesis. *FASEB J.* 2006;20:1692–1694.

Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.* 2008;87:77-95.

Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*. 2007;15:1619-22.

Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, Bex FJ, Lambert AJ, Goad MB, Gaur T, Stein GS, Lian JB, Komm BS. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol* 2004;18:1222-37.

Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004;93:1210-30.

Bontemps Y, Vuillermoz B, Antonicelli F, Perreau C, Danan JL, Maquart FX, Wegrowski Y. Specific protein-1 is a universal regulator of UDP-glucose dehydrogenase expression: its positive involvement in transforming growth factor- $\beta$  signaling and inhibition in hypoxia. *J. Biol. Chem.* 2003;278:21566–21575.

Bruckner P and Van der Rest M. Structure and function of cartilage collagens." *Microsc Res Tech.* 1994;28: 378-84.

Bruckner P, Vaughan L, Winterhalter KH. Type IX collagen from sternal cartilage of chicken embryo contains covalently bound glycosaminoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:2608-12.

Bryja V, Schulte G, Rawal N, Grahn A, Arenas E. Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. *J Cell Sci.* 2007;120:586-95.

Buckwalter JA and Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect.*1998;47:487-504.a

Buckwalter JA and Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *fnstr Course Lect.*1998;47:477-86.b

Buckwalter JA, Rosenberg LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev* 1988;1:87-112.

Buckwalter JA. Maintaining and restoring mobility in middle and old age: the importance of the soft tissues. *fnstr Course Lect.* 1997;46:459-69.

Budde BS, Mizumoto S, Kogawa R, Becker C, Altmüller J, Thiele H, Frommolt P, Toliat MR, Hammerle JM, Hohne W, Sugahara K, Nürnberg P, Kennerknecht I. Mutation of B3GAT3 causes skeletal dysplasia in a consanguineous clan from Nias. The 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Francisco, CA, November 8, 2012, Abstract 2861T, American Society of Human Genetics, Bethesda, MD.

Bui C, Talhaoui I, Chabel M, Mulliert G, Coughtrie MW, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S. Molecular characterization of  $\beta$  1,4-galactosyltransferase 7 genetic mutations linked to the progeroid form of Ehlers-Danlos syndrome (EDS). *FEBS Lett.*2010;584:3962–68.a

Cecil DL, Johnson K, Rediske J, Lotz M, Schmidt AM, Terkeltaub R. Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products. *Journal of Immunology* 2005;175:8296–8302.

Chadjichristos C, Ghayor C, Kypriotou M, Martin G, Renard E, Ala-Kokko L, Suske G, de Crombrughe B, Pujol JP, Galéra P. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 $\alpha$  down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 2003;278:39762–39772.

Chen M, Zhu M, Awad H, Li TF, Sheu TJ, Boyce BF, Chen D, O'Keefe RJ. Inhibition of beta-catenin signaling causes defects in postnatal cartilage development. *J. Cell Sci.* 2008;121:1455–1465.

Chevalier X, Goupille P, Beaulieu AD, Burch FX, Bensen WG, Conrozier T, Loeuille D, Kivitz AJ, Silver D, Appleton BE. Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum.* 2009;61: 344–352.

Cho HH, Kim YJ, Kim SJ, Kim JH, Bae YC, Ba B, Jung JS. Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue Eng* 2006;12:111-21.

Chun J, Oh H, Yang S, Park M. Wnt signaling in cartilage development and degeneration. *BMB Rep.* 2008; 41: 485–494.

Church V, Nohn T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 2002;115:4809-18.

Cohen AR, Wood DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH, Anderson JM. Human CASK/LIN-2 Binds Syndecan-2 and Protein 4.1 and Localizes to the Basolateral Membrane of Epithelial Cells. *J Cell Biol.* 1998;142:129–138.

Cohen SB, Proudman S, Kivitz AJ, Burch FX, Donohue JP, Burstein D, Sun YN, Banfield C, Vincent MS, Ni L, Zack DJ. A randomized, double-blind study of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R1) in patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Res Ther.* 2011;13: R125.

Cornelison DD, Wilcox-Adelman SA, Goetinck PF, Rauvala H, Rapraeger AC, Olwin BB. Essential and separable roles for syndecan-3 and syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev.* 2004;18:2231–36.

Daniels DL, Weis WI. ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Mol Cell* 2002;10:573-84.

Dai L, Zhang X, Hu X, Zhou C, Ao Y. Silencing of microRNA-101 prevents IL-1 $\beta$ -induced extracellular matrix degradation in chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy* 2012;14:R268.

Davidson ENB, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Research & Therapy* 2005;7:R1338–R1347.

Davidson ENB, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Expression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) and the TGF $\beta$  signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006; 65:1414–21.

Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005;8:739-50.

Dell'accio F, De Bari C, Eltawil NM, Vanhummelen P, Pitzalis C. Identification of the molecular response of articular cartilage to injury, by microarray screening: Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1410-21.

Dudhia J, Davidson CM, Wells TM, Hardingham TE, Bayliss MT. Studies on the G3 domain of aggrecan from human cartilage. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;785:245-247.

Eames BF, Yan YL, Swartz ME, Levic DS, Knapik EW, Postlethwait JH, Kimmel CB. Mutations in *fam20b* and *xylt1* reveal that cartilage matrix controls timing of endochondral ossification by inhibiting chondrocyte maturation. *PLoS Genet* 2011;7:e1002246.

Echtermeyer F, Bertrand J, Dreier R, Meinecke I, Neugebauer K, Fuerst M, Lee YJ, Song YW, Herzog C, Theilmeier G, Pap T. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat. Med.*2009;15:1072–76.

Enomoto-Iwamoto M, Kitagaki J, Koyama E, Tamamura Y, Wu C, Kanatani N, Koike T, Okada H, Komori T, Yoneda T, Church V, Francis-West PH, Kurisu K, Nohno T, Pacifici M, Iwamoto M. The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Dev Biol* 2002;251:142-56.

Ethell IM, Hagihara K, Miura Y, Irie F, Yamaguchi Y. Synbindin, a novel syndecan-2-binding protein in neuronal dendritic spines. *J Cell Biol.* 2000;151:53–68.

Eyre DR, Apon S, Wu JJ, Ericsson LH, Walsh KA. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett.* 1987;220:337-41.

Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age- related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem J.*1988;252:495-500.

Eyre DR, Wu JJ, Woods P. Cartilage specific collagens. Structural studies, in *Articular cartilage and osteoarthritis*. K.K.e. coll., Editol Raven Press;1992: 119-131.

Fioravanti A, Fabbroni M, Cerase A, Galeazzi M. Treatment of erosive osteoarthritis of the hands by intra-articular infliximab injections: a pilot study. *Rheumatol Int.* 2009;29: 961–965.

Franchimont P and Bassleer C. Effects of hormones and local growth factors on articular

chondrocyte metabolism. *J Rheumatol Suppl.* 1991;27:68-70.

Gao Y, Li M, Chen W, Simons M. Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol.* 2000;184:373-379.

Gao SY, Li EM, Cui L, Lu XF, Meng LY, Yuan HM, Xie JJ, Du ZP, Pang JX, Xu LY. Sp1 and AP-1 regulate expression of the human gene VIL2 in esophageal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 2009 ;284:7995-8004.

Gaur T, Rich L, Lengner CJ, Hussain S, Trevant B, Ayers D, Stein JL, Bodine PV, Komm BS, Stein GS, Lian JB. Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation. *J Cell Physiol.* 2006;208:87-96.

Ge X, Ma X, Meng J, Zhang C, Ma K, Zhou C. Role of Wnt-5A in interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase expression in rabbit temporomandibular joint condylar chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2009;60:2714-22.

Geary RL, Koyama N, Wang TW, Vergel S, Clowes AW. Failure of heparin to inhibit intimal hyperplasia in injured baboon arteries. The role of heparin-sensitive and -insensitive pathways in the stimulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *Circulation.* 1995;91:2972-81.

Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003; 55:1531-46.

Goldring MB. Articular cartilage degradation in osteoarthritis. *HSS Journal* 2012; 8:7-9.

Gordon MK, Castagnola P, Dublet B, Linsenmayer TF, Van der Rest M, Mayne R, Olsen BR. Cloning of a cDNA for a new member of the class of fibril-associated collagens with interrupted triple helices. *Eur J Biochem.* 1991;201:333-8.

Gotte M, and Kresse H. Defective glycosaminoglycan substitution of decorin in a patient with progeroid syndrome is a direct consequence of two point mutations in the galactosyltransferase I (beta4GalT-7) gene. *Biochem. Genet.* 2005;43:65-77.

Götte M, Spillmann D, Yip GW, Versteeg E, Echtermeyer FG, van Kuppevelt TH, Kiesel L. Changes in heparan sulfate are associated with delayed wound repair, altered cell migration, adhesion and contractility in the galactosyltransferase I (beta4GalT-7) deficient form of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2008;17:996-1009.

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

Götting C, Kuhn J, Zahn R, Brinkmann T, Kleesiek K. Molecular cloning and expression of human UDP-D-xylose-proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase and its first isoforme XT-II. *J.Mol.Biol.* 2000;304:517-28.

Gould SE, Upholt WB, Kosher RA. Characterization of chicken syndecan-3 as a heparan sulfate proteoglycan and its expression during embryogenesis. *Dev Biol.* 1995;168:438-451.

Granes F, Berndt C, Roy C, Mangeat P, Reina M, Vilaro S. Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain. *FEBS Lett.* 2003;547:212–216.

Grootjans JJ, Zimmermann P, Reekmans G, Smets A, Degeest G, Durr J, David G. Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:13683–688.

Grotewold L, Ruther U. The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J* 2002;21:966-975.

Hamerman D. The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med* 1989;320:1322-30.

Hamerman, D. "Aging and osteoarthritis: basic mechanisms." *J Am Geriatr Soc.* 1993;41:760-70.

Hardingham TE and Fosang AJ. The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol Suppl*, 1995;43: 86-90.

Hartmann C, Tabin CJ. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development* 2000;127:3141-59.

Hartmann C. Wnt-signaling and skeletogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2(3):274-6.

Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 2005;8:727-38.

Hoepfner LH, Secreto FJ, Westendorf JJ. Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:485-96.

Hoff P, Buttgerit F, Burmester GR, Jakstadt M, Gaber T, Andreas K, Matziolis G, Perka C, Röhner E. Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes. *International Orthopaedics* 2013; 37:145–51.

Hoff P, Buttgerit F, Burmester GR, Jakstadt M, Gaber T, Andreas K, Matziolis G, Perka C, Röhner E. Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes. *International Orthopaedics* 2013; 37:145–51.

Horowitz A, Murakami M, Gao Y, Simons M. Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate mediates the interaction of syndecan-4 with protein kinase C. *Biochemistry.* 1999;38:15871–877.

Horowitz A, Simons M. Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase C alpha. *J Biol Chem.* 1998;273:25548–551.

Hoang B, Moos M, Jr., Vukicevic S, Luyten FP. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J Biol Chem* 1996;271:26131-7.

Hsueh YP, Yang FC, Kharazia V, Naisbitt S, Cohen AR, Weinberg RJ, Sheng M. Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J Cell Biol.* 1998;142:139–151.

Hurtado A, Podinin H, Oudega M, Grimpe B. Deoxyribozyme-mediated knockdown of xylosyltransferase-1 mRNA promotes axon growth in the adult rat spinal cord. *Brain* 2008;131:2596–2605.

Hwang SG, Ryu JH, Kim IC, Jho EH, Jung HC, Kim K, Kim SJ, Chun JS. Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J Biol Chem* 2004;279:26597-604.

Hwang SG, Yu SS, Lee SW, Chun JS. Wnt-3a regulates chondrocyte differentiation via c-Jun/AP-1 pathway. *FEBS Lett* 2005;579:4837-42.

Ijiri K, Zerbini LF, Peng H, Otu HH, Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir C, Walsh N, Bierbaum BE, Mattingly D, van Flandern G, Komiya S, Aigner T, Libermann TA, Goldring MB. Differential expression of GADD45<sub>β</sub> in normal and osteoarthritic cartilage: potential role in homeostasis of articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.*2008 ;58 :2075–2087.

Im GI, Quan Z. The effects of Wnt inhibitors on the chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2010;16:2405-13.

IshiguroK ,KadomatsuK, KojimaT, MuramatsuH, NakamuraE, ItoM, Nagasaka T, Kobayashi H, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T. Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. *Dev Dyn.* 2000;219:539–544.

Jang SI and Steinert PM. Loricrin expression in cultured human keratinocytes is controlled by a complex interplay between transcription factors of the Sp1, CREB, AP-1, and AP2 families. *J. Biol. Chem.*2002; 277:42268–42279.

Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu SI, Ishikawa T, Noji S, Nohno T. Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev Growth Differ* 1999;41:29-40.

Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116:2627-34.

Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol* 2009;19:119-29.

Kohn A, Moon R. Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 2005;38:439–46.

Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, Sugito H, Young B, Yuasa T, Okabe T, Ochiai T, Kamiya N, Rountree RB, Kingsley DM, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Pacifici M. A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Dev. Biol.* 2008;316:62–73.

Kuettner KE, Aydelotte MB, Thonar EJ. Articular cartilage matrix and structure: a minireview. *J Rheumatol Suppl.*1991;27: 46-8.



Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 2000;16:279-83.

Lafeber FP, van Roy H, Wilbrink B, Huber-Bruning O, and Bijlsma JW. Human osteoarthritic cartilage is synthetically more active but in culture less vital than normal cartilage. *J. Rheumatol.*1992;19:123–129.

Lahm A, Mrosek E, Spank H, Erggelet C, Kasch R, Esser J, Merk H. Changes in content and synthesis of collagen types and proteoglycans in osteoarthritis of the knee joint and comparison of quantitative analysis with photoshop-based image analysis. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 2010; 130:557–64.

Lane NE, Lian K, Nevitt MC, Zmuda JM, Lui L, Li J, Wang J, Fontecha M, Umblas N, Rosenbach M, de Leon P, Corr M. Frizzled-related protein variants are risk factors for hip osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:1246-54.

Larsen LJ, Schottstaedt ER, Bost FC. Multiple congenital dislocations associated with characteristic facial abnormality. *J. Pediat.* 1950;37:574–81.

Leijten JC, van Blitterwijk CA, Karperien M, Emons J, van Gool S, Wit JM, et al. *GREM1*, *FRZB* and *DKK1* are key regulators of human articular cartilage homeostasis. *Arthritis Rheum* 2012.

Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, Ferreira A, Ciesielski C, Carson DA, Corr M.. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Nat Acad Sci USA* 2004;101:9757-62.

Lories RJ, Peeters J, Bakker A, Tylzanowski P, Derese I, Schrooten J, Thomas JT, Luyten FP. Articular cartilage and biomechanical properties of the long bones in *Frzb*-knockout mice. *Arthritis Rheum* 2007;56:4095-103.

Li L, and Davie JR. The role of *Sp1* and *Sp3* in normal and cancer cell biology. *Ann. Anat.*2010;192:275–283.

Li Y, Lacerda DA, Warman ML, Beier DR, Yoshioka H, Ninomiya Y, Oxford JT, Morris NP, Andrikopoulos K, Ramirez F et al. A fibrillar collagen gene, *Coll1a1*, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell.* 1995;80: 423-30.

Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF- $\alpha$  is mediated by MAPkinases, AP-1, and NF- $\kappa$ B transcription factors in articular chondrocytes. *Experimental Cell Research* 2003; 288:208–17.

Linsenmayer TF, Eavey RD, Schmid TM. Type X collagen: a hypertrophic cartilage-specific molecule. *Pathol Immunopathol Res.*1988;7:14-9.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.

- Lorenzo P, Bayliss MT, Heinegard D. Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. *Matrix Biology* 2004; 23: 381–91.
- Ma B, van Blitterswijk CA, Karperien M. A Wnt/beta-catenin negative feedback loop inhibits IL-1- induced MMP expression in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2012;64:2589-600.
- Macdonald BT, Semenov MV, He X. SnapShot: Wnt/beta-catenin signaling. *Cell*. 2007;131:1204.
- Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem*. 2002;277: 22201-8.
- Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice and Research* 2008, 22: 351–84.
- Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 1992;14: 455- 63.
- Mayne R, Brewton RG. Extracellular matrix of cartilage: collagen. In: Woessner JF, Howell DS, editors. *Joint cartilage degradation: basic and clinical aspects*. New York: Marcel Dekker.1993:81–108.
- Mayne R. Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum*.1989;32:241-6.
- Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI." *J Cell Biol*. 1989;108: 191-7.
- Merz D, Liu R, Johnson K, Terkeltaub R. IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene  $\alpha$ /CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. *Journal of Immunology* 2003;171: 4406–15.
- Meulenbelt I, Seymour AB, Nieuwland M, Huizinga TWJ, van Duijn CM, Slagboom PE. Association of the interleukin-1 gene cluster with radiographic signs of osteoarthritis of the hip. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50:1179–86.
- Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending receptor context. *PLoS Biol* 2006;4:e115.
- Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* 1999;18:7860-72.
- Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2002;3:REVIEWS3001.
- Min JL, Meulenbelt I, Riyazi N, Kloppenburg M, Houwing-Duistermaat JJ, Seymour AB, et al. Association of the Frizzled-related protein gene with symptomatic osteoarthritis at multiple sites. *Arthritis Rheum* 2005;52:1077-80.
- Mizumoto S, Ikegawa S, Sugahara K. Human genetic disorders caused by mutations in genes

encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 2013;288:10953-61.

Modl JM, Sether LA, Haughton VM, Kneeland JB. Articular cartilage: correlation of histologic zones with signal intensity at MR imaging. *Radiology* 1991;181:853-5.

Monje P, Marinissen MJ, Gutkind JS. Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:7030–7043.

Muir H. Proteoglycans of cartilage. *J Clin Pathol Suppl (R Col Pathol)*.1978;12: 67-81.

Nakamura Y, Nawata M, Wakitani S. Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders. *Am. J. Pathol.* 2005;167:97–105.

Nalesso G, Sherwood J, Bertrand J, Pap T, Ramachandran M, De Bari C, Pitzalis C, Dell'accio F. WNT-3A modulates articular chondrocyte phenotype by activating both canonical and noncanonical pathways. *J Cell Biol* 2011;193:551-64.

Nam J, Perera P, Liu J, Rath B, Deschner J, Gassner R, Butterfield TA, Agarwal S. Sequential alterations in catabolic and anabolic gene expression parallel pathological changes during progression of monoiodoacetate-induced arthritis. *PLoS ONE* 2011 6:e24320.

Noti JD, Reinemann BC, Petrus MN. Sp1 binds two sites in the CD11c promoter in vivo specifically in myeloid cells and cooperates with AP-1 to activate transcription. *Mol. Cell Biol* 1996;16:2940–2950.

Oh ES, Woods A, Couchman JR. Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1997;272:8133-36.

Oh H, Chun CH, Chun JS. Dickkopf-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis Rheum* 2012.

Olsen BR. New insights into the function of collagens from genetic analysis. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7: 720-7.

Orth P, Cucchiaroni M, Kaul G, Ong MF, Gräber S, Kohn DM, Madry H. Temporal and spatial migration pattern of the subchondral bone plate in a rabbit osteochondral defect model. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2012; 20:1161–1169.

Parkkinen JJ, Ikonen J, Lammi MJ, Laakkonen J, Tammi M, Helminen HJ. Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys.* 1993;300:458-65.

Parr BA, Shea MJ, Vassileva G, McMahon AP. Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* 1993;119:247-61.

Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine* 2005; 24: 1–12.

Peyron J, Stanescu V. Cartilage articulaire normal de l'adulte. Anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *Encycl Med Chir (Paris) Appareil locomoteur* 1994;14-003-A-10.

Pfander D, Heinz N, Rothe P, Carl HD, Swoboda B. Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1 $\beta$ : a possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2004; 63:240–44.

Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Mwale F, Kojima T, Sakai T, Wahl C, El-Maadawy S, Webb G, Tchetina E, Wu W. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2002; 61:ii78–ii81.

Praillet C, Grimaud JA, Lortat-Jacob H. Les protéoglycanes. I Molécules aux multiples fonctions futures molécules thérapeutiques ? *Med. Sci.* 1998;14:412-420.

Pritchard S, Guilak F. Effects of interleukin-1 on calcium signaling and the increase of filamentous actin in isolated and in situ articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2006;54:2164-74.

Prydz K and Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci.*2000;113 :193-205.

Quentin E, Gladen A, Roden L, Kresse H. 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.* 1990;87:1342-46.

Rahuel-Clermont S, Daligault F, Piet MH, Gulberti S, Netter P, Branlant G, Magdalou J, Lattard V. Biochemical and thermodynamic characterization of mutated beta1,4-galactosyltransferase 7 involved in the progeroid form of the Ehlers-Danlos syndrome. *Biochem. J.*2010;432:303–11.

Ricote M, García-Tuñón I, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. Interleukin-1 (IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1RA) in prostate carcinoma. *Cancer.* 2004; 100: 1388–1396.

Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater.* 2006;12:92-101.

Rudnicki JA, Brown AM. Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro. *Dev Biol* 1997;185:104-18.

Ryu JH, Kim SJ, Kim SH, Oh CD, Hwang SG, Chun CH, Oh SH, Seong JK, Huh TL, Chun JS. Regulation of the chondrocyte phenotype by beta-catenin. *Development* 2002;129:5541-50.

Ryu JH, Chun JS. Opposing roles of WNT-5A and WNT-11 in interleukin-1 $\beta$  regulation of type II collagen expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2006;281:22039-47.

Sakkas LI, Johanson NA, Scanzello CR, Platsoucas CD. Interleukin-12 is expressed by infiltrating macrophages and synovial lining cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cellular Immunology* 1998; 188:105–10.

Scanzello CR, Umoh E, Pessler F, Diaz-Torne C, Miles T, Dicarlo E, Potter HG, Mandl L, Marx R, Rodeo S, Goldring SR, Crow MK. Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease. *Osteoarthritis and Cartilage* 2009;17:1040–48.

Scott JE. Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry* 1996;35:8795-99.

Seidler DG, Faiyaz-Ul-Haque M, Hansen U, Yip GW, Zaidi SH, Teebi AS, Kiesel L, Götte M. 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 (beta4GalT-7). *J. Mol. Med.*2006;84:583–94.

Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2791-96.

Shiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Iwase M, Yoshikai Y, Yanada M, Yamamoto K, Matsushita T, Nishimura M, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T. Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem.* 2001;276:47483–488.

Shimazaki A, Wright MO, Elliot K, Salter DM, Millward-Sadler SJ. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human articular chondrocytes. *Biorheology* 2006;43:223-33.

Shimizu H, Julius MA, Giarré M, Zheng Z, Brown AM, Kitajewski J. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ.* 1997;8:1349–1358.

Shin J, Lee W, Lee D, Koo BK, Han I, Lim Y, Woods A, Couchman JR, Oh ES. Solution structure of the dimeric cytoplasmic domain of syndecan-4. *Biochemistry.* 2001;40:8471–8478.

Schulte G, Bryja V, Rawal N, Castelo-Branco G, Sousa KM, Arenas E. Purified Wnt-5a increases differentiation of midbrain dopaminergic cells and dishevelled phosphorylation. *J. Neurochem.* 2005;92:1550–1553.

Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, Butler PJ, Kikuchi A, Higuchi Y, Bienz M. The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007;14:484–492.

Schwarz-Romond T, Merrifield C, Nichols BJ, Bienz M. The Wnt signalling effector Dishevelled forms dynamic protein assemblies rather than stable associations with cytoplasmic vesicles. *J. Cell Sci.*2005;118,5269–5277.

Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT. Modulation of embryonic intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling by Wnt-5A. *Dev Biol.* 1997;182:114-20.

Silbiger SM, Jacobsen VL, Cupples RL, Koski RA. Cloning of cDNAs encoding human TIMP-3, a novel member of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *Gene* 1994 ;141: 293-7.

Singh, DP, Bhargavan B, Chhunchha B, Kubo E, Kumar A, Fatma N. Transcriptional protein Sp1 regulates LEDGF transcription by directly interacting with its cis-elements in GC-rich region of TATA-less gene promoter. *PloS One*. 2012 ; 7, e37012.

Steel HH and Kohl EJ. Multiple congenital dislocations associated with other skeletal anomalies (Larsen's syndrome) in three siblings. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1972;54:75– 82.

Stott NS, Jiang TX, Chuong CM. Successive formative stages of precartilaginous mesenchymal condensations in vitro: modulation of cell adhesion by Wnt-7A and BMP-2. *J Cell Physiol* 1999;180:314- 24.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 1995;270: 5331-8.

Su S, Grover J, Roughley PJ, DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Zafarullah M. Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints. *Rheumatol Int.* 1999;18: 183-91.

Sun Y, Mauerhan DR, Kneisl JS, James Norton H, Zinchenko N, Ingram J, Hanley EN Jr, Gruber HE. Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic Menisci. *The Open Rheumatology Journal* 2012; 6: 24–32.

Surmann-Schmitt C, Widmann N, Dietz U, Saeger B, Eitzinger N, Nakamura Y, et al. Wif-1 is expressed at cartilage-mesenchyme interfaces and impedes Wnt3a-mediated inhibition of chondrogenesis. *J Cell Sci* 2009;122:3627-37.

Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec JL, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD, De Robertis EM. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell.* 2010;143:1136–1148.

Tanos T, Marinissen MJ, Leskow FC, Hochbaum D, Martinetto H, Gutkind JS, Coso OA. Phosphorylation of c-Fos by members of the p38MAPK family. Role in the AP-1 response to UVlight. *J. Biol.Chem.*2005 ;280 :18842–18852.

Thompson RC and Oegema TR. Metabolic activity of articular cartilage in osteoarthritis. An in vitro study. *J. Bone Joint Surg. Am* 1979; 61:407–16.

Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ. Res.* 2005;96:488–500.

Tortorella MD, Liu RQ, Burn T, Newton RC, Arner E. Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4). *Matrix Biol.*2002;21: 499-511.

- Trattnig S. Overuse of hyaline cartilage and imaging. *Eur J RadioI.*1997;25: 188-98.
- Trippel, S.B., Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl.*1995;43:129-32.
- Tung JT, Arnold CE, Alexander LH, Yuzbasiyan-Gurkan V, Venta PJ, Richardson DW, Caron JP. Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1  $\beta$ -stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. *American Journal of Veterinary Research* 2002;63:987–93.
- Valhmu WB, Palmer GD, Dobson J, Fischer SG, Ratcliffe A. Regulatory activities of the 5'- and 3'-untranslated regions and promoter of the human aggrecan gene. *J. Biol.Chem.*1998;273:6196–6202.
- Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, et al. Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 2007;56:137-46.
- Van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative Wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* 2008;1, re9.
- Venkatesan N, Barré L, Benani A, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M. Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery: a strategy to promote cartilage repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:18087-92.
- Venkatesan N, Barré L, Bourhim M, Magdalou J, Mainard D, Netter P, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M. xylosyltransferase-I regulates glycosaminoglycan synthesis during the pathogenic process of human osteoarthritis. *PLoS One* 2012; 7:e34020.
- Venkatesan N, Barré L, Magdalou J, Mainard D, Netter P, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M. Modulation of xylosyltransferase I expression provides a mechanism regulating glycosaminoglycan chain synthesis during cartilage destruction and repair. *Faseb J.*2009;23:813–22.
- Voorzanger-Rousselot N, Ben-Tabassi NC, Garnero P. Opposite relationships between circulating Dkk-1 and cartilage breakdown in patients with rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;68:1513-14.
- Wansleeben C, Meijlink F. The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Dev. Dyn* 2011;240:616-26.
- Weng LH, Wang CJ, Ko JY, Sun YC, Wang FS. Control of Dkk-1 ameliorates chondrocyte apoptosis, cartilage destruction, and subchondral bone deterioration in osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 2010;62:1393-1402.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Lmmunity.*1997;7:837-47.

Williams III RJ and Harnly HW. Microfracture: indications, technique, and results. *Instructional Course Lectures*. 2007; 56:419–428.

Yuasa T, Kondo N, Yasuhara R, Shimono K, Mackem S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Transient activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling induces abnormal growth plate closure and articular cartilage thickening in postnatal mice. *Am J Pathol* 2009;175:1993-2003.

Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, Tugwell P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16: 137–162.

Zhu M, Chen M, Zuscik M, Wu Q, Wang YJ, Rosier RN, O'Keefe RJ, Chen D. Inhibition of beta-catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction. *Arthritis Rheum*. 2008;58:2053-64.

Zhu M, Tang D, Wu Q, Hao S, Chen M, Xie C, Rosier RN, O'Keefe RJ, Zuscik M, Chen D.. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J Bone Miner Res*. 2009;24:12-21.



**Glycobiology and Extracellular Matrices:  
Regulation of Xylosyltransferase I Gene  
Expression by Interleukin 1  $\beta$  in Human  
Primary Chondrocyte Cells:  
MECHANISM AND IMPACT ON  
PROTEOGLYCAN SYNTHESIS**



Mostafa Khair, Mustapha Bourhim, Lydia  
Barré, Dong Li, Patrick Netter, Jacques  
Magdalou, Sylvie Fournel-Gigleux and  
Mohamed Ouzzine

*J. Biol. Chem.* 2013, 288:1774-1784.

doi: 10.1074/jbc.M112.419887 originally published online December 5, 2012

---

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M112.419887](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.419887)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](http://www.jbc.org/).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2012/12/05/M112.419887.DC1.html>

This article cites 43 references, 18 of which can be accessed free at  
<http://www.jbc.org/content/288/3/1774.full.html#ref-list-1>

# Regulation of Xylosyltransferase I Gene Expression by Interleukin 1 $\beta$ in Human Primary Chondrocyte Cells

## MECHANISM AND IMPACT ON PROTEOGLYCAN SYNTHESIS\*<sup>§</sup>

Received for publication, September 16, 2012, and in revised form, November 23, 2012. Published, JBC Papers in Press, December 5, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.419887

Mostafa Khair, Mustapha Bourhim, Lydia Barré, Dong Li, Patrick Netter, Jacques Magdalou, Sylvie Fournel-Gigleux, and Mohamed Ouzzine<sup>1</sup>

From the UMR 7561 CNRS, Faculty of Medicine, University of Lorraine, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

**Background:** Xylosyltransferase I plays a critical role in proteoglycan synthesis.

**Results:** IL-1 $\beta$  cytokine regulates xylosyltransferase I expression into an early phase of induction and a late phase of repression through AP-1 and Sp3, respectively.

**Conclusion:** AP-1 and Sp3 are key regulators of IL-1 $\beta$ -mediated modulation of xylosyltransferase I expression.

**Significance:** Sp3 may be a putative target to prevent IL-1 $\beta$ -mediated inhibition of proteoglycan synthesis during osteoarthritis.

Xylosyltransferase I (XT-I) is an essential enzyme of proteoglycan (PG) biosynthesis pathway catalyzing the initial and rate-limiting step in glycosaminoglycan chain assembly. It plays a critical role in the regulation of PG synthesis in cartilage; however, little is known about underlying mechanism. Here, we provide evidence that, in human primary chondrocytes, IL-1 $\beta$  regulates XT-I gene expression into an early phase of induction and a late phase of down-regulation. Based on promoter deletions, the region up to  $-850$  bp was defined as a major element of XT-I gene displaying both constitutive and IL-1 $\beta$ -regulated promoter activity. Point mutation and signaling analyses revealed that IL-1 $\beta$ -induced promoter activity is achieved through AP-1 response elements and mediated by SAP/JNK and p38 signaling pathways. Transactivation and chromatin immunoprecipitation assays indicated that AP-1 is a potent transactivator of XT-I promoter and that IL-1 $\beta$ -induced activity is mediated through increased recruitment of AP-1 to the promoter. Finally, we show that Sp3 is a repressor of XT-I promoter and bring evidence that the repressive effect of IL-1 $\beta$  during the late phase is mediated through Sp3 recruitment to the promoter. This suggests that modulation of Sp3 in cartilage could prevent IL-1 $\beta$  inhibition of PG synthesis and limit tissue degradation.

Proteoglycans (PGs)<sup>2</sup> are a family of complex macromolecules present in the extracellular matrix and on the cell surface. They are characterized by the presence of one or multiple glycosaminoglycan (GAG) side chains covalently linked to a core protein. The ability of GAGs to bind a wide range of ligands such as cytokines, chemokines, growth factors, and enzymes

confer to PGs a critical role in the regulatory network of the cell (1). Thus, PGs are implicated in various physiological functions, including cell signaling and morphogenesis, cell proliferation, normal development, cellular cross-talk, and organization of the extracellular matrix (2–4). It is noteworthy that the biological activity of PGs is intimately related to the makeup of their polysaccharide GAG chains. Indeed, defects in the assembly of GAGs resulting from genetic mutations in glycosyltransferases, which are involved in the biosynthesis process have severe biological consequences in both vertebrates and invertebrates (5–9). In addition to genetic disorders, strong evidence supports the involvement of GAG defects in the pathogenesis of several diseases, including arthropathies (10), atherosclerosis (11), Alzheimer disease (12), and cancer (13, 14). In these pathological conditions, biosynthesis of GAGs is markedly affected as a result of the altered function and/or regulation of synthetic enzymes.

Synthesis of GAG chains of PGs is initiated by xylosyltransferase I (XT-I; EC 2.4.2.26), a glycosyltransferase that catalyzes the transfer of xylose from UDP-xylose to specific serine residues in PG core proteins, forming the xylose  $\beta$ 1-O-Ser structure which then gives rise to the linkage tetrasaccharidic sequence GlcA $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Xyl $\beta$ 1-O-Ser. This oligosaccharide serves as a primer for chain elongation, forming either heparan sulfate or chondroitin sulfate, depending upon the addition of an GlcNAc or GalNAc residue, respectively. The chains then polymerize by the alternating addition of GlcA and GlcNAc or GalNAc residues and undergo modifications by the cooperative action of multiple sulfotransferases and epimerases, thus generating binding sites for various ligands (15). The XT-I enzyme has received much attention because it plays a central role in GAG synthesis. Indeed, this enzyme catalyzes the first and rate-limiting step in the biosynthesis pathway (16, 17) and is therefore considered as a regulatory factor of GAG biosynthesis process. Accordingly, it has been shown that loss of XT-I expression was associated with strong decrease in GAG synthesis during arthritis development in rats, whereas high expression of XT-I was associated with high rate of GAG synthesis during cartilage repair in a rat model of cartilage regen-

\* This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-BLAN-0163-01, GlycoCart) and by the Fondation pour la Recherche Médicale (DVO20081013491, Vieillessement Ostéoarticulaire).

<sup>§</sup> This article contains supplemental Figs. 1 and 2.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: UMR7561CNRS, Biopôle, Faculté de Médecine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: 33-383-685-427; Fax: 33-383-685-409; E-mail: ouzzine@medecine.uhp-nancy.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: PG, proteoglycan; XT-I, xylosyltransferase I; GAG, glycosaminoglycan; OA, osteoarthritis; F, forward; R, reverse; MTT, methylthiazol tetrazolium.

eration, suggesting that XT-I regulates GAG synthesis during cartilage destruction and repair (18).

A hallmark of osteoarthritis (OA) is the marked increase in proinflammatory cytokines mainly interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) that inhibit PG synthesis and enhance degradation leading to cartilage depletion and erosion (19), and it has been shown that in the earliest stages of OA, there is an increase in the rate of GAG synthesis (20). However, in the later stages of the disease, the GAG synthesis process progressively decreased leading to increased loss of PGs and to cartilage degeneration. Of note, we recently found that the level of XT-I expression in human OA cartilage is correlated with the rate of PG synthesis and the severity of tissue degeneration, suggesting that the quantitative changes in XT-I expression might dictate the disease-related variations in PG synthesis (21).

OA disease develops in the context of chondrocytes responding to a stress-associated, proinflammatory environment. Thus, it is of particular importance to explore whether the expression of XT-I, that regulates PG synthesis in cartilage, is affected by the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$ , the main cytokine implicated in OA disease and to determine the molecular mechanism involved. Our results presented here reveal for the first time that XT-I gene expression is regulated by IL-1 $\beta$  into an early phase of induction and a late phase of down-regulation in human primary chondrocytes. We cloned the human XT-I gene promoter sequence and present evidence that both AP-1 and Sp1 transcription factors are required for basal promoter activity and demonstrate that stimulation of XT-I promoter activity by IL-1 $\beta$  is mediated through AP-1 response elements and SAP/JNK and p38 signaling pathways. Furthermore, we show that AP-1 transcription factor is a potent transactivator of the promoter and provide evidence that IL-1 $\beta$  stimulation of XT-I expression is mediated through increased recruitment of AP-1 transcription factor to the AP-1 response elements of the promoter. Moreover, we show that Sp3 transcription factor is a repressor of XT-I promoter and provide evidence that the repressive effect of IL-1 $\beta$  during the late phase results from recruitment of Sp3 to a critical Sp1 binding site.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chondrocyte Isolation and Culture**—Primary chondrocyte cells were isolated from cartilage samples taken from macroscopically normal areas of cartilage knee obtained from 13 individual OA patients (mean age  $65 \pm 9$  years) undergoing total knee replacement as described previously (22). This study was approved by our local research institution (Commission de la Recherche Clinique; registration no. UF 9757, CPRC 2004, Cellules souches et chondrogénèse). The protocol conforms to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki, and written informed consent has been obtained from each patient. Cells were maintained in DMEM-F12 medium supplemented with 2 mM glutamine, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin, and 10% (v/v) fetal calf serum (Invitrogen) at 37 °C in a humidified atmosphere supplemented with 5% CO<sub>2</sub>. Each of the individual cultures was tested for its responsiveness to IL-1 $\beta$  and TGF $\beta$  by measuring the rate of PG synthesis before and after cytokine treatment. Eight of the 13 chondrocyte cultures were responsive to both cytokines. Three of them were selected and

used in this study based on their high responsiveness to the cytokines.

**Cytokine Treatments**—Human primary chondrocyte cells were seeded onto six-well plates at  $5 \times 10^5$  cells/ml in DMEM F12 and allowed to grow to 80% confluence over 24 h. Cells were then serum-starved for 24 h and treated either with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) or vehicle for 6 h, 12 h, and 24 h prior to PG synthesis and XT-I expression analyses.

**Proteoglycan Synthesis**—Proteoglycan synthesis, as measured by <sup>35</sup>S-sulfate incorporation, was performed essentially as described (23). Briefly, chondrocytes were cultured in six-well plates in DMEM F-12 until 80% confluence and then radiolabeled with 10  $\mu$ Ci/ml <sup>35</sup>S-sulfate (PerkinElmer Life Sciences) for 6 h. Culture medium was collected and digested with papain (1 mg/ml), and aliquots of <sup>35</sup>S-labeled GAGs were precipitated by cetylpyridinium chloride and dissolved in scintillation fluid (Ultima Gold, PerkinElmer Life Science). The radioactivity associated with GAGs was measured by liquid scintillation counting (Packard, Rungis, France).

**Real-time Quantitative RT-PCR**—Total RNA from chondrocyte cells treated or not with IL-1 $\beta$  was isolated using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). The first strand cDNA synthesis reaction was performed using 500 ng of total RNA with oligo(dT) primer and Super Script Reverse Transcriptase (Clontech, Mountain View, CA). Quantitative PCR was carried out using SYBR Green Master Mix (Qiagen) and validated RT<sup>2</sup> PCR primer set for human XT-I, aggrecan, sox9, COL2A1, COL1A1, and ribosomal protein S29 (SuperArray Bioscience Corp., Frederick, MD) with the use of LightCycler detection system (Roche Applied Science). Cycling parameters were 15 min at 95 °C; 40 cycles of 15 s at 95 °C, 25 s at 55 °C, and 20 s at 72 °C. The specificity of PCR amplifications was examined by agarose gel electrophoresis. Gene expression was determined in triplicate in three separate experiments and normalized using the housekeeping gene ribosomal protein S29. Analyses and fold differences were determined using the comparative C<sub>T</sub> method. Fold change was calculated from the  $\Delta\Delta C_T$  values with the formula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , and data are relative to control values.

**Cloning of XT-I Promoter and Reporter Gene Constructs**—The human XT-I promoter region -1740 to +85 was amplified from human genomic DNA by PCR using 5'-TAGATGG-AGTCTTGCTCTGTAACCCAGGCTGG-3' (forward) and 5'-CTTCGGAGCGCGGCCGCGGAGCGAGGC-3' (reverse) primers and Advantage GC 2 Polymerase Mix (Clontech). Various 5'-deletion fragments of the XT-I promoter were generated by PCR using sense and antisense primers containing an adaptor with NheI and HindIII restriction sites at the 5'- and 3'-ends, respectively. Complete and truncated forms of XT-I promoter were subcloned into the NheI-HindIII sites of the pGL3basic vector (Promega, Madison, WI).

**Site-directed Mutagenesis**—Site-directed mutagenesis of the AP-1 and Sp1 sites in the pGL3(-1740/+85) XT-I promoter reporter constructs were generated by site-directed mutagenesis using the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). The forward (F) and reverse (R) primers used for mutation of AP-1 sites were as follows: AP-1 at -590 (mAP-1-590; 5'-ACCGGGGATTGTGTGTGGTTTCAGGAGTCACTCAC-3' (F) and 5'-GTGAGTGACTCCTGAACCCACACACAATCCC-

## Mechanism of IL-1 $\beta$ -mediated XT-I Regulation

CGGT-3' (R)), AP-1 at -640 (mAP-1-640; 5'-GGACCAGAGAAGTGGTTTCAGTGAACACTTAG-3' (F) and 5'-CTAAGTGTTCAGTGAACACTTCTCTGGTCC-3' (R)), AP-1 at 1020 (mAP-1-1020; 5'-ATCCCGAGCCTTCTCTGAACCA GTCTTTCTGGT-3' (F) and 5'-ACCAGAAAGACTGGTTCAGAGAAGGCT-3' (R)), Sp1 at -125 (mSp1-125; 5'-TCCC CCAGGCCCAACTCTCCGCCTCGGCCG-3' (F) and 5'-CGGGCCGAGGCGGAGAGTTGGGGCCTGGGGGA-3' (R)) and Sp1 at -40 (mSp1-40; 5'-GGTGTGGGGAGGGG-TTGGGCGGCGGCGGCCG-3' (F) and 5'-CGGGCCGCCGCCGCCCAACCCCTCCCCACACC-3' (R)). Final vector constructs were sequenced to verify that no errors had been introduced.

**Expression Vectors**—Vectors coding for the transcription factors c-Fos (pCMV-c-Fos) and c-Jun (pCMV-c-Jun) were kindly provided by Dr. Bianchi (University of Lorraine). pSG-Sp1 and pSG-Sp3 were constructed by the insertion of Sp1 and Sp3 coding sequence into pSG5 vector (Stratagene) and were described elsewhere (24). pAP-1-Luc was from Stratagene and designed to measure the activation of the AP-1 pathway.

**Transient Transfection and Promoter Activity Assays**—Human primary chondrocyte cells were seeded in 24-well plates at the density of  $4 \times 10^4$  cells/ml and grown under an atmosphere of at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> to 80% confluence. Cells were then transfected with 2  $\mu$ g of XT-I promoter construct and 100 ng of pRL-TK vector (Promega) using Exgen 500 reagent (Euromedex, Souffelweihersheim, France) according to the manufacturer's instructions. An additional 100 ng of vector expressing different factors was used when specified. The corresponding empty vectors were used as control. Twenty-four hours after transfection, firefly and *Renilla* luciferase activities in cells of each well were measured with the Dual-Luciferase Assay System (Promega) using a Berthold (Bad Wildbad, Germany) luminometer. Luciferase activities were normalized to pRL-TK vector activity and were expressed relative to the basal activity of empty pGL3Basic vector. The data presented were mean values ( $\pm$  S.D.) of triplicates repeated in three independent experiments.

To study the effect of IL-1 $\beta$  on promoter activity, cells were transfected with promoter constructs then serum-starved overnight and stimulated with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) for 12 h. When indicated, cells were pretreated for 30 min with 10  $\mu$ M of MEK (PD186161), 10  $\mu$ M of SAP/JNK (SP600125), 20  $\mu$ M of p38 (SB203580), 1  $\mu$ M of Sp1 (WP 631), or 5  $\mu$ M of PKC (GÖ6976) inhibitors (Merck Chemicals, Ltd, NG, UK). After treatment, luciferase activities were measured as described above.

**Chondrocyte Phenotypic Marker Analysis**—Human primary chondrocytes and fibroblasts were seeded in 24-well plates at the density of  $4 \times 10^4$  cells/well and grown at 37 °C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> to 80% confluence. Expression of chondrocyte phenotypic markers, *i.e.* COL2A1, COL1A1, aggrecan, and sox9 was analyzed by quantitative RT-PCR as described above. Data expressed are relative to fibroblasts values.

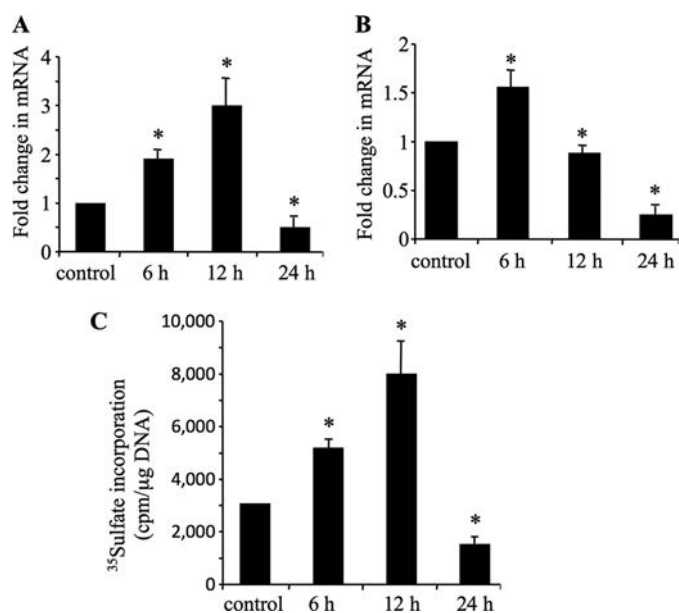
**Cell Viability**—Cell viability was examined using a colorimetric assay based on the methylthiazol tetrazolium (MTT) labeling reagent. Cells ( $4 \times 10^4$ /well) were seeded in 24-well plates in DMEM-F12 medium and cultured at 37 °C for 24 h. Assays were performed according to the instructions and pro-

tol provided by the manufacturer (Sigma-Aldrich). Briefly, culture medium was replaced by FBS-free DMEM-F12 containing 10  $\mu$ M MEK (PD186161), 10  $\mu$ M SAP/JNK (SP600125), 20  $\mu$ M p38 (SB203580), 1  $\mu$ M Sp1 (WP 631) or 5  $\mu$ M PKC (GÖ6976) inhibitors. Dimethyl sulfoxide (vehicle) was used as a control. Cells were incubated for 24 h at 37 °C, and then medium-containing inhibitors were removed from each well, and 100  $\mu$ l of MTT solution was added. Cells were incubated at 37 °C for 4 h, and MTT solution was aspirated, and 100  $\mu$ l per well of dimethyl sulfoxide was added to each well. Subsequently, the cell viability was assessed by measuring the absorbance at 550 nm with the microplate reader Varioskan Flash Multimode reader (Fisher Scientific). Results were compared with vehicle-treated cells and expressed as percentage inhibition.

**Western Blot Analysis**—Total protein from chondrocytes was extracted and quantified using the Bradford method (25). Proteins (30  $\mu$ g/lane) were separated on 10% SDS-PAGE gels, transferred to a PVDF membrane (Millipore, Eschborn, Germany), and subsequently blocked in PBS-Tween 20 containing 5% nonfat milk. Membranes were then incubated overnight with primary antibodies directed against p44/42 MAPK, phospho-p44/42, MAPK p38, phospho-p38, MEK1/2, phospho-MEK1/2, SAPK/JNK, phospho-SAPK/JNK, c-Jun, phospho-c-jun (Cell Signaling), Sp1, or Sp3 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. The blots were then developed using LumiGLO™ according to the instructions of the manufacturer (Cell Signaling).  $\beta$ -Actin was used to demonstrate equal protein load on gels.

**ChIP Assay**—Human primary chondrocyte cells were grown to 80% confluence in 15-cm plates and treated with IL-1 $\beta$  or vehicle for 4 h. Cells were cross-linked, lysed, and enzymatically sheared using the ChIP-IT Express kit according to the manufacturer's instructions (Active Motif, La Hulpe, Belgium). Chromatin immunoprecipitations were conducted with 7  $\mu$ g of sheared DNA and 3  $\mu$ g of rabbit polyclonal anti-c-Jun antibodies (Active Motif). Normal rabbit IgG antibodies were added in the control conditions. The DNA in immunoprecipitates was analyzed by PCR. The set of PCR primers used for the analysis of the AP-1-590 site and the neighboring AP-1-640 site were 5'-CGGGGCCAGCCTTTGGGGCTTGCATCC-3' for sense and 5'-AGACCGGTTGGCAGGTGGACACGTGAG-3' for antisense that recognize the -774 to -447 bp region. Primers sets for the analysis of the AP-1-1020 were 5'-AAAGCACA GCAGACAAGATGCGAAGCA-3' for sense and 5'-TCCTG-AAGTCCCCCTTCCTGTCTGCAC-3' for antisense that recognize the -1185 to -805 bp region. PCR amplification products were analyzed on GelRed-stained 2% (w/v) agarose gels.

**Pull-down Assay**—Nuclear proteins (50  $\mu$ g) from chondrocyte cells treated or not with IL-1 $\beta$  for 24 h were incubated with 100 pmol of biotinylated Sp1-125 probe (oligonucleotide -137 to -107), Sp1-40 probe (oligonucleotide -55 to -24), AP-1-640 (oligonucleotide -654 to -624) or unrelated probe (control) in reaction buffer containing 0.05 mg/ml of poly(dI-dC), 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 4% glycerol, 50 mM NaCl. After 1 h of incubation at room temperature, 100  $\mu$ l of 4% streptavidin-agarose beads (Sigma) were added to the mixture and then placed under rotat-



**FIGURE 1. IL-1 $\beta$  cytokine regulates XT-I and aggrecan mRNA expression and PG synthesis.** Human chondrocyte cells were treated with 10 ng/ml of IL-1 $\beta$  for 6, 12, and 24 h, respectively, and XT-I (A) and aggrecan (B) mRNA levels were determined by real time PCR as described under "Experimental Procedures." Results were normalized using the housekeeping gene ribosomal protein S29 and are expressed as relative expression compared with that obtained with control cells. C, PG synthesis studied by [<sup>35</sup>S]sulfate incorporation in primary human chondrocytes treated with IL-1 $\beta$  for 6, 12, and 24 h. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments. Statistical significance was evaluated using Student's *t* test (\*, *p* < 0.05).

ing agitation overnight at 4 °C. Beads were then recovered by centrifugation at 12,000  $\times$  *g* for 5 min at 4 °C and washed with 100  $\mu$ l of PBS containing 0.5% Triton X-100 and 5 mM EDTA. Proteins bound to the DNA probe were recovered after boiling the beads for 5 min in 30  $\mu$ l of Laemmli buffer. Protein identification was performed by Western blot using anti-Sp3 and anti-c-Jun antibodies, respectively.

## RESULTS

**XT-I Gene Expression Is Regulated by IL-1 $\beta$  in Human Primary Chondrocyte Cells**—Accumulating evidence indicates that XT-I catalyzes a rate-limiting step in PG synthesis pathway and plays a central role in the regulation of the PG synthesis process both in physiological and physiopathological conditions (18, 21, 26, 27). To understand the mechanism of IL-1 $\beta$ -mediated alteration of PG synthesis in OA disease and particularly the role of XT-I in this process, we investigated the effect of the cytokine on the expression of XT-I gene in human primary chondrocytes. Interestingly, the results revealed that treatment of chondrocytes with IL-1 $\beta$  for 6 and 12 h increased by 1.8- and 3-fold, respectively, the mRNA expression level of XT-I gene, whereas a decrease of 50% was produced by the cytokine when the cells were treated for 24 h (Fig. 1A), indicating that IL-1 $\beta$  regulates the expression of XT-I into an early phase of induction and a late phase of down-regulation. Likewise, aggrecan gene expression showed a similar biphasic regulation. Indeed, treatment of chondrocytes with IL-1 $\beta$  for 6 h increased by 1.5-fold the aggrecan mRNA expression level, whereas a decrease of  $\sim$ 20% was observed at 12 h, suggesting a premature inhibition of aggrecan expression compared with

that of XT-I, followed by a further decrease of 63% at 24 h of the treatment (Fig. 1B). Analysis of the rate of PG synthesis during IL-1 $\beta$  treatment of chondrocyte cells showed an increase of 1.6- and 2.6-fold at 6 and 12 h, respectively, and a decrease of 55% at 24 h of treatment (Fig. 1C). Conceivably, the increased expression of both XT-I and aggrecan and of the rate of PG synthesis at early phase of IL-1 $\beta$  treatment could be explained by the efforts of chondrocytes to counteract loss of PG produced by degradation.

To determine whether chondrocyte cells retained their phenotype in the culture conditions used, we analyzed the expression levels of chondrocyte phenotypic markers, *i.e.* COL2A1, sox9, and aggrecan in chondrocytes seeded at  $4 \times 10^4$  cells/well in a 24-well plate and grown to 80% confluency and compared them with that found in human primary fibroblasts. The results showed that chondrocytes expressed high level of aggrecan (180-fold) and sox9 (140-fold) mRNA and exhibited high ratio of COL2A1/COL1A1 mRNA (128) compared with fibroblasts (0.2) (supplemental Fig. 1), indicating that these cells retained a characteristic chondrocyte phenotype.

**Functional Characterization of the Human XT-I Promoter**—To define the mechanism of IL-1 $\beta$  action, we investigated the regulation of the XT-I gene promoter in human primary chondrocyte cells. For these purposes, the sequence of the XT-I promoter region  $-1740$  to  $+85$  was cloned from human genomic DNA by PCR as indicated in the "Experimental Procedures." *In silico* analysis of the promoter sequence using TFSEARCH software revealed the presence of canonical Sp1 and AP-1 transcription factor binding sites (Fig. 2) that might be potential regulators of constitutive and induced expression of XT-I in chondrocyte cells.

The  $-1740/+85$  promoter sequence and a series of 5'-deletion mutants were cloned upstream a firefly luciferase reporter gene in pGL3 basic vector, and the constructs were transfected into human primary chondrocyte cells cultured. The results of Dual-Luciferase assays are shown in Fig. 3. The shorted constructs  $-100/+85$ ,  $-270/+85$ , and  $-450/+85$  showed a very low promoter activity. However, when the length of the promoter sequence was extended to  $-850$  bp, a high promoter activity was observed, suggesting that the sequence between  $-850$  and  $-450$  bp contains elements that are essential for basal activity of the XT-I gene promoter (Fig. 3A). Similarly, high promoter activity was observed for the  $-1230/+85$  construct; however, the sequence further away from  $-1230$  exhibited less promoter activity and contains possible negative regulatory elements (Fig. 3A). Interestingly, treatment with IL-1 $\beta$  for 12 h significantly increased ( $3 \pm 0.2$ -fold) the transcriptional activity of the promoter construct  $-1740/+85$  (Fig. 3B), indicating that XT-I promoter activity is regulated by IL-1 $\beta$ . The stimulatory effect of IL-1 $\beta$  was also observed for the promoter constructs  $-1230/+85$  ( $2.2 \pm 0.2$ -fold) and  $-850/+85$  ( $3 \pm 0.3$ -fold), whereas it was absent for the  $-450/+85$  promoter construct, indicating that deletion of the 5'-end to  $-450$  completely abolished IL-1 $\beta$ -induced activity (Fig. 3B). Thus, these results revealed that a sequence from  $-850$  to  $-450$  bp in the promoter mediates IL-1 $\beta$ -induced stimulation of XT-I gene transcription.

## Mechanism of IL-1 $\beta$ -mediated XT-I Regulation

```

-1740 CGTTTTTTAGATGGAGTCTTGCTCTGTAACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGTGATCTCGGCTCACTGC
-1679 AGCCTCTGCCTCCTGGGTTCAAGAGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATCAGGGGTGT
-1611 GTGCCACCATGCCCGGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCATGTTGGCAAGGCTG
-1543 ATCTCGAACTTCTGACCTCAGGTGATCCTCCTGTCTTGGCTCCCAAAGTCTGCGATTACAGGCATG
-1475 AGCCACCGCGCCAGGCTATCTCACTATATTTTTAATGATTAACATCCACATCAGGCTTCTCTAGACC
-1407 TCAGGCTTGCTGAAGATGAGATTAACCTCATTACCTTTGGATGCGTGCACCTGGCCAGTGTCTGA
-1339 CACAAGCTTTGTATTACGGATGCTTGTGGAGTGGATGAAACAATCTCTTCCACTCCCTGCCTCATT
-1271 GTCTGATGAGCCTTCATTACACTCCACTTTCTTCTTTGTAAATTAGGATGAGGTGAAAAAGCACAG
-1203 CAGACAAGATGCGAAGCATTACGCCAAGTCCCAATTACAAAAGTATTGATCTGCTGTTGTATTTC
-1135 CCAGAGTGTAGGTCCCGTATGGGACACCAACGCCATCCCATATGCTCACTGTTCTGCGCTGCTGTGT
-1067 ATAAAGCCCTGGGCAAGAGGACAAGGGAGGGAAAAACCAGAAAGA CTGAGTCAGAGAAGGCTCGGGAT
-999 GAAATTTGAGTCCATTGGGATCATTCTGCCTAAACGACAGAGGAGAAAGCTTGGGCTCAGGGAGGAGT
-931 CCTCCTCCTCCTGGCTCAAGGTCACCGGGACAGACCAGTCAGGATGGGAAAGAAGTCCACTTTCAAGA
-863 GCAAGACCTGTTTCCCGAGGACCTGGGCCCTGTGCAGACAGGAAGGGGGACTTCAGGATGGATGGGGA
-795 AAAGGACACGCTGGGAGGCTGCGGGGCCAGCCTTTGGGGCTTGCATCCTGCGAAGGTTGAGTAACCTC
-727 ACGGGTCTCCCTTTTGGCGCTATACCCTTGCCAAGTGGGTTTGGAGTCTCTTGGCTTGTGAGTCTC
-659 AGGGACCAGAGA AGTGACTCAGTGAACACTTAGTACATCGTTGGCACCGGGGATTGTGT GTGATTCAG
-591 GAGTCACTCACAGAGCTTGTGCTGATTAACCTCCAGAAACTACCCAAAGCCTCCTCCCCACCCCTCA
-523 AGCCCAGGATGAAGGGATCAGACTGTGGCTCTGACACTCCTGAAATGTTTCTCAGTGTCCACCTGCC
-455 AACCGGTCTGGTACCGACAGAAGATCCCTGGACCGCAACTCCGGGGCTAGGAGCTTCTCCACGCAC
-387 TGCCTCCTTCCAGCGGCCACAGGAAAAAGGACCTCGGGACCCCTCTCTTCTGACCTCCCTTGG
-319 ATTCTGAGCGGGCCACCCTCAACCAAAGTCCCTGTTTCGCGGCCCTGCCTCTCTTTTCCGCCT
-251 TGGGAATTGTCCCCCTCGCCCCCATCTACTCCACTACGTCTGAGGGGTGTCTGTCTTCTCTGAT
-183 CGCCCCACCCCTTCTTTCCCTCCTCTTTTCTCCTC CGGCTCCTCCACGGCCCCGCCCTCTC
-115 CGCCTCGGCCCGCTCCCCCGCGCCTTCCCATCACCTCCCTCCAGCGGGGACAGGGGTGTGGG
-47 GAGGGGGCGGCGGGCGGCGGCCCGAGCGGGAGCCGAGCGGCAGCCGCGCGCGGGAGCTGCGGGG
+22 AGCGCGGGGGCGGCGCGGAGCGGTGCCGGGTCCCCGCGCTCGCTCGCCGGCCGCGCTCCGAA ATG

```

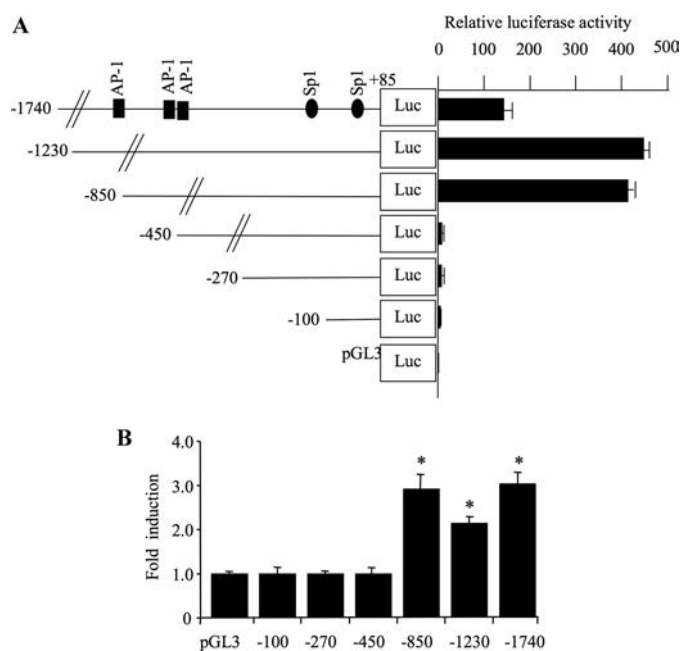
FIGURE 2. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the human XT-I gene. The 5'-flanking region of the XT-I gene was cloned from human genomic DNA as described under "Experimental Procedures" and sequenced. The putative start site of transcription (+1) is indicated by an arrow. The translation initiation ATG codon is boxed. Sp1 and AP-1 core sequences are underlined and in boldface type.

*Sp1 Transcription Factor Regulates Human XT-I Basal Promoter Activity*—The  $-1740/+85$  XT-I promoter fragment contains Sp1 core motifs located at  $-125$  bp (Sp1-125) and  $-40$  bp (Sp1-40) (see Fig. 2), all of which could potentially interact with the Sp1 transcription factor. To investigate the potential role of Sp1 in the function of the XT-I promoter, we used bisanthracycline (WP631), a potent Sp1 inhibitor (35). The presence of WP631 at a concentration of  $1 \mu\text{M}$  significantly inhibited (90%) the basal promoter activity (Fig. 4A), suggesting an important role for Sp1 in basal promoter activity. Mutants of each of Sp1 sites were generated by site-directed mutagenesis, and the effect of the mutations on promoter activity was determined. Fig. 4B showed that disruption of Sp1-125 core sequence resulted in a  $>80\%$  loss of promoter activity, indicating that Sp1-125 site is critical for basal promoter activity. In contrast, mutation of Sp1-40 stimulated XT-I promoter activity by 66%, suggesting that this site may be essential for repression or attenuation of the XT-I gene expression (Fig. 4B).

*IL-1 $\beta$ -induced XT-I Promoter Activity Did Not Involve Sp1 Response Elements*—To examine whether Sp1 regulatory elements in the human XT-I promoter are directly involved in

IL-1 $\beta$ -induced promoter activity, chondrocyte cells were transfected with  $-1740/+85$  XT-I promoter construct harboring Sp1-125 and Sp1-40 disrupted sites, respectively. The results clearly showed that none of the Sp1 mutations prevented the stimulatory effect of the cytokine (Fig. 4B). Indeed, Sp1-mutated promoter constructs exhibited similar induction levels (3-fold) as wild-type promoter following IL-1 $\beta$  stimulation (Fig. 4B). Thus, these results provide evidence that Sp1 regulatory elements are not required for IL-1 $\beta$ -induced promoter activity.

*Both Basal and IL-1 $\beta$ -induced XT-I Promoter Activity Are Mediated through AP-1*—It is well known that IL-1 $\beta$  activates the AP-1 signaling pathway in chondrocytes cells (28, 29). This was confirmed in our study by using the pAP-1-Luc luciferase reporter plasmid containing multiple copies of typical AP-1 binding sequence. Indeed, this reporter construct was activated by  $\sim 3$ -fold upon treatment of transfected chondrocytes with IL-1 $\beta$  (Fig. 5A). Interestingly, the  $-1740/+85$  XT-I promoter sequence contains three potential binding sites for the AP-1 transcription factor, which are located at positions  $-1020$  (AP-1-1020),  $-640$  (AP-1-640), and  $-590$  (AP-1-590), respectively (see Fig. 2). Their implication in basal transcription

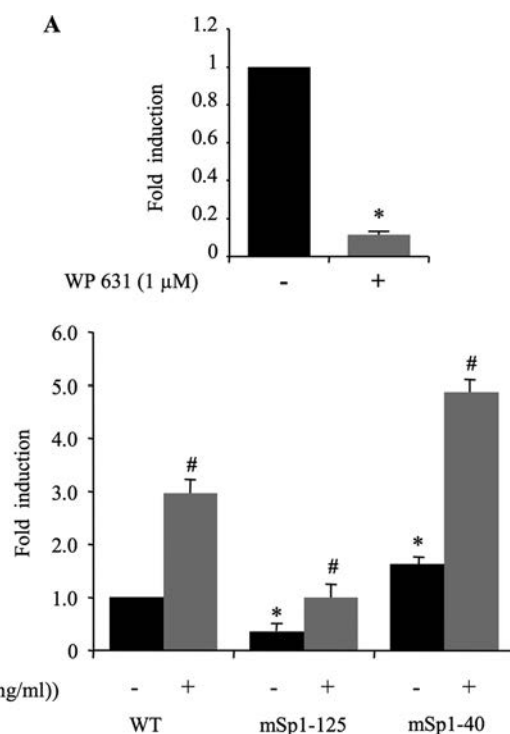


**FIGURE 3. Defining the human XT-I proximal promoter for constitutive and IL-1 $\beta$ -induced activity.** *A, left*, diagrams showing the 5'-deletion constructs of XT-I promoter linked to firefly luciferase reporter gene used for transient transfections. *Right*, relative luciferase activity of XT-I promoter deletion constructs and empty pGL3-Basic vector in human primary chondrocyte cells. Relative luciferase activity is calculated as fold activation over that of pGL3-Basic after normalization. *B*, human chondrocytes transfected with 5'-deletion constructs and pRL-TK vector were treated with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) or vehicle for 12 h, and relative luciferase activity was determined as described above. Relative luciferase activity is calculated as fold activation over that of untreated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments (\*,  $p < 0.05$ ).

and/or in the response of the promoter to IL-1 $\beta$  was investigated by site directed mutagenesis. Mutation of AP-1-590 (mAP-1-590) or AP-1-640 (mAP-1-640) dramatically reduced (81 and 90%, respectively) the basal promoter activity, whereas mutation of AP-1-1020 (mAP-1-1020) produced moderate (36%) inhibition compared with the two proximal AP-1 sites (Fig. 5B). These results suggest that AP-1-590 and AP-1-640 are critical for basal activity of human XT-I gene promoter.

As a further step toward understanding the role of AP-1 in the regulation of XT-I promoter activity, we investigated whether it is involved in stimulation of promoter activity by IL-1 $\beta$ . The results clearly showed that mutation of the AP-1-590 did not prevent stimulatory effect of IL-1 $\beta$  on XT-I promoter (Fig. 5B). Despite major reduction of the basal activity, IL-1 $\beta$  significantly ( $\sim 2$ -fold) induced the promoter activity. However, mutation of AP-1-640 or AP-1-1020 completely suppressed the stimulatory effect of IL-1 $\beta$  (Fig. 5B). These results strongly suggest that IL-1 $\beta$ -induced XT-I promoter activity is mediated through AP-1-640 and AP-1-1020 response elements.

**AP-1 Transcription Factor Is a Transactivator of XT-I Promoter**—To obtain further evidence to support the importance of the AP-1 transcription factor in the activation of XT-I promoter activity, we co-transfected the -1740/+85 promoter construct with pCMV-*c-Jun*, pCMV-*c-Fos* and both vectors, respectively, and analyzed the effect on the activity of the pro-

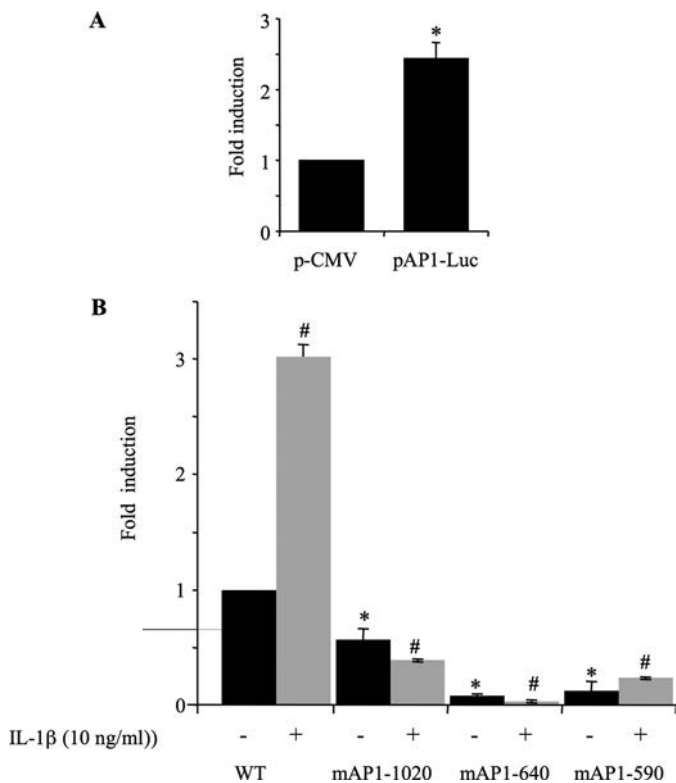


**FIGURE 4. Identification of functional Sp1 sites within human XT-I promoter.** *A*, chondrocyte cells were transfected with pGL-XT-I (-1740/+85) reporter construct and then treated or not with 1  $\mu$ M WP631 (Sp1 binding inhibitor). Twenty four hours later, cell extracts were assayed for luciferase activity. Relative luciferase activity is calculated as fold change over that of untreated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments (\*,  $p < 0.05$ ). *B*, point mutation analysis showing Sp1 site-dependent transcriptional activity of the XT-I promoter in chondrocytes. Luciferase activity of the wild-type (WT) and its mutant construct (mSp1-125 and mSp1-40) was measured in chondrocytes treated (12 h) with IL-1 $\beta$  or vehicle. Relative luciferase activity is calculated as fold change over that of WT in untreated cells. In IL-1 $\beta$ -treated cells, relative luciferase activity was determined as fold activation over that of untreated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments (\*,  $p < 0.05$ ).

moter. pCMV empty plasmid was used as a control. Fig. 6A clearly showed that overexpression of *c-Fos* and *c-Jun* in primary chondrocytes enhanced the promoter activity by 11- and 10-fold, respectively. Interestingly, overexpression of both *c-Fos* and *c-Jun* produced a strong activation (47-fold) of the human XT-I promoter (Fig. 6A). These results demonstrated that the AP-1<sup>*c-Jun/c-Fos*</sup> transcription factor is a potent activator of the human XT-I promoter.

**Endogenous AP-1 Directly Binds to the Cognate AP-1 Binding Sites in the Human XT-I Gene Promoter *In Vivo***—Based on the results above, we investigated whether AP-1 directly binds to the promoter region of XT-I and whether treatment with IL-1 $\beta$  affects its DNA binding activity *in vivo*. Therefore, we examined physical binding of AP-1 to the endogenous XT-I promoter with endogenous *c-Jun* proteins by using ChIP assays. As shown in Fig. 6B, the 327-bp (-774 to -447) of the XT-I promoter fragment harboring AP-1-640 and AP-1-590 response elements was detected from chromatin precipitated with endogenous *c-Jun* antibody but not with control IgG. Similar results were obtained for the 380 bp (-1185 to -805) of XT-I promoter fragment encompassing the AP-1-1020 site (Fig. 6B), indicating that AP-1 directly binds to the promoter region of XT-I *in vivo*. Interestingly, the binding of *c-Jun* to the 327-bp

## Mechanism of IL-1 $\beta$ -mediated XT-I Regulation

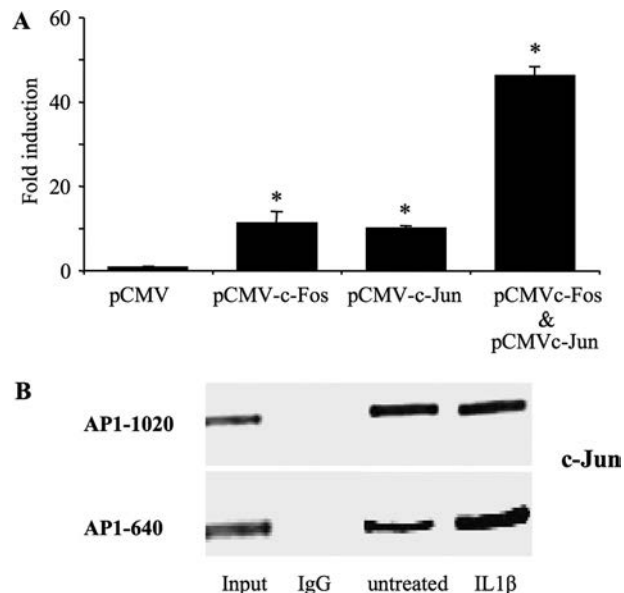


**FIGURE 5. AP-1 regulates both basal and IL-1 $\beta$ -induced promoter activity.** *A*, human chondrocyte cells were transfected with pAP-1-Luc (pCMV-(AP-1)<sub>3</sub>) and treated with IL-1 $\beta$  or vehicle for 12 h. Relative luciferase activity is calculated as fold change over that of empty vector (pCMV). *B*, point mutation analysis showing AP-1 site-dependent transcriptional activity of the XT-I promoter in chondrocytes. Luciferase activity of the wild-type (WT) and its mutant constructs (mAP-1-1020, mAP-1-640, and mAP-1-590) were measured in chondrocytes treated (12 h) with IL-1 $\beta$  or vehicle. Relative luciferase activity is calculated as fold change over that of WT in untreated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments (\*,  $p < 0.05$ ; #,  $p < 0.05$ ).

XT-I promoter fragment harboring the AP-1-640 and AP-1-590 response elements was significantly increased in IL-1 $\beta$ -treated cells (Fig. 6*B*), indicating that the DNA binding activity of AP-1 to the promoter is enhanced upon treatment with IL-1 $\beta$ .

**IL-1 $\beta$ -induced Activation of XT-I Promoter Is Mediated by JNK and p38 MAPK**—To investigate the signaling pathway that regulates activation of the XT-I promoter by IL-1 $\beta$ , we analyzed the phosphorylation status of JNK, ERK and p38 in human primary chondrocytes by Western blot. Fig. 7*A* showed that IL-1 $\beta$  treatment increased the levels of phosphorylated ERK and p38 within 5 min of treatment, reached a peak at 15 min, and was evident until 2 h. Phosphorylation of JNK was prominent at 15 min, peaked at 30 min, and was strongly attenuated after 1 h of treatment. The cytokine increased phosphorylation of c-Jun within 15 min of the treatment and was evident until 2 h.

To determine whether MAPK pathways were involved in IL-1 $\beta$ -induced XT-I activity, pharmacological inhibitors were added 30 min prior to IL-1 $\beta$  treatment. Fig. 7*B* showed that the PKC inhibitor (GÖ6976) and ERK 1/2 inhibitor (PD184161) did not affect the stimulatory effect of IL-1 $\beta$  on the XT-I promoter. In contrast, the JNK inhibitor (SP60012) and the p38 inhibitor (SB203580) suppressed the activation of the promoter by IL-1 $\beta$ . The results also showed that inhibition of MEK1/2 and of JNK



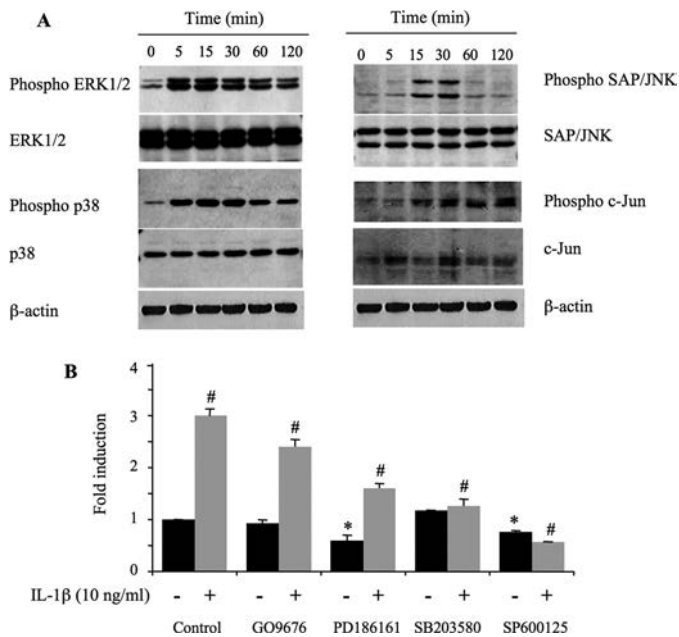
**FIGURE 6. c-Jun and c-Fos transactivate the XT-I promoter, and IL-1 $\beta$  increases the AP-1 recruitment to endogenous XT-I promoter in chondrocyte cells.** *A*, cells were transfected with the pGL-XT-I (-1740/+85) reporter construct (2  $\mu$ g) with 200 ng each of pCMV (empty vector), pCMV-c-Jun, or pCMV-c-Fos or pCMV-c-Jun + pCMV-c-Fos expression plasmids. Relative luciferase activity is calculated as fold activation over that of pCMV empty vector after normalization for *Renilla* luciferase activity. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments (\*,  $p < 0.05$ ). *B*, chondrocytes were treated with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) or vehicle for 4 h. ChIP with antibodies to c-Jun or with rabbit preimmune serum (IgG) was performed with primers specific to the region described under "Experimental Procedures." The quantity of each input DNA was initially measured equalized by O.D. A representative gel of three independent experiments stained by GelRed is shown.

reduced the basal activity of the promoter by 40 and 25%, respectively (Fig. 7*B*). Together, these data indicated that JNK and p38 MAPK, but not PKC and ERK plays an important role in IL-1 $\beta$ -induced XT-I promoter activity. They also showed the importance of MEK1/2 and of JNK in basal promoter activity. Noteworthy, analysis of potential cell toxicity of MAPK inhibitors using a MTT assay showed that the PKC inhibitor GÖ6976 produced 25% lethality whereas, JNK, ERK, p38, and Sp1 inhibitors did not significantly affect cell viability at the concentrations used (supplemental Fig. 2).

**Sp1 Activates and Sp3 Inhibits XT-I Promoter Activity**—Sp1 and Sp3 are ubiquitous transcriptional proteins that are highly homologous and compete for the same DNA elements. Having demonstrated the importance of Sp1 binding sites (Sp-40 and Sp-125) in XT-I promoter activity, we next examined the effects of Sp1 and Sp3 factors on the transcriptional activity of the promoter. Therefore, chondrocyte cells were transfected with the -1740/+85 XT-I promoter reporter construct along with Sp1 or Sp3 expression plasmids. Empty pSG5 vector was used as a control. As shown in Fig. 8*A*, overexpression of Sp1 in chondrocyte cells induced XT-I promoter activity by  $\sim$ 1.6-fold. In contrast, overexpression of Sp3 caused a strong reduction (4.4-fold  $\pm$  0.2) in promoter activity, indicating that Sp3 acts as a transcriptional repressor of the XT-I promoter.

**IL-1 $\beta$ -induced Inhibition of XT-I Expression during the Late Phase Is Mediated through Sp3 Recruitment to the Promoter**—The observation that Sp3 acts as a repressor of XT-I promoter activity prompted us to investigate whether it is involved in

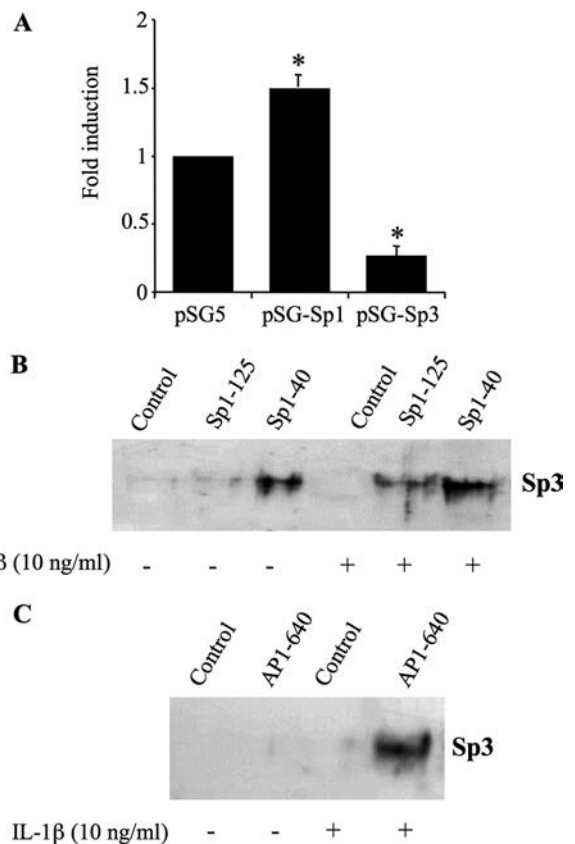




**FIGURE 7. IL-1 $\beta$ -stimulation of the XT-I promoter is dependent on activation of the SAP/JNK and p38 signaling pathways.** *A*, chondrocyte cells were stimulated with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) for 0–120 min, and protein lysates were prepared and probed with the indicated antibodies. A representative immunoblot of three independent experiments is shown. *B*, chondrocyte cells were transfected with the pGL-XT-I (-1740/+85) reporter promoter construct, starved, and preincubated with dimethyl sulfoxide (*Control*) or specific inhibitors GÖ9676, PD186161, SB203580, and SP600125, respectively, for 30 min before stimulation with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), or exposure to vehicle, for 12 h. Relative luciferase activity is calculated as fold change over that of control in untreated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments (\*,  $p < 0.05$ ; #,  $p < 0.05$ ).

IL-1 $\beta$ -induced inhibition of XT-I gene transcription observed when chondrocytes were treated for 24 h with the cytokine. For this purpose, we evaluated the binding of the Sp3 transcription factor to Sp1 sites by biotin pull-down assay, as ChIP would not be able to dissect out Sp3 binding to each Sp1 site (Sp-40 and Sp-125) because DNA fragments obtained are limited to 200 to 300 bp. Pull-down was performed using nuclear extracts prepared from chondrocyte cells treated or not with IL-1 $\beta$  for 24 h together with Sp-125 and Sp-40 probes. Interestingly, the data revealed that Sp3 binds to a Sp-40 site in non-treated cells suggesting a role in the attenuation of basal promoter activity previously shown for this site (Fig. 8*B*). More particularly, the results showed that IL-1 $\beta$  treatment led to recruitment of Sp3 to Sp-125 site and to an enhanced binding to the Sp-40 site (Fig. 8*B*), thereby indicating that IL-1 $\beta$ -induced inhibition of XT-I expression is mediated through Sp3 occupancy of Sp-125 and Sp-40 sites of the proximal promoter.

Next, we asked whether Sp3 interacts with AP-1, a major transcriptional regulator of XT-I gene expression. We performed biotin pull-down assays using AP-1-640 probes, containing the AP-1-640 binding site, which is essential for promoter activity and interacting with AP-1, together with nuclear extract from chondrocytes treated or not with IL-1 $\beta$  for 24 h. Interestingly, this showed that Sp3 was pulled down with the AP-1 probe when nuclear extract from IL-1 $\beta$ -treated cells was used but not with nuclear extract from untreated cells (Fig. 8*C*), indicating that Sp3 interacts with AP-1 following IL-1 $\beta$  treatment. Collectively, these results convincingly demonstrated



**FIGURE 8. Antagonist role of Sp1 and Sp3 in the regulation of human XT-I promoter activity.** *A*, chondrocyte cells were transiently transfected with pGL-XT-I (-1740/+85) reporter promoter construct with pSG5 (empty vector), pSG-Sp1, or pSG-Sp3 expression vectors. Relative luciferase activity is calculated as fold change over that of pSG5 vector after normalization for *Renilla* luciferase activity. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments (\*,  $p < 0.05$ ). *B*, nuclear extracts (50  $\mu$ g) prepared from cells treated with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) or vehicle for 4 h were incubated with Sp1-125, Sp1-40, or unrelated biotinylated probe (*Control*) for 1 h at room temperature. *C*, nuclear extracts were incubated with AP-1-640 biotinylated probe or unrelated probe (*Control*) for 1 h at room temperature. The Sp1 and AP-1 probe-protein complex was then precipitated by addition of streptavidin-agarose beads. Sp3 protein bound to the probe was determined by Western blot using an anti-Sp3 antibody.

that the inhibitory effect of IL-1 $\beta$  on XT-I gene expression is mediated through Sp3 occupancy of Sp1 sites and interaction with the AP-1 transcription factor.

## DISCUSSION

XT-I plays a key role in the biosynthesis of PGs by catalyzing the first steps of GAG chain assembly. This step is suggested to be rate-limiting and, therefore, may control synthesis of heparan sulfate and chondroitin sulfate PGs. In the present study, we investigated the regulation of XT-I gene in human primary chondrocyte cells by the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  and showed for the first time that IL-1 $\beta$  modulates the expression of the XT-I gene in chondrocytes into an early phase of up-regulation and a late phase of down-regulation. Similar biphasic regulation was observed for aggrecan expression suggesting that XT-I and aggrecan genes may be coordinately regulated by the same transcription factors. Accordingly, aggrecan gene promoter sequence contains several putative binding sites for Sp1 and AP-1 in its proximal region (36), as found in the XT-I gene promoter. Noteworthy, expression of aggrecan was down-reg-

## Mechanism of IL-1 $\beta$ -mediated XT-I Regulation

ulated prematurely (12 h) compared with that of XT-I gene, suggesting it may be more sensitive than XT-I gene to a similar repression mechanism, or that specific aggrecan gene repressor was induced earlier by IL-1 $\beta$ . Extensive investigation of aggrecan gene regulation by IL-1 $\beta$  would be required to test these hypotheses. On the other hand, PG synthesis was increased at 6 and 12 h, whereas aggrecan expression was up-regulated at 6 h but down-regulated at 12 h. Of note, PG synthesis was measured during the last 6 h of the treatment (spanning from 6 to 12 h), whereas aggrecan gene expression was measured at the end of the treatment (12 h). Therefore, it can be reasonably assumed that the differences exhibited between PG synthesis and aggrecan gene expression could originate from the fact that aggrecan expression was induced at 6 h (PG synthesis was measured from this time point until 12 h). Also, we cannot rule out that up-regulation of XT-I observed at 6 and 12 h may lead to an increase in the number of GAG chains that are initiated on aggrecan core protein. Indeed, XT-I catalyzes a rate-limiting step of PG synthesis pathway. Accordingly, we recently showed that overexpression of XT-I in chondrocytes and cartilage explants increased the level of PG-GAG synthesis. Conversely, down-regulation of XT-I gene expression by siRNA produced a strong decrease in PG-GAG synthesis (21).

Conceivably, the up-regulation of XT-I gene expression and stimulation of PG-GAG synthesis during early phase of IL-1 $\beta$  treatment of human chondrocyte cells may reflect an attempt by the cells to counteract PG degradation and depletion produced by the cytokine. Similarly, up-regulation of XT-I and aggrecan expression was observed in OA cartilage in areas next to lesions characterized by high increase in PG synthesis, suggesting an effort from chondrocytes to regenerate extracellular matrix within the degradative environment (21). This effort could also explain the high rate of PG synthesis measured in early OA (20) and in OA (30) cartilage as well as the increased expression of COL2A1 (31, 32). To investigate the molecular mechanism involved in the regulation of XT-I gene expression by IL-1 $\beta$  in chondrocytes, the 1.74-kb 5'-flanking DNA of the human XT-I gene was cloned and expressed as a functional promoter in human primary chondrocyte cells. Analysis of sequence directly upstream of the transcriptional initiation site revealed that the human XT-I promoter is a GC-rich TATA-less promoter containing proximal Sp1-binding sites as reported previously (24). Similar promoters are found in many mammalian genes such as GlcAT-I (24), VIL2 (33), and UDP-glucose dehydrogenase genes (34). Deletion analysis demonstrated that the -450 bp of the immediate 5'-flank is not sufficient to confer promoter activity in chondrocyte cells. However, this sequence contains the proximal Sp1 binding sites (-125 and -40) indicating that these sites *per se* were not sufficient to achieve a constitutive promoter activity and suggests that Sp1 may interact with other factors to promote activity. Indeed, TATA-less promoters are regulated by the involvement of Sp factors, which recruit and interact with specific transcription factors to achieve promoter activity (24, 35). Interestingly, extending the promoter sequence to -850 bp to contain the two AP-1 binding sites at position -590 and -640 conferred high promoter activity suggesting that AP-1 sites are critical for constitutive promoter activity and that AP-1 may

cooperate with Sp1 to achieve normal promoter activity. Accordingly, the AP-1-640 binding site was shown important for constitutive promoter activity in chondrosarcoma (37). Analysis of the respective roles of different Sp1 sites on promoter activity by site-directed mutagenesis revealed that disruption of the Sp1-125 binding site resulted in strong reduction of promoter activity. Interestingly, mutation of the Sp1-40 site released the promoter activity showing that this site acted as a repressor and suggesting that Sp1-40 and Sp1-125 binding sites within the XT-I promoter may recruit different factors or co-factors. The presence of Sp1 binding sites, which act as activators and/or repressors of promoter activity, was described recently for the LEDGF/p75 gene (35).

Within the Sp family, Sp1 and Sp3 are ubiquitously expressed, and both can bind to the same cognate DNA element (38). Interestingly, overexpression of Sp3 strongly inhibited XT-I promoter activity and a similar effect was observed for the promoter construct mutated in the Sp1-40. In contrast, no inhibitory effect of Sp3 was observed when Sp-125 mutated promoter was used, therefore suggesting that Sp1 and Sp3 factors bind to the same Sp1 site, Sp1-125. We can therefore speculate that competition between Sp1 and Sp3 for the binding at the Sp1-125 site may occur and overexpression of Sp3 may prevent Sp1 recruitment to the promoter. Importantly, it has been shown that treatment of chondrocyte cells with IL-1 $\beta$  for 24 h led to down-regulation of Sp1 and up-regulation of Sp3 expression (39). This observation may account for repression of XT-I promoter activity observed at 24 h of IL-1 $\beta$  treatment and suggest that the Sp3/Sp1 ratio may mediate IL-1 $\beta$  inhibitory effect on XT-I expression and could also account for IL-1 $\beta$  inhibition of aggrecan gene expression. Such a mechanism was previously demonstrated for IL-1 $\beta$ -induced COL2A1 gene transcription in chondrocytes (39). Interestingly, pulldown assay analyses clearly indicated that when chondrocytes were treated with IL-1 $\beta$  for 24 h, Sp3 binds to the Sp1-125 site probably by displacing Sp1 factor and represses the promoter.

Notably, our data revealed that the two AP-1 binding sites (AP-1-590 and AP-1-640) and the Sp1 binding site (Sp1-125) are essential for basal promoter activity, suggesting that synergistic interactions between AP-1 and Sp1 factors may occur to achieve promoter activity. Accordingly, cooperativity between Sp1 and AP-1 is essential for genes encoding Ezrin (33), leukocyte integrin gene, CD11c (40), and loricrin (41). However, the role of AP-1 response elements is not restricted to basal promoter activity but is essential for IL-1 $\beta$ -induced promoter activity. Indeed, mutagenesis within AP-1 binding sites of the XT-I promoter revealed that the AP-1-640 and AP-1-1020 binding sites, but not AP-1-590, are critically required for IL-1 $\beta$ -mediated effects on XT-I promoter activity, demonstrating that these sites play a critical role in the activation of XT-I promoter transcription via the IL-1 $\beta$ -induced pathway. Furthermore, overexpression of the AP-1 transcription factor strongly stimulated (50-fold) XT-I promoter activity.

Consistent with the results obtained by our reporter assays, ChIP assays demonstrated that AP-1 recruitment to the XT-I promoter is enhanced upon IL-1 $\beta$  treatment, indicating that the cytokine stimulates XT-I promoter activity by promoting the binding of AP-1 to the promoter. This process is mediated

through activation of SAP/JNK and p38 pathways as demonstrated by their phosphorylation following IL-1 $\beta$  treatment and by using specific inhibitors. Interestingly, analysis of potential toxicity of the MAPK inhibitors on chondrocyte cells by a MTT assay showed that JNK, p38, and Sp1 inhibitors did not significantly affect cell viability, indicating that the effects produced were a result of signaling pathways inhibition. Activation of XT-I promoter by p38 signaling pathways is probably due to phosphorylation of c-Fos by p38 MAPKs. Indeed, it has been shown that p38 MAPKs are able to activate c-Fos (42, 43). Thus, this pathway acts concomitantly with the activation of c-Jun by JNK/MAPK, thereby contributing to the complexity of AP-1 driven XT-I gene transcription regulation. Our data identify, for the first time, XT-I as a target of IL-1 $\beta$  signaling pathway and evidenced the critical role for AP-1 transcription factor in the induction and that of Sp3 in the repression of XT-I expression in human primary chondrocyte cells.

*Acknowledgment—We thank Mike Coughtrie for helpful discussion.*

## REFERENCES

- Couchman, J. R. (2010) Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 89–114
- Handel, T. M., Johnson, Z., Crown, S. E., Lau, E. K., and Proudfoot, A. E. (2005) Regulation of protein function by glycosaminoglycans—as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 385–410
- Princivalle, M., and de Agostini, A. (2002) Developmental roles of heparan sulfate proteoglycans: a comparative review in *Drosophila*, mouse and human. *The Int. J. Dev. Biol.* **46**, 267–278
- Rostand, K. S., and Esko, J. D. (1997) Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect. Immun.* **65**, 1–8
- 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: $\beta$ -xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human  $\beta$ 4-galactosyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* **274**, 26165–26171
- Baasanjav, S., Al-Gazali, L., Hashiguchi, T., Mizumoto, S., Fischer, B., Horn, D., Seelow, D., Ali, B. R., Aziz, S. A., Langer, R., Saleh, A. A., Becker, C., Nürnberg, G., Cantagrel, V., Gleeson, J. G., Gomez, D., Michel, J. B., Stricker, S., Lindner, T. H., Nürnberg, P., Sugahara, K., Mundlos, S., and Hoffmann, K. (2011) Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 15–27
- Wuyts, W., Van Hul, W., De Boule, K., Hendrickx, J., Bakker, E., Vanhoenacker, F., Mollica, F., Lüdecke, H. J., Sayli, B. S., Pazzaglia, U. E., Mortier, G., Hamel, B., Conrad, E. U., Matsushita, M., Raskind, W. H., and Willems, P. J. (1998) Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 346–354
- Hwang, H. Y., Olson, S. K., Brown, J. R., Esko, J. D., and Horvitz, H. R. (2003) The *Caenorhabditis elegans* genes sqv-2 and sqv-6, which are required for vulval morphogenesis, encode glycosaminoglycan galactosyltransferase II and xylosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **278**, 11735–11738
- 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
- Schwartz, N. B., and Domowicz, M. (2002) Chondrodysplasias due to proteoglycan defects. *Glycobiology* **12**, R57–R68
- Shriver, Z., Liu, D., and Sasisekharan, R. (2002) Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 71–77
- Ariga, T., Miyatake, T., and Yu, R. K. (2010) Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: amyloidogenesis and therapeutic strategies—a review. *J. Neurosci. Res.* **88**, 2303–2315
- Afratis, N., Gialeli, C., Nikitovic, D., Tsegenidis, T., Karousou, E., Theocharis, A. D., Pavão, M. S., Tzanakakis, G. N., and Karamanos, N. K. (2012) Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* **279**, 1177–1197
- Bui, C., Ouzzine, M., Talhaoui, I., Sharp, S., Prydz, K., Coughtrie, M. W., and Fournel-Gigleux, S. (2010) Epigenetics: methylation-associated repression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase gene expression contributes to the invasive phenotype of H-EMC-SS chondrosarcoma cells. *FASEB J.* **24**, 436–450
- Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., and Kitagawa, H. (2003) Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 612–620
- Schwartz, N. B. (1977) Regulation of synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan. *Ups J. Med. Sci.* **82**, 76–77
- Seo, N. S., Hocking, A. M., Höök, M., and McQuillan, D. J. (2005) Decorin core protein secretion is regulated by N-linked oligosaccharide and glycosaminoglycan additions. *J. Biol. Chem.* **280**, 42774–42784
- Venkatesan, N., Barré, 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
- Fernandes, J. C., Martel-Pelletier, J., and Pelletier, J. P. (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* **39**, 237–246
- Thompson, R. C., Jr., and Oegema, T. R., Jr. (1979) Metabolic activity of articular cartilage in osteoarthritis. An *in vitro* study. *J. Bone Joint Surg. Am.* **61**, 407–416
- Venkatesan, N., Barré, L., Bourhim, M., Magdalou, J., Mainard, D., Netter, P., Fournel-Gigleux, S., and Ouzzine, M. (2012) Xylosyltransferase-I regulates glycosaminoglycan synthesis during the pathogenic process of human osteoarthritis. *PLoS One* **7**, e34020
- Gouze, J. N., Bordji, K., Gulberti, S., Terlain, B., Netter, P., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S., and Ouzzine, M. (2001) Interleukin-1 $\beta$  down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: influence of glucosamine on interleukin-1 $\beta$ -mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **44**, 351–360
- de Vries, B. J., van den Berg, W. B., Vitters, E., and van de Putte, L. B. (1986) Quantitation of glycosaminoglycan metabolism in anatomically intact articular cartilage of the mouse patella: *in vitro* and *in vivo* studies with 35S-sulfate, 3H-glucosamine, and 3H-acetate. *Rheumatol. Int.* **6**, 273–281
- Barré, L., Venkatesan, N., Magdalou, J., Netter, P., Fournel-Gigleux, S., and Ouzzine, M. (2006) Evidence of calcium-dependent pathway in the regulation of human  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferase-1 (GlcAT-I) gene expression: a key enzyme in proteoglycan synthesis. *FASEB J.* **20**, 1692–1694
- 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
- Eames, B. F., Yan, Y. L., Swartz, M. E., Levic, D. S., Knapik, E. W., Postlethwait, J. H., and Kimmel, C. B. (2011) Mutations in fam20b and xylt1 reveal that cartilage matrix controls timing of endochondral ossification by inhibiting chondrocyte maturation. *PLoS Genet.* **7**, e1002246
- Götting, C., Kuhn, J., and Kleesiek, K. (2007) Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 1498–1517
- Chowdhury, T. T., Salter, D. M., Bader, D. L., and Lee, D. A. (2008) Signal transduction pathways involving p38 MAPK, JNK, NF $\kappa$ B and AP-1 influences the response of chondrocytes cultured in agarose constructs to IL-1 $\beta$  and dynamic compression. *Inflamm. Res.* **57**, 306–313
- Schmucker, A. C., Wright, J. B., Cole, M. D., and Brinckerhoff, C. E. (2012) Distal interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) response element of human matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) binds activator protein 1 (AP-1) transcription factors and regulates gene expression. *J. Biol. Chem.* **287**, 1189–1197
- Lafeber, F. P., van Roy, H., Wilbrink, B., Huber-Bruning, O., and Bijlsma, J. W. (1992) Human osteoarthritic cartilage is synthetically more active but in culture less vital than normal cartilage. *J. Rheumatol.* **19**, 123–129
- Aigner, T., Fundel, K., Saas, J., Gebhard, P. M., Haag, J., Weiss, T., Zien, A., Obermayr, F., Zimmer, R., and Bartnik, E. (2006) Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 3533–3544
- Ijiri, K., Zerbini, L. F., Peng, H., Otu, H. H., Tsuchimochi, K., Otero, M.,

## Mechanism of IL-1 $\beta$ -mediated XT-I Regulation

- Dragomir, C., Walsh, N., Bierbaum, B. E., Mattingly, D., van Flandern, G., Komiya, S., Aigner, T., Libermann, T. A., and Goldring, M. B. (2008) Differential expression of GADD45 $\beta$  in normal and osteoarthritic cartilage: potential role in homeostasis of articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **58**, 2075–2087
33. Gao, S. Y., Li, E. M., Cui, L., Lu, X. F., Meng, L. Y., Yuan, H. M., Xie, J. J., Du, Z. P., Pang, J. X., and Xu, L. Y. (2009) Sp1 and AP-1 regulate expression of the human gene VIL2 in esophageal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 7995–8004
34. Bontemps, Y., Vuillermoz, B., Antonicelli, F., Perreau, C., Danan, J. L., Maquart, F. X., and Wegrowski, Y. (2003) Specific protein-1 is a universal regulator of UDP-glucose dehydrogenase expression: its positive involvement in transforming growth factor- $\beta$  signaling and inhibition in hypoxia. *J. Biol. Chem.* **278**, 21566–21575
35. Singh, D. P., Bhargavan, B., Chhunchha, B., Kubo, E., Kumar, A., and Fatma, N. (2012) Transcriptional protein Sp1 regulates LEDGF transcription by directly interacting with its cis-elements in GC-rich region of TATA-less gene promoter. *PLoS One* **7**, e37012
36. Valhmu, W. B., Palmer, G. D., Dobson, J., Fischer, S. G., and Ratcliffe, A. (1998) Regulatory activities of the 5'- and 3'-untranslated regions and promoter of the human aggrecan gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 6196–6202
37. Müller, B., Prante, C., Kleesiek, K., and Götting, C. (2009) Identification and characterization of the human xylosyltransferase I gene promoter region. *J. Biol. Chem.* **284**, 30775–30782
38. Li, L., and Davie, J. R. (2010) The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann. Anat.* **192**, 275–283
39. Chadjichristos, C., Ghayor, C., Kypriotou, M., Martin, G., Renard, E., Ala-Kokko, L., Suske, G., de Crombrughe, B., Pujol, J. P., and Galéra, P. (2003) Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1  $\beta$  down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 39762–39772
40. Noti, J. D., Reinemann, B. C., and Petrus, M. N. (1996) Sp1 binds two sites in the CD11c promoter *in vivo* specifically in myeloid cells and cooperates with AP-1 to activate transcription. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2940–2950
41. Jang, S. I., and Steinert, P. M. (2002) Loricrin expression in cultured human keratinocytes is controlled by a complex interplay between transcription factors of the Sp1, CREB, AP-1, and AP2 families. *J. Biol. Chem.* **277**, 42268–42279
42. Monje, P., Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2003) Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7030–7043
43. Tanos, T., Marinissen, M. J., Leskow, F. C., Hochbaum, D., Martinetto, H., Gutkind, J. S., and Coso, O. A. (2005) Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. *J. Biol. Chem.* **280**, 18842–18852

**Resumé :** L'arthrose est caractérisée par une dégénérescence progressive du cartilage articulaire. Elle est caractérisée par l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires en particulier l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) qui inhibe la synthèse des protéoglycanes (PGs) et augmente leur dégradation conduisant à l'érosion du cartilage. Cependant, les mécanismes moléculaires de cette inhibition ne sont pas encore élucidés. Nous avons étudié l'effet de l'IL-1 $\beta$  sur l'expression du gène de la xylosyltransférase I (XT-I), enzyme qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la synthèse des PGs au niveau du cartilage. Nous avons montré que l'IL-1 $\beta$  est capable de réguler l'expression de la XT-I en deux phases : une phase précoce d'induction et une phase tardive d'inhibition. L'étude de la régulation du promoteur du gène humain de la XT-I par l'IL-1 $\beta$  a permis de montrer que la phase précoce d'induction est médiée par le facteur AP-1 alors que la phase d'inhibition implique le facteur de transcription Sp3. Nous avons également étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de l'anabolisme des PGs et de l'induction de la différenciation chondrocytaire par Wnt3a. Nous avons montré que Wnt-3a inhibe l'expression du PG, syndécan 4 dans le cartilage et dans les chondrocytes humain en culture via la voie de signalisation non canonique, ERK1/2. Nous avons montré que l'inhibition de l'expression du collagène II par Wnt-3a est médiée par le syndécan 4 et que ce dernier est essentiel à l'activation des voies non canoniques par Wnt-3a probablement via une interaction avec la protéine régulatrice Dishevelled. Enfin, nous avons montré que les effets délétères de l'IL-1 $\beta$  sur les PGs et le collagène II sont atténués par Wnt-3a en inhibant l'expression de l'ADMTS4 et de la MMP13.

**Mots clés :** Arthrose, Xylosyltransférase I, Wnt-3a, Syndécan 4, Cartilage.

**Summary:** Osteoarthritis is characterized by progressive degeneration of articular cartilage. It is characterized by the increase in pro-inflammatory cytokines, in particular interleukin 1 $\beta$  (IL- 1 $\beta$  ) which inhibits the synthesis of proteoglycans (PGs ) and increases their degradation leading to erosion of cartilage. However, the molecular mechanism of this inhibition is not yet elucidated. We studied the effect of IL-1 $\beta$  on gene expression of the xylosyltransferase I ( XT- I), an enzyme which plays an essential role in regulating the synthesis of PGs in the cartilage. We showed that IL-1 $\beta$  regulates the expression of the XT-I gene into two phases: an early phase of induction and a late phase of inhibition. The study of the regulation of the promoter of the human XT-I gene showed that the early induction phase by IL-1 $\beta$  is mediated by AP-1 while the late inhibition phase involves the Sp3 transcription factor. We also investigated the molecular mechanisms involved in the inhibition of PG anabolism and induction of chondrocyte dedifferentiation by Wnt-3a. We showed that Wnt-3a inhibits expression of the PG syndecan 4 in human cartilage and in cultured chondrocytes *via* the non-canonical signaling pathway involving the kinase ERK1/2. We also showed that inhibition of the expression of collagen II by Wnt-3a is mediated by syndecan 4, probably via interaction with a regulatory protein Dishevelled and that syndecan 4 is essential for non-canonical Wnt pathway signaling. Finally, we demonstrated that the deleterious effects of IL-1 $\beta$  on PGs and collagen II are reduced by Wnt-3a by inhibiting the expression of ADMTS4 and MMP13.

**Keywords :** Osteoarthritis , Xylosyltransferase I, Wnt-3a, Syndecan 4, Cartilage