HAL
open science

Étude des conséquences de la déficience génétique en ß1,3-galactosyltransférase 6 (ß3GalT6) sur la pathogénie d'une maladie génétique rare, le syndrome d'Ehlers-Danlos (SED)

Xiaomeng Pang

To cite this version:

Xiaomeng Pang. Étude des conséquences de la déficience génétique en ß1,3-galactosyltransférase 6 (ß3GalT6) sur la pathogénie d'une maladie génétique rare, le syndrome d'Ehlers-Danlos (SED). Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0190 . tel-01665817

HAL Id: tel-01665817

https://theses.hal.science/tel-01665817v1

Submitted on 17 Dec 2017

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par Xiaomeng PANG

Etude des conséquences de la déficience génétique en β1,3-galactosyltransférase 6 (β3GalT6) sur la pathogénie d'une maladie génétique rare, le syndrome d'Ehlers-Danlos (SED)

Le 16 Décembre 2016

Membres du jury :
Rapporteurs :

Monsieur Jean-Claude MICHALSKI, Directeur de Recherche CNRS, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), UMR 8576 - Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

Monsieur Philippe LASSALLE, Chargé de Recherche INSERM, Inserm U1019, Centre d'Immunité et d'Infection de Lille, Institut Pasteur de Lille - Université de Lille, Lille, France

Examinateurs :

Madame Fransiska MALFAIT, Professeur, Centre de Génétique Médicale, Université et Hôpital de Gand, Gand, Belgique

Monsieur Bernard NAMOUR, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CHU Nancy, Hôpitaux de Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Madame Sylvie FOURNEL-GIGLEUX, Directeur de Recherche INSERM, UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Vandœuvre-lès- Nancy, France (Directeur de Thèse)

Madame Sandrine GULBERTI, Maître de Conférences, UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France (Co-Directeur de Thèse)

Laboratoire IMoPA (UMR 7365 CNRS – Université de Lorraine) – Équipe Ingénierie Moléculaire, Cellulaire, Thérapeutique & Glycosyltransférases (MolCelTEG), Campus Biologie-Santé, Faculté de Médecine, Biopôle de l'Université de Lorraine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, CS 50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame le Docteur Sylvie FOURNEL-GIGLEUX pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour avoir diriger ce travail de thèse. Je la remercie de sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance qui m'ont beaucoup appris. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde sympathie et de mes sincères remerciements.

Mes remerciements s'adressent également à Madame le Docteur Sandrine GULBERTI, qui a co-encadré ce travail de thèse. Je la remercie d'avoir transmis son organisation et son enthousiasme, de m'avoir appris la patience et la rigueur. Merci beaucoup pour son soutien, sa confiance et le temps consacré à la correction de ce manuscrit.

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur le Docteur Jean-Claude MICHALSKI pour avoir accepté de juger ce travail thèse en qualité de rapporteur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de l'expression de mes remerciements les plus respectueux.

Je voudrais remercier Monsieur le Docteur Philippe LASSALLE d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant que rapporteur et pour ses remarques constructives en tant que membre de mon comité de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude et mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier Madame le Professeur Fransiska MALFAIT pour avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examinateur. Je la remercie également pour sa confiance et pour m'avoir permis d'initier ce travail de thèse. Veuillez trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je souhaite remercier Monsieur le Professeur Bernard NAMOUR d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant qu'examinateur, mais également pour ses remarques constructives en tant que membre de mon comité de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier le Professeur Jean-Yves JOUZEAU de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également à Monsieur le Docteur Mohamed OUZZINE, pour ses précieux conseils et pour ses idées scientifiques toujours efficaces.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Valérie GISCLARD, présidente de

l'UNSED (Union Nationale des Syndromes d'Ehlers-Danlos) pour son soutien à ce travail de thèse.

Dans un registre plus personnel, je tiens à remercier mes compagnons de thèse. Je remercie tout particulièrement Caroline, Irfan, Zhe (Xavier), Xu et Pan pour leur écoute, leur soutien, leur discussion, leur compréhension et des précieux conseils. Merci à Isabelle, Anne, Nick, Benjamin, Jean-Baptiste, Lydia, Dima, Madhia, Sajida, Dafné, Mathew et Mineem, pour tous les moments qu'on a partagé ensemble.

Je remercie également tous les autres personnes croisées au sein du laboratoire pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

Mes sincères remerciements à « *China Scholarship Council* » qui m'a soutenue une bourse pour l'étude en France.

Enfin, mes plus profonds remerciements vont à ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragé pour aller jusqu'au bout. Les mots ne suffiront pour vous remercier. Mon père, ma maman, mon frère, vous me manquez beaucoup. Je vous aime. Plus personnellement, je remercie mon fiancé, Shiheng LIANG, pour son aide, son écoute et surtout son amour qui m'a été essentiel durant ces années.

SOMMAIRE

Liste des Illustrations 7
Avant-propos 19
Introduction 25
Chapitre I : Syndrome d'Ehlers-Danlos 27
I.1 Classification des SED 27
I.2 Symptômes des SED 30
I.3 Modes de transmission des SED 32
I.4 Diagnostic des différents types de SED 32
I.5 Traitements des SED 33
I.6 SED associés à la biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique des glycosaminoglycanes 36
Chapitre II : Les protéoglycanes : Structure, classification et fonctions biologiques 41
II.1 Structure des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes 41
II.2 Classification des protéoglycanes 45
Chapitre III : La biosynthèse des protéoglycanes 59
III.1 Synthèse de l'amorce tétrasaccharidique 59
III.2 L'élongation des chaînes de glycosaminoglycanes 60
Chapitre IV : La β1,3-galactosyltransférase 6 67
IV.1 La famille des β1,3-galactosyltransférases (β3GalTs) 67
IV.2 La β1,3-galactosyltransférase 6 (β3GalT6) 68
IV.3 SED, SEMD-JL1 et mutations du gène *B3GALT6* 70
Problématique de l'étude et objectifs de travail 79
Matériels et Méthodes 83
Chapitre I. Matériels 85
I.1 Les réactifs chimiques et biochimiques 85
I.2 Les lignées cellulaires et les milieux utilisés en culture cellulaire 85
I.3 Les réactifs de biologie moléculaire 86
Chapitre II. Méthodes expérimentales 88
II.1 Culture cellulaire : entretien et congélation des cellules 88
II.2 Evaluation de l'activité galactosyltransférase par chromatographie liquide haute performance (CLHP) 88

II.3 Transfection des fibroblastes de derme humain (contrôle, non déficients) par les siRNA ciblant le gène *B3GALT6* 89
II.4 Analyse de la restauration de l'expression de la β3GalT6 sauvage dans les fibroblastes de patients 90
II.5 Analyse de l'expression des ARNm de la β3GalT6 par RT-PCR quantitative ... 91
II.6 Analyse de l'expression des protéines recombinantes par immunoblot 92
II.7 Analyse de la synthèse des GAGs à partir d'un xyloside exogène, le 4-Methylombelliferyl-β-D-xylopyranoside (4-MOX)..... 93
II.8 Test de cicatrisation / «*wound healing test*»..... 93
II.9 Analyse de l'expression des HS membranaires par immunofluorescence 94
II.10 Analyse de l'expression de la β3GalT6 dans les fibroblastes de patients par immunofluorescence 95
Résultats et Discussion..... 97
Chapitre I : Analyse de l'effet des mutations de la β3GalT6 sur la biosynthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme humain issus de patients atteints de SED..... 99
I.1 Analyse de la synthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme de peau des patients atteints de SED et les fibroblastes contrôle à partir d'un xyloside exogène, le 4-méthylombelliferyl-β-D-xylopyranoside (4-MOX)..... 100
I.2 Analyse de la synthèse des chaînes de HS à la surface des fibroblastes de derme de peau des patients (Patients F1500081, F1400276, F1400359 et F1400007, Tableau 11) et des fibroblastes contrôle par immunofluorescence. 109
I.3 Analyse de l'activité enzymatique de la β3GalT6 dans les fibroblastes de derme de peau des patients (Patients F1500081, F1400276 et F1400359, Tableau 11) et les fibroblastes contrôle correspondants. 112
Chapitre II : Analyse de l'effet des mutations de la β3GalT6 sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain issus des patients atteints de SED. 115
II.1 Analyse de la capacité migratoire des fibroblastes de derme de peau des patients et des fibroblastes contrôle. 115
Chapitre III : Analyse des conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur la synthèse des GAGs et la capacité migratoire des fibroblastes contrôle. 122
III.1 Analyse des conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur la synthèse des GAGs matriciels dans les fibroblastes contrôle correspondant aux patients 2, 3 et 5..... 122

III.2 Analyse des conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur l'expression des HS membranaires des fibroblastes contrôle correspondant au patient 3. 124
III.3 Analyse des conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur la capacité migratoire des fibroblastes contrôle correspondant aux patients 2, 3 et 5. 126
Chapitre IV : Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs matriciels et la capacité migratoire des fibroblastes de derme de peau des patients. 129
IV.1 Analyse de l'expression de la β3GalT6 après restauration de l'expression de son gène dans les fibroblastes de derme de peau des patients 2, 3 et 5. 129
IV.2 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs matriciels à partir de 4-MOX dans les fibroblastes de derme de peau des patients (Patient 2, 3 et 5). 131
IV.3 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes des patients (Patient 2, 3 et 5). 133
IV.4 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur l'expression des HS membranaires dans les fibroblastes de derme de peau des patients (Patient F1400276) par immunofluorescence. 135
Conclusions et Perspectives 139
I. Conclusion 141
II. Perspectives 143
REFERENCES 145

Liste des Illustrations

Liste des Tableaux

Tableau 1 Classification des syndromes d'Ehlers-Danlos selon la nosologie de Villefranche. 28
Tableau 2 Classification des syndromes d'Ehlers-Danlos-suite (nouveaux types)..... 29
Tableau 3 Etablissement du score d'hypermobilité articulaire de Beighton..... 31
Tableau 4 Composition des unités disaccharidiques des GAGs. 43
Tableau 5 Classification des protéoglycanes en fonction de leur localisation cellulaire. . 45
Tableau 6 Fonctions physiopathologiques de la décorine..... 51
Tableau 7 Ligands et fonctions biologiques des syndécanes. 53
Tableau 8 Caractéristiques fonctionnelles des glycosyltransférases de la famille des hβ3GalTs. 68
Tableau 9 Mutations du gène *B3GALT6* et de la protéine décrites chez les différents patients. 76
Tableau 10 Fournisseurs et sources biologiques des anticorps utilisés dans l'immunofluorescence. 85
Tableau 11 Mutations du gène *B3GALT6* et de la protéine décrites chez les différents patients atteints du syndrome d'Ehlers-Danlos. 86
Tableau 12 Séquences nucléotidiques du siRNA-β3GalT6. 87
Tableau 13 Durées et températures des différentes étapes du protocole de PCRq utilisées pour quantifier les niveaux d'expression relative des ARNm de la β3GalT6..... 92
Tableau 14 Description des signes cliniques des patients porteurs de mutations au niveau du gène *B3GALT6* 99

Liste des Figures

Figure 1 Photographies présentant les principaux signes cliniques du SED..... 31
Figure 2 Représentation schématique des protéoglycanes et glycosaminoglycanes intercellulaires, membranaires et extracellulaires. 44
Figure 3 Représentation schématique de la famille des hyalectanes. 46
Figure 4 Arbre phylogénétique et classification des petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs) 48
Figure 5 Représentation schématique de la structure de la décorine. 50
Figure 6 Représentation schématique des différents membres de la famille des syndécanes. 53
Figure 7 Représentation schématique des fonctions de la serglycine. 56
Figure 8 Représentation schématique de la structure du perlécane. 57
Figure 9 Représentation schématique des voies de biosynthèse des GAGs. 59
Figure 10 Représentation schématique de la biosynthèse et de la maturation des chaînes de CS/DS. 61
Figure 11 Représentation schématique des voies de biosynthèse et de maturation des chaînes de HS. 64
Figure 12 Représentation schématique de la stratégie expérimentale utilisée dans cette étude. 87
Figure 13 Analyse de la conséquence de la mutation du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme humain. 100
Figure 14 Analyse de la conséquence de la mutation du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme humain. 103
Figure 15 Analyse de la conséquence de la mutation du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes fœtaux. 107
Figure 16 Analyse par microscopie confocale de l'expression des HS membranaires marqués par l'anticorps anti-HS (10E4) (rouge)..... 110
Figure 17 Analyse de la conséquence de la mutation du gène *B3GALT6* sur l'activité galactosyltransférase (GalT) de la β3GalT6 des fibroblastes de derme humain..... 112
Figure 18 Analyse des conséquences de la mutation du gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain. 115
Figure 19 Analyse des conséquences de la mutation du gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain. 118

Figure 20 Analyse des conséquences de la mutation du gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain. 119
Figure 21 Analyse des conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme humain. 122
Figure 22 Analyse par microscopie confocale de l'expression de la β3GalT6 et des HS membranaires dans les fibroblastes contrôle (Contrôle associé au patient 3) après extinction du gène *B3GALT6* par un siRNA. 124
Figure 23 Analyse des conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain. 126
Figure 24 Analyse de l'expression de la β3GalT6 après restauration de l'expression de son gène dans les fibroblastes de patient. 129
Figure 25 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes des patients..... 131
Figure 26 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* après transfection du plasmide contenant le gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme des patients 2(A), 3(B) et 5(C). 133
Figure 27 Analyse par microscopie confocale de l'expression de la β3GalT6 et des HS membranaires dans les fibroblastes de patient (F1400276, Tableau 11) après la restauration de l'expression du gène *B3GALT6*. 135

Liste des Abréviations

A	Adénine
AANE	Acides Aminés Non Essentiels
AD	Autosomique dominant
ADAMTS	*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AH	Acide Hyaluronique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
Ala	Alanine
AR	Autosomique récessif
Arg	Arginine
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
Asp	Acide aspartique
Asn	Asparagine
AT	Antithrombine
ATCC	*American Type Culture Collection*
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphate/Nitro Blue Tetrazolium
bFGF	*basic Fibroblast Growth Factor*
BMP	*Bone Morphogenic Protein*
BMPER	*BMP binding endothelial cell precursor-derived regulator*
BSA	*Bovin Serum Albumin*
C	Cytosine
C4ST	Chondroïtine 4-*O*-sulfotransférases
C6ST	Chondroïtine 6-*O*-sulfotransférases
CHO	*Chinese Hamster Ovary*
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance

cmd	*cartilage matrix deficiency*
COMP	Protéine matricielle oligomérique du cartilage
CRP	*Complement regulatory protein*
CS	Chondroïtine sulfate
CSGalNAcT	N-acétylgalactosaminylTransférase
CSS	CS-synthases
Cys	Cystéine
D4ST	Dermatane 4-*O*-sulfotransférase
DDAVP	1-Désamino-8-D-Arginine vasopressine
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagles Medium*
DO	Densité optique
DS	Dermatane sulfate
ECM2	*Extracellular matrix protein 2*
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EGFR	*Epidermal Growth FactorReceptor*
EXT	Exostosin (Glycosyltransferase)
EXTL	Exostosin-Like (Glycosyltransferase)
Fam20B	*Family with sequence similarity 20 member B*
FGF	*Fibroblast Growth Factor*
FGFR	*Fibroblast Growth Factor Receptor*
G	Guanine
GAGs	Glycosaminoglycanes
Gal	Galactose
GalNAc	N-AcétylGalactosamine
GalNAcT	N-AcétylGalactosamineTransférase
Gb_3	Globotriaosylcéramide
Gb_4	Globoside
gD	Glycoprotéine D

GDF	*Growth differentiation factor*
GFP	*Green fluorescent protein*
Glc	Glucose
GlcA	*Glucuronic Acid*
GlcA-T	GlucuronosylTansférase
Glce	D-glucuronyl C5-épimérase
Gln	Glutamine
GlcNAc	N-AcétylGlucosamine
GlcNAc-T	N-AcétylGlucosamineTransférase
GlcNS	Glucosamine N-sulfatée
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GST	Glutathion-S-Transférase
GTs	GlycosylTransférases
HA	Hémagglutinine
HeLa	*Henrietta Lacks*
HEK	*Human Embryonic Kidney*
Hep	Héparine
His	Histidine
HOXD	*Homeobox D*
HP	Hydroxylysylpyridinoline
HS	Héparane sulfate
HSPG	Protéoglycane à HS
IdoA	Acide Iduronique
IGD	*Interglobular domain*
IGF1R	*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*
IgG	Immunoglobuline classe G
IL	Interleukine

Ile	Isoleucine
KO	*Knock-out*
KS	Kératane sulfate
LB	*Luria Bertani*
Lc_3	Lactosylcéramide
LDL	*Low Density Lipoprotein*
Leu	Leucine
LH1	Lysyl hydroxylase 1
LP	Lysylpyridinoline
LRRs	*Leucin Rich Repeat*
Lys	Lysine
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinase*
MMP	*Matrix Metalloproteinase*
MEC	Matrice Extracellulaire
Met	Méthionine
N-CAM	*Neural Cell-Adhesion Molecule*
NDST	*N*-Deacétylase / *N*-SulfoTransférase
NG2	Antigène neuronal/gliale 2
NS	N-sulfaté
NTP	Nucléotides TriPhosphate
PAPS	3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PDGF	*Platelet Derived Growth Factor*
PDZ	*Post synaptic density protein, Drosophilia discs large tumor suppressor, Zonula occludens-1 protein*
PEI	Polyéthlènimine
PFA	*para*formaldéhyde
PG	Protéoglycane

Phe	Phenylalanine
PRELP	*Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein*
Pro	Proline
PVDF	PolyVinylidène DiFluorure
RE	Réticulum Endoplasmique
rFVIIa	*Recombinant factor VIIa*
RPS29	*Ribosomal Protein S29*
RT	Rétro Transcription
SAB	Sérum Albumine Bovine
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SEA	*Sea urchin sperm protein, Enterokinase, Agrin*
SED	Syndrome d'Ehlers-Danlos
SEMD-JL1	Dysplasie spondylo-épimétaphysaire avec hyperlaxité ligamentaire de type 1
Ser	Sérine
Ser-Gly	Sérine-Glycine
SHOX	S*hort stature homeobox*
shRNA	*small hairpin Ribonucleic Acid*
siRNA	*small interfering Ribonucleic Acid*
SLRP	*Small Leucine Rich Proteoglycan*
SNC	Système nerveux central
sqv	*squashed vulva*
ST	Sulfotransférase
STEAP	*six transmembrane epithelial antigen of prostate*
Sulf	Sulfatase
SVF	Sérum de Veau Fœtal
SYND	Syndécan
T	Thymine
TBST	*Tris Buffer Saline Tween*

TFA	Acide trifluoroacétique
TGF-β	*Transforming Growth Factor β*
Thr	Thréonine
TNF	*Tumor Necrosis Factor*
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosine
UDP	Uridine DiPhosphate
UST	Uronyl 2-*O*-sulfotransférase
Val	Valine
VEGF	*Vascular Epidermal Growth Factor*
WT	*Wild Type*
Xyl	Xylose
XylT	XylosylTransférase
β3GalT	β1,3-Galactosyltransférase
β4GalT	β1,4-GalactosylTransférase
2-OST	2-*O*-SulfoTranférase
3-OST	3-*O*-SulfoTranférase
4-MOX	4-Méthylombelliféryl-β-D-xylopyranoside
6-OST	6-*O*-SulfoTranférase

Avant-propos

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (SED) est un groupe hétérogène de maladies génétiques touchant principalement les constituants matriciels comme le collagène et les protéoglycanes (PGs). La matrice extracellulaire (MEC) étant particulièrement abondante dans les tissus conjonctifs tels que la peau, le cartilage, les os, les muscles, la paroi des viscères et des vaisseaux sanguins, il conduit à des symptômes très diversifiés plus ou moins sévères, associés à des signes cliniques communs, comme des articulations hypermobiles, une peau fragile et élastique, ou encore des problèmes de cicatrisation. Dans les premières formes de SED décrites, des mutations des gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse et la maturation des collagènes ont été identifiées. Plus récemment, d'autres travaux ont également impliqué d'autres molécules matricielles (en particulier, les PGs) dans des formes plus rares et sévères de SED. Il a par exemple été montré que des mutations du gène codant la β1,3-galactosyltransférase 6 (β3GalT6), qui est impliquée dans l'initiation de la biosynthèse des PGs, peuvent également être à l'origine d'une forme pléiotropique de SED et d'une maladie génétique du tissu conjonctif, la dysplasie spondylo-épimétaphysaire avec hyperlaxité ligamentaire de type 1 (SEMD-JL1), faisant des PGs des cibles également importantes pour l'étude de ces pathologies.

Les PGs sont des macromolécules situées à la surface des cellules et dans les MEC et jouant un rôle majeur dans le maintien de la structure tridimensionnelle et l'organisation des tissus conjonctifs. Ils sont impliqués dans de multiples processus physiopathologiques comme la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire ou encore la réparation tissulaire. Les PGs sont constitués d'un squelette peptidique appelé protéine *core* sur lequel sont fixées des chaînes hétéropolysaccharidiques linéaires appelées glycosaminoglycanes (GAGs). La biosynthèse des GAGs débute par la formation d'une amorce tétrasaccharidique [Acide glucuronique-β1,3-Galactose-β1,3-Galactose-β1,4-Xylose-β1-*O*-] (GlcA-β1,3-Gal-β1,3-Gal-β1,4-Xyl-β1-*O*-) à partir de laquelle seront ensuite polymérisés les différents types de chaînes de GAGs, qui seront simultanément maturés par diverses réactions d'épimérisation et de sulfatations.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis focalisée sur l'étude de la β3GalT6, qui catalyse le transfert du troisième résidu (galactose) de l'amorce tétrasaccharidique sur la protéine *core* des PGs. Un précédent travail réalisé au sein de notre équipe, en collaboration avec le Centre de Génétique Médicale de Gand (Belgique), a montré que les fibroblastes de derme de peau des patients déficients en β3GalT6 présentaient un défaut de synthèse des GAGs associé à un retard de migration cellulaire par rapport à des cellules contrôle (non porteuses de la déficience

génétique) (Malfait, Kariminejad et al. 2013). Sur la base de ces résultats et des récentes publications impliquant la β3GalT6 dans des maladies génétiques rares des tissus conjonctifs (comme le SED et la SEMD-JL1), l'objectif de ma thèse a été de mieux comprendre l'implication de cette enzyme dans le processus physiopathologique du SED, en particulier en termes d'anabolisme des GAGs et de capacité migratoire des cellules.

Dans la première partie de ce travail, nous avons analysé la biosynthèse des GAGs (matriciels et HS membranaires) en parallèle de la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain issus des patients atteints de SED et porteurs des mutations au niveau du gène *B3GALT6*.

Nous avons, dans un deuxième temps, réalisé une étude de type « gain et perte de fonction » afin de mieux comprendre le rôle de la déficience en β3GalT6 dans l'altération des fonctions tissulaires observée chez les patients. Pour ce faire, nous avons étudié les conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* sur la biosynthèse des GAGs matriciels, l'expression des HS membranaires et la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain non déficients en culture (cellules contrôle) pour analyser les conséquences de la déficience génétique en β3GalT6 et comprendre ses manifestations cellulaires. De façon complémentaire, les conséquences de la restauration de l'expression du gène codant la β3GalT6 ont été analysées dans les cellules (déficientes) des patients atteints de SED en analysant la biosynthèse des GAGs matriciels, l'expression des HS membranaires et la capacité migratoire des fibroblastes afin de voir si l'expression d'une enzyme sauvage dans des cellules déficientes est capable de s'opposer aux effets cellulaires délétères qui sont la conséquence des défauts génétiques.

Ce manuscrit de thèse débutera par une introduction bibliographique présentant la classification et les symptômes des SED, ainsi que les différents traitements actuellement proposés aux patients. Les mutations des gènes responsables des différents types de SED seront présentées, en particulier celles présentes au niveau des gènes codant des enzymes de biosynthèse des GAGs, comme la β3GalT6, sur laquelle se focalise ce travail de thèse. La partie consacrée plus précisément à la structure et aux fonctions biologiques des PGs (et des GAGs) sera suivie par une description de la biosynthèse et de la maturation de ces chaînes hétéropolysaccharidiques. La famille des β1,3-galactosyltransférases (β3GalTs), en particulier la β3GalT6, sera également décrite d'un point de vue fonctionnel dans la mesure où aucune information relative à la structure tridimensionnelle de cette enzyme n'est disponible. La problématique et les objectifs de ce travail de thèse seront présentés afin d'illustrer l'importance de l'étude de cette enzyme dans le contexte physiopathologique du SED. La stratégie expérimentale et les techniques

utilisées seront décrites avant de présenter et discuter les résultats obtenus au cours de ce travail. Finalement, les perspectives à court, moyen et long terme seront exposées en termes d'étude structure-fonction de la β3GalT6 et d'analyse de ses fonctions cellulaires.

L'ensemble des résultats obtenus et à venir devrait nous permettre de mieux comprendre l'implication de la β3GalT6 dans la pathogénie du SED et le cas échéant, de proposer différentes stratégies thérapeutiques visant à s'opposer à la réduction d'anabolisme des GAGs et aux altérations fonctionnelles qui en résultent.

Introduction Bibliographique

Chapitre I : Syndrome d'Ehlers-Danlos

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (SED) est un groupe hétérogène de maladies génétiques touchant principalement les constituants matriciels des tissus conjonctifs, comme la peau, les ligaments, les articulations, la paroi des vaisseaux sanguins ou encore des organes internes. La première description de ce syndrome a été réalisée par deux dermatologues, le Docteur Edvard Ehlers à Copenhague en 1900 et le Docteur Alexandre Danlos à Paris en 1908.

I.1 Classification des SED

Le SED est aujourd'hui considéré comme appartenant aux maladies dites rares, pour lesquelles la pathologie touche moins d'une personne sur 5000 (1/5000) (Pyeritz, 2000). Ils sont classés en six types différents selon la nosologie de Villefranche qui se distinguent par le mode de transmission, la nature et la gravité des symptômes cliniques et par le défaut génétique lorsqu'il est identifié (Tableau 1) (Beighton, De Paepe et al. 1998, Miyake, Kosho et al. 2014).

(i) Le type classique (1/20 000) caractérisé par une hyperextensibilité cutanée, des cicatrices atrophiques, une hyperlaxité ligamentaire et la peau douce, et dans lequel des gènes codant des collagènes sont mutés,

(ii) Le type hypermobile (1/5 000-20 000) caractérisé par une hypermobilité articulaire avec un score de Beighton > 5 selon l'échelle de Beighton (voir partie I.2),

(iii) Le type vasculaire (1/50 000-250 000) dans le quel le gène *COL3A1* codant le collagène de type 3 est muté et caractérisé par une fragilité des parois artérielles, du tube digestif ou de l'utérus, de multiples ecchymoses et une peau fine et translucide,

(iv) Le type cypho-scoliotique (1/100 000) caractérisé par une hyperlaxité articulaire généralisée, une hypotonie musculaire et une cyphoscoliose,

(v) Le type arthrochalasique (rare, environ 30 cas rapportés dans le monde) dans lequel des gènes codant le collagène de type I sont mutés et caratérisé par une hypermobilité articulaire généralisée sévère, des subluxations (dislocations partielles) et des luxations récidivantes, une hyperextensiblilité cutanée et une fragilité tissulaire,

(vi) Le type dermatosparaxis (rare, environ une douzaine de cas rapportés dans le monde) présentant une fragilité cutanée extrême, une peau laxe et redondante, des hématomes fréquents et un retard de croissance.

Tableau 1 Classification des syndromes d'Ehlers-Danlos selon la nosologie de Villefranche. (Beighton, De Paepe et al. 1998)

Nosologie de Villefranche	Ancienne classification	Principaux symptômes cliniques	Mutations des gènes/ protéines	Mode de transmission
Classique	SED type I et II	Hyperextensibilité de la peau Cicatrices hypertrophiques Hypermobilité des articulations	*COL5A1* *COL5A2* *COL1A1* Collagène type I et V	AD
Hypermobile	SED type III	Hyperextensibilité variable de la peau (pas de cicatrice atrophique) Hypermobilité généralisée des articulations	Inconnue	AD
Vasculaire	SED type IV	Peau mince et translucide Fragilité et rupture des artères, de l'intestin ou de l'utérus Contusions étendues Aspect caractéristique du visage	*COL3A1* Collagène type III	AD
Cyphoscoliotique	SED type VI	Articulations lâches Hypotonie musculaire sévère à la naissance Scoliose à la naissance Fragilité de la sclérotique Rupture du globe oculaire	*PLOD 1* Procollagène lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygénase 1	AR
Arthrochalasique	SED type VIIA et VIIB	Hypermobilité sévère des articulations avec subluxations récurrentes Luxation congénitale bilatérale des hanches	*COL1A1* *COL1A2* Collagène type I	AD
Dermatosparaxis	SED type VIIC	Fragilité cutanée importante Ecchymoses étendues	*ADAMTS2* A disintégrine et métal-loprotéinase avec motif thrombospondine 2	AR

AD : autosomique dominante ; AR : autosomique récessive.

Tableau 2 Classification des syndromes d'Ehlers-Danlos-suite (nouveaux types)

Nosologie de Villefranche	Principaux symptômes cliniques	Mutations gènes/ protéine	Mode de transmission
Progéroïde	Petite stature Anomalies cranio-faciales Hypermobilité des articulations Hyperextensibilité de la peau Retard de la cicatrisation	*B4GALT7* *B3GALT6* β1,4-galactosyltransférase 7 β 1,3-galactosyltransférase 6	AR
Musculo-contractural	Arthrogrypose distale sévère Arachnodactylie Pied-bot Retard psycho-moteur et de développement sévère	*CHST14* Carbohydrate (Dermatane) 4-*O*-sulfotransférase 14	AR
Cardiaque valvulaire	Troubles cardiaques valvulaires (insuffisance mitrale …) Articulations hypermobiles Peau hyperextensible	*COL1A2* Collagène type I	AR
Spondylo-cheiro-dysplasique	Dysplasie squelettique généralisée Anomalies du rachis et des mains	*SLC39A13* *Solute Carrier Family 39 (Zinc Transporter), Member 13*	AR
Hétérotopie nodulaire périventriculaire	Epilepsie focale Anomalies cardiaques (valves aortiques bicuspides etc)	*FLNA* Filamine A	Dominante liée à l'X

AD : autosomique dominante ; AR : autosomique récessive.

D'autres sous-types de SED, beaucoup plus rares, appelés quelquefois SED-*like*, ont été décrits plus récemment et ont été intégrés à la liste principale des SED décrits jusqu'alors (De Paepe and Malfait 2012, Miyake, Kosho et al. 2014). Ces nouveaux types de SED incluent (Tableau 2) :

(i) Le type progéroïde, caractérisé par une désorganisation globale des tissus conjonctifs et des défauts musculo-squelettiques comme une petite stature, des anomalies cranio-faciales, une hypermobilité des articulations, une hyperextensibilité de la peau et un retard de la cicatrisation. Les patients atteints de ce type de SED présentent un défaut majeur de biosynthèse des glycosaminoglycanes (GAGs), conséquence de la mutation d'une glycosyltransférase (β1,4-galactosyltransférase 7) impliquée dans leur biosynthèse (voir partie I.6.2),

(ii) Le type musculo-contractural dans lequel une enzyme de maturation des chaînes de GAGs est mutée (la dermatane 4-*O*-sulfotransférase, D4ST) et caractérisé par une fragilité globale des tissus conjonctifs, des anomalies du développement et des contractures musculaires congénitales, un relâchement de la peau et une laxité des articulations,

(iii) Le type cardiaque valvulaire présentant des mutations du gène *COL1A2* et caractérisé par des troubles des cardiaques valvulaires, des articulations hypermobiles et une peau hyperextensible,

(iv) Le type spondylo-cheiro-dysplasique dans lequel une dysplasie squelettique généralisée est observée avec des manifestations ciblées typiques au niveau du rachis et des mains, par exemple, une ostéopénie des corps vertébraux, des doigts effilés,

(v) Le type hétérotopie nodulaire périventriculaire caractérisé par des malformations du cortex cérébral associées à une épilepsie focale qui se développe dans la deuxième décennie de la vie.

I.2 Symptômes des SED

Le SED conduit à des symptômes très diversifiés, plus ou moins sévères, mais présentant néanmoins des signes cliniques communs. Une des manifestations les plus typiques du SED est une **peau hyper extensible**, qui s'étire facilement, dotée d'une élasticité importante (elle s'étend aisément et reprend sa forme initiale après relâchement). La peau des patients est fine avec des vaisseaux apparents et présente un aspect lisse et velouté au toucher. Pour le type vasculaire, la peau n'est pas hyper extensible, mais mince et transparente avec des veines apparentes facilement visibles à cause de la finesse de la peau. La peau des patients présente une **fragilité** et une facilité à se déchirer après un traumatisme même léger, ce qui conduit à la formation de **cicatrices atrophiques** (Figure 1A). **L'hypermobilité des articulations** (Figure 1B) est généralisée et variable en intensité et en fonction de l'âge des patients. Elle est souvent asymptomatique dans l'enfance et l'adolescence, et peut devenir sévère avec le temps. Elle se caractérise par des complications articulaires associées à des subluxations répétitives, des entorses et des douleurs articulaires chroniques. L'hypermobilité articulaire peut être estimée au moyen de l'échelle de Beighton, un système d'évaluation objectif semi quantitatif (Tableau 3) (Beighton, De Paepe et al. 1998). Le score de Beighton est basé sur une série de neuf manipulations cliniques. Un diagnostic de SED est retenu en cas de score supérieur ou égal à 5 points. L'hypotonie musculaire peut contribuer à un retard du développement moteur,

des problèmes de la marche et une légère perturbation de la motricité. Les patients sont fréquemment sujets à des **ecchymoses,** aboutissant spontanément à la formation d'hématomes, et conduisant souvent au dépôt d'hémosidérine (un pigment insoluble présent dans le sang et contenant de l'hydroxyde ferrique) dans les zones exposées telles que les tibias et les genoux (Figure 1A). Ces patients ont tendance à présenter des **saignements** prononcés, par exemple suite à un simple brossage de dents, en dépit d'une coagulation normale.

Ces manifestations cliniques associées observées chez des patients atteints de SED résultent de la **faiblesse et la fragilité généralisée des tissus conjonctifs mous.**

Figure 1 Photographies présentant les principaux signes cliniques du SED.
A) Patient atteint du syndrome d'Ehlers-Danlos (SED) du type classique présentant des cicatrices larges et atrophiques sur les genoux et les tibias, les pieds plats avec hallux valgus. B) Patient atteint de SED du type arthrochalasique présentant une hyperlaxité des articulations des doigts. C) Patient atteint de SED du type dermatosparaxis montre un aspect typique du visage avec épicanthus (aspect bridé des yeux), fissures palpébrales *downslanting*, sclérotique bleue, micrognathie, lèvre proéminente et cicatrices du visage en particulier autour de la bouche (De Paepe and Malfait 2012).

Tableau 3 Etablissement du score d'hypermobilité articulaire de Beighton. (Beighton, De Paepe et al. 1998)

Articulation/Signe	Négatif	Positif	
		Unilatéral	Bilatéral
Dorsiflexion passive du 5e doigt > 90 °	0	1	2
Flexion passive du pouce vers l'avant-bras	0	1	2
Hyper extension du coude > 10 °	0	1	2
Hyper extension des genoux > 10 °	0	1	2
Flexion complète du tronc, genoux complètement étendus, avec les paumes complètement sur le sol	0	1	
Score positif si ≥ 5			

Le score de Beighton prend en compte le degré de mobilité par manipulation passive de cinq articulations distinctes.

I.3 Modes de transmission des SED

Trois types de transmission sont répertoriés dans ce type de syndrome :

(i) La transmission de la maladie selon un **mode autosomique dominant (AD)** pour lesquels le gène déficient est porté par l'un ou l'autre des parents, ce qui entraine, pour chaque enfant, une probabilité de 50% d'être atteint par la maladie, qu'il soit de sexe féminin ou masculin. C'est le cas de la majorité des types de SED, par exemple le type classique.

(ii) Si la transmission du SED suit un mode **autosomique récessif (AR),** l'enfant atteint de SED doit recevoir le gène déficient de ses deux parents pour qu'il y ait une expression clinique de la pathologie (par exemple le type dermatosparaxis). Dans ce cas, les parents sont eux-mêmes porteurs sains, et ne manifestent aucun symptome. Le risque d'être atteint de la pathologie pour un enfant à venir est donc de 25%.

(iii) Plus rarement, le gène déficient est porté par un **chromosome sexuel**. Par exemple, le type hétérotopie nodulaire périventriculaire présente un mode de transmission dominant lié à l'X maternel, ayant pour conséquence, pour chaque enfant à naître, une probabilité de 50% d'être atteint cette maladie (Gomez-Garre, Seijo et al. 2006).

I.4 Diagnostic des différents types de SED

L'identification du ou des gènes responsables du SED reste difficile. Le diagnostic des SED repose dans un premier temps et principalement sur **une évaluation clinique**. Le médecin établit son diagnostic en analysant les symptômes et les antécédents familiaux et pathologiques du patient, ainsi que les affections détectées chez d'autres membres de la famille (proche). L'évaluation clinique est l'étape cruciale et parfois suffisante pour établir un diagnostic correct. L'hypermobilité articulaire est évaluée par l'établissement du score de mobilité articulaire déterminé selon la méthode de Beighton (voir partie I.2, Tableau 3). Pour certains types de SED, des analyses structurales des tissus, complétées par des études biochimiques et moléculaires peuvent être utilisées pour diagnostiquer les différents sous-types de SED de façon précise. **L'analyse ultra structurale** de la peau est effectuée grâce à la microscopie électronique. Elle peut révéler une structure anormale des fibrilles de collagène qui prennent alors un aspect irrégulier et désordonné avec une variabilité du diamètre des fibrilles de collagène. Cependant, ces anomalies sont communes à plusieurs sous-types de SED et ne sont pas suffisamment spécifiques pour discriminer les patients atteints des différents sous-types de SED.

Une culture de fibroblastes (issus d'une biopsie cutanée) est la première étape du diagnostic des SED au laboratoire. L'analyse moléculaire des échantillons est réalisée sur l'ADN génomique et l'ARNm extraits des fibroblastes en culture. **L'analyse des collagènes de type I, III et V** par SDS-PAGE (grâce à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide) permet de détecter des anomalies quantitatives ou qualitatives des collagènes dans les fibroblastes des patients. L'analyse biochimique du collagène de type III et/ou l'analyse du génotypage du gène *COL3A1* peuvent confirmer de façon définitive un diagnostic de SED de type vasculaire. Le SED de type cyphoscoliotique est caractérisé par des mutations du gène *PLOD1,* entraînant une déficience en lysyl hydroxylase 1 (LH1) qui joue un rôle très important dans la modification post-traductionnelle dans le processus de maturation du collagène. La LH1 catalyse l'hydroxylation du résidu lysine dans les domaines en triple hélice des collagènes de type I et III, afin de former les liaisons croisées (*cross-links*) entre les fibres de collagène. Il a été montré une augmentation du rapport lysylpyridinoline (LP) / hydroxylysylpyridinoline (HP), qui sont des produits excrétés dans les urines après la protéolyse du collagène chez les patients atteints de cette forme de SED. La mesure du **rapport LP/HP urinaire** (par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)) est un test sensible et spécifique pour le diagnostic de cette forme de SED. A titre indicatif, la valeur du rapport LP/HP est d'environ 6 chez les patients alors qu'elle est en moyenne de 0.2 pour les personnes non porteuses de la déficience génétique (Rohrbach, Vandersteen et al. 2011).

L'imagerie médicale peut être une technique complémentaire au diagnostic. Dans la forme classique du SED, une échocardiographie est utile, puisqu'il existe des cas de troubles cardiaques. Dans la forme vasculaire, une échographie doppler artérielle ou une angio-IRM cervico-encéphalique de l'aorte abdominale et de ses branches (artères des membres inférieurs) peuvent être proposés.

La sévérité des risques peut par ailleurs justifier un **diagnostic prénatal**, sur l'ADN extrait des cellules fœtales obtenues par amniocentèse (entre 15 et 18 semaines de grossesse) ou à partir des villosités choriales (entre 10 et 12 semaines de grossesse) pour réaliser une identification de l'anomalie génique suspectée dans la famille.

I.5 Traitements des SED

Il n'y a pas actuellement de traitement curatif des SED. Les traitements proposés aux patients sont à l'heure actuelle uniquement symptomatiques et préventifs. Ils comprennent la prévention

cardiovasculaire, la physiothérapie, les médicaments antalgiques et anti-inflammatoires et un suivi psychologique.

I.5.1 Traitements préventifs et examens d'imagerie médicale

Les enfants présentant une fragilité cutanée sévère doivent porter des coussinets et des bandages sur le front, le menton et les genoux afin d'éviter les lacérations cutanées. En cas de blessures, les plaies doivent être refermées sans tension, et les points de suture doivent être laissés suffisamment longtemps pour éviter l'étirement de la cicatrice ou la réouverture de la plaie.

Les patients présentant des ecchymoses multiples doivent être encouragés à éviter les sports de contact, les exercices violents et les médicaments interférant avec les mécanismes de l'hémostase, par exemple l'aspirine (acide acétylsalicylique). Une supplémentation en **acide ascorbique** (vitamine C) peut également être envisagée chez les patients atteints de SED. En effet, l'acide ascorbique est nécessaire au bon fonctionnement de la prolylhydroxylase, une enzyme impliquée dans la production d'une molécule entrant dans la composition du collagène (l'hydroxyproline). Une carence en vitamine C, peut être à l'origine d'une désorganisation des tissus comme la peau, et être à l'origine de symptômes proches de ceux du SED, comme des lésions de la peau, une fragilité des vaisseaux et une cicatrisation difficile. Un apport en vitamine C pourrait donc potentiellement aider les patients à limiter l'apparition de ce genre de symptômes et par exemple, diminuer la fragilité vasculaire chez certains patients, du fait de sa capacité à augmenter *in vitro* la synthèse de collagène par les fibroblastes (Shashikiran, Rastogi et al. 1999, Mantle, Wilkins et al. 2005).

Une **échocardiographie** du coeur et des vaisseaux doit être effectuée chez tous les patients atteints de SED afin de mesurer le diamètre de la racine de l'aorte pour évaluer les anomalies valvulaires cardiaques associées à l'âge et à la morphologie des patients. Si les patients appartiennent à un groupe évalué « à risque » par rapport aux complications vasculaires, il est important de faire contrôler la tension artérielle du patient de façon régulière. Les explorations vasculaires invasives comme l'artériographie et le cathétérisme sont cependant contre-indiquées chez certains patients car elles peuvent entraîner une rupture vasculaire qui risquerait de provoquer une morbidité et une mortalité significativement plus importante chez ce groupe de patients à risque (Cikrit, Miles et al. 1987, Freeman, Swegle et al. 1996). Les indications chirurgicales sont à reconsidérer en prenant en compte la fragilité vasculaire excessive de ces patients si une intervention doit être programmée.

En fonction de la symptomatologie, des **orthèses** plantaires et/ou des membres supérieurs peuvent être utilisées, pour éviter d'exercer des pressions trop importantes sur la peau et prévenir les luxations. Dans des cas plus graves, l'adaptation de l'environnement quotidien peut s'avérer utile pour diminuer le risque de blessure et de chute. L'indication des gestes endo-utérins doit toujours être rediscutée compte tenu de la fragilité de l'endomètre. Les manipulations vertébrales, en particulier cervicales, doivent être proscrites. Le médecin traitant doit être sensibilisé aux risques éventuels des gestes invasifs et des possibles complications après un geste médical, du fait de la fragilité tissulaire de ces patients et de leur symptomatologie complexe.

Il est très important de **suivre les femmes enceintes** atteintes de SED de type vasculaire dans un programme obstétriques à haut risque. Il a été décrit un risque de 12% de rupture utérine ou de rupture artérielle *peripartum* chez les femmes enceintes atteintes de ce type de maladie (Pepin, Schwarze et al. 2000).

I.5.2 Traitements médicamenteux

L'utilisation de la **desmopressine** (1-Désamino-8-D-Arginine vasopressine, DDAVP), un analogue de la vasopressine, a montré une réduction de la tendance hémorragique dans l'intervention dentaire ou chirurgicale chez les patients atteint de SED de type VI et VIII, qui présentaient un symptôme hémorragique (Stine and Becton 1997). Un rapport de cas clinique a décrit que le **rFVIIa (*Recombinant factor VIIa*)**, un facteur impliqué dans la cascade de la coagulation sanguine, a arrêté le saignement qui persistait chez un patient atteint de SED de type vasculaire (Faber, Craig et al. 2007).

Les **anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)** peuvent soulager les douleurs articulaires, mais leur utilisation peut conduire une action anti-agrégante plaquettaire, qui peut aggraver la fragilité vasculaire. Le **paracétamol** et le **cérécoxib** (un AINS de deuxième génération de la famille des inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase-2) n'affectent pas l'hémostase et peuvent être utilisés dans le cas de douleurs légères ou occasionnelles (Castori 2012).

I.5.3 Traitements physiques et physiothérapie

Chez les patients présentant une hypotonie musculaire ou un retard du développement moteur, une **physiothérapie** est indispensable. Des exercices musculaires doux, associés à certains

sports, comme la natation, sont utiles afin d'améliorer le développement et la coordination musculaire des patients.

Enfin, un **soutien psychologique** et comportemental, voire même une psychothérapie, peuvent être utiles dans tous les types de SED afin d'aider les patients à évoluer dans leur vie quotidienne. Une information claire doit être transmise aux patients, particulièrement sur le caractère évolutif de la pathologie. Les associations de malades peuvent être bénéfiques dans cette pathologie et venir en soutien des patients, comme l'association AMSED génétique (Association des Malades des Syndromes d'Ehlers-Danlos, récemment renommée UNSED) qui œuvre en France, en Suisse, en Belgique et en Italie (*http://www.amsed-genetique.com*) et qui a apporté son soutien à cette étude.

I.6 SED associés à la biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique des glycosaminoglycanes

I.6.1. Rappels des premières mutations associées au SED

Dans les premières formes de SED décrites, des mutations des gènes codant les **collagènes** fibrillaires de type I, III et V ont été identifiées, ainsi que des gènes codant les enzymes impliquées dans la **biosynthèse et la maturation de ces collagènes** (Tableau 1). Il a par exemple été montré que des mutations au niveau du gène *COL5A1,* codant la chaîne α du collagène de type V, étaient à l'origine des manifestations cliniques correspondant aux types dit « classiques » de SED (Toriello, Glover et al. 1996, Wenstrup, Langland et al. 1996, De Paepe, Nuytinck et al. 1997). Les mêmes observations ont été rapportées dans le cas d'une mutation ponctuelle affectant le gène *COL1A1,* impliqué dans la synthèse de la chaîne α du collagène de type I (Nuytinck, Freund et al. 2000). De la même façon, les mutations du gène *COL1A2,* codant la chaîne α2 du collagène de type I, conduisent à un phénotype de SED de type cardiovasculaire (Schwarze, Hata et al. 2004, Malfait, Symoens et al. 2006). Une autre mutation du gène impliqué dans la synthèse du collagène de type I (*COL1A1*) a été identifiée dans certains cas de SED de type classique associé à la rupture des parois artérielles (Malfait, Symoens et al. 2007). Il a été montré que des manifestations cliniques similaires pouvaient également être dues à des atteintes portant sur les gènes codant des enzymes impliquées dans la maturation du collagène. Par exemple, des mutations du gène *ADAMTS2,* codant une métalloprotéase matricielle responsable du clivage du propeptide *N*-terminal du pro-collagène dans le cadre de la maturation post-traductionnelle des collagènes fibrillaires, ont été identifiées

comme étant à l'origine du SED de type dermatosparaxis (Colige, Sieron et al. 1999, Colige, Nuytinck et al. 2004, Malfait, De Coster et al. 2004).

Des mutations touchant des gènes codant d'autres composants matriciels, comme les **protéoglycanes** (PGs) (voir Chapitre II) ont également été décrites. Des défauts présents au niveau des gènes codant des enzymes responsables de l'initiation de la biosynthèse des glycosaminoglycanes (GAGs) (voir Chapitre II), comme les gènes *B4GALT7* et *B3GALT6*, ont été associées à une forme progéroide et pléiotropique de SED respectivement. Les SED associés à ces déficiences génétiques seront détaillés dans les chapitres III et IV.

I.6.2 SED et mutations du gène *B4GALT7*

- Des mutations du gène *B4GALT7* sont associées à une forme progéroide de SED

A côté des mutations des gènes codant les enzymes de biosynthèse ou de maturation du collagène, d'autres formes de SED ont été décrites et associées à des gènes de différentes familles, comme ceux codant des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des GAGs (voir Chapitre III). Chez le premier patient étudié, qui présentait des symptômes très proches de ceux observés pour les SED dits « classiques » et un aspect « progéroïde », une substitution déficiente en GAGs de la protéine *core* de la décorine a été initialement observée sur culture de fibroblates de peau. Ceci indiquait que dans cette forme de SED (nommée forme progéroide), ce sont les PGs (plutôt que les collagènes) qui sont touchés et responsables des symptomes observés (Kresse, Rosthoj et al. 1987). Deux mutations du gène *B4GALT7*, codant la β1,4-galactosyltransférase 7 (β4GalT7), qui catalyse le transfert du deuxième résidu (galactose) de l'amorce tétrasaccharidique sur le xylose fixé à la protéine *core* (voir Chapitre II) ont été ultérieurement identifiées chez ce patient (Almeida, Levery et al. 1999, Okajima, Fukumoto et al. 1999, Okajima, Yoshida et al. 1999). Il s'agit de deux mutations ponctuelles (hétérozygote) pour lesquelles l'alanine en position 186 est remplacée par un acide aspartique (Ala186Glu) et la leucine en position 206 par une proline (Leu206Pro). Une autre mutation homozygote du gène *B4GALT7* pour laquelle une arginine en position 270 est remplacée par une cystéine (Arg270Cys) a par la suite été décrite chez deux autres patients (dans une grande famille) atteints de ce même type (progéroide) de SED (Faiyaz-Ul-Haque, Zaidi et al. 2004). Plus récemment, une nouvelle mutation, touchant la leucine en position 41 remplacée par un résidu proline (Leu41Pro), a pu être intégrée à la liste des mutations affectant l'activité de la β4GalT7 et associée une forme de SED (Guo, Stoler et al. 2013).

La mutation homozygote au niveau du gène *B4GALT7* (Arg270Cys) a parallèlement été identifiée comme étant à l'origine d'une variante du syndrome de Larsen dans l'île de la Réunion (Cartault, Munier et al. 2015). Cette maladie est caractérisée par de multiples dislocations des articulations avec une hyperlaxité ligamentaire, un nanisme, des anomalies cranio-faciales caractéristiques.

Très récemment, Salter et al. (2016) ont décrit le cas de deux patients porteurs (dans différentes familles) de défauts composites du gène *B4GALT7* : (i) un patient chez lequel le résidu histidine en position 93 est remplacé par un résidu proline, mutation entrainant un décalage du cadre de lecture (His93Pro *frameshift**73) et portant une mutation faux sens pour laquelle la cystéine en position 214 est remplacée par une tyrosine (Cys214Tyr), et (ii) un patient présentant la mutation Arg270Cys précédemment décrite par Seidler et al (2006) et une mutation pour laquelle un tryptohpane remplace une arginine en position 141 (Arg141Trp). Ces patients présentent des symptômes similaires à ceux décrits dans la forme dite « progéroide » du SED, comme une hypermobilité des articulations, une petite stature et des anomalies cranio-faciales (Salter, Davies et al. 2016).

- La β4GalT7 : gène, fonctions et implications fonctionnelles dans le SED

Le gène *B4GALT7* est un gène localisé sur le chromosome 5 (au locus 5q35.2-q35.3) et composé de 6 exons. Ce gène code la β4GalT7, une glycosyltransférase constituée 327 acides aminés avec une masse moléculaire apparente de 37kDa. La β4GalT7 est localisée dans l'appareil de Golgi et présente une topologie membranaire de type II, c'est-à-dire possédant un court domaine cytoplasmique (d'une dizaine de résidus), un seul domaine transmembranaire d'une quinzaine d'acides aminés et la majorité de la protéine localisée dans la lumière de l'appareil de Golgi et comprenant le site actif de l'enzyme (Okajima, Yoshida et al. 1999).

Comme décrit précédemment, les mutations décrites au niveau du gène *B4GALT7* conduisent à l'apparition de mutations faux-sens de résidus situés dans ou à proximité des motifs conservés de l'enzyme, et donc au final, à la production d'une protéine non fonctionnelle. La β4GalT7 recombinante mutée (**Leu206Pro**) présente une perte totale de fonctionnalité. De façon intéressante, la protéine mutée est uniquement détectée dans le cytoplasme (Okajima, Fukumoto et al. 1999) et non plus dans l'appareil de Golgi où les réactions de glycosylation ont lieu, et ce mutant est inactif. La perte de fonctionnalité de la protéine mutée Leu206Pro peut donc être associée à sa mauvaise localisation cellulaire. Le résidu Leu206 est conservé dans

toutes les β4GalT7s chez les mammifères et est localisé dans un élément de structure secondaire conservé (feuillet β), suggérant que sa mutation entraine vraisemblablement un mauvais repliement et une localisation anormale (Ramakrishnan and Qasba 2010). Aucune glycosylation de la protéine *core* de la décorine n'est par ailleurs observée dans les cellules CHOpgs-618 déficientes en β4GalT7 sauvage, mais exprimant le mutant Leu206Pro (Götte and Kresse 2005), attestant de l'incapacité de l'enzyme mutée à initier la biosynthèse des GAGs *in cellulo*.

Le mutant **Ala186Asp** est correctement localisé dans l'appareil de Golgi, et présente une réduction d'activité environ de 50% de l'activité galactosyltransférase. Le résidu Ala186 est quant à lui impliqué dans la fixation/l'interaction avec le substrat donneur, l'UDP-Gal car présent au niveau d'une région conservée du site actif (Bui, Talhaoui et al. 2010, Rahuel-Clermont, Daligault et al. 2010). Donc, malgré sa bonne localisation cellulaire, cette mutation affecte soit sa capacité à fixer le substrat donneur, soit le mécanisme catalytique lui-même.

De façon complémentaire, l'activité enzymatique de la β4GalT7 est réduite de plus que trois fois dans les fibroblastes de patient porteur de la mutation **Arg270Cys** par rapport aux fibroblastes contrôle (Seidler, Faiyaz-Ul-Haque et al. 2006). Le résidu Arg270 est localisé au niveau d'une boucle flexible qui se referme sur le site actif suite à la fixation du substrat donneur (Rahuel-Clermont, Daligault et al. 2010). Il est donc possible qu'une mutation à ce niveau entraine une modification de la structure de la boucle, provoquant un changement conformationel local (Tsutsui, Ramakrishnan et al. 2013). Cette mutation (Arg270Cys) conduit à une glycosylation aberrante et incomplète des protéines *core* de la décorine et du biglycane dans les fibroblastes de derme humain issus de patients atteints de SED par rapport aux fibroblastes contrôle. La fibrillogenèse déficiente du collagène et la réduction de la prolifération des fibroblastes du patient sont également observées au niveau de cellules porteuses de la mutation (Seidler, Faiyaz-Ul-Haque et al. 2006). Götte et al. (2008) ont également montré une réduction de la sulfatation des HSPGs dans ces fibroblastes déficients en β4GalT7. L'altération de la structure des HSPGs entraine un retard de cicatrisation, une augmentation de l'adhérence cellulaire à la fibronectine *in vitro*, mais aussi une capacité réduite à former des filaments d'actine et à organiser un réseau de collagène fonctionnel dans les cellules déficientes des patients par rapport aux fibroblastes contrôle (Gotte, Spillmann et al. 2008).

En conclusion, les mutations du gène *B4GALT7* (**Ala186Asp, Leu206Pro et Arg270Cys**) conduisent à (i) une modification de l'affinité de l'enzyme mutée vis-à-vis des substrats, ou (ii)

une altération de la structure de l'enzyme, une mislocalisation, et une baisse de fonctionnalité qui affecte au final la biosynthèse des GAGs,

Ces observations nous permettent de faire le lien entre la déficience génétique en β4GalT7, la perte de l'activité enzymatique, une biosynthèse aberrante des chaînes des GAGs et, dans une certaine mesure, les symptômes cliniques observés chez les patients atteints de la forme progéroide de SED. La description plus récente de ces différentes formes de SED met en évidence l'importance des PGs dans l'architecture et la fonctionnalité des tissus conjonctifs et explique pourquoi un défaut de leur biosynthèse conduit à des effets aussi délétères chez les patients porteurs de mutations au niveau des gènes codant des enzymes de biosynthèse des GAGs. La structure et la fonction des PGs et des GAGs qu'ils portent vont maintenant être abordées dans le chapitre II.

Chapitre II : Les protéoglycanes : Structure, classification et fonctions biologiques

II.1 Structure des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes

II.1.1.Structure des protéoglycanes (PGs)

Les PGs sont des macromolécules possédant une double nature biochimique, à la fois protéique et glycosidique. Ils sont constitués d'un squelette peptidique appelé protéine *core* (ou protéine porteuse) sur lequel sont fixées de façon covalente de longues chaînes hétéropolysaccharidiques linéaires appelées glycosaminoglycanes (GAGs) (Figure 2).

La protéine *core* est propre à chacune des principales familles de PGs et comporte des motifs conservés spécifiques constituant des sites d'ancrage potentiels pour les chaînes de GAGs. Il s'agit très souvent de motifs répétés sérine-glycine (Ser-Gly) au niveau desquels le groupement hydroxyle de la chaine latérale de la sérine est impliqué dans une liaison *O*-glycosidique avec un résidu xylose, à partir duquel s'effectuera d'abord l'amorçage de la chaîne hétéropolysaccharidique.

La zone de liaison protéine *core*-GAG (*linkage region*) est constituée d'un tétrasaccharide [Acide glucuronique-β1,3-Galactose-β1,3-Galactose-β1,4-Xylose-β1-*O*-] (GlcA-β1,3-Gal-β1,3-Gal-β1,4-Xyl-β1-*O*-), commun aux principaux types de chaines de GAGs, et à partir de laquelle seront polymérisées les différentes chaines hétéropolysaccharidiques.

L'élongation des GAGs est réalisée à partir de cette amorce et s'effectue par ajout successif, séquentiel et coordonné d'un motif disaccharidique, composé (i) d'un sucre aminé, comme la N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) ou la N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc) et (ii) d'un acide uronique, soit l'acide D-glucuronique (GlcA) ou son épimère en position 5, l'acide L-iduronique (IdoA).

II.1.2.Structure des principaux types de GAGs

La composition des unités disaccharidiques, ainsi que la nature de la liaison entre les deux oses du disaccharide, détermine le type de GAGs synthétisés. Quatre grands types de chaînes de GAGs peuvent ainsi être distingués : (i) l'acide hyaluronique (AH), (ii) les héparine/héparane sulfates (Hep/HS), (iii) les chondroïtine sulfates/dermatane sulfates (CS/DS) et (iv) les kératane sulfates (KS) (Tableau 4). A l'exception de l'AH, les GAGs peuvent être diversement sulfatés

en cours de synthèse, ce qui contribue à la complexité structurale et fonctionnelle des GAGs et donc des PGs qui en sont constitués.

L'acide hyaluronique (AH) est constitué de la répétition de l'unité disaccharidique (GlcA-β1,3-GlcNAc-β1,4). Contrairement aux autres GAGs, l'AH n'est jamais associé à une protéine porteuse et totalement dépourvu de groupement sulfate. L'AH est un des composants principaux des matrices extracellulaires des tissus, et est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques, telles que l'hydratation des tissus et la régulation de l'équilibre osmotique, la prolifération, l'adhérence et la migration cellulaire (Jiang, Liang et al. 2011).

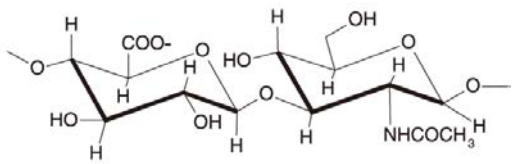
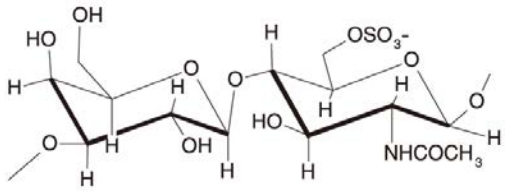
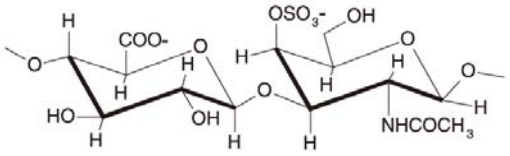
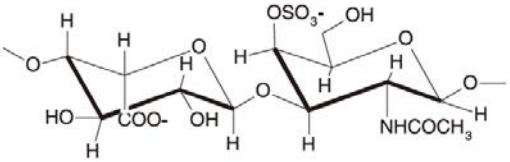
Les kératane sulfates (KS) sont les seuls GAGs qui ne contiennent pas d'acide uronique, puisqu'ils sont composés par la répétition d'un motif de type N-acétyl-lactosamine (Gal-β1,4-GlcNAc-β1,3). Les unités dissacharidiques des KS peuvent être sulfatées en position 6 au niveau des deux oses constitutifs. Les KS sont connus pour jouer un rôle dans le maintien de l'hydratation des tissus au niveau du cartilage et de la cornée par exemple. Ils peuvent également participer à des processus biologiques comme la migration cellulaire (Funderburgh 2000).

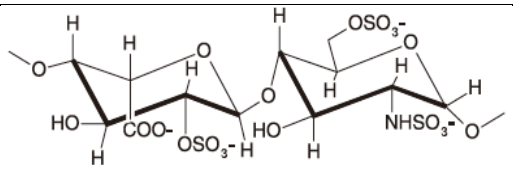
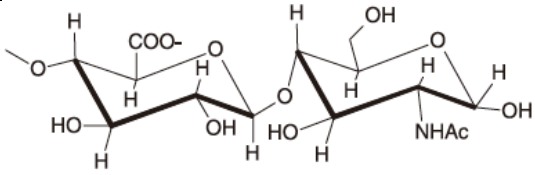
L'unité disaccharidique composant les **chondroïtine sulfates (CS)** contient un résidu GlcA lié à une GalNAc par une liaison β1,3 [GlcA-β1,3-GalNAc-β1,4], et celle composant les **dermatane sulfates (DS)** est formée de la répétition de l'unité disaccharidique [IdoA-β1,3-GalNAc-β1,4]. Les CS/DS peuvent être diversement sulfatées en position 4 et/ou 6 des résidus de GalNAc et/ou en position 2 du résidus GlcA (Lauder 2009). Il a été montré que la variation de la sulfatation des différents motifs des chaînes CS/DS explique les fonctions différentes de ces GAGs dans divers processus physiopathologiques, tels que l'inflammation, l'adhésion cellulaire, le développement du système nerveux central (SNC), la cicatrisation, la signalisation des facteurs de croissance, la morphogenèse et la division cellulaire (Wang, Sugahara et al. 2016).

L'**héparine (Hep)** est composée de la répétition d'unités disaccharidiques formées le plus souvent de résidus IdoA (90%) liés à des unités GlcNAc. Les **héparane sulfates (HS)** sont quant à eux composés de la répétition de la même unité disaccharidique, à la différence près qu'ils contiennent principalement des résidus GlcA, mais également des résidus IdoA suite à l'épimérisation en position 5 du résidu GlcA. Les disaccharides isolés à partir des Hep/HS sont généralement sulfatés en position 2 sur les résidus IdoA et/ou en position 2, 3 et/ou 6 sur les résidus GlcNAc. L'Hep présente un degré de sulfatation plus élevé que celui des HS. Les

chaînes de HS sont organisées en (i) domaines NS contenant des unités disaccharidiques (IdoA-GlcNAc) *N*-sulfatés (NS), (ii) domaines NA/NS qui sont des domaines de transition faiblement sulfatés contenant des disaccharides *N*-acétylées (NA) ainsi que des unités *N*-sulfatés (NS), (iii) domaines NA contenant des disaccharides *N*-acétylées (GlcA-GlcNAc). La présence des structures NS est principalement responsable de la reconnaissance et de la fixation de nombreux ligands comme des chimiokines ou des facteurs de croissance qui voient leur activité biologique modulée par ces interactions avec les chaines de GAGs (Staples, Shi et al. 2010). Ainsi, les chaînes de HS sont impliquées dans la régulation de multiples voies de la signalisation cellulaire, par exemple en jouant le rôle de co-récepteurs pour les FGF (*Fibroblast Growth Factors*) et en favorisant leur fixation sur leur récepteur, FGFR (*Fibroblast Growth Factors Receptor*) (Rapraeger, Krufka et al. 1991, Yayon, Klagsbrun et al. 1991).

Tableau 4 Composition des unités disaccharidiques des GAGs.
(Gandhi and Mancera 2008)

Glycosaminoglycanes	Motif disaccharidique	Caractéristiques
Acide hyaluronique (AH)	 D-GlcA- β(1→ 4)-D-GlcNAc-α(1→ 4)	Poids moléculaire 4-8 000 kDa. Non sulfaté et non lié à une protéine porteuse. Retrouvé dans le liquide synovial, l'humeur vitrée et les MEC des tissus conjonctif.
Kératane sulfate (KS)	 D-Gal-β(1→ 4)-D-GalNAc6S-β(1→ 3)	Poids moléculaire 4-19 kDa. Sulfaté sur le Gal et/ou le GlcNAc en position 6. Retrouvé dans la cornée, le cartilage.
Chondroïtine sulfate (CS)	 D-GlcA-β(1→ 3)-D-GalNAc4S-β(1→ 4)	Poids moléculaire 5-50 kDa. Sulfaté en position 4 et/ou 6 du GalNAc et/ou en position 2 du GlcA. Retrouvé dans le cartilage, le tendon, le ligament, l'aorte.
Dermatane sulfate (DS)	 L-IdoA-α(1→ 3)-D-GalNAc4S-β(1→ 4)	Poids moléculaire 15-40 kDa. Sulfaté en position 4 et/ou 6 de la GalNAc et/ou en position 2 du GlcA.

		Retrouvé dans la peau, les vaisseaux sanguins, les valves cardiaques.
Héparine (Hep)	 L-IdoA2S-α(1→4)-D-GlcNS6S-α(1→4)	Poids moléculaire 10-12 kDa. Sulfaté en position 2 de l'IdoA et/ou en position 2, 3 et/ou 6 de la GlcNAc Composant intracellulaire des mastocytes, présent dans le foie, les poumons et la peau.
Héparane sulfate (HS)	 D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1-4)	Poids moléculaire 10-70 kDa. Sulfaté en position 2 de l'IdoA et/ou en position 2, 3 et/ou 6 de la GlcNAc Composant extracellulaire et membranaire.

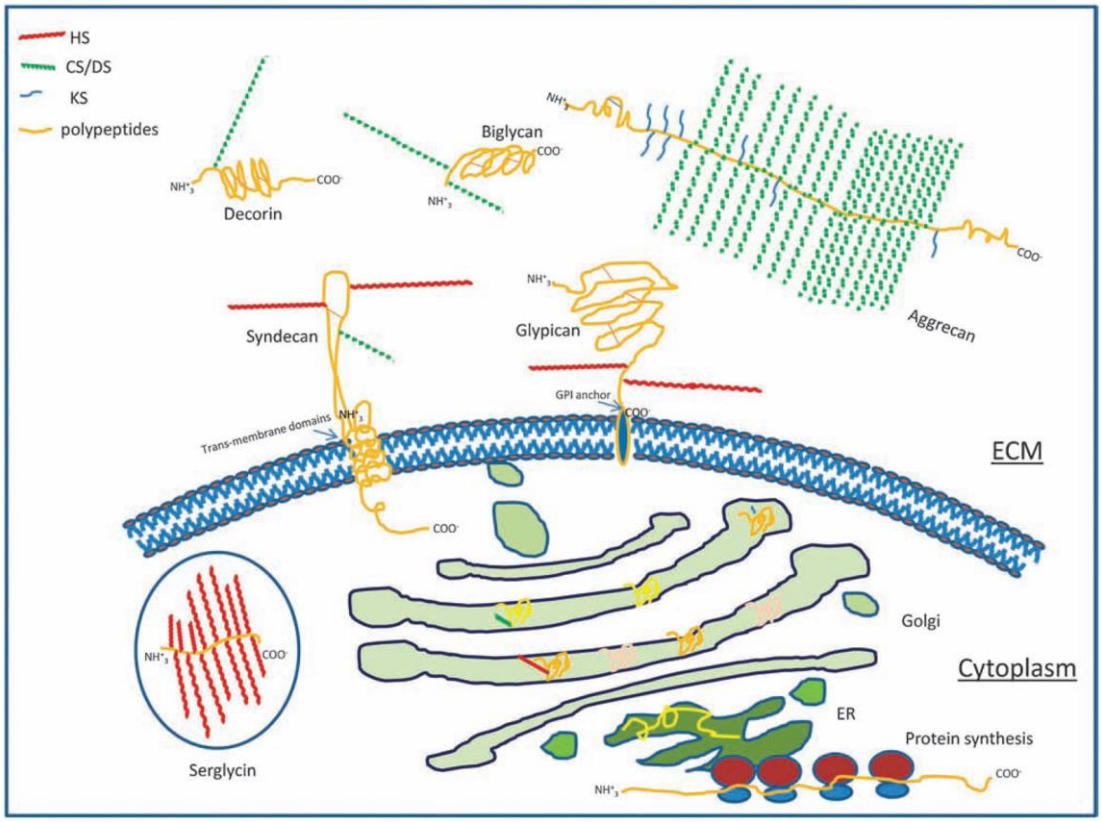


Figure 2 Représentation schématique des protéoglycanes et glycosaminoglycanes intercellulaires, membranaires et extracellulaires.
Les PGs sont des macromolécules situées à la surface (syndécane, glypicane), à l'intérieur des cellules (serglycine) et dans les matrices extracellulaires (MEC) (agrécane, biglycane, décorine) des tissus conjonctifs. Elles sont composées d'une partie protéique (en jaune) sur laquelle sont fixées de manière covalente des chaînes polysaccharidiques linéaires appelées glycosaminoglycanes (GAGs) :

héparine/héparane sulfates Hep/HS (en rouge), chondroïtine sulfates/dermatane sulfates CS/DS (en vert) et kératane sulfates KS (en bleu) (Li, Ly et al. 2012).

II.2 Classification des protéoglycanes

Il existe plusieurs systèmes de classification des PGs basés (i) sur la nature de la protéine *core*, (ii) leur composition en unités dissacharidiques : galacto- ou glucosaminoglycanes, (iii) leur taille : PGs de haut ou faible poids moléculaire ou encore (iv) en fonction de leur localisation cellulaire. C'est ce dernier type de classification que nous utiliserons pour présenter les différents types de PGs en distinguant quatre grands groupes (Tableau 5) : (1) les PGs (extracellulaires) de la MEC, (2) les PGs membranaires, (3) les PGs intracellulaires, (4) les PGs péricellulaires (Iozzo and Schaefer 2015). Nous présenterons plus précisément un PG de chaque famille en précisant ses fonctions.

Tableau 5 Classification des protéoglycanes en fonction de leur localisation cellulaire.

Localisations cellulaires	Protéoglycanes	Gènes	Chaînes de GAGs
Extracellulaire	Agrécane	*ACAN*	CS/KS
	Versicane	*VCAN*	CS
	Neurocane	*NCAN*	CS
	Brévicane	*BCAN*	CS
	Biglycane	*BGN*	CS
	Décorine	*DCN*	DS
	Fibromoduline	*FMOD*	KS
	Lumicane	*LUM*	KS
	Kératocane	*KERA*	KS
	Ostéoadherine	*OMD*	KS
	Epiphycane	*EPYC*	DS/CS
	Testicane	*SPOCK*	HS
Membrane plasmique	Syndécane	*SDC*	HS
	NG2 (antigène neuronal/gliale 2)	*CSPG4*	CS
	Beta-glycane	*TGFBR3*	CS/HS
	Phosphacane	*PTPRZ1*	CS
	Glypicane	*GPC*	HS
Intracellulaire	Serglycine	*SRGN*	Hep
Péricellulaire	Perlécane	*HSPG2*	HS
	Agrine	*AGRN*	HS

II.2.1. Protéoglycanes extracellulaires

La famille des PGs extracellulaires est le plus grand groupe de PGs, lui-même subdivisé en deux sous-familles, distinguées en fonction de leur taille : (i) les PGs de haut poids moléculaire

se liant à l'AH, comme les hyalectanes, et (ii) les petits PGs riches en leucine (*small leucine-rich proteoglycans ou* SLRPs) comme la décorine ou le biglycane.

A. Les hyalectanes : exemple de l'agrécane

La famille des hyalectanes comprend quatre membres : l'agrécane, le versicane, le neurocane et le brévicane. Ces PGs partagent une structure similaire avec une organisation en trois domaines : (i) un domaine peptidique globulaire *N*-terminal qui est capable de lier l'AH par l'intermédiaire d'une protéine de liaison, (ii) un domaine central qui contient les sites d'attachement des chaînes de GAGs, et (iii) un domaine peptidique C-terminal pouvant interagir avec les lectines (Figure 3) (Iozzo 1998).

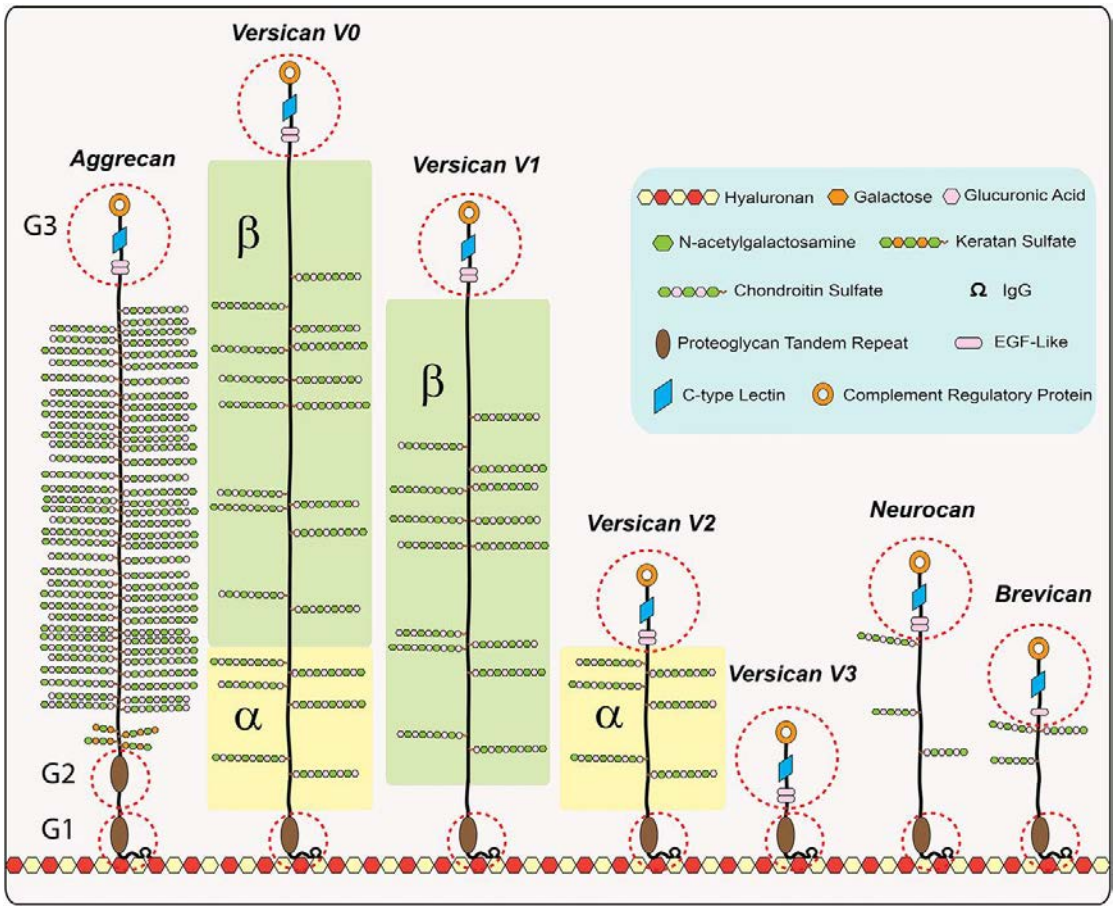


Figure 3 Représentation schématique de la famille des hyalectanes.
Les hyalectanes comprennent quatre membres : l'agrécane, le versicane, le neurocane et le brévicane. Ils ont une organisation moléculaire similaire : (i) un domaine N-terminal interagissant avec l'AH, (ii) un domaine central qui contient les sites de liaison pour les chaînes de GAGs, et (iii) un domaine C-terminal capable de lier les lectines. Les quatre formes du versicane (V0, V1, V2 et V3) sont représentées ici. Le variant V0 du versicane est le plus long puisqu'il contient deux domaines GAG-α et GAG-β, alors que les variants V1 et V2 ne contiennent qu'un seul domaine GAG-α ou GAG-β respectivement. Le variant V3 ne porte aucune chaîne de GAGs. Les cercles en pointillés indiquent les domaines globulaires (G1-G3). Ces domaines sont composés d'environ 100 acides aminés et contiennent chacun des résidus cystéines qui établissent entre eux des ponts disulfures (Iozzo and Schaefer 2015).

Nous allons revenir plus en détail sur un des membres de cette famille de PGs extracellulaires, l'agrécane. La partie protéique de l'agrécane est composée de trois domaines globulaires nommés G1, G2 et G3 contenant chacun des résidus cystéines qui établissent entre eux des ponts disulfures permettent le maintien d'une structure fonctionnelle de ces domaines (Figure 3). **Le domaine G1**, situé à l'extrémité N-terminale de la protéine *core*, possède un rôle structural dans la mesure où il peut interagir avec l'AH. Cette interaction est stabilisée par une protéine de liaison (*link protein*) qui renforce la stabilité du complexe agrécane-AH dans les MEC. Les domaines G1 et G2 sont séparés par un **domaine interglobulaire** (IGD, *interglobular domain*), qui contient des sites sensibles à l'action des protéases. Ces domaines sont donc directement impliqués dans la dégradation des agrécanes par des agrécanases (par exemple ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*)) au cours des processus physiopathologiques comme l'ostéo-arthrite et d'autres maladies inflammatoires/dégénératives dans lesquelles ces PGs sont dégradés, entrainant une désorganisation globale du tissu contribuant aux symptômes pathologiques (Lin and Liu 2010). Le rôle du **domaine G2** n'a pas clairement été défini à ce jour. Les domaines G2 et G3 sont séparés par un grand domaine protéique contenant des sites d'attachement pour les chaines de GAGs de type KS (une cinquantaine de chaines) et CS (jusqu'à plus de cent chaines) (Wight, Toole et al. 2011, Iozzo and Schaefer 2015). Le dernier domaine globulaire de l'agrécane, le **domaine G3**, est localisé en position C-terminale et contient (i) deux domaines protéiques de type EGF (*Epidermal Growth Factor*)-*like*, (ii) un domaine lectine de type C, et (ii) un domaine de régulation pour les protéines du complément (CRP, *complement regulatory protein*). Le domaine G3 peut interagir avec un certain nombre de molécules matricielles dont le collagène de type II dans le cartilage ou encore avec les tenascines et les fibulines. Ces interactions sont responsables de l'interconnection de l'agrécane avec différents constituants de la surface cellulaire et de la MEC contribuant à un feedback mécanosensible aux chondrocytes (Aspberg, Miura et al. 1997).

L'agrécane est un PG de haut poids moléculaire majoritaire dans le cartilage. L'association non covalente d'une centaine de monomères d'agrécane à l'AH conduit à la formation de complexes supramoléculaires qui peuvent atteindre une masse moléculaire supérieure à 200 000 kDa et contribuent de façon importante à l'organisation tridimensionnelle de la MEC des tissus conjonctifs (Wight, Toole et al. 2011). La densité élevée en chaînes de GAGs de ces complexes

explique leur grande densité de charges négatives et leur caractère hydratant, conférant ainsi au cartilage une élasticité et une forte résistance aux stress mécaniques (Aspberg 2012).

De par sa localisation et ses propriétés physicochimiques, l'agrécane assure donc en premier lieu un rôle structural dans les MEC et est à l'origine des propriétés de résistance aux forces de compression du tissu cartilagineux. Toute modification de l'intégrité de sa structure peut être à l'origine d'importants remaniements au niveau de la structure matricielle et être à l'origine de phénomènes pathologiques. Il a par exemple été décrit que la déficience génétique en agrécane est responsable de chondrodysplasies chez le poulet et la souris, maladies dans lesquelles la formation de l'os et du cartilage est affectée (Vertel 1995).

B. Petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs) : exemple de la décorine

Les protéoglycanes de la famille des SLRPs (*small leucine-rich proteoglycans*) sont caractérisés par la présence d'un domaine protéique central contenant des séquences riches en leucine appelées LRRs (*Leucin Rich Repeat*). Les SLRPs sont constitués d'une petite protéine *core* d'environ 40kDa portant une ou deux chaînes de CS/DS et/ou plusieurs chaînes de KS (Iozzo, Goldoni et al. 2011). A ce jour, 18 SLRPs, principalement localisés dans la MEC, ont été décrits. Ces PGs ont été regroupés en cinq classes en fonction de leur organisation génique, du nombre de domaines riches en leucine (LRRs) qu'ils possèdent et du type de chaînes de GAGs greffées sur la protéine *core* (Figure 4) (Schaefer and Iozzo 2008).

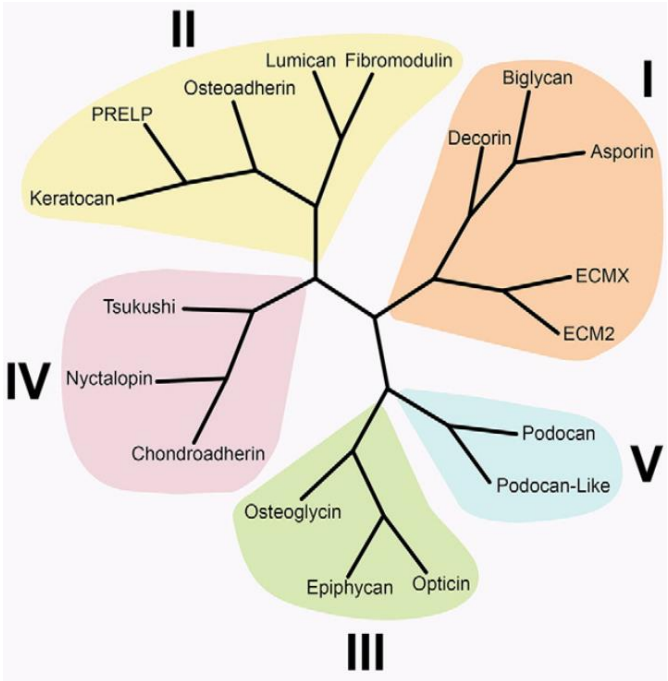


Figure 4 Arbre phylogénétique et classification des petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs) (Iozzo and Schaefer 2015).

Les classes I, II et III sont dites canoniques et les classes IV et V, non canoniques, avec des PGs qui ne portent aucune chaîne de GAGs. Les SLRPs ont été décrits pour leur rôle structural et fonctionnel dans de multiples processus biologiques. Ils sont par exemple capables d'interagir avec un certain nombre de collagènes (comme les collagènes de type I, II, III, IV, V, VI, XII, XIV) et contribuent à la régulation de leur fibrillogenèse. Ils sont donc impliqués dans le maintien de la fonctionnalité des collagènes et donc responsables du maintien de la structure tridimensionnelle des matrices qui en dépendent (Chen and Birk 2013). Certains SLRPs, comme la décorine ou le biglycane, interagissent avec des effecteurs protéiques comme le TGF-β (*Transforming Growth Factor β*), les BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) et le TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-α*), expliquant le rôle fonctionnel de ces GAGs dans des fonctions biologiques comme la prolifération cellulaire (Iozzo, Goldoni et al. 2011).

La décorine est un petit PG qui possède une protéine *core* d'un poids moléculaire d'environ 40 kDa et porte une seule chaîne de DS au niveau de l'extrémité N-terminale (Figure 5). Elle contient quatre domaines. Le **premier domaine** est constitué d'un peptide du signal (14 acides aminés) ciblant la protéine au réticulum endoplasmique rugueux et d'un propeptide (16 acides aminés) qui probablement permet de la reconnaissance de la xylosyltransférase pour initier la biosynthèse de la chaîne de GAG sur la protéine *core* (Sawhney, Hering et al. 1991, Iozzo 1998). Ce domaine est clivé avant la sécrétion de la décorine. Le **deuxième domaine**, qui est riche en résidus cystéine, possède le site d'attachement de la chaîne de GAG. Ces domaines riches en cystéines permettent la formation de ponts disulfures intramoléculaires qui permettent à la décorine de se maintenir dans une structure tridimensionnelle biologiquement active. Le **troisième domaine** contient dix motifs riches en leucine (LRRs) et peut être N-glycosylé. Le **quatrième domaine** de la protéine *core* de la décorine est le domaine C-terminal qui contient deux résidus cystéine conservés impliqués dans un pont disulfure dont la présence est indispensable à l'interaction avec les collagènes (Scott, Winterbottom et al. 1986, Rada, Cornuet et al. 1993).

La décorine peut interagir avec de nombreuses macromolécules de la MEC, comme les collagènes de type I, II, III et VI auxquels elle peut se lier de façon non covalente et réguler leur fibrillogenèse. Les souris génétiquement déficientes en décorine présentent des fibrilles de collagène avec une organisation anormale dans la peau et le tendon de la queue, associés à une fragilité de la peau (Danielson, Baribault et al. 1997). Ceci souligne le rôle fondamental de la décorine dans la régulation de la fibrillogènese du collagène *in vivo*. Ces phénotypes observés

chez les souris se rapprochent de ceux observés chez les patients atteints du syndrome d'Ehlers-Danlos et caractérisés par des anomalies structurales et fonctionnelles des tissus conjonctifs (Byers and Murray 2014).

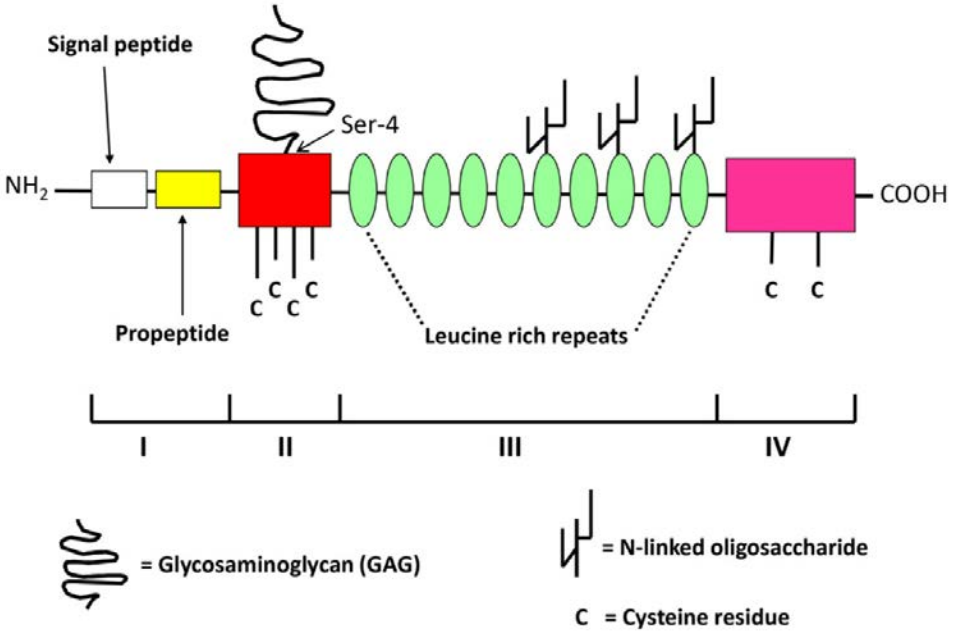


Figure 5 Représentation schématique de la structure de la décorine.
La décorine possède quatre domaines distincts communs aux SRLPs incluant : (i) un peptide signal et un propeptide dans le premier domaine qui sont clivés avant la sécrétion de la décorine, (ii) un domaine riche en cystéines qui contient le site d'ancrage de l'unique chaîne de DS, (iii) Le troisième domaine comporte dix motifs répétés riches en leucine (*Leucin Rich Repeat,* LRRs) qui peuvent être N-glycosylés, (iv) un domaine C-terminal qui contient deux résidus cystéine (Jarvelainen, Sainio et al. 2015).

La décorine peut également interagir avec des facteurs de croissance (comme le TGF-β) (Sofeu Feugaing, Gotte et al. 2013). En liant le TGF-β, elle inhibe son activité biologique en l'empêchant de se lier à son récepteur pour activer la prolifération cellulaire. Ainsi, la décorine peut bloquer l'action du TGF-β et inhiber la prolifération des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) (Yamaguchi and Ruoslahti 1988, Yamaguchi, Mann et al. 1990).

Dans un contexte pathologique, il a été observé que la réduction de l'expression de la décorine dans les tissus tumoraux est associée à un plus mauvais pronostic pour le cancer du sein invasif. (Troup, Njue et al. 2003, Goldoni, Seidler et al. 2008, Iozzo, Goldoni et al. 2011). La décorine est donc impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire et joue un rôle important dans le processus de croissance et de progression tumorale. La décorine pourrait donc être considérée comme un facteur thérapeutique potentiel dans certains types de traitements anti-cancéreux. Ses fonctions physiopathologiques sont référencées dans le Tableau 6.

Tableau 6 Fonctions physiopathologiques de la décorine.

Processus biologiques et implications pathologiques régulés par la décorine.	Références
Maladie de Lyme	(Brown, Wooten et al. 2001)
Asthme	(Marchica, Pinelli et al. 2011)
Néphropathie diabétique et fibrose tubulointerstitial	(Williams, Qiu et al. 2007) (Merline, Lazaroski et al. 2009) (Schaefer, Macakova et al. 2002) (Schaefer, Mihalik et al. 2004)
Infarctus du myocarde	(Weis, Zimmerman et al. 2005)
Transparence de cornée	(Zhang, Chen et al. 2009)
Biomécaniques du tendon	(Zhang, Ezura et al. 2006) (Robinson, Lin et al. 2004) (Robinson, Huang et al. 2005) (Elliott, Robinson et al. 2003)
Minéralisation de dentine et homéostasie parodontale	(Goldberg, Septier et al. 2005) (Haruyama, Sreenath et al. 2009) (Hakkinen, Strassburger et al. 2000)
Fibrose et cirrhose hépatique et carcinome hépatocellulaire	(Baghy, Iozzo et al. 2012) (Baghy, Dezso et al. 2011) (Baghy, Horvath et al. 2013) (Horvath, Kovalszky et al. 2014)
Fibrillogenèse du collagène	(Ruhland, Schonherr et al. 2007) (Seidler, Schaefer et al. 2005) (Ferdous, Lazaro et al. 2008)
Biologie de la membrane fœtale	(Calmus, Macksoud et al. 2011) (Wu, Aron et al. 2012) (Wu, Horgan et al. 2014)
Cicatrisation et angiogenèse	(Jarvelainen, Puolakkainen et al. 2006) (Grant, Yenisey et al. 2002) (Schonherr, Sunderkotter et al. 2004) (Neill, Painter et al. 2012) (Neill, Jones et al. 2013) (Jarvelainen, Sainio et al. 2015)
Initiation de l'immunité et l'inflammation	(Merline, Moreth et al. 2011) (Seidler, Mohamed et al. 2011) (Bocian, Urbanowitz et al. 2013)
Adhésion et migration cellulaire	(Ferdous, Peterson et al. 2010)
Biologie des cellules souches mésenchymateuses	(Bi, Stuelten et al. 2005)

II.2.2 Protéoglycanes membranaires : exemple du syndécane

Les PGs membranaires sont, comme leur nom l'indique, localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules, même s'ils peuvent également exister sous forme soluble (après coupure en amont de leur domaine transmembranaire et libération dans le milieu extracellulaire). Ils

sont représentés en majorité par la famille des syndécanes (que nous détaillerons juste après) et des glypicanes. Etant situés à la surface des cellules, à l'interface cellule-MEC, ils ont une position stratégique pour réguler de nombreux processus biologiques.

Parmi eux, la famille des syndécanes compte quatre membres chez les vertébrés: le syndécane-1 (CD138), le syndécane-2 (fibroglycane), le syndécane-3 (N-syndécane) et le syndécane-4 (amphiglycane/ryudocane) (Figure 6). Les syndécanes sont exprimés dans presque tous les types de cellules à l'exception des érythrocytes (Xian, Gopal et al. 2010).

Les syndécanes sont des HSPGs transmembranaires qui présentent une topologie de type I avec une organisation structurale en trois domaines (Figure 6) : (i) un domaine extracellulaire, (ii) un domaine transmembranaire et (iii) un domaine cytoplasmique (Couchman 2010).

Le domaine extracellulaire situé à l'extrémité N-terminale est très variable entre les différents syndécanes avec seulement une homologie de séquences protéiques de 10 à 20% entre les différentes familles de syndécanes. Il contient des motifs Ser-Gly au niveau desquels se fixent au moins trois chaînes de HS et/ou CS ainsi qu'un site spécifique, de clivage protéoglytique de la partie extracellulaire du PG (Choi, Chung et al. 2011).
Les domaines transmembranaire et cytoplasmique sont très conservés au sein de tous les syndécanes avec une homologie de séquences protéiques d'environ 60-70% (Iozzo and Schaefer 2015). Le **domaine transmembranaire** est constitué d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage membranaire. Le **domaine cytoplasmique** situé à l'extrémité C-terminale est constitué de trois régions : les régions C1 et C2 sont très conservées et interrompues par une région caractérisée par une taille et une composition variable en fonction des syndécanes considérés (région V) (Figure 6) (Choi, Chung et al. 2011). Ce domaine peut lier des protéines contenant de domaine PDZ (*Post synaptic density protein, Drosophilia discs large tumor suppressor, Zonula occludens-1 protein*). Cette interaction est impliquée dans la signalisation, l'adhésion et la migration cellulaire (Cheng, Montmasson et al. 2016). Par exemple, le syndécane-4 interagit avec la synectine contribuant au processus de la migration cellulaire (Tkachenko, Elfenbein et al. 2006).
Les chaînes de GAGs portées par les syndécanes jouent un rôle prépondérant dans l'activité biologiques de ces PGs car ils interagissent avec de nombreux facteurs extracellulaires, comme les facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, des (glyco)protéines matricielles ou encore des récepteurs (Tableau 7). De manière générale, les syndécanes sont impliqués dans des divers processus biologiques en relation avec les interactions cellules-cellules et cellules-

matrices comme l'inflammation, l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les principaux ligands des syndécanes sont présentés dans le Tableau 7.

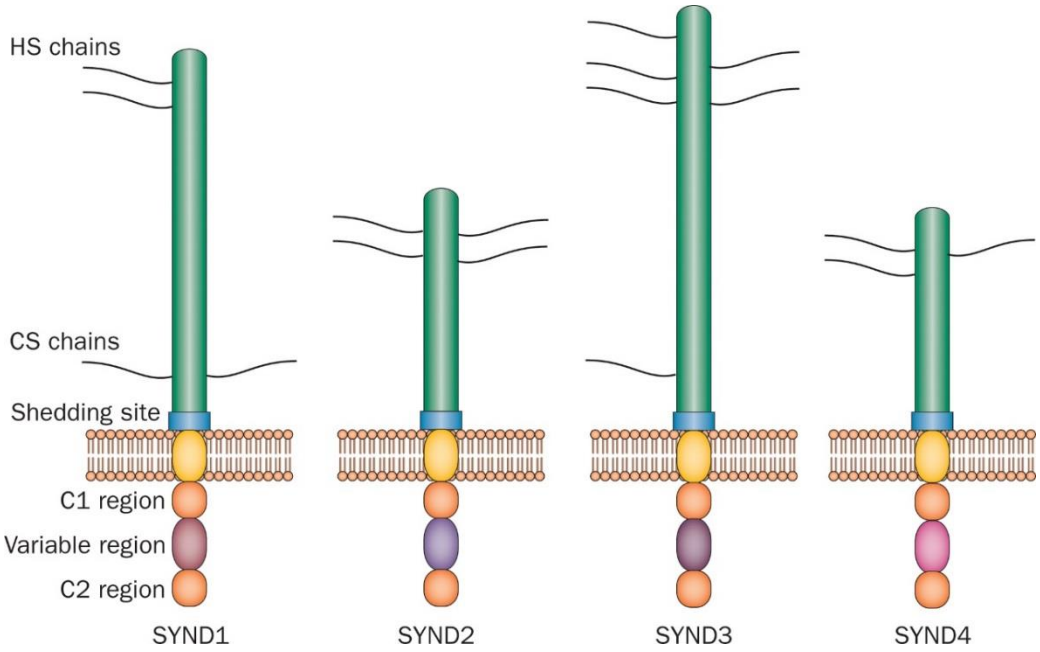


Figure 6 Représentation schématique des différents membres de la famille des syndécanes. Les syndécanes sont des protéines transmembranaires portant majoritairement des chaînes d'héparane-sulfate (HS). La famille des syndécanes compte quatre membres chez les vertébrés. Ils possèdent un domaine extracellulaire portant des chaînes de GAGs qui leur permettent de lier un grand nombre de ligands extracellulaires, un seul domaine transmembranaire et une courte extrémité C-terminale cytoplasmique constitué de régions conservées C1 et C2 séparées par un domaine variable (Pap and Bertrand 2013).

Tableau 7 Ligands et fonctions biologiques des syndécanes.

Ligands des syndécanes	Fonctions biologiques	Références
Molécules dans MEC		(Xian, Gopal et al. 2010)
Fibronectine	Adhésion cellulaire	(Klass, Couchman et al. 2000) (Woods, Longley et al. 2000)
Vitronectine	Adhésion cellulaire	(Wilkins-Port, Sanderson et al. 2003)
Laminine	Adhésion et migration cellulaire	(Bachy, Letourneur et al. 2008) (Ogawa, Tsubota et al. 2007)
Ténascine	Inhibition d'adhésion cellulaire, stimulation de la prolifération des cellules tumorales	(Huang, Chiquet-Ehrismann et al. 2001) (Orend, Huang et al. 2003)
Chimiokines		
CXCL8 (*chemokine C-X-C motif ligand 8*)	Polyarthrite rhumatoïde	(Patterson, Gardner et al. 2005)
CXCL10	Fibrose pulmonaire	(Jiang, Liang et al. 2010)
CXCL12	Chimiotactisme, migration et invasion des cellules tumorales	(Brule, Friand et al. 2009) (Sutton, Friand et al. 2007)

CCL5 (*chemokine C-C motif ligand 5*)	Angiogenèse	(Suffee, Hlawaty et al. 2012)
Cytokines Ostéopontine IL-1 (Interleukine-1)	 Prolifération des chondrocytes Arthrite inflammatoire	 (Shimo, Gentili et al. 2004) (Wang, Markova et al. 2011) (Korb-Pap, Stratis et al. 2012) (Sebestyen, Gallai et al. 2000) (Worapamorn, Haase et al. 2001)
Facteurs de croissance FGF-2 (*Fibroblast growth factor 2*) TGF-β (*Transforming growth factor beta*) BMP-2 (*Bone morphogenetic protein 2*)	 Prolifération et cicatrisation Cicatrisation, régénération tissulaire Inhibition de la chondrogenèse	 (Subramanian, Fitzgerald et al. 1997) (Shimazu, Nah et al. 1996) (Clasper, Vekemans et al. 1999) (Mukhopadhyay, Wong et al. 2010) (Sebestyen, Gallai et al. 2000) (Worapamorn, Haase et al. 2001) (Fisher, Li et al. 2006)
Métalloprotéinases Aggrécanases (ADAMTS-4, 5) MMP-7 (*Matrix metalloproteinase-7*) MMP-13 (*Matrix metalloproteinase-13*)	 Dégradation du cartilage Croissance, migration et invasion des cellules de cancer du côlon Dégradation du cartilage	 (Wang, Markova et al. 2011) (Gao, Plaas et al. 2004) (Echtermeyer, Bertrand et al. 2009) (Ryu, Lee et al. 2009) (Choi, Kim et al. 2012) (Zhang, Yang et al. 2010)

II.2.3 Protéoglycanes intracellulaires : exemple de la serglycine

La serglycine est le seul membre décrit dans la famille des PGs intracellulaires. Elle possède une protéine *core* d'environ 20 kDa contenant huit répétitions Ser-Gly sur lesquelles peuvent venir s'ancrer des chaînes de GAGs.

Elle présente également la particularité d'être le seul PG qui porte des chaînes de type Hep (Kolset and Pejler 2011, Korpetinou, Skandalis et al. 2014). Le type et le taux de sulfatation des chaînes de CS/DS/HS/Hep est très variable et est dépendant du type cellulaire. Par exemple, la serglycine présente dans les cellules hématopoïétiques (mastocytes muqueux, macrophages) porte des chaînes de type CS-E avec un taux élevé de sulfatation. Des chaînes de type CS-4 avec un taux bas de la sulfatation de la serglycine sont observées dans les cellules dans la circulation sanguine, par exemple des lymphocytes, des plaquettes et des monocytes (Kolset and Pejler 2011).

La serglycine est principalement exprimée par les cellules hématopoïétiques et stockées dans les granules de sécrétion des mastocytes (Abrink, Grujic et al. 2004). Elle joue un rôle crucial pour le stockage et la sécrétion d'autres molécules bioactives (protéases, chimiokines, cytokines et facteurs de croissance) dans les granules de sécrétion, présentes sous forme de complexe (Figure 7) (Kolset and Pejler 2011, Korpetinou, Skandalis et al. 2014). Cependant, sa présence a été rapportée dans d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les chondrocytes, les fibroblastes et les cellules cancéreuses (Korpetinou, Skandalis et al. 2014).

La serglycine est par ailleurs impliquée dans différents processus pathologiques comme les réponses inflammatoires et réactions immunes ainsi que dans la tumorigenèse. Elle joue un rôle clé dans la progression tumorale, car il a été montré qu'elle peut protéger les cellules tumorales des attaques du complément comme inhibiteur de l'activation du complément (C1q) (Korpetinou, Skandalis et al. 2013).

La serglycine est également retrouvée à la surface des cellules de myélome en interaction avec la protéine CD44 pour favoriser l'adhésion au collagène de type I et à la moelle osseuse (Figure 7). Cette interaction affecte de manière positive la biosynthèse et la sécrétion des MMP (métalloprotéinases matricielles)-9 et -2, qui sont des enzymes clés impliquées dans l'invasion et la diffusion des cellules de myélome (Skliris, Labropoulou et al. 2013, Purushothaman and Toole 2014).

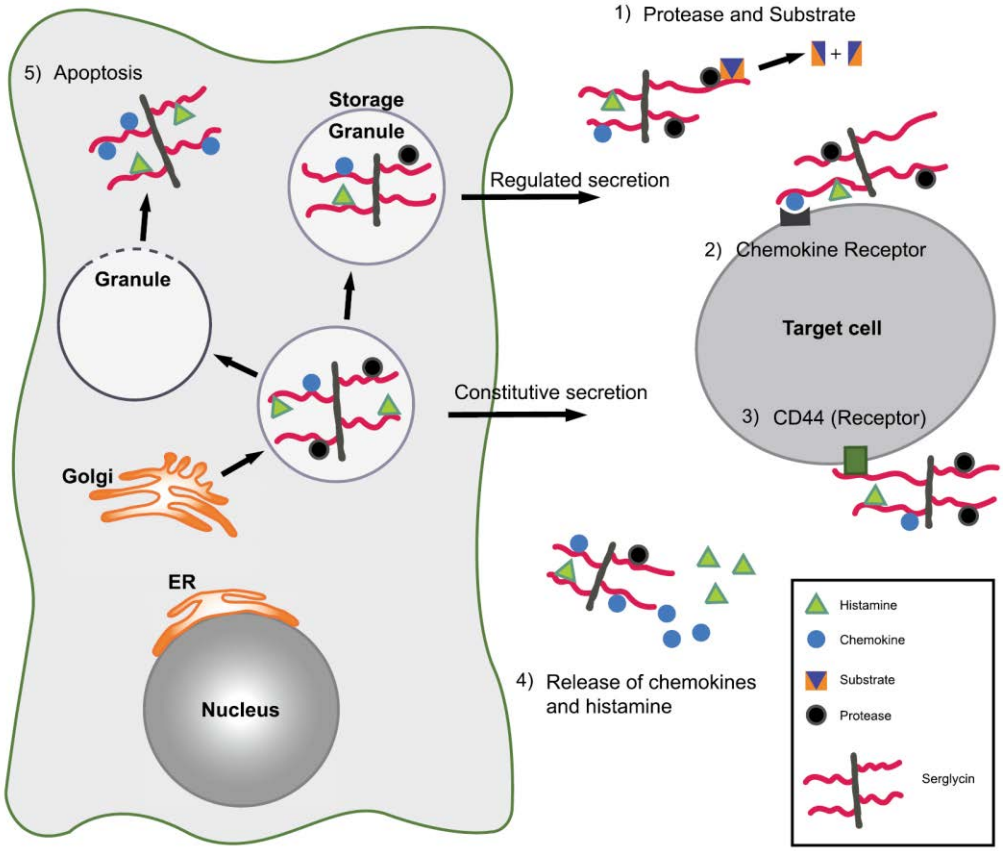


Figure 7 Représentation schématique des fonctions de la serglycine.
La serglycine est soit sécrétée, soit transportée vers des granules sécrétoires. Plusieurs molécules peuvent interagir avec la serglycine et être libérées avec elle au moment de l'exocyose des vésicules de sécrétion: 1) Une protéase peut interagir avec la serglycine et ainsi se rapprocher de son substrat potentiel pour l'hydrolyser; 2) La serglycine peut faciliter le transport des chimiokines à leurs cellules cible et contribuer à leur liaison avec les récepteurs; 3) La serglycine peut interagir avec des récepteurs ou protéines exposées à la surface des cellules, par exemple la protéine CD44 ou d'autres partenaires; 4) Certaines molécules liées à la serglycine peuvent être libérées dans la MEC après la sécrétion et exercer leur action biologique sur leurs cibles; et 5) La libération des complexes de serglycine-protéase dans le cytosol provoque l'apoptose cellulaire (Melo, Waern et al. 2011) (Kolset and Pejler 2011).

II.2.4 Protéoglycanes péricellulaires : exemple du perlécane

Le perlécane est un PG exprimé dans les tissus vasculaires (au niveau de l'endothélium et de l'épithélium) et avasculaires (cartilage et stroma de tissu conjonctif) et situé au niveau de la surface cellulaire et de la membrane basale des cellules (cellules endothéliales et épithéliales) (Iozzo 2005, Iozzo and Schaefer 2015). Le perlécane est constitué d'une protéine *core* de grande taille (masse moléculaire supérieure à 400kDa) constituée de multiples domaines et portant trois chaînes de HS du côté N-terminal (Figure 8).

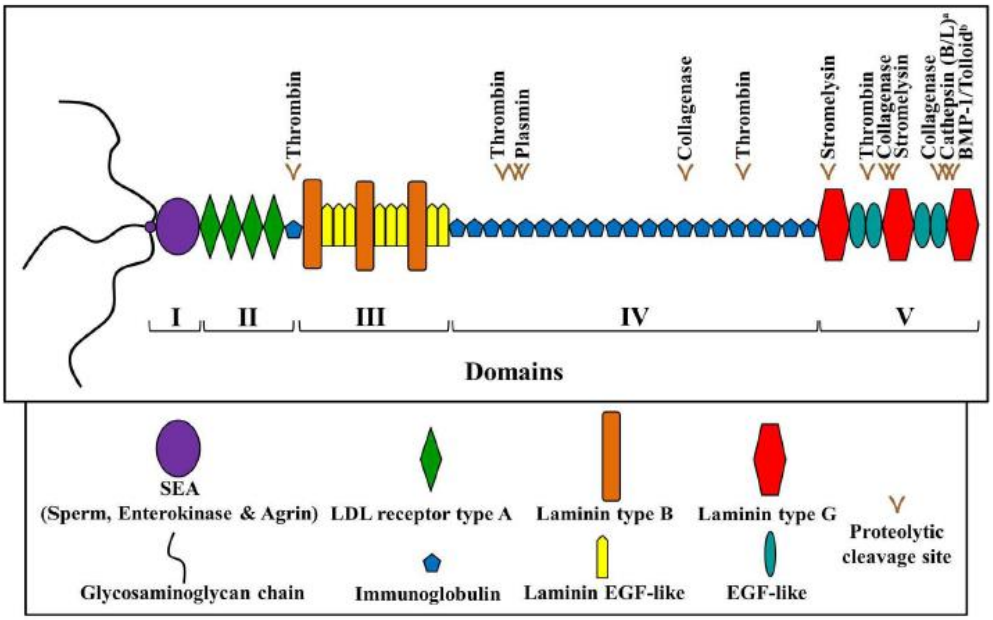


Figure 8 Représentation schématique de la structure du perlécane.
La protéine *core* du perlécane est composée de cinq domaines (notés I-V) : Le domaine I contient des sites d'ancrage des chaînes de HS et un domaine nommé SEA (*Sea urchin sperm protein, Enterokinase, Agrin*). Le domaine II est constitué de quatre domaines des récepteurs pour les LDL (*Low Density Lipoprotein*) de type A et d'un motif de type immunoglobuline (Ig)-*like*. Le domaine III possède trois domaines laminine de type B interrompus par des domaines laminines-EGF (*Epidermal Growth Factor*)-*like* répétés. Le domaine IV est constitué de 21 motifs immunoglobulines-*like*. Et le domaine V contient trois motifs laminine de type G séparés chacune par deux répétitions d'un motif de type EGF-*like*. Les sites de clivages protéolytiques ainsi que les protéases impliquées sont également indiqués dans la figure (Roberts, Kahle et al. 2012).

La protéine *core* du perlécane est constituée de cinq domaines (notés I, II, III, IV et V) (Figure 8) : Le **domaine I** contient trois répétitions de trois acides aminés Ser-Gly-Asp, au niveau desquelles sont fixés trois chaînes de HS et comportant un domaine nommé SEA (*Sea urchin sperm protein, Enterokinase, Agrin*) qui se trouve également dans l'agrine (un HSPG) et d'autres protéines (entérokinase) (Bork and Patthy 1995). Mais la fonction du domaine SEA n'est pas connue encore. Le **domaine II** est constitué de quatre domaines correspondant à des récepteurs pour les LDL (*Low Density Lipoprotein*) de type A, suivis par un motif de type immunoglobuline (Ig)-*like*. Le **domaine III** possède trois domaines laminine de type B, qui sont interrompus par des domaines laminines-EGF (*Epidermal Growth Factor*)-*like* répétés. Le **domaine IV** contient 21 motifs immunoglobulines-*like* qui ont une homologie de séquence avec la molécule d'adhésion N-CAM (*Neural Cell-Adhesion Molecule*). Le **domaine V** contient trois motifs laminine de type G qui sont séparées chacune par deux répétitions d'un motif de type EGF-*like*.

En raison de ses multiples domaines, le perlécane est susceptible d'interagir avec de nombreuses molécules dont des composants de la MEC, et certaines molécules effectrices interagissant au niveau de la surface cellulaire, comme le FGF-7 (Mongiat, Taylor et al. 2000), le FGF-2 (Knox, Merry et al. 2002), le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) (Gohring, Sasaki et al. 1998), ou le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Goyal, Pal et al. 2011). La chaîne de HS située au niveau du domaine I est capable de lier le FGF-2, jouant un rôle très important dans l'angiogénèse, la cicatrisation et l'invasion tumorale (Whitelock, Murdoch et al. 1996). Les souris portant un défaut génétique au niveau des sites Ser-Gly-Asp, sur lesquels se fixent les chaînes de HS, montrent un défaut d'angiogenèse, un retard de cicatrisation et une suppression de la croissance tumorale (Zhou, Wang et al. 2004). Il a également été montré que la protéine *core* du perlécane joue un rôle de réservoir du FGF-7 et pour réguler la croissance du cancer et le remodelage tissulaire. (Mongiat, Taylor et al. 2000). Le perlécane peut ainsi lier le facteur *sonic hedgehog* (SHH) et réguler de façon positive la signalisation de ce facteur, contribuant à l'agressivité et à la formation de métastases dans le cancer de la prostate (Datta, Pierce et al. 2006).

Comme nous venons de le voir, les PGs jouent un rôle majeur, à la fois structural et fonctionnel, dans le maintien de l'architecture tridimensionnelle de la MEC des tissus conjonctifs. Des altérations de leur structure ou une dérégulation de leur métabolisme entrainent l'apparition de situations pathologiques qu'il est nécessaire de mieux comprendre pour pouvoir identifier de nouvelles cibles pharmacologiques et proposer des pistes thérapeutiques potentielles pour s'opposer à ces dérèglements dans un contexte clinique.

Nous proposons de cibler notre approche sur l'étude des voies de biosynthèse des GAGs qui vont être présentées plus en détail dans le chapitre III, avant de nous focaliser sur l'enzyme qui fait l'objet de ce travail et qui est impliquée dans une forme pléiotropique de SED, la β3GalT6 qui sera plus précisément décrite dans le chapitre IV.

Chapitre III : La biosynthèse des protéoglycanes

La biosynthèse des PGs débute par la synthèse de la protéine *core* dans le réticulum endoplasmique (RE). Elle se poursuit dans les compartiments tardifs du RE et dans l'appareil de Golgi par la formation d'une amorce tétrasaccharidique (GlcA-β1,3-Gal-β1,3-Gal-β1,4-Xyl-β1-*O*-) à partir de laquelle seront polymérisés les différents types de chaînes de GAGs (Figure 9).

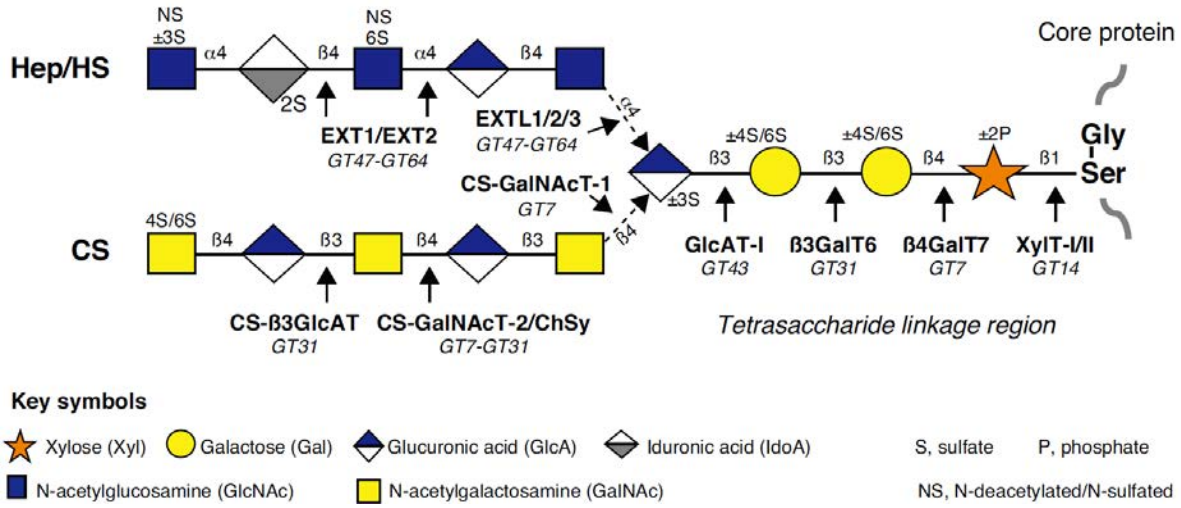


Figure 9 Représentation schématique des voies de biosynthèse des GAGs.
La protéine *core* est transportée vers l'appareil de Golgi après sa synthèse dans le réticulum endoplasmique. La synthèse de la chaîne de GAG est initiée par la formation d'une amorce tétrasaccharidique (GlcA-β1,3-Gal-β1,3-Gal-β1,4-Xyl-β1-*O*-) qui débute par l'addition d'un xylose (Xyl) par les xylosyltransférases I et/ou II (XylT-I/II), suivi par l'ajout de deux résidus galactose (Gal) par les galactosyltransférases I (β4GalT7) et II (β3GalT6) respectivement et d'un acide glucuronique (GlcA) par la glucuronosyltransférase I (GlcAT-I). Les motifs disaccharidiques composés d'une N-Acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) pour les HS et l'Hep ou une N-Acétyl-D-galactosamine (GalNAc) pour les CS/DS et d'un acide uronique, l'acide D-glucuronique (GlcA) ou l'acide L-iduronique (IdoA) sont ensuite ajoutés pour former les Hep/HS (par l'intermédiaire des HS-synthases) ou CS/DS) (par l'intermédiaire des CS-synthases, respectivement. Les chaînes de GAGs subissent ensuite en cours de synthèse, de nombreuses modifications comprenant des *O*- et *N*-sulfatations et des phosphorylations (Breton, Fournel-Gigleux et al. 2012).

III.1 Synthèse de l'amorce tét asaccharidique

La synthèse de l'amorce tétrasaccharidique est initiée par l'addition d'un résidu xylose (Xyl) qui est catalysée par les xylosyltransférases I et/ou II (XT-I et/ou XT-II) (Gotting, Kuhn et al. 2000). Deux résidus galactose (Gal1 et Gal2) sont ensuite ajoutés par la β1,4-galactosyltransférase 7 (β4GalT7, GalT-I) (Almeida, Levery et al. 1999) et la β1,3-galactosyltransférase 6 (β3GalT6, GalT-II) (Bai, Zhou et al. 2001) dont l'étude de la déficience génétique fait l'objet de ce travail. Finalement, le transfert de l'acide glucuronique (GlcA) est

catalysé par la β1,3-glucuronosyltransférase I (GlcAT-I) (Kitagawa, Tone et al. 1998). Ces glycosyltransférases agissent de façon spécifique, séquentielle et coordonnée pour synthétiser l'amorce tétrasaccharidique à partir de laquelle pourra être initiée la polymérisation des différents types de chaines de GAGs (Figure 9). Il est intéressant de noter que l'amorce tétrasaccharidique peut subir plusieurs types de modifications, comme (i) une phosphorylation du Xyl en position 2 réalisée par la kinase Fam20B (Koike, Izumikawa et al. 2009), et (ii) des sulfatations des deux Gal en positions 4 et/ou 6 (Kitagawa, Tsutsumi et al. 2008).

De façon intéressante pour notre étude, il a été décrit que la phosphorylation du Xyl en position 2 améliore l'efficacité enzymatique de la β3GalT6 d'un facteur 200 par rapport à un substrat non phosphorylé, ce qui indique que cette modification joue un rôle important dans le processus de la formation de l'amorce tétrasaccharidique et donc dans l'initiation de la biosynthèse des GAGs (Wen, Xiao et al. 2014). La régulation exercée par la phosphorylation du Xyl à ce niveau semble de plus très fine dans la mesure où notre équipe avait montré une absence totale d'activité de la β4GalT7 (l'enzyme qui intervient juste avant la β3GalT6) *in vitro* vis-à-vis d'un substrat phosphorylé en position 2 sur le Xyl (Gulberti, Lattard et al. 2005). Par contre, l'efficacité catalytique de la GlcAT-I, l'enzyme qui termine la formation de l'amorce tétrasaccharidique et qui intervient juste après la β3GalT6 dans la chaine de réaction, augmente en utilisant un substrat phosphorylé sur le Xyl par rapport au substrat non phosphorylé (Tone, Pedersen et al. 2008).

III.2 L'él ngation des chaînes de glycosaminoglycanes

L'élongation des chaînes de GAGs est réalisée à partir de l'amorce tétrasaccharidique par l'ajout successif d'un motif disaccharidique composé : (i) d'un sucre aminé : GlcNAc pour l'Hep et les HS ou GalNAc pour les CS/DS et (ii) d'un acide uronique : GlcA pour les CS/HS ou IdoA pour l'Hep et les DS. Dans tous les cas, le transfert des éléments constituant le motif disaccharidique élémentaire est catalysé par des glycosyltransférases (GTs) spécifiques de la famille des HS-synthases (EXT1/EXT2) pour la biosynthèse des HS et de l'Hep (Kitagawa, Shimakawa et al. 1999, Kim, Kitagawa et al. 2001), ou par les enzymes de la famille des CS-synthases (CSS) pour la production des CS/DS (Yada, Gotoh et al. 2003, Yada, Sato et al. 2003). Les chaînes de GAGs subissent ensuite en cours ou en fin de synthèse, de nombreuses modifications comprenant principalement une épimérisation du GlcA en IdoA et des *O*- et *N*-sulfatations par des sulfotransférases spécifiques.

III.2.1 Elongation et maturation des chaines de CS/DS

Six GTs sont impliquées dans la formation de la chaîne hétéropolysaccharidique qui compose les CS/DS : ChGn-1, ChGn-2, ChSy-1, ChSy-2, ChSy-3 et ChPF (Figure 10). Ces enzymes possèdent (i) des activités GalNAcT-I et -II pour le transfert des résidus GalNAc sur l'amorce tétrasaccharidique ou la chaine en cours de synthèse respectivement, et (ii) une activité GlcAT-II pour le transfert des résidus GlcA (qui pourront (ou non) être épimérisés en IdoA dans les chaînes de DS) sur les résidus GalNAc (Figure 10). Les ChSy-1, ChSy-2 et ChSy-3 possèdent les deux activités GlcAT-II et GalNAcT-II, ce qui leur permet d'ajouter séquentiellement les résidus GlcA et GalNAc les uns à la suite des autres de façon très efficace. Par contre, elles ne semblent pas capables de polymériser les chaînes de CS/DS indépendamment les unes des autres et doivent nécessairement s'associer pour avoir une activité optimale (Kitagawa, Izumikawa et al. 2003, Izumikawa, Uyama et al. 2007, Izumikawa, Koike et al. 2008).

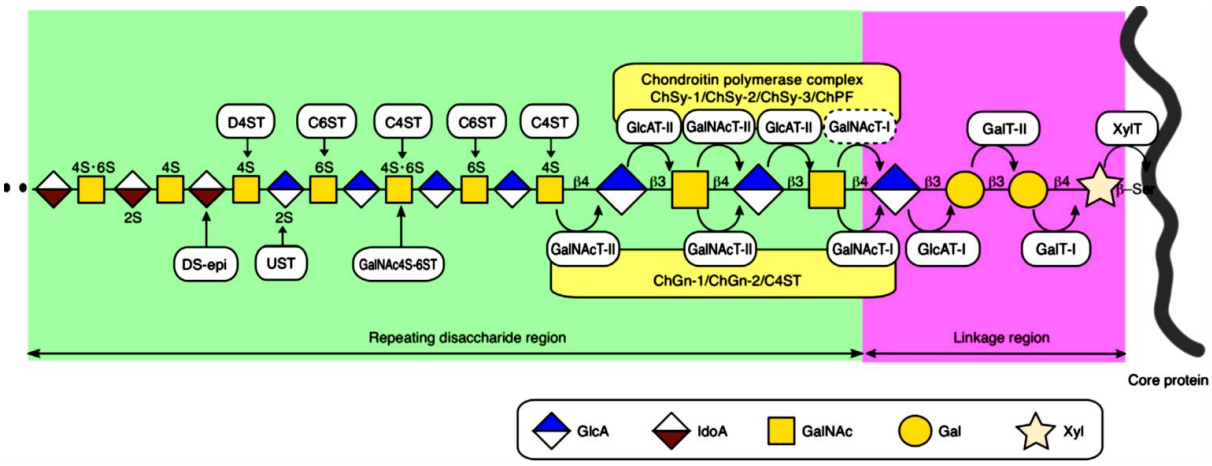


Figure 10 Représentation schématique de la biosynthèse et de la maturation des chaînes de CS/DS. L'élongation des chaînes de CS/DS à partir de l'amorce tétrasaccharitique est réalisée par un complexe enzymatique formé entre les différentes enzymes de la voie de biosynthèse : ChSy-1, la ChSy-2, la ChSy-3 et la ChPF. La ChGn-1 (GalNAcT-I) régule l'initiation de la polymérisation des chaines de CS dans la mesure où elle est responsable de la fixation du premier résidu GalNAc sur l'amorce tétrasaccharidique. Les chaînes de CS/DS sont ensuite allongées grâce aux activités GlcAT-II et GalNAcT-II des complexes enzymatiques formés. Les chaînes de CS sont finalement maturées par l'ajout de groupements sulfate au niveau des positions 4 et 6 des résidus GalNAc et/ou en position 2 de l'acide hexuronique (GlcA ou IdoA) grâce à l'action de différentes sulfotransférases (C4STs, C6STs, D4ST, UST, GalNAc4S-6ST). Les DS-épimérases convertissent les résidus de GlcA en IdoA dans les chaînes de DS (Mikami and Kitagawa 2013).

Il a été décrit que la ChGn-1 (activité GalNAcT-I) et la ChGn-2 (activité GalNAcT-II) régulent la polymérisation des chaines de CS/DS en formant des complexes avec certaines sulfotransférases (en particulier les 4-*O*-sulfotransférases-1 et 2, C4ST-1 et 2), favorisant ainsi la maturation des chaînes de CS en cours de synthèse (Izumikawa, Okuura et al. 2011,

Izumikawa, Koike et al. 2012). Finalement, les chaînes de CS/DS subissent des modifications de type épimérisation (des GlcA en IdoA dans les DS) (Malmstrom, Bartolini et al. 2012) et des *O*-sulfatations (en positions 4 et/ou 6 des résidus GalNAc), que nous allons maintenant détailler (Figure 10) (Fukuta, Kobayashi et al. 1998, Hiraoka, Nakagawa et al. 2000, Kang, Evers et al. 2002).

Les chaînes de CS/DS peuvent subir un certain nombre de sulfatations sur différentes positions grâce à l'intervention de sulfotransférases spécifiques qui transfèrent des groupements sulfates (à partir du donneur 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS)). Le type de sulfatation le plus fréquemment trouvé sur les CD/DS est la **4-*O*-sulfatation**. Quatre 4-*O*-sulfotransférases (C4ST-1, 2, 3 et D4ST) peuvent transférer un groupement sulfate en position 4 des résidus GalNAc (Hiraoka, Nakagawa et al. 2000, Kang, Evers et al. 2002). Leur spécificité de substrat dépend par ailleurs de la proximité de certains résidus, comme dans le cas de la D4ST qui est responsable de la 4-*O*-sulfatation des résidus GalNAc situés à côté des résidus IdoA dans le cas des chaînes de DS (Figure 10) (Evers, Xia et al. 2001, Mikami, Mizumoto et al. 2003). De façon intéressante, il a été observé que la **C4ST-1** pouvait réguler la longueur des chaines de CS avec la **ChGn-2** qui transfère un résidu GalNAc à l'extrémité non-réductrice du polysaccharide. La 4-*O*-sulfatation des résidus GalNAc à l'extrémité non-réductrice semble donc favoriser l'élongation des chaînes de CS/DS grâce à l'intervention du complexe ChSy-1/ChPF (Izumikawa, Okuura et al. 2011).

Il a également été démontré que la **C4ST-2** coopère avec la **ChGn-1** pour réguler le nombre de chaînes de CS. En effet, la polymérisation des chaînes de CS par les CSS utilise comme substrat accepteur un tétrasaccharide ou un pentasaccharide possédant une extrémité non réductrice au niveau du résidu GalNAc(4-*O*-sulfate), mais pas un substrat oligosaccharidique présentant un résidu GalNAc non sulfaté. Ces éléments montrent la finesse de la régulation de la maturation des chaînes de CS/DS en relation avec les spécificités de substrats très étroites des enzymes responsables de ces modifications sur les chaines de GAGs.

A côté des C4STs, les **6-*O*-sulfotransférases (C6STs)** ajoutent un groupement sulfate en position 6 des résidus GalNAc (Fukuta, Kobayashi et al. 1998). Comme nous l'avons vu précédemment, ces modifications interviennent de façon très précise comme en témoigne la GalNAc-4-sulfate 6-*O*-sulfotransférase, qui ajoute un groupement sulfate en position 6 exclusivement sur des résidus GalNAc sulfatés en position 4 (Figure 10) (Fukuta, Kobayashi et al. 1998, Uchimura, Kadomatsu et al. 2002).

Enfin, une **2-*O*-sulfotransférase** spécifique des chaînes de CS/DS nommée UST (uronyl 2-*O*-sulfotransférase) transfère des groupements sulfates en position 2 sur les acides uroniques GlcA et IdoA (Figure 10) (Kobayashi, Sugumaran et al. 1999).

La biosynthèse des CS/DS est un processus complexe faisant intervenir de nombreuses glycosyltransférases qui s'organisent en complexes entre elles et avec des sulfotransférases pour réaliser une biosynthèse et une maturation efficaces des GAGs. L'ensemble des réactions mises en jeu permet la formation de chaînes de CS/DS matures qui pourront exercer leurs diverses activités biologiques, en particulier au sein de la MEC des tissus conjonctifs.

III.2.2 Elongation des chaînes de HS

Après la formation de l'amorce tétrasaccharidique, le premier résidu GlcNAc est ajouté sur le résidu GlcA termimal grâce à l'action des GTs de la famille des EXTL (*Exostosin-like glycosyltransferases*) 1, 2 et 3, qui possèdent une activité α-GlcNAc transférase (GlcNAcT). Il a été décrit que l'EXTL3 est la principale enzyme impliquée dans l'initiation de la biosynthèse des HS *in vivo* (Han, Belenkaya et al. 2004, Holmborn, Habicher et al. 2012). De façon intéressante, l'EXTL2 a montré une activité de transfert soit du résidu GlcNAc (activité GlcNAcT-I) soit du groupement GalNAc (activité GalNAcT-I) sur l'amorce tétrasaccharidique initiant la polymérisation de la chaîne de GAG. Mais une fois le premier résidu GlcNAc lié à l'amorce, la chaîne de HS est polymérisée par l'addition successive des résidus GlcA et GlcNAc par les glycosyltransférases EXT1 et EXT2 (Kreuger and Kjellen 2012).

De façon complémentaire à la biosynthèse, les chaînes de HS peuvent être, comme les chaines de CS/DS, diversement maturées, en particulier grâce à l'ajout de groupements sulfates. Dans ce contexte, quatre familles de sulfotransférases interviennent pour maturer les chaines de HS (Figure 11) : (i) des *N*-déacétylases/*N*-sulfotransférases (NDSTs) responsable de la *N*-déacétylation et de la sulfatation des résidus GlcNAc, (ii) une 2-*O*-sulfotransférase (2-OST) qui transfère des groupements sulfate sur la position 2 du résidu IdoA, (iii) des 6-*O*-sulfotransférases (6-OSTs) impliquées dans la sulfatation des résidus GlcNAc en position 6 et finalement (iv) des 3-*O*-sulfotransférases (3-OSTs) qui catalyse le transfert d'un groupement sulfate sur les résidus GlcNAc 6-*O*-sulfatés ou non. La C5-épimérase est également impliquée dans la maturation des chaînes de HS et catalyse la conversion des résidus GlcA en IdoA.

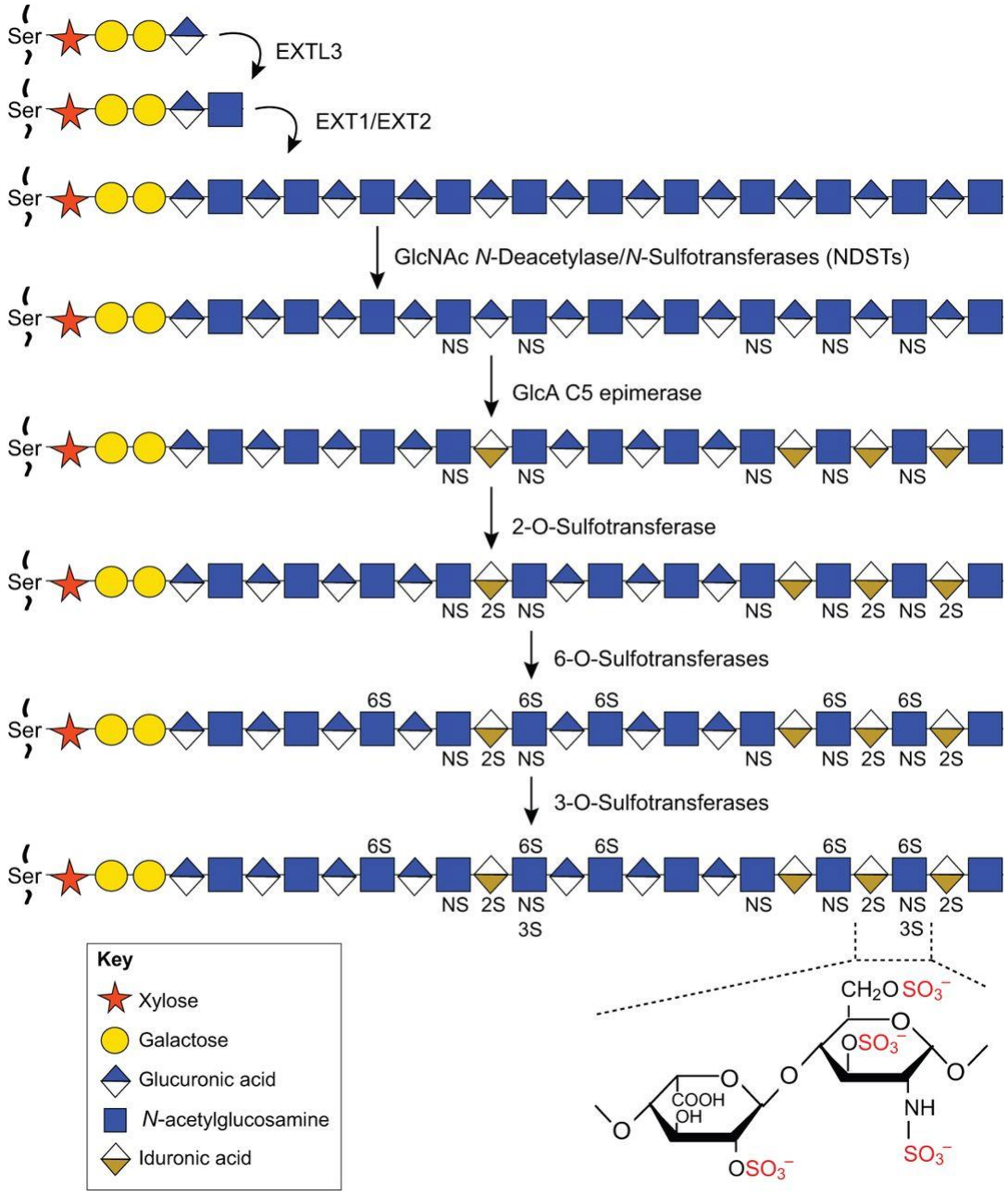


Figure 11 Représentation schématique des voies de biosynthèse et de maturation des chaînes de HS.
La formation des chaînes de HS à partir de l'amorce tétrasaccharidique est initiée par l'EXTL3 par l'ajout le résidu GlcNAc. Les chaînes sont ensuite polymérisées par l'addition des résidus GlcA et GlcNAc par les EXT1 et EXT2. La maturation des chaînes de HS se déroule en cinq étapes: 1) une *N*-déacétylation associée à une *N*-sulfatation des résidus GlcNAc par les enzymes de la famille des *N*-déacétylases/*N*-sulfotransférases (NDSTs); 2) une C5-épimérisation des résidus GlcA en IdoA par la C5-épimérase; 3) une 2-*O*-sulfatation partielle des résidus IdoA par la 2-OST; 4) un ajout des groupements sulfates en position 6 des résidus GlcNAc par les 6-OSTs; 5) une 3-*O*-sulfatation des résidus GlcNAc par les 3-OSTs en fin de synthèse (Poulain and Yost 2015).

La modification des chaînes de HS se déroule en cinq étapes (Figure 11) : (i) La maturation des chaînes de HS est initiée par les NDSTs qui catalyse la ***N*-déacétylation** suivie de la ***N*-sulfatation** des résidus GlcNAc. Il en a été conclu que la réaction de NDSTs joue un rôle très

important dans la maturation des chaînes HS car plusieurs modifications se présentent sur les sites *N*-sulfatés. Plusieurs études ont montré que des chaînes de HS qui sont synthétisées dans les cellules CHO déficientes en *N*-sulfotransférase (lignée CHO *pgs*E-606) sont faiblement *N*- et *O*-sulfatées en comparaison de ce qui peut être observé dans les cellules CHO sauvages non déficientes (Bame, Zhang et al. 1994).

Il est ensuite décrit trois types de réactions de *O*-sulfatation au niveau des chaines de HS :

(ii) Des **sulfatations en position 2** des acides uroniques (GlcA et IdoA), catalysées par les 2-OSTs. Dans ce cas, les sites de 2-*O*-sulfatation doivent être flanqués de deux résidus GlcNAc *N*-sulfatés (Liu, Sheng et al. 2014).

(iii) Des **sulfatations en position 6** des résidus GlcNAc ou GlcNAc *N*-sulfatés catalysées par les 6-OSTs. La réaction de 6-*O*-sulfatation a lieu sur le résidu qui se trouve du côté réducteur par rapport aux résidus GlcA-2-sulfatés ou IdoA-2-sulfatés. Il a d'ailleurs été montré que la 6-*O*-sulfatation inhibe l'action de la 2-OST, indiquant une spécificité de substrat étroite de la part de ses sulfotransférases et une régulation fine des voies de maturation des HS (Liu, Sheng et al. 2014).

(iv) Des **sulfatations en position 3** des résidus GlcNAc catalysées par les 3-OSTs qui interviennent au niveau de la dernière étape de la voie de maturation des HS. Cette modification est rare, mais primordiale pour la formation de motifs oligosaccharidiques sulfatés qui constituent des sites de reconnaissance et d'interaction spécifiques pour certains ligands, comme l'antithrombine III (AT-III) (Petitou, Casu et al. 2003), la glycoprotéine gD de l'*Herpes Simplex Virus* de type 1 (Shukla, Liu et al. 1999) ou la cyclophiline B (Vanpouille, Deligny et al. 2007). L'interaction de ces ligands protéiques au niveau de motifs 3-*O*-sulfatés peut réguler l'activité biologique de ces molécules et les activités biologiques qui leur sont associées (Mao, Gauche et al. 2016).

Comme nous l'avions vu pour les chaines de CS/DS, la biosynthèse des HS est également un processus complexe faisant intervenir de nombreuses glycosyltransférases capables de s'organiser en complexes protéiques dotés de plusieurs activités glycosyltransférases. Les nombreuses enzymes intervenant dans la maturation des chaînes et l'ordre séquentiel de ces modifications spécifiques conditionnent la nature des HS qui seront produits par les cellules. Ces processus sont particulièrement importants pour la fonctionnalité des GAGs dans la mesure où les HSPGs membranaires ont une localisation stratégique à l'interface cellule-matrice. Ils

ont donc un rôle déterminant dans la régulation de certaines voies de signalisation, médiées en particulier par les récepteurs aux facteurs de croissance, avec lesquels ils peuvent interagir et dont ils peuvent réguler l'activation.

Ce travail de thèse est consacré à l'étude de la déficience génétique en β3GalT6, une glycosyltransférase impliquée dans l'initiation de la biosynthèse des GAGs, dans le contexte du SED. Nous allons dans un premier temps rappeler les caractéristiques de la famille des β3GalTs dont fait partie l'enzyme d'intérêt, avant de nous concentrer plus précisément sur la β3GalT6 (Chapitre IV).

Chapitre IV : La β1,3-galactosyltransférase 6

IV.1 La famille des β1,3-galactosyltransférases (β3GalTs)

La famille des β3GalTs contient sept membres chez l'Homme (hβ3GalTs), notés β3GalT1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 (Tableau 8). Les β3GalTs sont des protéines transmembranaires, présentant une topologie de type II, c'est-à-dire possédant un court domaine cytoplasmique N-terminal, un seul segment transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés (hydrophobes) organisés en hélice et un large domaine C-terminal constituant le site actif de l'enzyme et contenant les sites de fixation des substrats. Les β3GalTs 1, 2, 4, 5, 6 et 7 transfèrent un galactose à partir du nucléotide sucre donneur UDP-Gal, sur des substrats accepteurs présentant des résidus GlcNAc, GalNAc ou Gal terminaux afin de former une liaison β1,3. De façon particulière pour cette famille de GTs, la β3GalT3 (nommée plus tard β3GalNAcT1), catalyse le transfert d'un résidu GalNAc (à partir de l'UDP-GalNAc) sur un substrat accepteur de nature lipidique, le Gb3 (globotriaosylcéramide, Gal-α1,4-Gal-β1,4-Glc-β1-Céramide), produisant le Gb_4 (globoside, GalNAc-β1,3-Gal-α1,4-Gal-β1,4-Glc-β1-Cer) (Amado, Almeida et al. 1998, Okajima, Nakamura et al. 2000).

Un résumé des propriétés fonctionnelles des différentes hβ3GalTs est présenté dans le Tableau 8. Pour résumer, la β**3GalT2** présente une similaire spécificité de substrat à celui de la β**3GalT1**. Elles transfèrent toutes les deux un Gal sur un résidu GlcNAc terminal sur des accepteurs de nature lipidique, comme par exemple Lc_3Cer (lactosylcéramide), pour former un motif [Gal-β1,3-GlcNAc]. Les β**3GalT4, β3GalT5 et β3GalT7** catalysent la formation du motif [Gal-β1,3-GalNAc] pour synthétiser des dérivés gangliosides ou encore l'antigène de Lewis de type 1 [Galβ1,3(Fucα1,4)GlcNAcβ1-] . La β**3GalT6** catalyse l'addition du troisième résidu (Gal) de l'amorce tétrasaccharidique qui initie la biosynthèse des GAGs sur le motif disaccharidique [Gal-β1,4-Xyl] fixé à la protéine *core* des PGs (Amado, Almeida et al. 1998, Amado 1999, Hennet 2002). Il s'agit de la seule glycosyltransférase de cette famille connue pour (i) transférer un Gal sur un Gal terminal, les autres β3GalTs transférant préférentiellement le résidu Gal sur un sucre terminal aminé (GalNAc ou GlcNAc) et (ii) être impliquée dans l'initiation de la biosynthèse des GAGs.

Tableau 8 Caractéristiques fonctionnelles des glycosyltransférases de la famille des hβ3GalTs.

Enzymes	Localisation chromosomique	Taille de la protéine (acides aminés)	Substrats accepteurs	Références
β3GalT1	2p14	326	GlcNAc-β1→/glycoprotéine	(Amado, Almeida et al. 1998) (Hennet, Dinter et al. 1998)
β3GalT2	1q31	422	GlcNAc-β1→/ovalbumine GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ1-Céramide (Lc_3, lactosylcéramide)	(Amado, Almeida et al. 1998) (Hennet, Dinter et al. 1998) (Kolbinger, Streiff et al. 1998)
β3GalT4	6p21	378	GalNAcβ1,4(NeuAcα2,3)Galβ1-4Glcβ1-Cer (GM_2) GalNAcβ1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer (AsialoGM$_2$) GalNAcβ1,4(NeuAcα2,8NeuAcα2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer (GD_2)	(Amado, Almeida et al. 1998) (Miyazaki, Fukumoto et al. 1997)
β3GalT5	21q22.3	310	GalNAcβ1,3Galα1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer (Gb_4) O-linked core3 GlcNAcβ1,3GalNAc Antigène de Lewis A et de Lewis-sialyle dans les tumeurs gastro-intestinales et pancréatiques	(Isshiki, Togayachi et al. 1999) (Zhou, Berger et al. 1999) (Zhou, Henion et al. 2000)
β3GalT6	1p36.33	329	Galβ1,4Xyl-protéine *core* (GAG)	(Bai, Zhou et al. 2001)
β3GalT7	7	363	GalNAcα1-*O*-phenyl Glycopeptide PSGL-1 (*P-selectin glycopeptide ligand*) contenant GalNAcα1-*O*-Thr	(Ju, Brewer et al. 2002)

IV.2 La β1,3-galactosyltransfé ase 6 (β3GalT6)

La β3GalT6 est une glycosyltransférase membranaire présente dans les compartiments médians de l'appareil de Golgi et impliquée dans les étapes précoces de la biosynthèse des GAGs (Bai, Zhou et al. 2001). Le gène codant la β3GalT6 humaine (h*B3GALT6*) est un gène localisé sur le chromosome 1 au locus 1p36.33 et composé d'un unique exon d'environ 2.8 kb. L'ADNc codant cette protéine a été cloné par Bai et al. (2001) (Bai, Zhou et al. 2001). Il code une protéine de 329 acides aminés présentant une masse moléculaire apparente de 37kDa. Comme nous

l'avons précédemment décrit pour les autres membres de la famille des la β3GalTs (voir paragraphe IV.1), la β3GalT6 présente une topologie membranaire de type II avec un court domaine cytoplasmique de 11 acides aminés, un unique domaine transmembranaire constitué de 19 acides aminés suivant directement le domaine cytoplasmique. Le domaine transmembranaire de la β3GalT6 a la particularité de posséder un résidu cystéine conservé chez la souris, l'Homme et le nématode *Caenorhabditis elegans* qui pourrait être impliqué dans un pont disulfure intermoléculaire dans le cas d'une dimérisation de l'enzyme, ce qui n'a pas été clairement démontré à ce jour. Le domaine transmembranaire est suivi d'un segment riche en Ser, Pro, Ala, Gly, appelé domaine « SPLAG » présent également dans d'autres transférases (comme les 3-OSTs par exemple). Il est inclus dans une région « *stem* » séparant le domaine catalytique du domaine transmembranaire (Shworak, Liu et al. 1999, Bai, Zhou et al. 2001). Il s'agit d'un domaine structural important dont la présence est supposée nécessaire pour maintenir une conformation tridimensionnelle active de l'enzyme au contact de la membrane.

Bai et al. (2001) ont décrit que la β3GalT6 transfère un résidu Gal à partir de l'UDP-Gal (substrat donneur) sur un β-galactoside ou un glycane possédant un galactose terminal et impliqué dans une liaison β-*O*-glycosidique (substrat accepteur) pour former un motif (Gal-β1,3-Gal) (Bai, Zhou et al. 2001). Malgré tout, peu d'informations concernant les propriétés structurales, fonctionnelles de cette enzyme ou son mécanisme catalytique sont disponibles à ce jour, d'où la nécessité d'approfondire l'étude moléculaire de cette enzyme, en particulier dans un contexte physiopathologique.

Il s'agit d'une enzyme importante pour l'initiation de la biosynthèse des CS/DS et HS dans la mesure où la production de ces GAGs est fortement réduite dans les cellules HeLa après extinction de l'expression du gène *B3GALT6* par un siRNA spécifiquement dirigé contre ce gène. Cette enzyme joue donc un rôle central dans l'initiation de la biosynthèse des différents types de GAGs dans la mesure où elle contribue à la formation de l'amorce tétrasaccharidique qui leur est commune (Bai, Zhou et al. 2001).

Des orthologues de l'enzyme humaine ont été identifiés (i) chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) : *d*β3GalTII (Ueyama, Takemae et al. 2008), et (ii) chez le nématode *Caenorhabditis elegans : sqv-2* (*squashed vulva*-2) (Hwang, Olson et al. 2003). Comme l'enzyme humaine, les formes orthologues de la β3GalT6 humaine montrent une activité catalytique similaire en réalisant le transfert du résidu Gal sur un disaccharide possédant une structure oligosaccharidique de type (Gal-β1,4-Xylβ-) et possédant un Gal terminal (Hwang,

Olson et al. 2003, Ueyama, Takemae et al. 2008). La structure tridimensionnelle de cette enzyme n'a pas encore été résolue et son mécanisme catalytique n'est pas encore clairement établi à ce jour. Des mutations du gène *B3GALT6* ont été récemment identifiées et associées à un groupe des maladies génétiques rares du tissu conjonctif, le SED et la dysplasie spondylo-épimétaphysaire avec hyperlaxité ligamentaire type 1 (SEMD-JL1). La compréhension du fonctionnement de cette enzyme ainsi que l'analyse des défauts engendrés par sa mutation chez les patients pourront permettre d'apporter des informations sur le rôle de certains acides aminés ou motifs peptidiques dans la fonctionnalité de la β3GalT6 et potentiellement, de proposer des solutions pour s'opposer au déficit de synthèse matricielle observés dans les cellules des patients en ciblant cette enzyme.

IV.3 SED, SEMD-JL1 et mutations du gène *B3GALT6*

IV.3.1 Des mutations du gène *B3GALT6* sont associées à une forme pléiotropique de SED et à la SEMD-JL1

Des mutations du gène *B3GALT6* ont été décrites et associées à un groupe de maladies du tissu conjonctif incluant la dysplasie spondylo-épimétaphysaire avec hyperlaxité ligamentaire type 1 (SEMD-JL1) et une forme pléiotropique de SED. Il a été observé un tableau clinique très proche de la forme progéroide (dans laquelle la β4GalT7 est mutée, voir partie I.6.2.) chez des patients porteurs de mutations au niveau du gène codant la β3GalT6 (Tableau 9), qui initie la formation des chaines de GAG sur la protéine *core* des PGs (voir Chapitre II et III) (Malfait, Kariminejad et al. 2013, Nakajima, Mizumoto et al. 2013, Ritelli, Chiarelli et al. 2015, Vorster, Beighton et al. 2015). Malfait et al. (2013) ont identifié des mutations du gène *B3GALT6* chez cinq patients atteints d'une forme pléiotropique de SED dans trois familles indépendantes caractérisées par une cyphoscoliose sévère, une hyperlaxité et une contracture articulaire, une fragilité de la peau et une déficience intellectuelle (Malfait, Kariminejad et al. 2013). Nakajima et al. (2013) ont également décrit la même année quatre patients atteints d'une forme pléiotropique de SED qui sont également porteurs de nouvelles mutations au niveau du gène *B3GALT6* (Nakajima, Mizumoto et al. 2013*)*.

De la même façon, la SEMD-JL1, une maladie autosomique récessive, a été décrite en 1980 par Beighton et Kozlowski chez sept enfants qui présentaient des symptomes similaires avec un mauvais alignement spinal, une hypermobilité articulaire, en particulier au niveau des mains, une asymétrie de la cage thoracique, des pieds bots, une dislocation radiale de la tête, une légère extensibilité de la peau, des phalanges spatulées et une fente labiale et palatine (Beighton and

Kozlowski 1980). Plus récemment pour cette pathologie, un certain nombre des patients ateints de SEMD-JL1 (dans lesquels la β3GalT6 est mutée) ont été décrits, dont huit provenant de sept familles (Nakajima, Mizumoto et al. 2013), huit familles (Vorster, Beighton et al. 2015) et deux patients provenant de la même famille (Ritelli, Chiarelli et al. 2015).

IV.3.2 Implications fonctionnelles des mutations de la β3GalT6 dans la pathogén e du SED

Les mutations de la β3GalT6 décrites conduisent à l'apparition (i) de mutations faux-sens de résidus situés dans ou à proximité des motifs conservés entre les différentes β3GalTs ou entre les β3GalT6 de différentes espèces ou (ii) à des délétions entrainant des décalages du cadre de lecture et donc au final, à la production d'une protéine non fonctionnelle (Tableau 9). Dans la majorité des cas, la β3GalT6 mutée présente une mauvaise fonctionnalité avec une réduction ou une suppression de l'activité galactosyltransférase (GalT) en fonction des mutations. Une diminution significative de l'activité GalT a été observée dans les cellules HeLa exprimant les enzymes recombinantes mutées (Ser65Gly, Pro67Leu, Asp156Asn, Arg232Cys, Cys300Ser et Ser309Thr) par rapport aux cellules exprimant la β3GalT6 sauvage (Nakajima, Mizumoto et al. 2013). Certaines protéines mutées (Ser65Gly, Pro67Leu et Arg232Cys) présentent de plus une mauvaise localisation subcellulaire, dans le noyau et le cytoplasme au lieu de la localisation attendue dans l'appareil de Golgi. Comme décrit précédemment pour la β4GalT7, des mutations conduisent à une structure et/ou un repliement altérés et une mauvaise localisation subcellulaire, sont associées à une perte de fonction (Bui, Talhaoui et al. 2010).

Une réduction du taux de HS et de façon surprenante, une augmentation de l'expression des CS/DS ont été observées à la surface des cellules lymphoblastoïdes des patients porteurs des déficiences génétiques en β3GalT6 par rapport aux cellules contrôle (Nakajima, Mizumoto et al. 2013). Malfait et al. (2013) ont quant à eux montré que les mutations du gène *B3GALT6* conduisent *in cellulo* à la production de décorine immature, ou faiblement glycosylée (en fonction des patients), ainsi qu'à la réduction ou la suppression de l'expression des chaînes de HS membranaires dans les fibroblastes de derme humain des patients atteint de SED (par rapport aux fibroblastes contrôle non déficients). De façon complémentaire, un retard de migration est observé avec les fibroblastes des patients par rapport aux cellules fibroblastiques contrôle dans un test de blessure (Malfait, Kariminejad et al. 2013), soulignant l'impact négatif de la réduction du contenu cellulaire en GAGs sur cette fonction biologique. Une organisation anormale du réseau de collagène fibrillaire a également été observée au niveau du derme des patients par microscopie électronique à transmission, montrant qu'il existe un lien

entre le défaut de synthèse des GAGs et l'organisation structurale du réseau collagénique, même en l'absence de toute mutation touchant les enzymes de biosynthèse ou de maturation du collagène (Malfait, Kariminejad et al. 2013). Les mutations du gène codant la β3GalT6 impactent donc de façon négative la biosynthèse des GAGs et les fonctions structurales et fonctionnelles qui leur sont associées, comme ici l'organisation matricielle et la migration des cellules.

IV.3.3 Relation entre la déficience génétique en β3GalT6 et la physiopathologie du SED et SEMD-JL1

- Impact sur la biosynthèse des GAGs

Le lien entre la déficience génétique en β3GalT6 et le processus pathogénique aboutissant à l'altération des tissus conjonctifs et squelettiques n'est pas clairement établi et reste en cours d'investigation dans notre équipe et dans d'autres. Ritelli et al. (2015) ont montré des modifications de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des GAGs, l'organisation des collagènes et la voie de signalisation du TGFβ dans les fibroblastes de derme humain de deux patientes porteuses de la déficience génétique en β3GalT6. Dans cette étude, une réduction très importante de l'expression des chaînes de HS membranaires associée à une organisation matricielle anormale (formant réseau désorganisé dans la MEC ou comme points à la surface cellulaire) du perlécane, un HSPG matriciel, sont observées dans des fibroblastes des patients par rapport aux cellules contrôle (Ritelli, Chiarelli et al. 2015). Le perlécane se lie à plusieurs composants de la MEC, comme par exemple, les collagènes de type I et IV, la laminine et la fibronectine et interagit avec des facteurs de croissance comme FGF2. Il a été montré un défaut du développement céphalique et une dysplasie squelettique chez les souris porteuses d'une déficience génétique en perlécane. Une réduction et une désorganisation des fibrilles de collagène et des GAGs ont été globalement observées dans la MEC du cartilage de ces souris déficientes (Arikawa-Hirasawa, Watanabe et al. 1999). Ceci suggère que le perlécane joue un rôle important dans le processus de développement du tissu squelettique. Dans le cas décrit par Ritelli et al. (2015), la mutation du gène *B3GALT6* impacte de façon négative la biosynthèse des HS, donc leur organisation matricielle, et modifie le réseau d'interactions de ces macromolécules avec d'autres composants matriciels comme les collagènes. Par contre, aucune différence d'organisation et de niveau d'expression n'est détectée pour les chaînes de CS dans la MEC entre les fibroblastes des patients et les cellules contrôle (Ritelli, Chiarelli et al. 2015), résultat contradictoire avec celui observé par Malfait et al. (2013) pour lequel les

patients présentaient une réduction significative ou une absence de glycanation de la protéine *core* de la décorine *in cellulo* (Malfait, Kariminejad et al. 2013). Il est donc possible, au vu de ces différents résultats, que l'impact des différentes mutations sur le niveau d'expression et/ou l'activité de la β3GalT6 et par extension, sur le niveau d'expression des HS et des CS/DS, soit variable d'une mutation à l'autre, expliquant la diversité des symptômes et la variabilité de leur gravité, point que les cliniciens ne peuvent expliquer à l'heure actuelle. Cependant, les mécanismes par lesquels ces défauts génétiques affectant la β3GalT6 perturbent différentiellement les voies de synthèse des HS et des CS/DS reste difficile à comprendre dans l'état actuel des connaisances.

- Impact sur l'expression et l'organisation matricielle des collagènes

L'expression et l'organisation des collagènes ont été analysées dans les fibroblastes de derme des patients déficients par Ritelli et al. (2015). Le collagène de **type III** est bien structuré et localisé dans la MEC dans les cellules contrôle, alors qu'il est détecté et désorganisé dans le cytoplasme des fibroblastes déficients en β3GalT6. Il en est de même pour le collagène de **type V** dont l'expression est réduite, formant un réseau désorganisé dans la MEC des fibroblastes des patients par rapport aux cellules contrôle. **L'intégrine α2β1,** le récepteur transmembranaire du collagène de type I, impliqué dans la signalisation cellulaire régulant les phénomènes de migration, prolifération et différenciation cellulaires est présent, comme attendu, à la surface des cellules contrôle, mais n'est pas détecté dans les cellules déficientes (Ritelli, Chiarelli et al. 2015). Ces résultats indiquent que les mutations du gène *B3GALT6* impactent de façon négative la localisation et l'organisation globale du réseau matriciel en modulant les niveaux d'expression des différents types de collagène et des molécules qui interagissent avec eux dans les fibroblastes de derme des patients déficients.

Une réduction de l'expression de la protéine matricielle oligomérique du cartilage (COMP) a été observée dans les fibroblastes des patients déficients en β3GalT6 (Ritelli, Chiarelli et al. 2015). La **COMP** est une glycoprotéine non collagénique matricielle qui est principalement présente dans le cartilage, les ligaments, les tendons, les muscles squelettiques et la plaque de croissance. Elle est impliquée dans le développement du cartilage et dans l'ossification endochondrale (Koelling, Clauditz et al. 2006). Des mutations du gène *COMP* ont été identifiées et sont à l'origine de phénotypes cliniques qui sont proches de ceux observés chez les patients atteints de SED, comme une pseudo achondroplasie et une dysplasie épiphysaire multiple caractérisées par une petite stature, une brachydactylie, une hypermobilité articulaire,

une arthrose précoce et une scoliose (Briggs, Hoffman et al. 1995). Dans ce cas, les mutations du gène *B3GALT6* impactent de façon négative la transcription des gènes codant des facteurs importants dans le développement des tissus musculaires et squelettiques, mettant en évidence la relation entre la mutation du gène *B3GALT6*, son impact sur le taux d'expression des protéines matricielles et les altérations fonctionnelles des tissus qui en résultent.

Pour résumer, les résultats obtenus dans les fibroblastes de derme humain des deux patientes décrites par Ritelli et al. (2015), indiquent que les mutations du gène *B3GALT6* entrainent une perturbation de la biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique des chaînes de HS et CS/DS, et une dérégulation générale de la production des protéines de la MEC dans les tissus conjonctifs, comme les collagènes et la protéine COMP, et donc au final, conduisent à une perte de la fonctionnalité des tissus en relation directe avec la désorganisation matricielle observée chez les patients.

- Impact sur la voie de signalisation du TGFβ

La voie de signalisation du TGFβ (*transforming growth factor beta*) joue un rôle très important dans nombreux processus cellulaires comprenant la prolifération, la différenciation, la morphogenèse, l'apoptose et la régénération tissulaire (Shi and Massagué 2003). Les BMPs (*bone morphogenetic proteins*) sont des facteurs de croissance de la superfamille des TGFβ, qui sont impliquées dans la formation de l'os, la croissance, le remodelage osseux et la régénération squelettique (Chen, Zhao et al. 2004). Il a été montré chez les patients porteurs de mutations au niveau du gène *B3GALT6,* une modification de la transcription des gènes codant des protéines impliquées dans la transduction de la signalisation de la voie **TGFβ/BMP** (Ritelli, Chiarelli et al. 2015) **:** (i) Une régulation positive de l'expression des gènes ***GDF6,*** codant la protéine du même nom GDF6 (*growth differentiation factor 6*), un inhibiteur potentiel de la différenciation ostéogénique des cellules stromales de moelle osseuse humaine *in vitro* (Shen, Bhargav et al. 2009) et (ii) une augmentation de l'expression de ***BMPER*** (*BMP binding endothelial*) impliquée dans l'inhibition de la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes (Binnerts, Wen et al. 2004), et (iii) une régulation négative de l'expression du gène ***GDF15,*** codant la protéine GDF15 (*growth differentiation factor 15*) qui joue un rôle important dans le remodelage osseux (Hinoi, Ochi et al. 2012). Très récemment, les gènes *GDF15* et *COMP* ont été décrits comme des gènes candidats possibles pour entraîner une dysplasie congénitale de la hanche, qui est aussi présente chez les patients déficients en β3GalT6 (Lavrijsen, Leegwater et al. 2014). Une augmentation très importante de l'expression

du gène ***STEAP4,*** qui code la protéine STEAP4 (*six transmembrane epithelial antigen of prostate*), une ferroréductase endosomale, impliquée dans le développement et la fonction des ostéoclastes est observée dans les fibroblastes des patients (Ritelli, Chiarelli et al. 2015).

L'ensemble des résultats décrits dans la littérature suggère que la déficience génétique en β3GalT6 conduit à une augmentation de la résorption osseuse par les ostéoclastes et à une diminution de la formation osseuse par les ostéoblastes. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que le phénotype pathologique de l'os chez les patients atteints de SEMD-JL1 et SED présente (i) une biosynthèse aberrante des PGs, (ii) une diminution des marqueurs ostéogéniques, (iii) ainsi qu'une régulation négative des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de ces phénomènes, expliquant les altérations du squelette et les complications associées chez ces patients.

- Impact sur l'expression et l'activité des facteurs de transcription

Les mutations du gène *B3GALT6* peuvent également conduire à une réduction de l'expression des gènes codant des facteurs de transcription impliqués dans le développement du tissu musculaire squelettique, comme par exemple les gènes ***HOXD10*, *HOXD11* et *SHOX*** codant les protéines HOXD10 (*homeobox D10*), HOXD11 (*homeobox D11*) et SHOX (*short stature homeobox*) respectivement (Ritelli, Chiarelli et al. 2015). Des résultats indiquent que la modification de l'expression des gènes de ces facteurs de transcription contribue au développement des anomalies squelettiques observées chez les patients porteurs de la déficience génétique en β3GalT6.

L'ensemble des résultats obtenus nous permet d'avoir un meilleur aperçu des gènes potentiellement importants pour la fonctionnalité des tissus et le mécanisme moléculaire qui contribue à l'étiopathogénie de la déficience génétique de la β3GalT6 dans le processus physiopathologique de la perte de fonctionnalité globale des tissus conjonctifs et squelettiques observé chez les patients. La β3GalT6 joue un rôle précoce très important dans la biosynthèse des GAGs qui ont, en particulier, une fonction cruciale dans le processus de développement embryonnaire et postnatal ainsi que dans le maintien de la structure tridimensionnelle fonctionnelle de la MEC des tissus conjonctifs et squelettiques.

Tableau 9 Mutations du gène *B3GALT6* et de la protéine décrites chez les différents patients.
(A) Forme pléiotropique - Syndrome d'Ehlers-Danlos-like d'après Malfait et al. 2013. (B) Familles 1-7 : Dysplasie spondylo-épimétaphysaire avec hyperlaxité ligamentaire type 1 (SEMD-JL1) et familles 8-10 : Forme progéroïde du syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS-PF) d'après Nakajima et al. 2013. (C) Familles 1-5,8-10 : SEMD-JL1 d'après Vorster et al. 2015. (D) Patient 1 et 2 : SEMD-JL1 d'après Ritelli et al. 2015.

A)

Dénomination des patients	**Mutation au niveau du gène *B3GALT6***	**Mutation au niveau de la protéine β3GalT6**
Patient 2	c.619G>C	p.Asp207His
Patient 3	c.323_344del c.619G>C	Délétion p.Ala108Glyfs*163 p.Asp207His
Patient 5	c.649G>A	p.Gly217Ser

B)

Dénomination des familles de patients	**Mutation au niveau du gène *B3GALT6***	**Mutation au niveau de la protéine β3GalT6**
Family 1	c.1A>G c.694C>T	p.Met1 ? p.Arg232Cys
Family 2	c.1A>G c.466G>A	p.Met1 ? p.Asp156Asn
Family 3	c.1A>G	p.Met1 ?
Family 4	c.1A>G c.694C>T	p.Met1 ? p.Arg232Cys
Family 5	c.694C>T c.899G>C	p.Arg232Cys p.Cys300Ser
Family 6	c.1A>G c.193A>G	p.Met1 ? p.Ser65Gly
Family 7	c.200C>T c.694C>T	p.Pro67Leu p.Arg232Cys
Family 8	c.353delA c.925T>A	Délétion p.Ala118Alafs*160 p.Ser309Thr
Family 9	c.588delG c.925T>A	Délétion p.Arg197Alafs*81 p.Ser309Thr
Family 10	c.16C>T c.415_423del	p.Arg6Trp Délétion p.Met139Ala141

C)

Dénomination des familles de patients	**Mutation au niveau du gène *B3GALT6***	**Mutation au niveau de la protéine β3GalT6**
Family 1	c.16C>T c.200C>T	p. Arg6Trp p.Pro67Leu
Family 2	c.235A>G	p.Thr79Ala

Family 3	c.235A>G c.235A>G	p.Thr79Ala p.Thr79Ala
Family 4	c.235A>G	p.Thr79Ala
	c.200C>T c.235A>G	p.Pro67Leu p.Thr79Ala
Family 5	c.200C>T c.235A>G	p.Pro67Leu p.Thr79Ala
Family 8	c.235A>G	p.Thr79Ala
	c.235A>G c.235A>G	p.Thr79Ala p.Thr79Ala
Family 9	c.235A>G	p.Thr79Ala
	c.200C>T	p.Pro67Leu
Family 10	c.235A>G c.235A>G	p.Thr79Ala p.Thr79Ala

D)

Dénomination des patients	**Mutation au niveau du gène *B3GALT6***	**Mutation au niveau de la protéine β3GalT6**
Patient 1	c.227del c.766C>T	Délétion p.Ile76Thrfs*202 p.Arg256Trp
Patient 2	c.227del c.766C>T	Délétion p.Ile76Thrfs*202 p.Arg256Trp

Problématique de l’étude et objectifs de travail

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (SED) est un groupe de maladies génétiques rares qui conduit à des manifestations très diversifiées et de sévérité variable, touchant principalement les tissus conjonctifs comme la peau, les articulations et les vaisseaux sanguins. Les premières formes de SED décrites présentaient des mutations au niveau des gènes codant les collagènes fibrillaires ou les enzymes impliquées dans leur biosynthèse ou leur maturation. Plus récemment, les glycosyltransférases qui catalysent la formation de l'amorce tétrasaccharidique qui initie la biosynthèse des chaînes des GAGs sur les PGs, ont également été impliquées dans ce type de syndrome. Malgré la différence d'origine de la déficience génétique (collagènes ou PGs), les symptômes observés chez les patients atteints de SED présentent des caractéristiques communes comme des articulations hypermobiles, une fragilité de la peau et un défaut de cicatrisation associés à des altérations des tissus conjonctifs, en particulier au niveau du système musculo-squelettique.

L'équipe MolCelTEG s'est depuis de nombreuses années intéressée à la caractérisation structurale et fonctionnelle des glycosyltransférases impliquées dans les étapes précoces de la biosynthèse des GAGs, en particulier celle des enzymes responsables de la formation de l'amorce tétrasaccharidique (Bui, Talhaoui et al. 2010, Talhaoui, Bui et al. 2010). Dans un travail réalisé en collaboration avec notre équipe et le Centre de Génétique Médicale de Gand (Belgique), il a été montré que les fibroblastes de derme de peau des patients porteurs d'une déficience génétique en β3GalT6 présentaient un défaut de synthèse de GAGs membranaires et extracellulaires, associé à un retard de migration cellulaire par rapport aux cellules contrôle (non déficientes) (Malfait, Kariminejad et al. 2013). Ces résultats indiquent que la mutation du gène *B3GALT6,* codant une enzyme clé de la biosynthèse des GAGs, est responsable de la perte de fonctionnalité des tissus, et par extension, pourraient expliquer les symptômes observés chez ces patients atteints de SED, comme le retard de cicatrisation par exemple.

Sur la base des résultats obtenus par notre équipe et des récentes publications impliquant la β3GalT6 dans une maladie génétique rare des tissus conjonctifs, une forme pléiotropique de SED également appelé « SED-*like* », nous allons dans un premier temps essayer de comprendre dans quelle mesure la déficience enzymatique en β3GalT6 serait à l'origine des pertes de fonctions tissulaires observées chez les patients, en particulier en termes d'anabolisme des GAGs et de capacité migratoire des cellules. Les travaux effectués dans ce contexte ont été réalisés sur des fibroblastes de derme humain issus de patients atteints de SED ou des fibroblastes contrôle, issus de personnes non porteuses de la déficience génétique, de même âge

et de même sexe que les patients. Les cellules avec lesquelles nous avons travaillé nous ont été fournies par le Centre de Génétique Médicale de l'Université de Gand en Belgique avec lequel nous collaborons dans le cadre de ce projet.

Nous proposons dans ce travail d'étudier les conséquences physiopathologiques de la déficience génétique en β3GalT6 observées chez les patients atteints de SED dans lequel cette enzyme est mutée (voir stratégie expérimentale dans *Matériels et Méthodes*, Figure 12). Pour ce faire, nos objectifs ont été les suivants :

(1) Analyser les conséquences de la déficience génétique en β3GalT6 sur la biosynthèse des GAGs matriciels, l'activité galactosyltransférase de la β3GalT6, l'expression des HS membranaires et la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain issus des patients atteints de SED pour lesquels le gène *B3GALT6* est muté (par rapport aux cellules contrôles non déficientes prises comme témoins).

(2) Réaliser une étude de type « gain et perte de fonction » afin de comprendre le rôle de la déficience en β3GalT6 dans la physiopathologie du SED. Pour cela, nous avons :

(i) Etudié les conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* (en utilisant un siRNA) sur la biosynthèse des GAGs matriciels et l'expression des HS membranaires dans des fibroblastes de derme humain non déficients en culture et évalué leur capacité migratoire dans un test de cicatrisation dit de « *wound healing* »

(ii) Déterminé les conséquences de la restauration de l'expression de la β3GalT6 sur la biosynthèse des GAGs, l'expression des HS membranaires et la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain issus des patients atteints de SED. Cette étape permettra de savoir si la restauration de l'expression de la β3GalT6 dans des cellules déficientes peut d'une part être envisagée, et dans un deuxième temps, de voir si l'expression d'une enzyme sauvage au niveau de tissus déficients peut suffire à s'opposer aux déficits (anabolisme des GAGs, migration) observés dans les cellules possédant une enzyme mutée.

Matériels et Méthodes

Chapitre I. Matériels

I.1 Les réactifs chimiques et biochimiques

Le 4-Méthylombelliféryl-β-D-xylopyranoside (4-MOX), l'Uridine 5′-diphosphogalactose disodium salt (UDP-Gal), l'ampicilline, la kanamycine et le milieu *Luria Bertani* (LB) ont été fournis par Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Le 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphate/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT) provient de l'Amresco. Le disaccharide Gal-β1,4-Xyl(2-*O*-phosphate)-*O*-MethoxyNaphthyle (Gal-Xyl(2P)-OMN) a été gracieusement fourni par Dr Chrystel Lopin-Bon (Institut de chimie organique et analytique COA-UMR7311, Université d'Orléans, France).

L'anticorps polyclonal anti-HA (*human influenza hemagglutinin*) et l'anticorps polyclonal anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline ont été fourni par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le $Na_2{}^{35}SO_4$ était fourni par Perkin Elmer Life Sciences (Courtabœuf, France). La résine Sephadex G50 fine provient d'Amersham Biosciences (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). L'albumine sérique bovine (BSA*, Bovin Serum Albumin*) est fournie par Euromedex (Souffelweyersheim, France). Des anticorps utilisés pour l'étude de l'immunofluorescence sont listés dans le Tableau 10.

Tableau 10 Fournisseurs et sources biologiques des anticorps utilisés dans l'immunofluorescence.

Anticorps	Source biologique	Fournisseur
Anti-HS (H1890, 10E4 epitope)	Souris	USBiological, USA
Anti-β3GalT6	Souris	Abnova, Taiwan
Anti-GOLPH4	Lapin	Abcam, France
Anti-souris conjugué AlexaFluor488	Chèvre	Invitrogen, USA
Anti-lapin conjugué AlexaFluor555	Chèvre	Invitrogen, USA

I.2 Les lignées cellulaires et les milieux utilisés en culture cellulaire

Les fibroblastes de derme humain issus de patients atteints de syndrome d'Ehlers-Danlos (Tableau 11) et les fibroblastes contrôles (issus de biopsies de peau de personnes de même âge et de même sexe que les patients, mais non porteuses de l'altération génétique) ont été gracieusement fournis par le Dr Fransiska Malfait (Centre de Génétique Médicale, Gand, Belgique).

Tableau 11 Mutations du gène *B3GALT6* et de la protéine décrites chez les différents patients atteints du syndrome d'Ehlers-Danlos.

Dénomination des patients	Mutation au niveau du gène *B3GALT6*	Mutation au niveau de la protéine β3GalT6
Patient 2#	c.619G>C	p.Asp207His
Patient 3	c.323_344del c.619G>C	Délétion p.Ala108Glyfs*163 p.Asp207His
Patient 5#	c.649G>A	p.Gly217Ser
F1500081	c.795A>C c.929A>G	p.Glu265Asp p.Tyr310Cys
F1400276	c.477del c.782G>A	Délétion p. Phe160Serfs*118 p.Arg261His
F1400359#	c.545A>G	p.(Tyr182Cys)
F1400007	c.513_520del c.181G>C	Délétion p.Glu174Alafs*266 p.Val61Leu

: mutation homozygote.
fs*: *frame-shift*, mutation provoquée par des délétions ou des insertions de nucléotides non multiple de 3 conduisant un changement de cadre de lecture.

Les cellules HeLa (cellules épithéliales humaines de carcinome de col utérin) sont obtenues auprès de la banque de cellules « *European Collection of Cell Culture* » (ECACC, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les cellules CHO pgsB-618 (cellules d'ovaire de hamster chinois déficientes en β4GalT7, CRL-2241) proviennent de la banque de cellules *« American Type Culture Collection »* (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France).

Les milieux de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), la glutamine, la pénicilline/streptomycine, le mélange d'acides aminés non essentiels (*men non-essential amino acids*) proviennent de Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), et le SVF (sérum de veau fœtal) est fourni par Dominique Dutscher (Brumath, France). Les inserts de culture utilisés pour les tests de cicatrisation cellulaire proviennent d'Ibidi (Biovalley, Marne-la-Vallée, France).

I.3 Les réactifs de biologie moléculaire

Le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1a (+) a été fourni par Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). L'agent de transfection DharmaFECT 2 provient de ThermoFisher Scientific. Le kit d'électroporation pour les fibroblastes (Amaxa® Human Dermal Fibroblast Nucleofector® Kit) a été fourni par Lonza (Amboise, France).

Le siRNA contrôle, le siRNA dirigé contre le gène *B3GALT6* ainsi que le kit d'extraction

d'ARN (RNeasy Mini Kit) proviennent de Qiagen (Courtabœuf, France). La séquence nucléotidique du siRNA β3GalT6 est présentée dans le Tableau 12. La réaction de transcription inverse (*reverse transcriptase*, RT) est réalisée avec le kit SuperScript VILO (Invitrogen). L'agent intercalent utilisé pour les réactions de PCR (*polymerase chain reaction*) quantitative, le SYBR Green a été fourni par Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France).

Tableau 12 Séquences nucléotidiques du siRNA-β3GalT6.

Nom siRNA	Séquence nucléotidique	
siRNA β3GalT6	Sens Antisens	5'-CGUCUCUCACGUACUUUAATT-3' 5'-UUAAAGUACGUGAGAGACGGG-3'

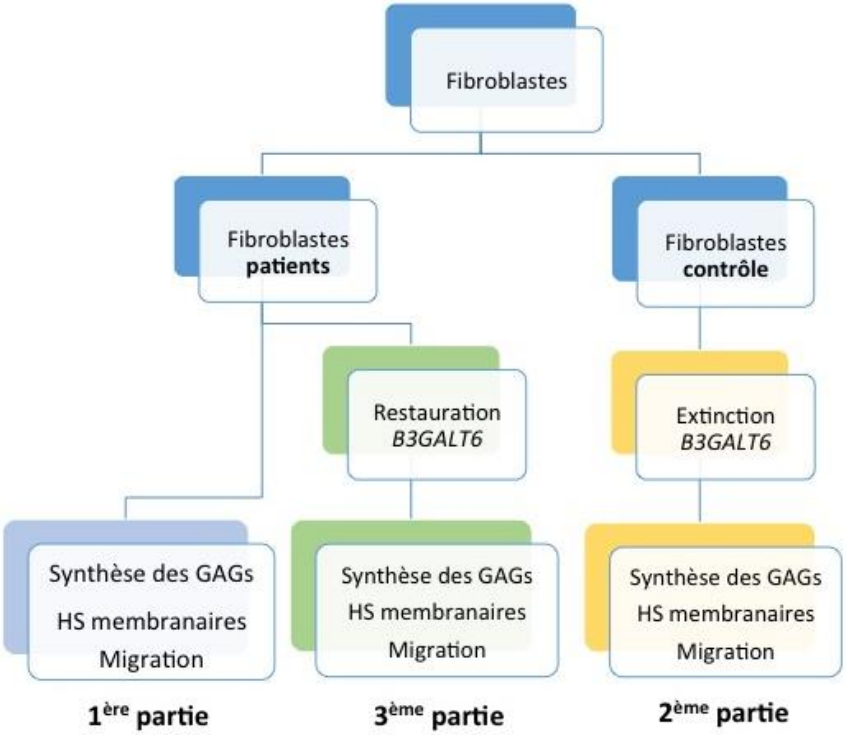


Figure 12 Représentation schématique de la stratégie expérimentale utilisée dans cette étude.
1ère partie : Analyse de la biosynthèse des GAGs matriciels et de la capacité migratoire des **fibroblastes de derme humain issus de patients** atteints du syndrome d'Ehlers-Danlos (SED). L'analyse de la synthèse des GAGs repose sur la mesure du taux d'incorporation du soufre radiomarqué ($Na_2SO_4[^{35}S]$) dans les chaînes de GAGs néo-synthétisées à partir d'un xyloside exogène, le 4-méthylombelliferyl-β-D-xylopyranoside (4-MOX). L'immunofluorescence indirecte est réalisée pour analyser l'expresssion des HS membranaires des fibroblastes. La capacité migratoire des fibroblastes est analysée par un test de cicatrisation. **2ème partie** : Analyse des conséquences de l'**extinction** du gène de la β3GalT6 sur l'expression de la β3GalT6 et la synthèse des GAGs (matriciels et HS membranaires) dans des fibroblastes de derme humain non déficients en culture et sur leur capacité migratoire après une transfection par un siRNA ciblant le gène *B3GALT6*. **3ème partie** : Analyse des conséquences de la **restauration** de l'expression du gène *B3GALT6* sur l'expression de la β3GalT6, la biosynthèse des GAGs (matriciels et HS membranaires) et sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain issus des patients après électroporation d'un vecteur recombinant contenant la séquence codant la β3GalT6.

Chapitre II. Méthodes expérimentales

II.1 Culture cellulaire : entretien et congélation des cellules

Les fibroblastes de derme humain issus de patients atteints d'une forme pléiotropique de SED (Tableau 11) et les fibroblastes contrôle (non déficients) sont cultivés dans un milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, 4.5g/L D-Glucose) auquel sont ajoutés 1% (v/v) d'acides aminés non essentiels, 1% (v/v) du mélange d'antibiotiques pénicilline/streptomycine et 10% (v/v) de SVF préalablement décomplémenté. Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO_2 dans des flasques de 75 cm² (Corning Incorporated, NY, Costar®). Le milieu est renouvelé tous les 2-3 jours.

Des stocks de cellules sont réalisés à différents passages de culture dans un milieu contenant 10% (v/v) de DMSO et 20% (v/v) de SVF. Les cryotubes préparés sont alors placés dans un système de congélation approprié (chambre de congélation) à -80°C puis stockés à plus long terme dans un congélateur à -145°C ou dans l'azote liquide.

II.2 Evaluation de l'activité galactosyltransfé ase par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

II.2.1 Préparation des homogénats cellulaires et dosage des protéines totales

Les fibroblastes de derme humain en culture sont dans un premier temps rincés par du tampon PBS (*phosphate buffered saline*) puis détachés de leur support de culture par l'ajout d'une solution à 5mM du mélange trypsine-EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*, pH 7.0) avant d'être centrifugées 10min à 200g. Les culots cellulaires sont repris dans un tampon 50mM Bis-Tris (pH 6.5), contenant 10mM $MnCl_2$ et 0.1% (v/v) Triton X-100. Les membranes cellulaires sont lysées grâce à trois cycles de congélation-décongélation « *freeze-thaw cycles* » (5min à -145°C puis 3min à 37°C) successifs.

La méthode de Bradford (1976) a ensuite été utilisée pour déterminer la concentration de protéines totales dans les lysats cellulaires. Il s'agit d'une méthode colorimétrique utilisant le bleu de Coomassie qui se fixe sur les acides aminés basiques des protéines. Une gamme étalon est systématiquement réalisée en parallèle des échantillons à doser à partir d'une solution de BSA de concentration connue. La DO (densité optique) à 595nm est mesurée 5min après l'ajout du réactif coloré contenant le bleu de Coomassie. Les concentrations protéiques totales des

échantillons à doser sont déduites à partir de celle obtenues avec la gamme étalon.

II.2.2 Evaluation de l'activité galactosyltransférase

La réaction enzymatique est basée sur l'incubation des homogénats cellulaires en présence du substrat donneur (UDP-Gal) de l'enzyme et du substrat accepteur, le disaccharide phosphorylé, Gal-Xyl(2P)-OMN. L'incubation est réalisée à 37°C durant 2h dans un volume final de 50 µL contenant :

- 50µg des homogénats cellulaires
- 50mM de tampon Bis-Tris (pH 7.2), contenant 5mM $MnCl_2$
- 5mM Gal-Xyl(2P)-OMN (substrat accepteur)
- 2mM UDP-Gal (substrat donneur).

La réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans la glace et en ajoutant 5 µL d'HCl 6N. Les essais sont centrifugés 10 min à 10 000g à 4°C, puis les surnageants contenant potentiellement les produits de réaction sont analysés par CHLP en phase inverse sur une colonne C18 (XBridge, 4.6 x 150 mm, 5 µm, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) en utilisant une chaîne (Alliance Waters e2695) équipée d'un détecteur UV (Waters 486). La phase mobile permettant la séparation du produit de réaction du substrat non métabolisé est composée de 18% (v/v) acétonitrile/H2O, 0.02% (v/v) acide trifluoroacétique (TFA). Le produit de réaction est détecté en suivant l'absorbance à 320 nm, puis quantifié au moyen d'une gamme étalon (allant de 0 à 50nmol) analysée en parallèle des échantillons à partir de dilutions successives de produit de réaction Gal-Gal-Xyl(2P)-OMN. L'activité enzymatique de la β3GalT6 est exprimée en nanomoles de produit formé au cours du temps, rapportées à la quantité de protéines totales présentes dans l'échantillon (nmoles/min/µg protéines totales).

II.3 Transfection des fibroblastes de derme humain (contrôle, non déficients) par les siRNA ciblant le gène *B3GALT6*

Les fibroblastes de derme humain contrôle sont transfectés par un siRNA contrôle (contrôle négatif, siRNA ne ciblant aucun gène humain) ou un siRNA dirigé spécifiquement contre le gène *B3GALT6* (Qiagen) en utilisant l'agent de transfection DharmaFECT 2 (Thermo Scientific Dharmacon®).

A partir d'une flasque de 75cm² contenant des fibroblastes à environ 80% de confluence

(environ 2 000 000 à 4 000 000 cellules), une étape de trypsination suivie d'une centrifugation à 110g pendant 5 minutes permettent de récupérer le culot cellulaire qui est resuspendu dans 1mL de milieu DMEM complet sans antibiotique afin de procéder au comptage des cellules : 10µL de cette suspension cellulaire et 10µL de Bleu Trypan sont additionnés et placés dans une cellule de comptage (compteur automatique de cellules TC20, Biorad). Une fois le comptage effectué, les cellules sont ensemencées en plaques 12 puits (Corning Incorporated, NY, Costar®) à une densité d'environ 100 000 cellules vivantes par puits si le pourcentage de viabilité est supérieur à 90%, et placées durant toute la nuit à l'incubateur à 37°C.

Le mélange de transfection contenant 10 nM de siRNA (contrôle ou β3GalT6) et 5µg/mL d'agent de transfection DharmaFECT2 est déposé à sec sur le tapis cellulaire. Les cellules sont ensuite laissées en culture à 37°C pendant 24 heures dans 1mL de milieu complet sans antibiotique par puits. Une manipulation contrôle sans siRNA, mais en présence de l'agent de transfection est réalisée en parallèle afin de s'assurer de la non-toxicité de cet agent sur les cellules dans nos conditions expérimentales.

II.4 Analyse de la restauration de l'expression de la β3GalT6 sauvage dans les fibroblastes de patients

La restauration de l'expression de la β3GalT6 recombinante sauvage dans les fibroblastes de patients s'effectue par transfection en utilisant la technique d'électroporation selon les recommandations du fournisseur Lonza (Amboise, France). L'électroporation est une méthode qui permet l'exposition des cellules vivantes à des impulsions électriques courtes pour induire des changements de la différence de potentiel transmembranaire. Les membranes cellulaires sont ainsi déstabilisées, créant transitoirement des pores membranaires par lesquels l'ADN plasmidique peut entrer dans la cellule.

A partir d'une flasque de 75cm² contenant des fibroblastes à environ 80% de confluence, une étape de trypsination est suivie du comptage des cellules (voir partie II.3). 400 000 cellules sont récupérées et centrifugées à 110g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est resuspendu dans 100µL de la solution Nucleofector® fournie dans le kit d'électroporation, avant l'addition de 2-3µg d'ADN. Dans un premier temps, un plasmide contenant la séquence codant la GFP a été utilisé pour évaluer l'efficacité de la technique de transfection utilisée. Une fois la technique mise au point, le plasmide recombinant pcDNA3.1-β3GalT6 a été transfecté selon cette technique dans les cellules fibroblastiques de patients. Le mélange cellules/ADN est ensuite

transféré dans une cuvette dédiée (fournie dans le kit) cuvette placée ensuite dans l'appareil d'électroporation Amaxa Biosystems Nucleofector II en suivant les instructions du fournisseur. Une fois la transfection effectuée, les cellules sont ensemencées en plaques 12 puits (le contenu d'une cuvette d'électroporation ensemencée par puits), et placées à l'incubateur à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% (v/v) CO_2. Les cellules sont ensuite collectées 24, 48 ou 72h post-transfection pour analyse.

II.5 Analyse de l'expression des ARNm de la β3GalT6 par RT-PCR quantitative

Le niveau d'expression des ARNm de la β3GalT6 dans les fibroblastes de derme humain est quantifiée par RT-PCR quantitative 24h, 48h et 72h après la transfection par les siRNA dans les différentes conditions expérimentales (siRNA contrôle ou siRNA β3GalT6).

II.5.1 Extraction des ARNm totaux

Les ARNm totaux sont extraits en suivant les instructions du kit Qiagen® Rneasy Mini (Qiagen). La concentration des ARNm totaux est ensuite évaluée par la mesure de l'absorbance à 260nm et 280nm sur le spectrophotomètre Nanodrop® (Spectrophotometer ND-1000, ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA). La qualité et la pureté des ARNm extraits sont évaluées grâce au rapport A_{260nm}/A_{280nm} qui doit être compris entre 1.8 et 2.

II.5.2 RT-PCR quantitative

La rétro-transcription (RT) de l'ARNm en ADNc est effectuée en utilisant 1µg d'ARNm à l'aide du kit Super Script VILO® cDNA Synthesis (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur dans les conditions expérimentales suivantes : (1) 10 minutes à 25°C, (2) 60 minutes à 42°C, (3) 5 minutes à 85°C. La réaction de PCRq a été réalisée en plaques 96 puits sur l'appareil Applied Biosystems® StepOnePlus™ Real-Time PCR System dans un volume final de 20µL, contenant 2µL de la dilution d'ADNc (dilution au 1/10ème dans de l'eau ultra pure sans RNase), 4pmoles des amorces *B3GALT6* (QuantiTect® primer assay, Qiagen) ou 10 pmoles des amorces de *Ribosomal Protein S29* (RPS 29) utilisées comme gène de ménage et 10µL de SYBR Green (BioRad). La réaction de PCRq comprend les étapes décrites dans le Tableau 13.

La méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ est utilisée pour déterminer les niveaux d'expression relative des ARNm de la β3GalT6 dans les différentes conditions expérimentales après normalisation par rapport au

gène de référence RPS 29.

Tableau 13 Durées et températures des différentes étapes du protocole de PCRq utilisées pour quantifier les niveaux d'expression relative des ARNm de la β3GalT6.

95°C	15 minutes	
95°C 60°C 72°C	15 secondes 25 secondes 20 secondes	45 cycles
RT95°C 60°C 95°C	15 secondes 1 minute 15 secondes	

II.6 Analyse de l'expression des protéines recombinantes par immunoblot

30µg de protéines totales sont mélangées (v/v) dans un tampon contenant un mélange β-mercaptoethanol : bleu de laemmli (1 : 19) contenant 62.5mM tris-HCl (pH 6.8), 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glycérol, 0.01% (p/v) bleu de bromophenol. Les protéines sont dénaturées durant 5min à 95°C dans ce mélange avant d'être déposées dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) à 10% (p/v). L'électrophorèse est effectuée à un ampérage constant de 20mA (4mA/cm² gel) pendant 90 minutes. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (*polyvinylidene difluoride*, Millipore, Eschborn, Allemagne) en milieu semi-sec, dans un appareil d'électro-transfert Trans-Blot (Bio-Rad), sous un voltage constant de 15V par gel pendant une heure. Après le transfert, la membrane est saturée durant 1h sous agitation par une solution à 5% (p/v) de BSA diluée dans un tampon TBST (*tris buffer saline tween*, composé de 150mM Tris-HCL (pH 8.5), 10mM NaCl, 1% (v/v) Tween 20, 0.02% (p/v) azide de sodium). La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt ou l'étiquette portée par la protéine d'intérêt (dans notre cas, l'anticorps utilisé (anti-HA, 1/10 000) est dirigé contre l'étiquette HA de la β3GalT6). Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois avec le tampon TBST et incubée avec un anticorps secondaire anti-IgG couplé à la phosphatase alcaline. La présence de la protéine recombinante est révélée par l'ajout de BCIP/NBT (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphate/Nitro Blue Tetrazolium*), substrat de la phosphatase alcaline, qui permet de développer une coloration bleu-violet suite à sa métabolisation. L'expression de la protéine pourra ainsi être visualisée sur les membranes.

II.7 Analyse de la synthèse des GAGs à partir d'un xyloside exogène, le 4-Methylombelliferyl-β-D-xylopyranoside (4-MOX).

L'analyse de la biosynthèse des GAGs repose sur la mesure du taux d'incorporation du soufre radiomarqué ($Na_2{}^{35}SO_4$) dans les chaînes de GAGs néo-synthétisées. Pour ce faire, après extinction de l'expression du gène *B3GALT6* dans les cellules contrôle (voir partie II.3) ou restauration de son expression dans les fibroblastes de patients (voir partie II.4), les cellules sont cultivées pendant 48h dans le milieu Fisher's(+) L-Glutamine supplémenté par 2% (v/v) de SVF, contenant le sulfate de sodium $Na_2{}^{35}SO_4$ (10µCi/mL), en présence de concentrations croissantes de 4-MOX (0 à 10µM final).

-Méthode (i) : Après 48h, le milieu de culture des cellules est recueilli et déposé sur une colonne de filtration sur gel Sephadex G-50 fine (GE Healthcare). Des fractions de 1.5mL sont collectées à la sortie de la colonne et la radioactivité présente dans les différentes fractions est mesurée par comptage en scintillation liquide (dans le mélange de scintillation Ultima Gold™, Perkin Elmer).

-Méthode (ii) : Après 48h, les chaînes de GAGs néo-synthétisées dans le milieu de culture des fibroblastes sont précipitées par 4 volumes d'éthanol (96% (v/v)) et sont repris dans 1mL de l'eau. Les suspensions aqueuses sont filtrées (*Glass microfiber filters*, GF/C™ diameter 25mm, GE Healthcare Life Sciences) pour séparer les chaînes de GAGs radiomarquées du précurseur radioactif $Na_2{}^{35}SO_4$ non-incorporé. La radioactivité présente sur le filtre (correspondant à celle des GAGs synthétisés) est mesurée par comptage en scintillation liquide.

Les cellules sont grattées en parallèle dans 100µL de tampon PBS-1% (v/v) SDS. La concentration en ADN double brin des cellules (proportionnelle au nombre de cellules présentes dans les puits) est évaluée par fluorimétrie à l'aide du kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen™) suivant les instructions du fournisseur sur l'appareil Qubit® 2.0 Fluorometer.

Le taux de synthèse des GAGs matriciels des fibroblastes à partir du 4-MOX est finalement évalué en rapportant la radioactivité associée aux GAGs radiomarqués à la quantité d'ADN présente dans les différents puits.

II.8 Test de cicatrisation / «*wound healing test*»

Les fibroblastes de derme humain sont cultivés en boîte *µ-Dish 35mm, high* (Ibidi®) contenant

une chambre en silicone délimitant deux compartiments de culture et permettant de créer une brèche cellulaire lors de son retrait. Les fibroblastes sont ensemencés séparément dans chacune des deux chambres de l'insert à une densité de 35 000 cellules (10 000 cellules pour la transfection de siRNA) dans 70µL de milieu complet sans antibiotique, et placés durant toute la nuit à l'incubateur à 37°C afin d'obtenir une adhésion complète.

Le lendemain, le mélange de transfection contenant 0.7pmoles de siRNA et 0.35µL de DharmaFECT 2 est déposé à sec sur le tapis cellulaire. Les cellules sont incubées à 37°C dans 70µL de milieu sans antibiotique par chambre. 24h après la transfection par le siRNA contrôle ou le siRNA β3GalT6, le milieu de culture et la chambre de silicone sont retirés créant une brèche au milieu des cellules des deux compartiments, et représentant le point de départ de notre test de migration (t = 0h). La boîte de culture est remplie avec 2mL de milieu complet et des photos sont prises après 20h (t = 20h) et 40h (t = 40h) de culture afin d'observer le recouvrement éventuel de la brèche par les cellules qui migrent. Le nombre de fibroblastes ayant migré dans la brèche est déterminé en utilisant le logiciel Photoshop CS6.

II.9 Analyse de l'expression des HS membranaires par immunofluorescence

Les analyses d'immunofluorescence indirecte ont pour but de marquer les chaînes de HS présentes à la surface des cellules à l'aide d'un anticorps spécifique, anti-HS (10E4 épitope) reconnaissant un épitope contenant des résidus glucosamine N-sulfatés dans les chaînes de HS. Les cellules en culture (70% de confluence) sont d'abord rincées avec du tampon PBS, puis fixées avec une solution de PFA (para formaldéhyde) à 4% (p/v) durant 10 min. Les sites de fixation non spécifiques sont ensuite bloqués avec une solution à 5% (p/v) de BSA diluée dans un tampon PBS. L'anticorps primaire anti-HS (dilution 1/70) est alors placé au contact des cellules pendant une heure. Les cellules sont ensuite lavées par du tampon PBS puis incubées 1h en présence du deuxième anticorps (secondaire) conjugué à l'AlexaFluor 488 anti-souris de chèvre (préparé à la dilution 1/1000). Après lavage, les lamelles sont incubées en présence d'une solution intercalente de TO-PRO-3 (Life Technologies) à 1µM afin de visualiser les noyaux cellulaires. Enfin, les lamelles sont lavées dans une solution de PBS avant leur analyse microscopique réalisée à l'aide du microscope confocal SP5-X laser (Plate Forme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, PTIBC IBISA - FR 3209 et UMR 7365 CNRS Université de Lorraine, Biopole, Vandoeuvre-lès-Nancy).

II.10 Analyse de l'expression de la β3GalT6 dans les fibroblastes de patients par immunofluorescence

Après une étape de fixation des cellules comme précédemment décrit dans la partie II.9, les cellules sont incubées dans une solution détergente (perméabilisante) de triton X-100 à 0.5% (p/v). Cette étape est nécessaire pour favoriser l'entrée de l'anticorps dans la cellule afin qu'il puisse atteindre sa cible moléculaire. L'étape de perméabilisation est suivie d'une étape de blocage grâce à une solution de BSA (5% (p/v)). Les cellules sont ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire anti-β3GalT6 de souris (dilution de 1/50) pendant 1h, et enfin incubées une heure en présence de l'anticorps secondaire conjugué à l'AlexaFluor 488 anti-souris de chèvre (dilution 1/1000). Après lavage par la solution de PBS, les cellules sont mises en présence d'un anticorps ciblant un marqueur moléculaire de l'appareil de Golgi, l'anticorps primaire anti-GOLPH4 de lapin (dilution 1/400), suivie par 1h d'incubation de l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué AlexaFluor555 (dilution 1/1500). Enfin, après lavage, l'analyse microscopique de l'expression de la β3GalT6 est réalisée à l'aide du microscope confocal SP5-X laser (Plate Forme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, PTIBC IBISA - FR 3209 et UMR 7365 CNRS Université de Lorraine, Biopole, Vandoeuvre-lès-Nancy).

Résultats et Discussion

Chapitre I : Analyse de l'effet des mutations de la β3GalT6 sur la biosynthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme humain issus de patients atteints de SED.

Comme nous l'avons décrit dans la première partie de l'introduction bibliographique, les patients porteurs de mutations au niveau du gène *B3GALT6* présentent des symptômes communs au SED, comme une peau hyperextensible ou une hypermobilité des articulations. Malgré tout, le degré de sévérité de la maladie est variable d'un patient à l'autre avec des signes cliniques plus ou moins prononcés au niveau craniofacial ou au niveau du système musculo-squelettique (Tableau 14).

Tableau 14 Description des signes cliniques des patients porteurs de mutations au niveau du gène *B3GALT6*
(Malfait, Kariminejad et al. 2013 et publication en cours de rédaction)

Patients	Sexe	Ages	Signes craniofaciaux	Signes musculosquelettiques	Caractéristiques de la peau	Autres
Patient 2	M	26 ans	Menton proéminent Sclérotique bleue Fissures palpébrales Petites dents	Hypotonie musculaire Cyphoscoliose Hyperlaxité des articulations Contractures articulaires développées Fractures récurrentes	Mince Hyperextensibilité Retard de cicatrisation Cicatrices atrophiques	Déficience intellectuelle
Patient 3	M	9 ans	Sclérotique bleue Oreilles basses Petites dents jaunes Asymétrie du crâne Prognathisme	Pieds bots Luxation congénitale bilatérale des hanches Cyphoscoliose sévère Hypotonie musculaire importante Hyperlaxité des articulations Hypotonie musculaire Fractures récurrentes	Mince Hyperextensibilité Veines visibles Cicatrices atrophiques	Rattachement de la rétine hémorragie cérébrale Déficience intellectuelle
Patient 5	F	20 mois	Sclérotique bleue Proptosis Nez court	Pieds bots Luxation congénitale bilatérale des hanches Hypotonie musculaire Hyperlaxité des articulations Fractures récurrentes	Veloutée Pâteuse à toucher	Déficience intellectuelle
F1500081	M	12 mois	Plagiocéphalie Proptose Sclérotique bleue dents hypoplastiques	Contractures articulaires Scoliose Hypotonie musculaire Fractures récurrentes Hypermobilité et luxations des articulations	Mince et fragile Pâteuse à toucher	hémorragie intracrânienne Trachéomalacie
F1400276	F	13 mois	Long philtrum Pont nasal déprimé	Scoliose Hypotonie musculaire	Pâteuse à toucher	Hypoplasie pulmonaire

			Sclérotique bleue	sévère Hyperextensibilité des articulations Luxation bilatérale des hanches Contractures articulaires		Atelectasie
F1400359	M	8 ans	Long philtrum Nez courte Fissures palpébrales downslanting Sclérotique bleue	Petite stature Pieds bots Pectus excavatum Hypermobilité et luxations des articulations	Velouté Sans élasticité	-

I.1 Analyse de la synthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme de peau des patients atteints de SED et les fibroblastes contrôle à partir d'un xyloside exogène, le 4-méthylombelliferyl-β-D-xylopyranoside (4-MOX).

A. Patient 2, Patient 3 et Patient 5 (description des mutations dans le Tableau 11) et contrôle (Malfait, Kariminejad et al. 2013).

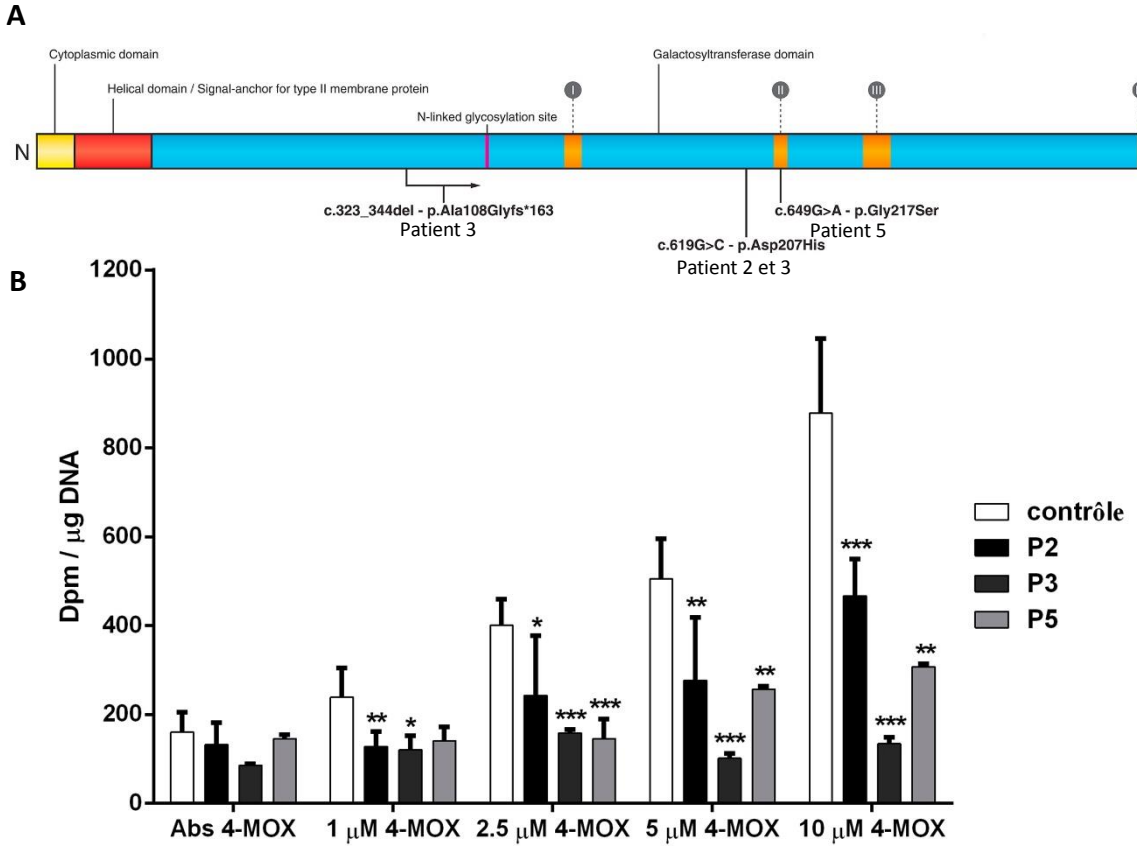


Figure 13 Analyse de la conséquence de la mutation du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme humain.
(A) Représentation schematique des différents domaines protéiques de la β3GalT6 et de l'emplacement des différentes mutations des patients 2, 3 et 5 (P2, P3 et P5, Tableau 11). Les sites conservés (notés I-IV, en orange) ont été identifiés par rapport aux alignements des séquences primaires des β3GalT6 chez

différentes espèces (Malfait, Kariminejad et al. 2013). (B) Les fibroblastes des patients 2, 3 et 5 (P2, P3 et P5, Tableau 11) et les fibroblastes contrôle sont cultivés en présence de soufre radiomarqué pendant 48h comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. La synthèse des GAGs est évaluée pour les différentes cellules en rapportant la radioactivité associée aux chaînes de GAGs néo-synthétisées à partir du 4-MOX à la quantité d'ADN quantifiée dans chaque condition expérimentale. n = 3 (expériences indépendantes réalisées en triplicat), *$p<0.05$, ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$, test *t* de Student

Afin de mieux comprendre les conséquences de la déficience génétique causée par la mutation du gène *B3GALT6*, nous avons d'abord évalué la capacité de synthèse des GAGs matriciels des fibroblastes des patients 2, 3 et 5 atteints d'une forme pléiotropique de SED (P2, P3 et P5, Tableau 11) et des fibroblastes contrôle à partir d'un xyloside exogène, le 4-MOX.

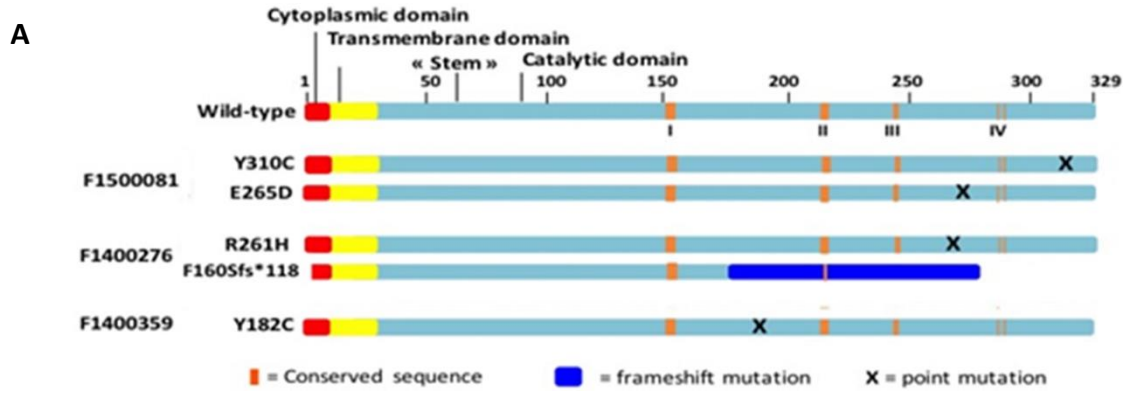
Les résultats de la Figure 13 montrent qu'il n'y a pas de différence significative du taux de synthèse des GAGs entre les fibroblastes des patients et celui des cellules contrôle en absence de xyloside exogène dans le milieu de culture. Une diminution modérée mais significative du taux de synthèse des GAGs est observée en présence de 1µM final de 4-MOX, chez les patients 2 et 3, mais n'est pas significative pour le patient 5, même si une réduction globale de l'anabolisme est relevée dans nos conditions expérimentales. Les différences sont plus marquées entre les patients en présence de plus fortes concentrations en xylosides exogènes, en particulier à la plus forte concentration testée ici (10µM final). Dans ces conditions, les taux de synthèse des GAGs dans les fibroblastes des **patients 2 et 5** ont été réduits de 45% et 65% respectivement et de plus de 80% pour les fibroblastes du **patient 3** par rapport aux fibroblastes contrôle (Figure 13).

En conclusion de cette expérimentation, nous pouvons observer que la synthèse des GAGs matriciels à partir d'un xyloside exogène est globalement réduite de façon significative (entre 50% et 80% environ) dans les fibroblastes des patients par rapport aux fibroblastes contrôle. Le plus faible taux de synthèse des GAG est observé dans les cellules du patient 3 qui porte une mutation ponctuelle Asp207His associée à une délétion (Tableau 11). Dans ce cas, la synthèse des chaines de GAGs à partir du xyloside exogène est quasiment inexistante dans la mesure où le taux de synthèse observé dans les cellules du patient 3 en présence de 10µM de 4-MOX est très proche de celui relevé en absence de xyloside. Il semble donc que les cellules de ce patient ne soient pas capables de produire des chaines de GAGs, ou alors en quantité très faible, dans nos conditions expérimentales, attestant de la non-fonctionnalité de la β3GalT6 à initier ce phénomène.

Par contre, les fibroblastes des patients 2 et 5 porteurs d'une mutation ponctuelle localisée dans le site actif de l'enzyme (Asp207His et Gly217Ser respectivement) montrent un taux de synthèse diminué, mais moins prononcé que celui observé chez le patient 3. Les cellules de ces patients sont donc capables de synthétiser des GAGs à partir du xyloside exogène, même si le taux de synthèse est très réduit par rapport aux cellules non déficientes. L'impact de ces mutations ponctuelles semble donc moins important en termes d'anabolisme que la double mutation ponctuelle/délétion décrite pour le patient 3. Il est important de noter que les résidus Asp207 et Gly217 sont situés dans des motifs conservés de la β3GalT6 (vu par rapport aux alignements des séquences primaires des protéines chez différentes espèces) (Malfait, Kariminejad et al. 2013). A ce stade, nous pouvons donc supposer que ces résidus peuvent avoir un rôle soit dans la fixation des substrats, soit dans la catalyse. Ces résultats peuvent nous amener à penser que la mutation ponctuelle d'un seul résidu présent au niveau d'un motif conservé de la β3GalT6 suffit à altérer de façon plus ou moins importante en fonction de la mutation, la capacité de cette enzyme à initier la biosynthèse des GAGs matriciels.

Ces résultats sont en accord avec des résultats obtenus *in vitro* dans lesquels l'activité enzymatique de la β3GalT6 a été mesurée dans des homogénats cellulaires préparés à partir des fibroblastes des patients et des fibroblastes contrôle (*résultats non présentés*). Dans ces différentes séries d'expériences, il a été observé que l'activité GalT des cellules contrôle était supérieure (d'environ un facteur 2) à celle des cellules des patients 2 et 5. Par contre, cette activité est plus faible chez le patient 3, voire à la limite du seuil de détection de la méthode analytique. Ces résultats vont donc dans le même sens que les essais d'anabolisme cellulaire et suggèrent fortement que l'incapacité des cellules des patients à initier la biosynthèse des GAGs est liée à une activité réduite de la β3GalT6 au niveau de ces cellules.

B. Patients F1500081, F1400276 et F1400359 (description des mutations dans le Tableau 11) et contrôles appariés (publication en cours de rédaction).



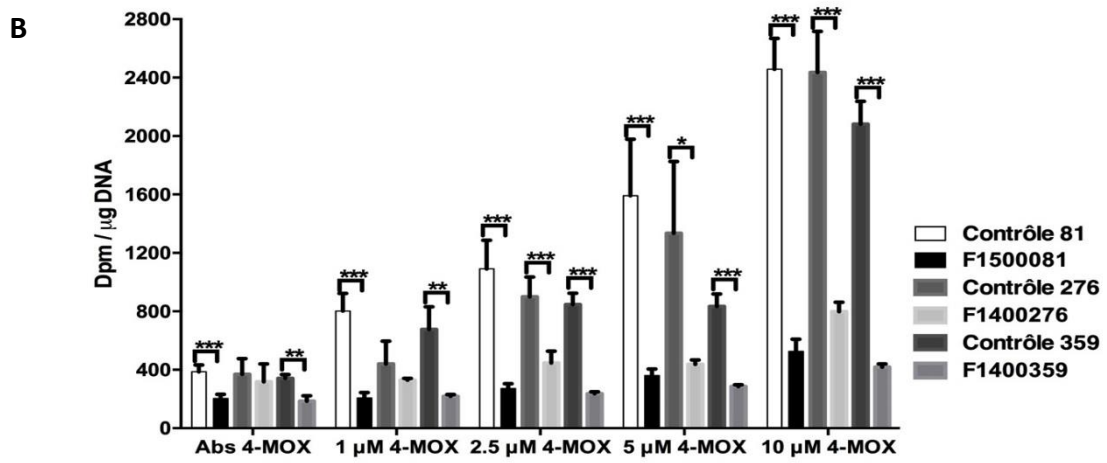


Figure 14 Analyse de la conséquence de la mutation du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme humain.
(A) Représentation schématique des différents domaines protéiques de la β3GalT6 et de l'emplacement des différentes mutations des patients F1500081, F1400276 et F1400359 (Tableau 11). Les sites conservés (notés I à IV, en orange) ont été identifiés par rapport aux alignements des séquences primaires des β3GalT6 chez différentes espèces. (B) Les fibroblastes des patients (F1500081, F1400276 et F1400359, Tableau 11) et les fibroblastes contrôle sont cultivés en présence de soufre radiomarqué pendant 48h comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. La synthèse des GAGs est évaluée pour les différentes cellules en rapportant la radioactivité associée aux chaînes de GAGs néo-synthétisées à partir du 4-MOX à la quantité d'ADN double brin quantifié dans chaque condition expérimentale. n= 3 (expériences indépendantes réalisées en triplicat), *$p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$, test *t* de Student

Nous avons précédemment observé que la mutation du gène *B3GALT6* conduisait à une diminution de synthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme humain issus de trois patients atteints d'une forme pléiotropique de SED (et porteurs de mutations au niveau du gène *B3GALT6)* par rapport aux fibroblastes contrôle (patients 2, 3 et 5, Tableau 11 et Figure 13 (Malfait, Kariminejad et al. 2013). De façon complémentaire, nous avons récemment analysé la capacité de synthèse des GAGs des fibroblastes de trois nouveaux patients chez lesquels ont été récemment détectées des mutations du gène *B3GALT6* (patients notés F1500081, F1400276 et F1400359, Tableau 11), mutations homozygotes ou hétérozygotes et différentes de celles décrites chez les patients 2, 3 et 5.

Une réduction très importante du taux de synthèse des GAGs est observée chez le **patient F1500081** par rapport aux fibroblastes contrôle, quelque soit la concentration du xyloside 4-MOX présente dans les essais (Figure 14). Il est intéressant de noter qu'une réduction de moitié de l'anabolisme est observée en absence de 4-MOX, indiquant que le taux de synthèse initial des GAGs cellulaires chez ce patient est plus faible que celui de cellules non déficientes. L'anabolisme n'est guère augmenté en présence de concentrations croissantes de 4-MOX (1-10µM). En effet, le taux de synthèse des GAGs en présence de 0 et 10µM de 4-MOX est multiplié par 6 dans les fibroblastes contrôle, alors qu'il n'est augmenté que d'un facteur 2 dans

les cellules déficientes du patient (Figure 14). Le **patient F1500081** porte deux mutations ponctuelles (Glu265Asp et Tyr310Cys), localisées dans le site actif de l'enzyme. Les résidus Glu265 et Tyr310 sont localisés à proximité d'un motif conservé de la β3GalT6 (vu par rapport aux alignements des séquences primaires des protéines chez différentes espèces), ce qui laisse présager de leur importance en termes structural et/ou fonctionnel.

Des résultats similaires sont obtenus avec le **patient F1400276**, traduisant également l'effet délétère de la mutation de la β3GalT6 sur l'anabolisme des GAGs. Dans ce cas, il n'y a cependant pas de différence significative du taux de synthèse des GAGs entre les fibroblastes du patient et celui des cellules contrôle en absence ou en présence de 1µM final de 4-MOX dans le milieu de culture. Les différences entre le contrôle et le patient sont plus marquées uniquement en présence de plus fortes concentrations en xyloside exogène, en particulier à la plus forte concentration de 4-MOX testée ici (10µM final). Dans ces conditions, le taux de synthèse des GAGs dans les fibroblastes du patient F1400276 a été réduit de 67% par rapport aux fibroblastes contrôle (Figure 14). Les fibroblastes de ce patient sont porteurs d'une délétion entrainant un décalage du cadre de lecture (Phe160Serfs*118), associée à une mutation ponctuelle dans laquelle l'arginine en position 261 est remplacée par une histidine (Arg261His), résidu proche, dans la séquence primaire de la protéine, d'un motif conservé. Il est important de noter que le résidu Phe160 (qui borde la zone délétée) est localisé dans un motif conservé dans la famille des β3GalTs (Patel and Balaji 2007). Le décalage du cadre de lecture en aval de la mutation permet de comprendre pourquoi l'enzyme mutée n'est plus capable d'initier la biosynthèse des GAGs dans la mesure où la séquence de la protéine mutée ne correspond plus à celle de la β3GalT6. La perte de fonctionnalité de l'enzyme suite au décalage du cadre de lecture entraine donc une réduction importante de la capacité des cellules à produire des GAGs et expliqueraient, au moins en partie, les effets cliniques sévères observés chez les patients porteurs de ces mutations.

Une réduction significative du taux de synthèse des GAGs est également observée chez le **patient F1400359** par rapport aux fibrolastes contrôle quelque soit la concentration de 4-MOX présente dans les essais. Comme le patient F1500081, ce patient montre une réduction significative d'anabolisme (46%) en absence de 4-MOX, suggérant un faible taux initial de synthèse des GAGs matriciels. Le taux de synthèse des GAGs à été réduit de 80% par rapport aux fibroblastes contrôle à la plus forte concentration de 4-MOX (10µM final). Comme le patient F1500081, le taux de biosynthèse à partir du 4-MOX n'est quasiment pas augmenté en

présence de xyloside, attestant de l'incapacité des cellules à produire des GAGs dans ces conditions (Figure 14). Ce patient est porteur d'une mutation ponctuelle homozygote touchant le résidu du site actif Tyr182Cys, situé dans un motif conservé de la β3GalT6 chez différentes espèces.

Nous pouvons donc conclure de cette série de manipulations que les mutations de la β3GalT6 affectent de façon importante la synthèse des GAGs matriciels à partir du 4-MOX. Le plus faible taux de synthèse de GAGs est observé dans les cellules du **patient F1500081** qui porte deux mutations ponctuelles Glu265Asp et Tyr310Cys. Nous pouvons conclure de ces résultats que ces résidus sont importants pour la fonction de l'enzyme et que leur mutation même conservative dans le cas Glu265Asp est fortement délétère pour l'activité de l'enzyme.

A ce stade, nous pouvons supposer que les résidus conservés dans la séquence primaire de la β3GalT6 chez différentes espèces ou les motifs se trouvant à proximité sont peut-être impliqués : (i) soit dans le processus catalytique, (ii) soit dans la fixation des substrats, (iii) soit dans le maintien d'une conformation active de l'enzyme.

Pour certains patients, ces données sont en accord avec les résultats d'analyse de la glycanation de la décorine sécrétée dans le milieu de culture des fibroblastes de derme humain (évalué par immunoblot par le Centre de Génétique Médicale de Gand, Belgique, publication en cours de rédaction). En effet, la glycanation de la décorine est diminuée de façon importante dans les fibroblastes du **patient F1500081** qui présente les signes cliniques les plus sévères par rapport aux fibroblastes contrôle. Comme nous l'avons décrit dans la partie « *Introduction bibliographique* », la décorine interagit avec les collagènes et régule leur fibrillogenèse. Ce petit SLRPG joue donc un rôle très important dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des tissus conjonctifs (Gubbiotti, Vallet et al. 2016). Par exemple, le complexe décorine/matriline-1 (une protéine de la MEC présente dans le cartilage) joue un rôle de « liaison » entre le collagène de type VI et l'aggrécane ou le collagène de type II (Wiberg, Klatt et al. 2003). De la même façon, l'interaction de la décorine avec la dermatopontine (une protéine de la MEC impliquée dans l'adhérence et la migration des fibroblastes) peut réguler la fibrillogenèse du collagène et modifier le diamètre des fibrilles (Takeda, Utani et al. 2002, Liu, Meng et al. 2013). De façon complémentaire, il a été observé que des souris déficientes en décorine présentent une fragilité de la peau (également observée chez le patient F1500081), à cause d'une variabilité du diamètre des fibrilles de collagène (Danielson, Baribault et al. 1997). Pour attester du lien entre les PGs et le collagène, il a été observé des symptomes proches de

ceux observés chez les patients atteints de la dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich et de la myopathie de Bethlem (maladies génétiques qui sont dues à des mutations des gènes codant le collagène de type VI (Lampe and Bushby 2005)) chez nos patients (comme une faiblesse musculaire, des multiples contractures des articulations et une hypermobilité des articulations) . De façon intéressante, une réduction de l'expression du collagène de type V et une organisation anormale du réseau de collagène fibrillaire ont également été observées dans les fibroblastes déficients en β3GalT6 (Malfait, Kariminejad et al. 2013, Ritelli, Chiarelli et al. 2015), confortant l'idée que les défauts des GAGs, engendrés par la mutation du gène *B3GALT6*, impactent aussi de façon négative l'organisation du collagène dans la MEC. A ce stade de l'étude, nous pouvons émettre hypothèse que le défaut de synthèse des GAGs (matriciels entre autres) dû à la mutation de la β3GalT6, conduit à une modification de la composition et de la structure de la MEC, en particulier l'organisation du réseau collagénique, et entraine des symptômes plus ou moins sévères, observés chez les patients, comme une peau fragile, une hypotonie musculaire et des contracture des articulations.

En résumé, les mutations de la β3GalT6 entraînent donc globalement un défaut de synthèse des GAGs matriciels dans les fibroblastes de derme de peau chez ces trois patients par rapport aux cellules qui ne portent pas ces mutations, ce qui pourrait expliquer les symptômes plus ou moins sévères observés chez les patients en termes de perte de fonctionnalité des tissus conjonctifs en particulier.

Les patients inclus dans notre étude portent différentes mutations du gène *B3GALT6,* mais présentent des signes craniofaciaux et musculosquelettiques communs (comme des contractures articulaires, une scoliose sévère, une hypotonie musculaire et une hypermobilité et des luxations articulaires) associés à des manifestations cliniques au niveau de la peau plus ou moins sévères. Nos résultats diffèrent cependant d'un patient à l'autre, montrant que les fibroblastes de derme humain des patients (F1400276 présentant des symptômes musculosquelettiques très sévères associés des signes au niveau de la peau modérées) peuvent dans certains cas assurer la glycanation de la protéine *core* de la décorine, même lorsque la β3GalT6 est déficiente. Il est possible que l'impact des différentes mutations sur l'anabolisme des GAGs (en particulier, la décorine ici) soit variable d'une mutation à l'autre, expliquant la variabilité de la gravité des signes cliniques observés . Des expériences complémentaires seront nécessaires pour comprendre ce phénomène et évaluer ses conséquences fonctionnelles.

C. Fibroblastes fœtaux, échantillon F1400007 (description des mutations dans le Tableau 11) et contrôle.

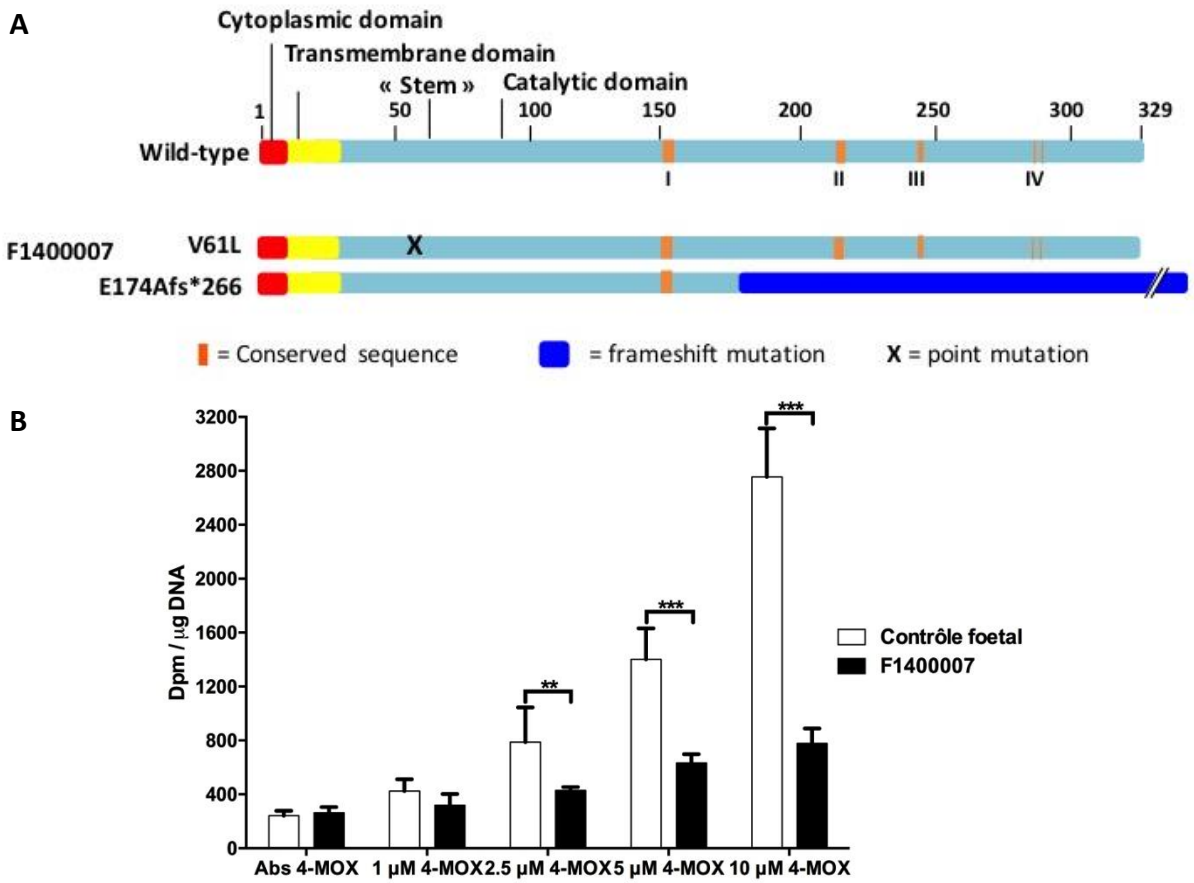


Figure 15 Analyse de la conséquence de la mutation du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes fœtaux.
(A) Représentation schématique des différents domaines protéiques de la β3GalT6 et de l'emplacement des différentes mutations de l'échantillon fœtal F1400007 (Tableau 11). Les sites conservés (notés I à IV, en orange) ont été identifiés par rapport aux alignements des séquences primaires des β3GalT6 chez différentes espèces. (B) Les fibroblastes fœtaux (F1400007, Tableau 11) et les fibroblastes fœtaux contrôle sont cultivés en présence de soufre radiomarqué ($Na_2SO_4[^{35}S]$) pendant 48h comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. La synthèse des GAGs est évaluée pour les différentes cellules en rapportant la radioactivité associée aux chaînes de GAGs néo-synthétisées à partir du 4-MOX (0-10µM) à la quantité d'ADN pour chaque condition expérimentale. n=3 (expériences indépendantes réalisées en triplicat), **$p<0.01$ et ***$p<0.001$, test *t* de Student.

Nous avons également disposé de cellules fibroblastiques issues d'un foetus porté par une femme dont la grossesse a été interrompue suite au diagnostic d'une dysplasie squelettique sévère après examens échographiques.

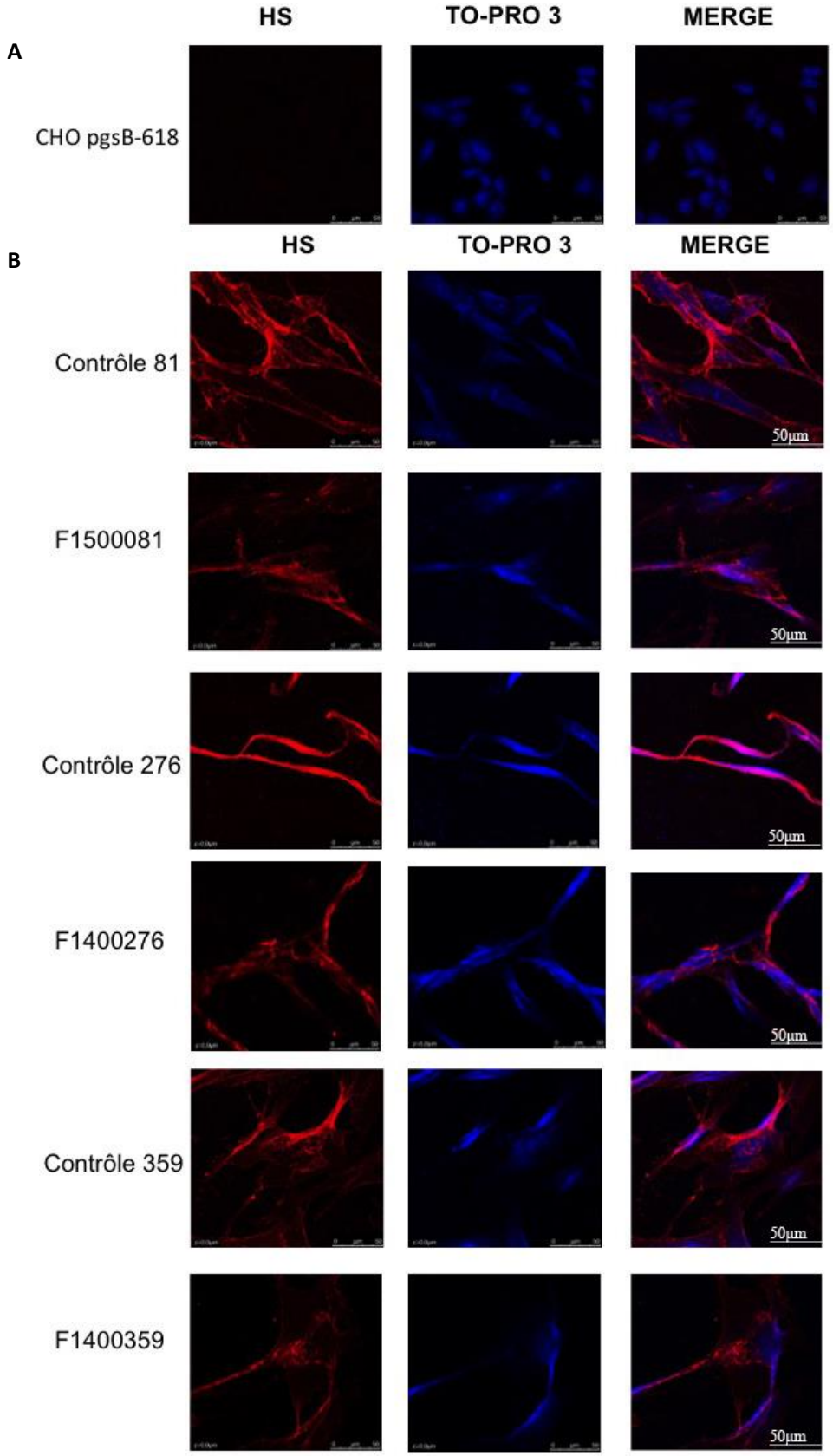
Les cellules fœtales étudiées ici sont porteuses d'un défaut sur chacun des deux allèles (défaut composite) associant (i) une délétion conduisant au remplacement de la glutamine 174 par une alanine et décalant le cadre de lecture de la séquence protéique *(frameshift, fs)* sur les 266 acides

aminés suivants dans la séquence (Glu174Alafs*266) et (ii) d'une mutation ponctuelle conduisant au remplacement d'une valine par une leucine en position 61 (Val61Leu). Il est intéressant de noter qu'il s'agit du seul mutant de notre étude pour lequel la mutation se situe au niveau de la région « *stem* », c'est-à-dire entre le segment transmembranaire et le site actif (les autres mutations du gène *B3GALT6* présentes chez les autres patients se situant dans le domaine catalytique).

Les résultats de la figure 15 montrent qu'il n'y a pas de différence significative du taux de synthèse des GAGs entre les fibroblastes fœtaux et celui des cellules fœtales contrôle en absence de xyloside exogène et en présence de 1µM de xyloside dans le milieu de culture, indiquant qu'un taux basal de GAGs peut être produit dans ces cellules. Une réduction très importante de la synthèse des GAGs dans ces fibroblastes est cependant observée par rapport aux cellules contrôle en présence de 2.5, 5 et surtout 10µM final de 4-MOX (environ 70% de réduction du taux de synthèse des GAGs) (Figure 15).

La délétion observée chez le mutant Glu174Alafs*266, en entrainant un décalage du cadre de lecture, conduit au final à la production d'une protéine tronquée, vraisemblablement non fonctionnelle (Figure 15A). Nakajima et al. (2013) ont montré que les mutants de la β3GalT6 recombinante (Ser65Gly, Pro67Leu) présentaient une très importante déficience de l'activité enzymatique associée à une localisation dans le noyau et le cytoplasme au lieu de la localisation native dans l'appareil de Golgi (Nakajima, Mizumoto et al. 2013). Dans notre travail, nous avons observé que la protéine mutée en position 61 (Val61Leu) associée à une délétion (Glu174Alafs*266) est détectée uniquement dans l'appareil de Golgi, mais avec un signal de fluorescence plus faible (*résultats non montrés*), indiquant une bonne localisation cellulaire, mais peut-être un défaut d'expression de cette enzyme mutée dans les fibroblastes. En termes d'anabolisme des GAGs, nous observons, dans les fibroblastes fœtaux, des effets similaires à ceux des cellules des patients enfants et adultes, avec des effets délétères des défauts génétiques de la β3GalT6.

I.2 Analyse de la synthèse des chaînes de HS à la surface des fibroblastes de derme de peau des patients (Patients F1500081, F1400276, F1400359 et F1400007, Tableau 11) et des fibroblastes contrôle par immunofluorescence.



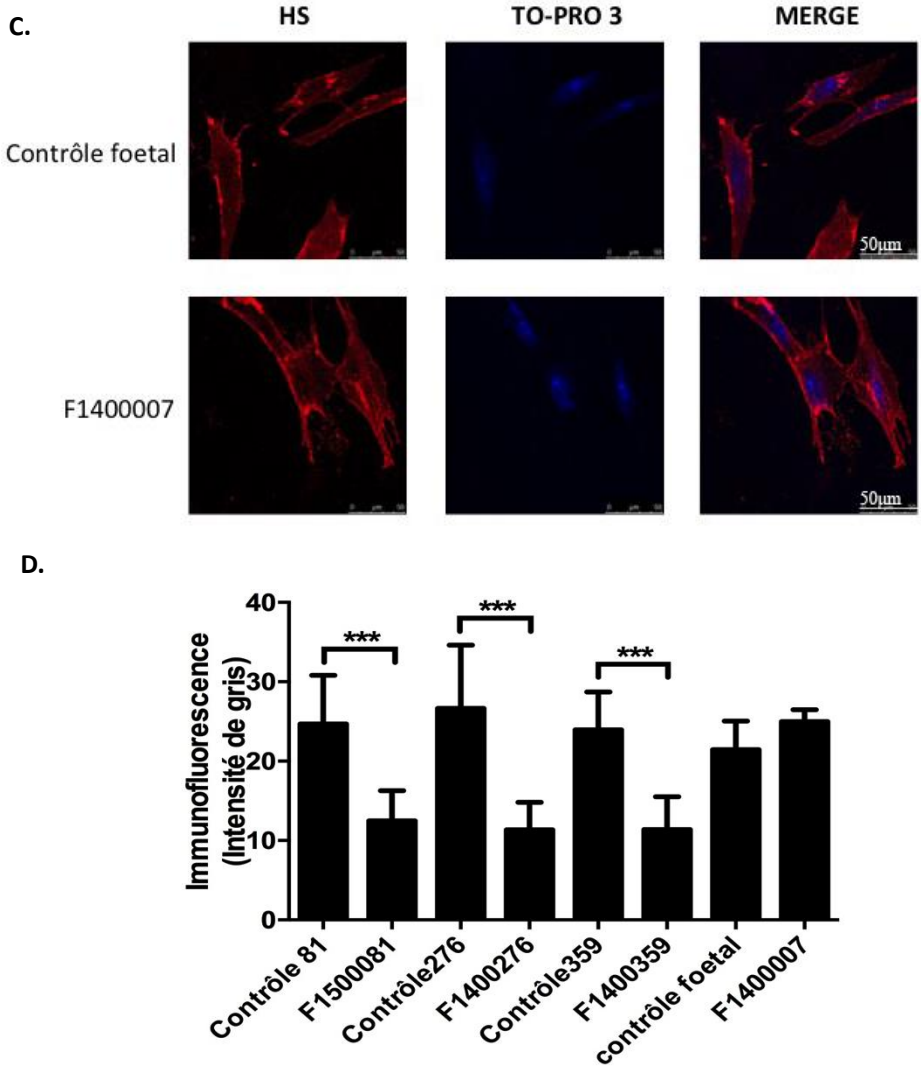


Figure 16 Analyse par microscopie confocale de l'expression des HS membranaires marqués par l'anticorps anti-HS (10E4) (rouge)
(A) dans les cellules CHO-pgsB-618 déficientes en β4GalT7, et donc ne produisant pas de chaines de GAGs, (B) dans les fibroblastes de derme humain des patients (Patients F1500081, F1400276, F1400359, Tableau 11) et les fibroblastes contrôle, et (C) dans les fibroblastes fœtaux (F1400007, Tableau 11). Dans chaque série de manipulations, les noyaux cellulaires ont été marqués par un agent intercalant, le TO-PRO3 (bleu), comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. L'analyse microscopique est réalisée à l'aide du microscope confocal SP5-X laser. (D) L'intensité de gris de l'immunofluorescence détectée a été analysée par logiciel Image J. n = 2 (≥8 images par expérience), échelle = 50µm, *** $p < 0.001$, test *t* de Student

Nous avons réalisé l'analyse par immunofluorescence, en microscopie confocale, de l'expression des chaînes de HS à la surface des fibroblastes des patients F1500081, F1400276, F1400359 (Figure 16B) et des fibroblastes fœtaux F1400007 (Figure 16C) par rapport aux différents contrôles appariés. Les cellules CHO pgsB-618 (déficientes en β4GalT7, la deuxième glycosyltransférase intervenant dans la voie de biosynthèse des GAGs (voir Chapitre III de l'introduction bibliogrpahique) qui ne peuvent pas synthétiser de chaines de GAGs, ont été utilisées comme témoin négatif afin de valider nos conditions expérimentales. Aucun signal de

fluorescence correspondant aux HS membranaires (rouge) n'est observé dans les cellules CHO pgsB-618, montrant bien que des cellules déficientes ne produisent pas de HS au niveau de la membrane plasmique (Figure 16A).

Nous avons en parallèle analysé l'expression des HS à la surface des fibroblastes des patients et des cellules contrôle. Un marquage (rouge) continu de la membrane cellulaire est observé dans les fibroblastes contrôle, attestant de la présence des HS membranaires dans ces cellules non déficientes. Par contre, les fibroblastes des patients montrent une réduction globale du marquage des HS par rapport aux cellules contrôle. Le signal de fluorescence détecté dans les cellules déficientes fait de plus apparaitre un marquage discontinu au niveau de la membrane plasmique dans les cellules des patients F1500081, F1400276 et F1400359, montrant qu'en plus de la réduction de l'expression des HS membranaires, leur répartition au sein de la membrane est perturbée. De façon surprenante, aucune différence de marquage n'est observée dans les fibroblastes fœtaux déficients (F1400007) par rapport aux cellules fœtales contrôle (Figure 16C), malgré la perte d'anabolisme précédemment mise en évidence au niveau de ces cellules (Figure 15).

Nakajima et al. (2013) avait, de la même façon, observé une réduction globale du taux de HS à la surface des cellules lymphoblastoïdes des patients atteints de SEMD-JL1 (et porteurs de la déficience génétique en β3GalT6) par rapport aux cellules contrôle (Nakajima, Mizumoto et al. 2013). De façon complémentaire, nous avions déjà mis en évidence un défaut d'expression (réduction ou suppression) des HS membranaires dans les cellules des patients présentant des mutations au niveau du gène *B3GALT6* chez les premiers patients étudiés (Malfait, Kariminejad et al. 2013). Plus récemment, une réduction très importante des chaînes de HS et une organisation anormale du perlécane (HSPG) ont été observées dans les MEC des fibroblastes des patients déficients en β3GalT6 par rapport aux cellules contrôle (Ritelli, Chiarelli et al. 2015).

Nos résultats et ceux d'autres équipes montrent d'une manière générale que dès lors que les fibroblastes des patients portent une déficience génétique en β3GalT6, l'expression des chaînes de HS au niveau de la membrane est diminuée dans les cellules déficientes par rapport aux cellules contrôle. Ces résultats confirment l'importance de la β3GalT6 dans l'initiation des chaînes de GAGs (ici de type HS), et expliquent le défaut de synthèse des GAGs et ses conséquences structurales et fonctionnelles dans les fibroblastes (et les tissus) des patients.

I.3 Analyse de l'activité enzymatique de la β3GalT6 dans les fibroblastes de derme de peau des patients (Patients F1500081, F1400276 et F1400359, Tableau 11) et les fibroblastes contrôle correspondants.

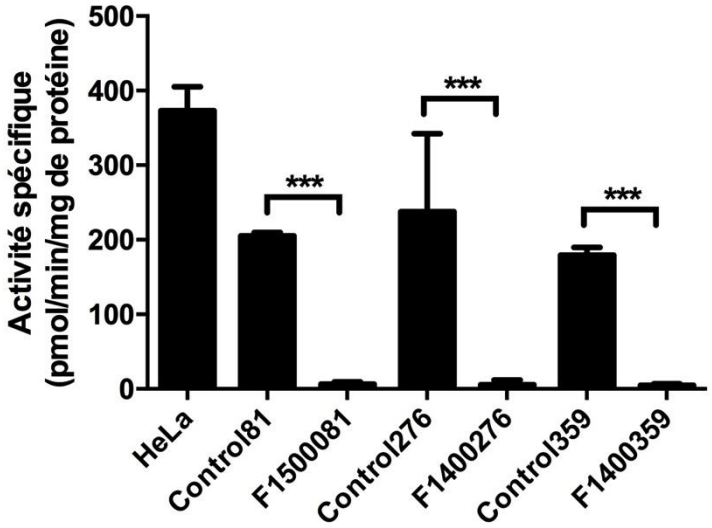


Figure 17 Analyse de la conséquence de la mutation du gène *B3GALT6* sur l'activité galactosyltransfe´ ase (GalT) de la β3GalT6 des fibroblastes de derme humain.
Les essais enzymatiques ont été réalisés en utilisant 50µg de protéines totales issues d'homogénats cellulaires préparés à partir des fibroblastes en tampon Bis-Tris (50mM, pH7.2) en présence de 10mM $MnCl_2$, 5mM du substrat accepteur, le dérivé Gal-Xyl(2P)-OMN, et 2mM du substrat donneur, l'UDP-Gal. Après 2h d'incubation à 37°C, l'activité enzymatique est évaluée par CHLP en phase inverse comme décrit dans la section *Matériels et Méthodes*. Les cellules HeLa, cellules humaines issues d'un carcinome utérin, exprimant la β3GalT6 sauvage, ont été utilisées. n= 2 (expériences indépendantes réalisées en duplicat), *** $p < 0.001$, test *t* de Student

En parallèle de la mesure du taux des chaines de GAGs néosynthétisées dans le milieu de culture des cellules (déficientes ou non), nous avons réalisé une mesure de l'activité galactosyltransférase (GalT) de la β3GalT6 dans les fibroblastes des trois derniers patients étudiés (F1500081, F1400276 et F1400359, Tableau 11) vis-à-vis d'un analogue de substrat disaccharidique phosphorylé en position 2 sur le xylose (Gal-Xyl(2-*O*-phosphate)-*O*-méthoxynaphthyle (Gal-Xyl(2P)-OMN)) (voir *Introduction Bibliographique* partie III.1). Nous avons ainsi évalué la capacité des enzymes mutées à transférer un résidu galactose sur cet accepteur par rapport aux cellules exprimant une enzyme sauvage *in vitro* (Figure 17).

Les fibroblastes contrôle présentent une activité galactosyltransférase comprise entre 200 et 250 pmol/min/mg de protéines totales. Les cellules HeLa, cellules humaines issues d'un carcinome utérin, prises comme contrôle positif dans cette expérience dans la mesure où elles expriment la β3GalT6 sauvage, présentent une activité GalT du double de celle des fibroblastes non déficients (environ 400 pmol/min/mg de protéines totales). Par contre, une activité enzymatique très faible (inférieure à 10 pmol/min/mg de protéines totales) est détectée dans les homogénats

cellulaires préparés à partir des cellules des patients, attestant de la non-fonctionnalité de l'enzyme dans les fibroblastes déficients (Figure 17).

Comme nous l'avons décrit ci-dessus pour le taux de biosynthèse des GAGs à partir du 4-MOX, l'activité galactosyltransférase de la β3GalT6 est très fortement réduite, voire quasiment nulle, dans les cellules des patients porteurs des différentes déficiences génétiques. Une diminution significative de l'activité de la β3GalT6 a également été observée par Nakajima et al. (2013) dans les cellules HeLa exprimant les enzymes recombinantes mutantes. Dans ce cas, les mutations étudiées sont différentes de celles décrites dans notre étude (Ser65Gly, Pro67Leu, Asp156Asn, Arg232Cys, Cys300Ser et Ser309Thr), mais montrent de la même façon une perte d'activité enzymatique majeure de la β3GalT6 mutée par rapport aux cellules recombinantes exprimant la β3GalT6 sauvage (Nakajima, Mizumoto et al. 2013). Ces résultats peuvent donc nous laisser penser que les différentes mutations de la β3GalT6 présentes chez les patients entraînent une réduction ou une suppression de son activité enzymatique, ce qui a pour répercussion une diminution du taux de synthèse des GAGs.

Au vu des effets drastiques de ces mutations sur l'activité enzymatique de la β3GalT6, il parait évident que les résidus mutés soient des acides aminés cruciaux pour la fonction de l'enzyme (pour son activité enzymatique et/ou pour sa structure) et donc possiblement impliqués dans le mécanisme catalytique et/ou dans la fixation des substrats. Des informations pourront nous être fournies dans ce contexte par l'étude des enzymes recombinantes (β3GalT6 sauvage et mutées) purifiées dont la production est en cours d'optimisation au laboratoire. L'étude des paramètres cinétiques de ces enzymes recombinantes mutées (par rapport à la β3GalT6 sauvage) pourra nous permettre de savoir si l'affinité apparente des enzymes mutées vis-à-vis des substrats (donneur et/ou accepteur) est modifiée et si la vitesse de réaction est impactée par les mutations. Ce point est en cours d'investigation dans notre équipe. L'utilisation de protéines recombinantes permettra de plus de disposer d'une quantité suffisante d'enzyme (sauvage ou mutée) purifiée pour la réalisation de tests fonctionnels ou d'analyses structurales le cas échéant.

Il est tout de même intéressant de noter que les chaînes de HS membranaires sont détectables dans nos conditions expérimentales (Figure 16), indiquant qu'une faible quantité de GAGs est présente malgré une activité enzymatique de la β3GalT6 très faible (voire quasiment nulle, à la limite de détection du test) *in vitro*. Ceci suggère que la biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique n'est peut être pas qu'une simple addition des résidus [GlcA-Gal-Gal-Xyl] et qu'elle n'est peut être pas limitante dans le système. Il est possible dans le contexte de la

mutation d'une enzyme impliquée précocément dans la voie de biosynthèse, que d'autres glycosyltransférases puissent peut-être avoir des fonctions biochimiques compensatoires et être impliquées dans la formation d'une amorce de structure différente, en agissant par une voie parallèle ou alternative à la voie naturelle de biosynthèse.

Chapitre II : Analyse de l'effet des mutations de la β3GalT6 sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain issus des patients atteints de SED.

II.1 Analyse de la capacité migratoire des fibroblastes de derme de peau des patients et des fibroblastes contrôle.

A. patients 2, 3 et 5 (P2, P3 et P5, Tableau 11) et contrôle (Malfait, Kariminejad et al. 2013).

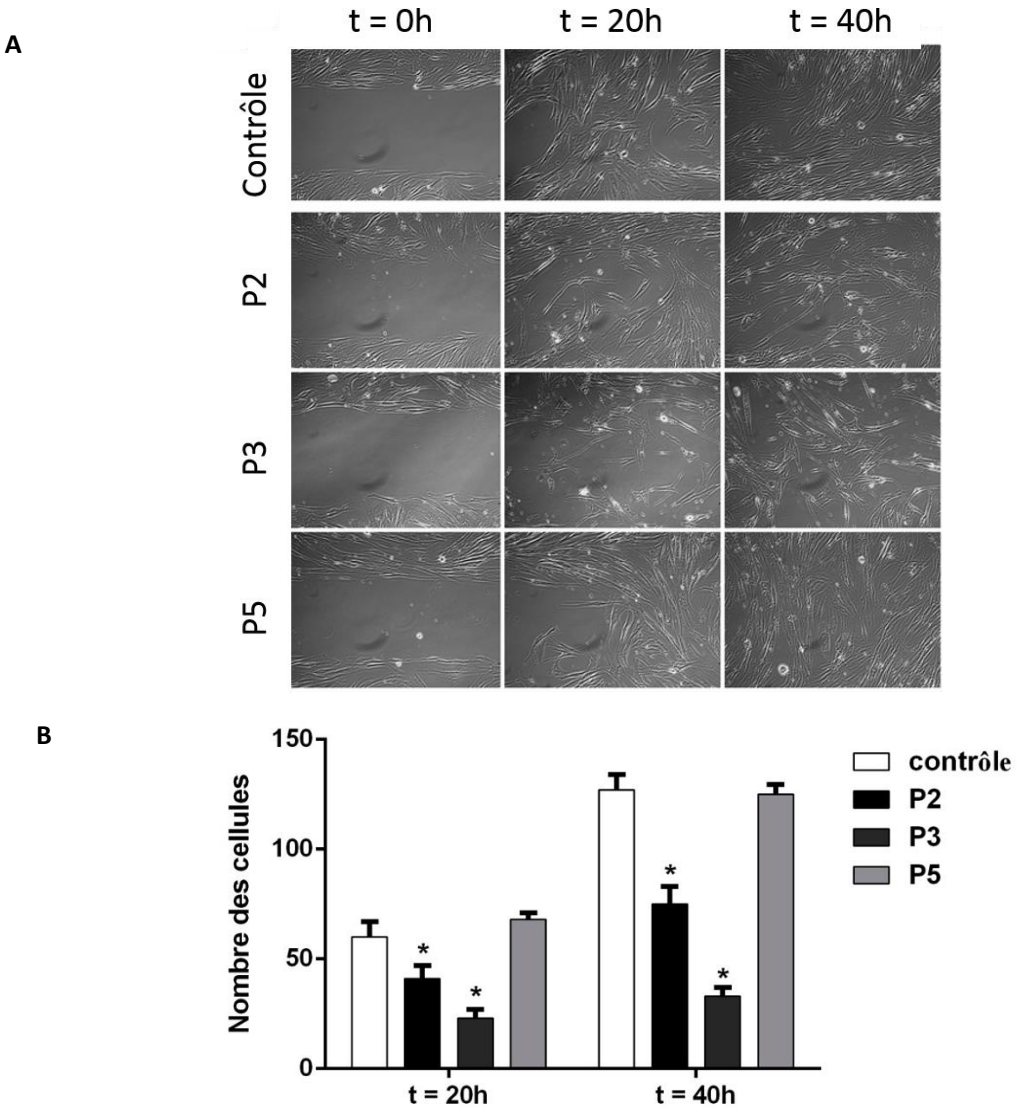


Figure 18 Analyse des conséquences de la mutation du gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain.
Après ensemencement en boîte de culture *µ-Dish 35mm, high* (Ibidi®) et adhésion complète des fibroblastes (35 000 cellules par chambre), la pellicule de silicone est retirée de la boîte, créant une brèche entre les deux compartiments (correspondant au temps de migration de 0h) comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les analyses sont réalisées aux temps de migration de 20h et 40h. (A) Photographies de la migration des fibroblastes contrôle et des **patients 2, 3 et 5** (P2, P3 et P5, Tableau 11) au microscope inversé à contraste de phase à l'objectif 10/0.25. (B) Les cellules proliférant et

migrant dans la brèche cellulaire générée au temps 20h et 40h sont comptées à l'aide du logiciel Photoshop. n=3 (expériences indépendantes réalisées en triplicat), *p＜0.05, test *t* de Student

La capacité migratoire des fibroblastes des patients (P2, P3 et P5, Tableau 11) et des cellules contrôle a été évaluée par un test de cicatrisation (*wound healing test*), parallèlement à la mesure du taux de synthèse des GAGs matriciels (Figure 13), à l'analyse de l'expression des HS membranaires et à l'étude de la glycanation de la protéine *core* de la décorine *in cellulo* (Malfait, Kariminejad et al. 2013).

Nous n'avons pas observé de différence significative de la migration entre les fibroblastes provenant du **patient 5** et les fibroblastes contrôle quelque soit le temps de culture (Figure 18), malgré un défaut de synthèse des chaînes de GAGs néosynthétisées à partir d'un xyloside exogène (Figure 13) et un défaut de glycanation de la protéine *core* de la décorine *in cellulo* (Malfait, Kariminejad et al. 2013).

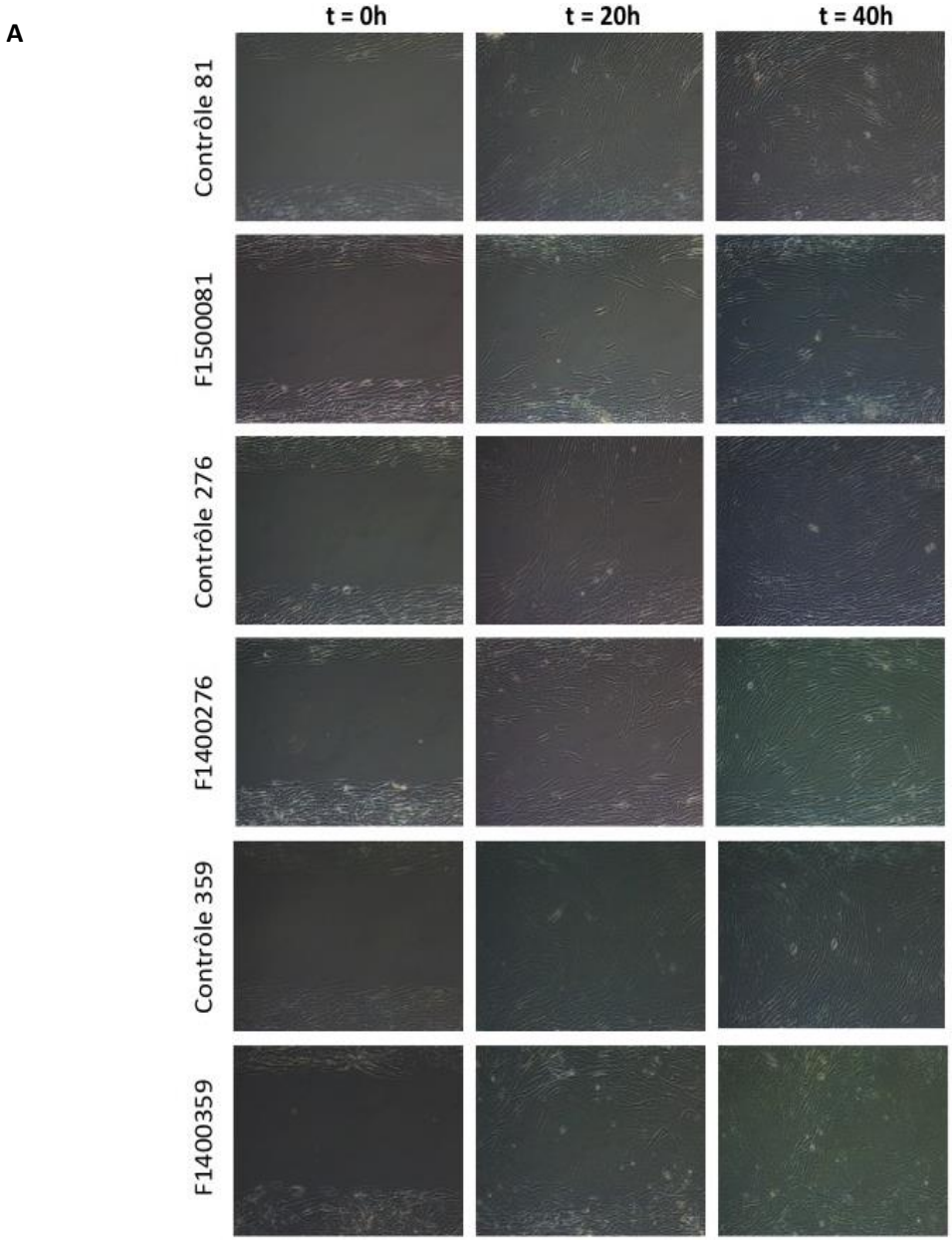
Par contre, le nombre de cellules migrant dans la brèche est diminué de 35% et 40% après 20h et 40h de migration respectivement avec les fibroblastes du **patient 2** par rapport aux fibroblastes contrôle (Figure 18). Les résultats sont encore plus marqués avec les fibroblastes du **patient 3**, pour lesquels un très important retard de migration est observé (nombre de cellules migrant dans la brèche cellulaire réduit de 65% et 75% après 20h et 40h de migration respectivement) par rapport aux fibroblastes contrôle (Figure 18). Il est intéressant de noter que ce patient présente également les signes cliniques les plus sévères par rapport aux deux autres patients étudiés (Malfait, Kariminejad et al. 2013).

La capacité migratoire des fibroblastes de peau des patients est donc globalement réduite par rapport aux fibroblastes contrôle après 20h et 40h de migration (à l'exception du patient 5). Le retard de recouvrement de la brèche cellulaire est le plus important pour les fibroblastes du **patient 3** qui porte la mutation ponctuelle Asp207His associée à une délétion, par rapport aux fibroblastes du **patient 2** atteint de la seule mutation faux-sens Asp207His et du **patient 5** atteint de la mutation ponctuelle Gly217Ser. Ces résultats suggèrent que la mutation de la β3GalT6 chez les patients entraîne un défaut de son activité GalT (voir partie I.1), ce qui a pour répercussion une diminution du taux de synthèse des GAGs matriciels (Figure 13) associée à une modification de la capacité migratoire des cellules fibroblastiques de peau (Figure 18). Nous pouvons donc supposer à ce niveau que les mutations qui impacteraient le plus

l'anabolisme des GAGs seraient celles qui conduiraient à un retard de cicatrisation le plus important et expliqueraient la sévérité des symptômes cliniques décrits chez les patients.

B. Patients F1500081, F1400276 et F1400359 (Tableau 11) et contrôles.

La capacité migratoire des fibroblastes des patients F1500081, F1400276 et F1400359 (Tableau 11) et des cellules contrôle a été évaluée comme précédemment décrit par un test de cicatrisation, parallèlement à la mesure du taux de synthèse des GAGs matriciels (Figure 14), à l'étude de l'activité enzymatique de la β3GalT6 (Figure 17) et à l'analyse de l'expression des HS membranaires (Figure 16).



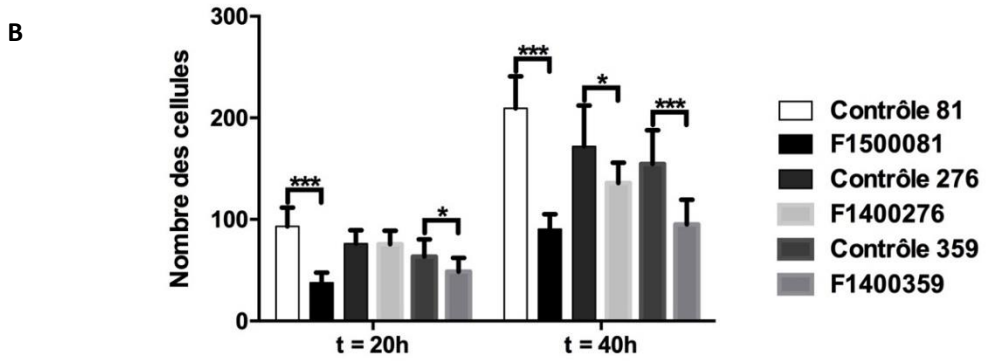


Figure 19 Analyse des conséquences de la mutation du gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain.
Après ensemencement en boîte de culture *μ-Dish 35mm, high* (Ibidi®) et adhésion complète des fibroblastes (35 000 cellules par chambre), la pellicule de silicone est retirée de la boîte, créant une brèche entre les deux compartiments (correspondant au temps de migration de 0h) comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les analyses sont réalisées aux temps de migration de 20h et 40h. (A) Photographies de la migration des fibroblastes contrôles et des patients **F1500081, F1400276 et F1400359** (Tableau 11) au microscope inversé à contraste de phase à l'objectif 10/0.25. (B) Les cellules proliférant et migrant dans la brèche cellulaire générée au temps 20h et 40h sont comptées à l'aide du logiciel photoshop. n=3 (expériences indépendantes réalisées en duplicat), *$p < 0.05$ et *** $p < 0.001$, test *t* de Student.

Les résultats sont plus marqués avec les fibroblastes du **patient F1500081**, pour lesquels un très important retard de migration est observé dès le temps de 20h et 40h. En effet, le nombre de cellules migrant dans la brèche est réduit d'environ 60% après 20h et 40h de migration par rapport aux fibroblastes contrôle (Figure 19). Nous n'avons pas observé de différence significative de la migration entre les fibroblastes du **patient F1400276** et les fibroblastes contrôle au temps de 20h. Par contre, le nombre de cellules migrant dans la brèche est diminué de 20% après 40h de migration chez ce patient par rapport aux fibroblastes contrôle. Pour le **patient F1400359**, environ 20% et 40% de réduction du nombre des cellules migrant est observée après 20h et 40h de migration respectivement par rapport aux fibroblastes contrôle (Figure 19).

Comme pour les premiers patients étudiés (voir partie II.1, Figure 18), la capacité migratoire des fibroblastes de peau des patients est donc globalement réduite par rapport aux fibroblastes contrôle après 20h et 40h de migration. Le retard de recouvrement de la brèche cellulaire est le plus important pour les fibroblastes du **patient F1500081** qui porte deux mutations ponctuelles Glu265Asp et Tyr310Cys localisées à proximité de ou dans un motif conservé de la β3GalT6.

Ces résultats sont cohérents avec les précédents qui mettaient en évidence une réduction importante du taux de synthèse des GAGs dans ces fibroblastes déficients (Figure 14), ainsi qu'une plus faible production de HS à la membrane cellulaire (Figure 16). Dans ces conditions,

une altération de la biosynthèse des GAGs aurait pour conséquence un retard de migration des fibroblastes et contribuerait au retard de cicatrisation observé chez ces patients et pourrait expliquer, entre autres, la perte de fonctions tissulaires observées dans la pathologie.

De façon surprenante, le patient F1400276, qui présente des symptômes craniofaciaux et des altérations du système musculosquelettique très sévères (associés à des effets au niveau de la peau modérés) et une réduction très importante de l'activité enzymatique de la β3GalT6, montre le retard de migration le moins prononcé (pas de différence de migration à 20h et une réduction de migration modérée de 20% à 40h, Figure 19). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus sur la glycanation de la décorine, pour lesquels ce patient montre le même niveau de glycanation de la décorine sécrétée que les cellules contrôle. Il semble donc que, dans les fibroblastes de derme du patient F1400276, les mutations de la β3GalT6 (délétion p. Phe160Serfs*118 et mutation ponctuelle Arg261His) (i) affectent peu la synthèse des chaînes de GAGs sur la protéine *core* de la décorine, (ii) affectent peu la capacité migratoire des cellules, et finalement (iii) ne conduisent pas à des signes cliniques sévères au niveau de la peau.

C. Fibroblastes fœtaux (F1400007, Tableau 11) et contrôle.

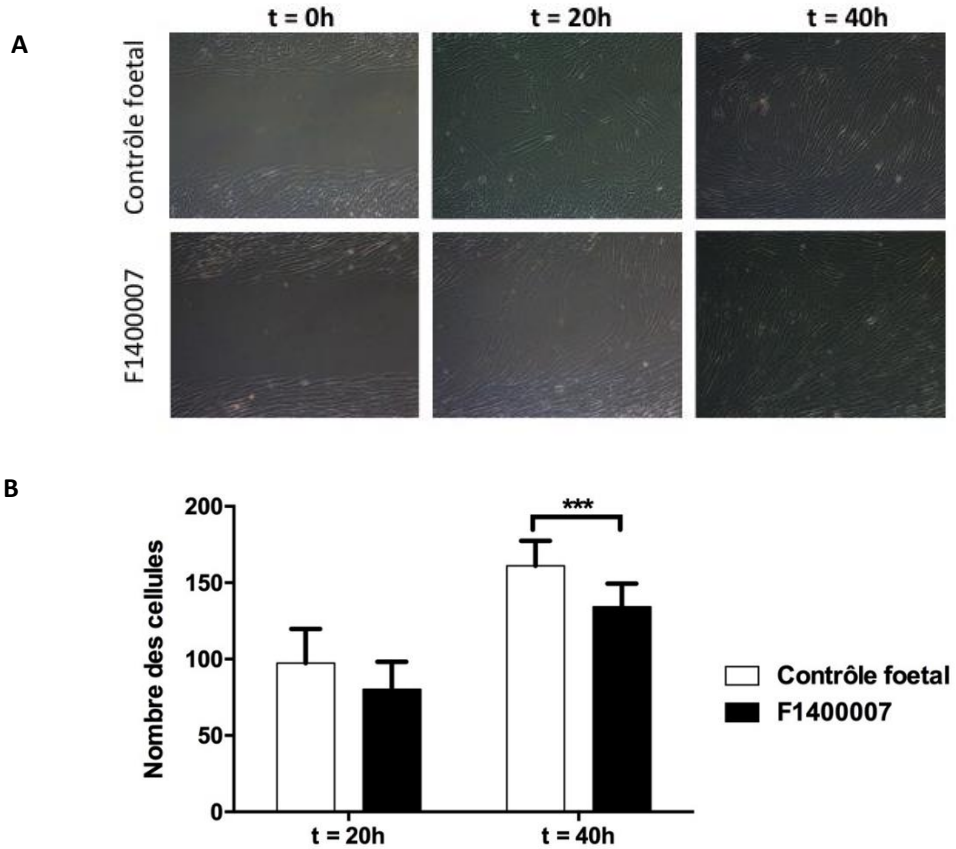


Figure 20 Analyse des conséquences de la mutation du gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain.

Après ensemencement en boîte de culture *μ-Dish 35mm, high* (Ibidi®) et adhésion complète des fibroblastes (35 000 cellules par chambre), la pellicule de silicone est retirée de la boîte, créant une brèche entre les deux compartiments (correspondant au temps de migration de 0h) comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les analyses sont réalisées aux temps de migration de 20h et 40h. (A) Photographies de la migration des fibroblastes contrôle et des **fibroblastes fœtaux déficients** (F1400007, Tableau 11) au microscope inversé à contraste de phase à l'objectif 10/0.25. (B) Les cellules proliférant et migrant dans la brèche cellulaire générée au temps 20h et 40h sont comptées à l'aide du logiciel photoshop. n=3 (expériences indépendantes réalisées en duplicat), *** $p < 0.001$, test *t* de Student.

La capacité migratoire des fibroblastes fœtaux porteurs d'une délétion (Glu174Alafs*266) au niveau du gène *B3GALT6* et d'une mutation ponctuelle (Val61Leu) est faiblement réduite par rapport aux fibroblastes contrôle après 20h et 40h de migration. Il n'y pas de différence significative de migration entre les fibroblastes des cellules fœtales déficientes et les fibroblastes fœtaux contrôle au temps 20h. Une réduction modérée mais significative (d'environ 20%) du nombre de cellules migrant dans la brèche est observée après 40h de migration par rapport aux fibroblastes contrôle (Figure 20).

Ces résultats indiquent que la mutation du gène *B3GALT6* (mutation hétérozygote incluant une délétion entrainant un décalage du cadre de lecture associée à une mutation ponctuelle dans le site actif de la β3GalT6) présente chez le fœtus entraîne une diminution globale du taux de synthèse des GAGs matriciels associée à une faible réduction de la capacité migratoire des cellules fibroblastiques de peau.

Il est maintenant établi que les fibroblastes jouent un rôle essentiel dans le phénomène de cicatrisation en raison de leur capacité à réguler la migration cellulaire en étroite relation avec la MEC qu'ils produisent. Ce phénomène implique de multiples composants matriciels, comme par exemple les collagènes, la fibrine, la fibronectine, les PGs et des protéines matricielles qui participent ensemble à la migration des fibroblastes. Il a en particulier été montré que la présence des chaînes libres des GAGs (en majorité des CS) dans la MEC favorise la migration et la prolifération cellulaire au début de la cicatrisation chez les fibroblastes d'embryons de rat (Kosir, Quinn et al. 2000). A l'inverse un retard de cicatrisation des plaies cutanées a été observé chez des souris porteuses d'une déficience génétique en décorine, un petit PG matriciel dont la protéine *core* porte une seule chaine de DS, montrant le rôle de ce PG dans le phénomène de cicatrisation (Jarvelainen, Puolakkainen et al. 2006).

De façon complémentaire, les voies de signalisation associées aux facteurs de croissance (comme les FGF par exemple) et impliquant les HS (qui jouent le rôle de corécepteurs des FGF) et les intégrines sont capables de faciliter les interactions avec le cytosquelette, pour moduler

les interactions cellule-cellule et/ou cellule-matrice, et donc impacter la migration des cellules. Le syndécane, un PG membranaire portant des chaines de HS, est le mieux caractérisé dans ce type de phénomène. Il a été montré que sa présence facilitait l'adhérence des cellules entre elles et modifierait la migration cellulaire *via* l'interaction avec les intégrines, la fibronectine et le cytosquelette d'actine (Mythreye and Blobe 2009).

Dans ce contexte, nos résultats confirment le rôle des GAGs (et donc des PGs) dans le processus de migration cellulaire. Dans le cas des patients déficients en β3GalT6 (et présentant un retard de cicatrisation), il est possible que la réduction du taux de GAGs matriciels observée chez ces patients soit à l'origine du défaut de migration des fibroblastes et contribuerait aux manifestations délétères observées dans la pathologie, comme le défaut de cicatrisation observé dans ce type de SED.

Des expériences d'analyse de la prolifération des fibroblastes des patients (et des cellules contrôle) seront envisagées à court terme pour compléter les résultats des tests de migration. En effet, la vitesse de croissance des fibroblastes est propre à chaque patient et l'évaluation de la migration cellulaire dans un test de cicatrisation peut être biaisée par la vitesse de prolifération plus ou moins importante des cellules. Ce paramètre sera évalué prochainement et confronté aux résultats du test de migration.

Chapitre III : Analyse des conséquence de l'extinction du gè e *B3GALT6* par des siRNA sur la synthèse des GAGs et la capacité migratoire des fibroblastes contrôle.

Afin de mieux comprendre les conséquences physiopathologiques des mutations de la β3GalT6 chez les patients atteints de SED, nous avons décidé de commencer par éteindre l'expression du gène codant cette enzyme dans les fibroblastes contrôle de même âge et de même sexe que les trois patients (P2, P3 et P5) et d'analyser les conséquences de cette extinction sur l'anabolisme cellulaire (en termes de biosynthèse des GAGs matriciels et HS membranaires en particulier) et sur la capacité migratoire de ces cellules. Il nous sera alors possible de déterminer si les différences que nous observons entre les cellules contrôle et celles des patients sont liées à une diminution de l'expression de la β3GalT6 dans ces cellules.

III.1 Analyse des consé uences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur la synthèse des GAGs matriciels dans les fibroblastes contrôle correspondant aux patients 2, 3 et 5.

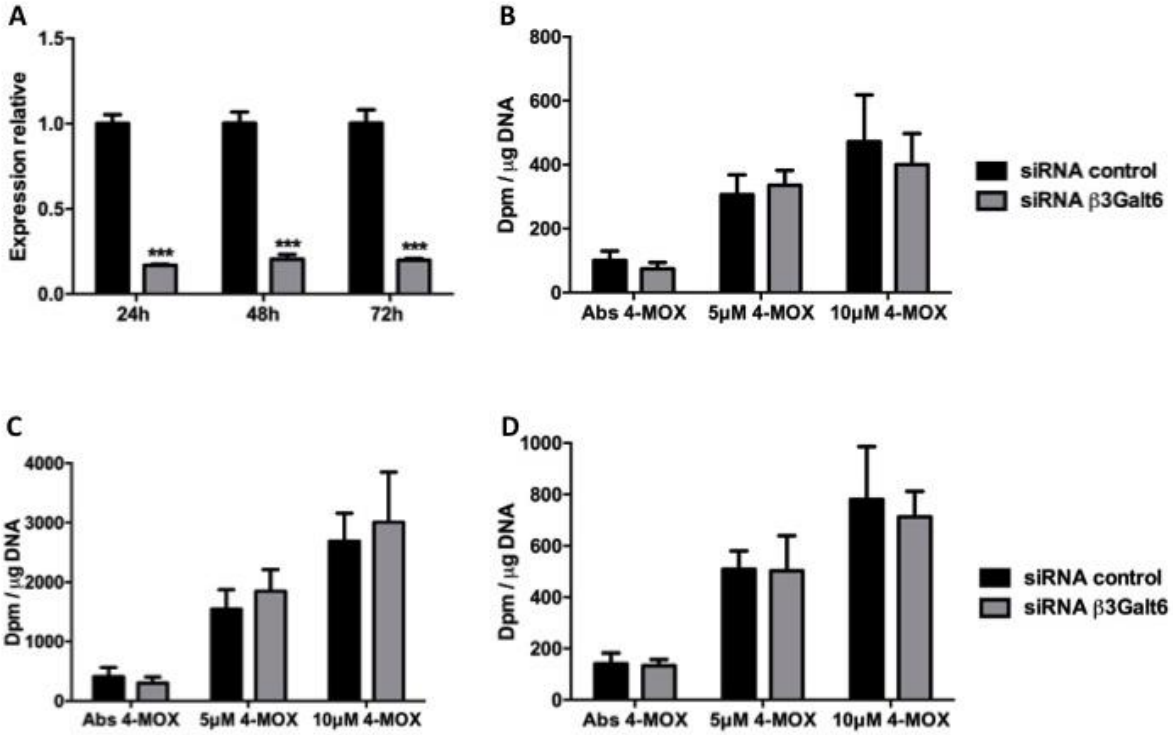


Figure 21 Analyse des conséquen es de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes de derme humain.
(A) Analyse de l'expression de l'ARNm de la β3GalT6 après extinction par les siRNA contrôle et siRNA β3GalT6 dirigé contre le gène *B3GALT6*. (B, C, D) Analyse de la synthèse des GAGs matriciels après extinction de l'expression du gène *B3GALT6* par des siRNA dans les fibroblastes contrôle correspondant aux patients 2(B), 3(C) et 5(D). Le taux de synthèse des GAGs est évalué 24h après transfection des fibroblastes par le siRNA contrôle ou le siRNA β3GalT6, en présence (ou absence) de xyloside exogène

(4-MOX) et de soufre radiomarqué comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. n=3 (expériences réalisées en triplicat), *** $p < 0.001$, test *t* de Student.

Nous avons tout d'abord évalué le taux d'expression des ARNm de la β3GalT6 dans les fibroblastes contrôle (correspondant aux patients 2, 3 et 5, Tableau 11) après transfection par un siRNA contrôle ou un siRNA β3GalT6 dirigé spécifiquement contre le gène *B3GALT6*. Les résultats montrent que 24h, 48h et 72h après la transfection, l'expression de l'ARNm a été réduite d'environ 80% dans les fibroblastes contrôle transfectés par le siRNA β3GalT6 par rapport aux cellules transfectées par le siRNA contrôle (Figure 21A). Ces résultats indiquent une bonne efficacité de l'ARN interférent à éteindre l'expression du gène *B3GALT6* pendant au moins 72h dans les conditions expérimentales utilisées.

Pour analyser les conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes contrôle, nous avons évalué le taux d'incorporation du soufre radiomarqué dans les chaînes de GAGs néosynthétisées à partir du 4-MOX dans les fibroblastes transfectés par le siRNA contrôle et le siRNA β3GalT6.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative du taux de synthèse des GAGs entre les fibroblastes contrôle transfectés par le siRNA β3GalT6 et le siRNA contrôle en absence de xyloside exogène dans le milieu de culture. Ce taux de synthèse des GAGs est équivalent en présence de 5µM final de 4-MOX, cette concentration en xyloside n'étant sans doute pas suffisamment forte pour observer une différence de synthèse dans nos conditions expérimentales. Le taux de synthèse des GAGs dans les fibroblastes contrôle transfectés par le siRNA β3GalT6 a été réduit d'environ 5-10% par rapport au siRNA contrôle à la concentration maximale de 4-MOX testée (10µM). Cette diminution n'est cependant pas significative. (Figure 21B, C et D).

En conclusion de cette série d'expérimentations, nos résultats montrent que, malgré la forte diminution de l'expression de l'ARNm de la β3GalT6 liée à l'extinction de son gène par des siRNA (stable pendant 72h), la biosynthèse des GAGs matriciels dans des fibroblastes de peau humains des cellules contrôle n'est pas (ou très peu) affectée.

A ce stade des manipulations, nous avons cherché à expliquer ces résultats en émettant l'hypothèse que la β3GalT6 pouvait être encore exprimée dans les cellules suite à l'extinction de son gène. En effet, si l'enzyme est dégradée lentement, elle resterait présente dans l'appareil de Golgi après extinction et serait capable d'assurer la biosynthèse des GAGs, ce qui

expliquerait pourquoi ce paramètre ne serait pas affecté. Ce point a été vérifié par immunofluorescence en étudiant le niveau d'expression de la β3GalT6 dans les fibroblastes contrôle après extinction (voir partie III.2).

III.2 Analyse des conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur l'expression des HS membranaires des fibroblastes contrôle correspondant au patient 3.

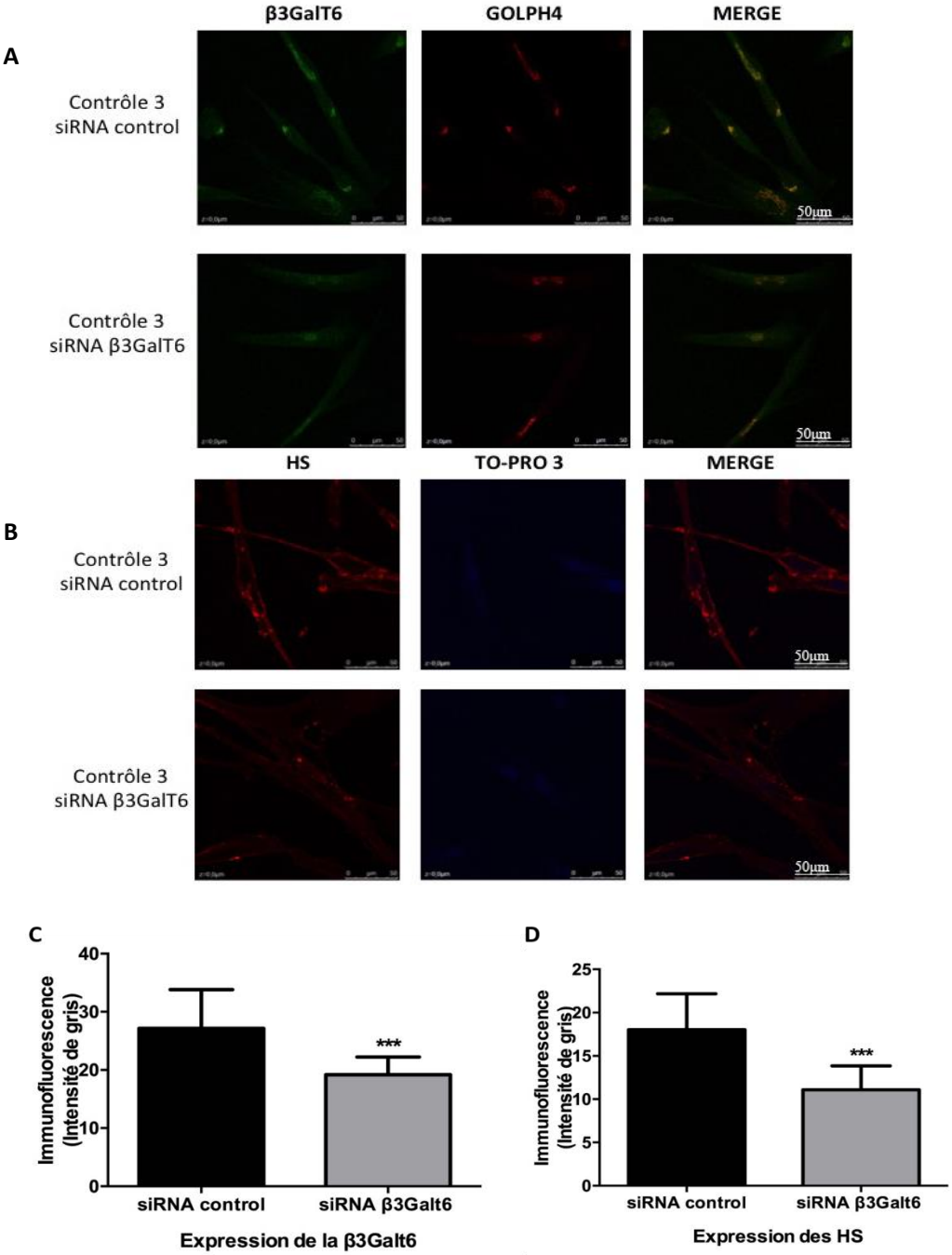


Figure 22 Analyse par microscopie confocale de l'expression de la β3GalT6 et des HS membranaires dans les fibroblastes contrôle (Contrôle associé au patient 3) après extinction du gène *B3GALT6* par un siRNA.

(A) L'expression de la β3GalT6 a été analysée en utilisant l'anticorps anti-β3GalT6 (vert) après 48h de transfection par les siRNA contrôle et siRNA β3GalT6. L'anticorps anti-GOLPH4 est utilisé pour marquer l'appareil de Golgi (rouge). (B) L'expression des HS membranaires a été analysée en utilisant l'anticorps anti-HS (10E4) (rouge). Les noyaux cellulaires ont été marqués par un agent intercalant, le TO-PRO3 (bleu), comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. L'analyse microscopique est réalisée à l'aide du microscope confocal SP5-X laser. (C et D) L'intensité de gris de l'immunofluorescence détectée a été analysée par logiciel Image J. n=2 (≥8 images par expérience), scale=50µm, ***$p < 0.001$, test *t* de Student

L'analyse de l'expression de la β3GalT6 par immunofluorescence après transfection par un siRNA contrôle ou un siRNA β3GalT6 dans les fibroblastes contrôle a été réalisée pour étudier l'effet de l'extinction de l'ARN sur le niveau d'expression de la protéine. La figure 22 montre que la β3GalT6 (signal vert) est détectée à la fois dans les cellules transfectées par le siRNA contrôle et le siRNA β3GalT6. Dans les deux cas, elle est colocalisée avec le marqueur GOLPH4 (signal rouge), ce qui indique que la β3GalT6 est toujours présente dans l'appareil de Golgi. Cependant, après extinction du gène *B3GALT6* (par le siRNA β3GalT6), les cellules présentent une réduction modérée (significative) du marquage fluorescent par rapport aux cellules transfectées par le siRNA contrôle (Figure 22A et 22C), mettant en évidence une faible réduction de l'expression de la β3GalT6 dans ces cellules malgré une extinction efficace et stable de l'ARN durant la durée de la manipulation. Ceci nous permet d'expliquer les résultats précédemment observés sur l'anabolisme des GAGs matriciels et sur la migration cellulaire par le fait que le niveau d'expression de la β3GalT6 est réduit après extinction, mais semble encore suffisant important pour synthétiser des chaînes de GAGs à partir du 4-MOX exogènes (Figure 21) dans nos conditions expérimentales.

Il en est de même pour l'analyse de l'expression des HS membranaires réalisée dans les mêmes conditions expérimentales. La figure 22B montrent un marquage (rouge) continu de la membrane cellulaire dans les fibroblastes transfectés par le siRNA contrôle. Une faible réduction (significative) du signal de fluorescence des HS est détectée dans les cellules après extinction de l'expression de la β3GalT6 (par le siRNA β3GalT6) par rapport aux fibroblastes transfectés par le siRNA contrôle, montrant un impact également modéré de l'extinction de l'enzyme sur la production des HS membranaires.

Nos résultats montrent que, lorsque les fibroblastes sont transfectés par un siRNA β3GalT6, l'expression la protéine est toujours présente (au moins 48h post transfection). Ceci explique que l'expression des chaînes de HS au niveau de la membrane plasmique soit faiblement (ou non) réduite, comme pour l'anabolisme des GAGs matriciels, dans la mesure où la protéine

reste exprimée (même de façon légèrement réduite). Il reste donc encore suffisamment de β3GalT6 exprimée dans les cellules après extinction par le siRNA, expliquant le maintien du niveau de synthèse des GAGs (matriciels et membranaires).

III.3 Analyse des conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur la capacité migratoire des fibroblastes contrôle correspondant aux patients 2, 3 et 5.

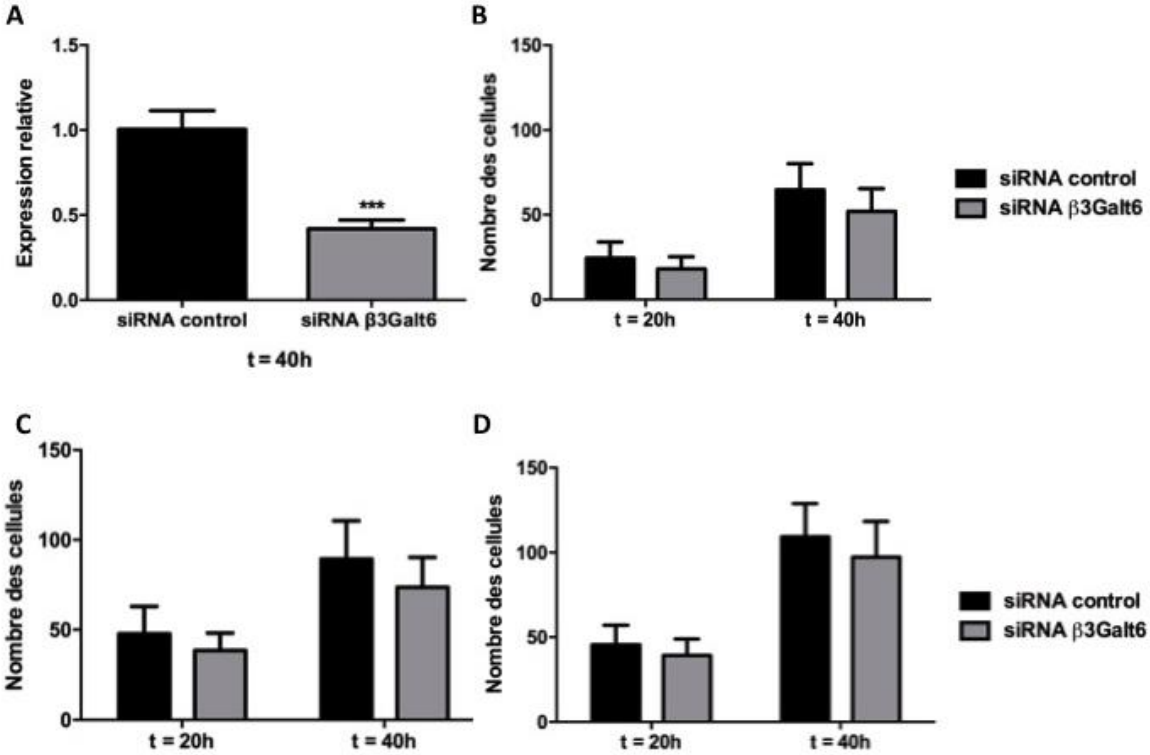


Figure 23 Analyse des conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain.
(A) Analyse de l'expression de l'ARNm de la β3GalT6 après extinction du gène *B3GALT6* par les siRNA contrôle et siRNA β3GalT6. (B, C et D) Analyse de la capacité migratoire des fibroblastes après extinction de l'expression du gène *B3GALT6* par des siRNA chez les fibroblastes contrôle correspondant aux patients 2(B), 3(C) et 5(D). Après l'ensemencement des cellules et 24h de transfection par le siRNA contrôle ou le siRNA β3GalT6 en boîte de culture *μ-Dish 35mm, high* (Ibidi®), la pellicule de silicone est retirée de la boîte de culture, créant une brèche entre les cellules (correspondant au temps de migration de 0h) comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les observations sont réalisées aux temps de migration de 20h et 40h. Les cellules proliférant et migrant dans la brèche cellulaire générée au temps 20h et 40h sont comptées à l'aide du logiciel photoshop. n=3 (expériences réalisées en duplicat), ***$p < 0.001$, test *t* de Student

Comme précédemment, nous avons commencé par évaluer le taux d'expression des ARNm de la β3GalT6 dans les fibroblastes contrôle (contrôles associés aux patients 2, 3 et 5) après transfection par un siRNA contrôle ou un siRNA-β3GalT6 après 20h et 40h de migration. Les résultats peuvent être comparés à ceux obtenus précédemment lors de la manipulation permettant l'évaluation du taux de biosynthèse des GAGs matriciels (Figure 21A) à savoir que

l'expression de l'ARNm de la β3GalT6 a été réduite d'environ 60% dans les fibroblastes contrôle transfectés par le siRNA-β3GalT6 par rapport aux cellules transfectées par le siRNA contrôle (Figure 23A). Cette extinction reste stable au moins pendant tout le temps de la manipulation.

Pour analyser les conséquences de l'extinction du gène *B3GALT6* sur la capacité de migration des fibroblastes transfectés par un siRNA contrôle ou un siRNA-β3GalT6, nous avons réalisé un test de blessure («*wound healing test*»). Nous observons que la réduction d'expression du gène *B3GALT6* par des siRNA entraine une diminution non significative, d'environ 10% de la migration des fibroblastes par rapport aux cellules transfectées par le siRNA contrôle, ce qui a pu être observé dans nos conditions expérimentales aux temps de migration de 20h et de 40h. (Figure 23B, C et D).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que, dans nos conditions expérimentales, l'extinction du gène *B3GALT6* affecte peu, voire n'affecte pas, la migration des fibroblastes dans la brèche cellulaire. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors de la mesure du taux de synthèse des GAGs matriciels (voir partie III.1, Figure 21B, C et D) pour lesquels nous n'avions pas observé de différence significative de la production de GAGs à partir d'un xyloside exogène après extinction du gène *B3GALT6* dans les fibroblastes. Comme indiqué précédemment, il reste donc encore suffisamment de β3GalT6 exprimée dans les cellules après extinction par le siRNA, pour maintenir le niveau de synthèse des GAGs (matriciels et membranaires) et assurer la migration des cellules.

Ces résultats nous indiquent surtout que cette manipulation ne pourra pas être exploitée en l'état pour réduire de façon importante le niveau d'expression de l'enzyme dans les cellules contrôle (malgré la bonne extinction de l'expression de son ARNm) et ne nous permettra pas de reproduire les défauts observés dans les cellules déficientes des patients en termes de perte d'anabolisme et de réduction de la migration cellulaire. Les conditions de transfection pourraient dans un premier temps être améliorées pour essayer d'augmenter l'efficacité de transfection et entrainer une extinction totale de l'expression du gène dans les cellules. La concentration en siRNA, le nombre de cellules utilisées ou le tempts de contact des cellules avec les siRNA pourraient ainsi être adaptés. D'autres méthodes d'extinction de gène pourraient également être envisagées, comme par exemple l'utilisation d'un shRNA (*small hairpin RNA*) transfecté dans les cellules suite à une infection par un vecteur viral recombinant (lentivirus par

exemple), système qui présente une bonne efficacité de transfection et reste stable au cours de l'expérimentation.

Chapitre IV : Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs matriciels et la capacité migratoire des fibroblastes de derme de peau des patients.

De façon complémentaire à l'extinction du gène *B3GALT6* par des siRNA, des analyses de **restauration de l'expression de la β3GalT6 dans les fibroblastes des patients** ont été menées pour évaluer si l'expression de la protéine sauvage dans les cellules déficientes est capable de s'opposer, voire de restaurer, la perte d'anabolisme et le défaut de migration observés lorsque l'enzyme est mutée.

IV.1 Analyse de l'expression de la β3GalT6 après restauration de l'expression de son gène dans les fibroblastes de derme de peau des patients 2, 3 et 5.

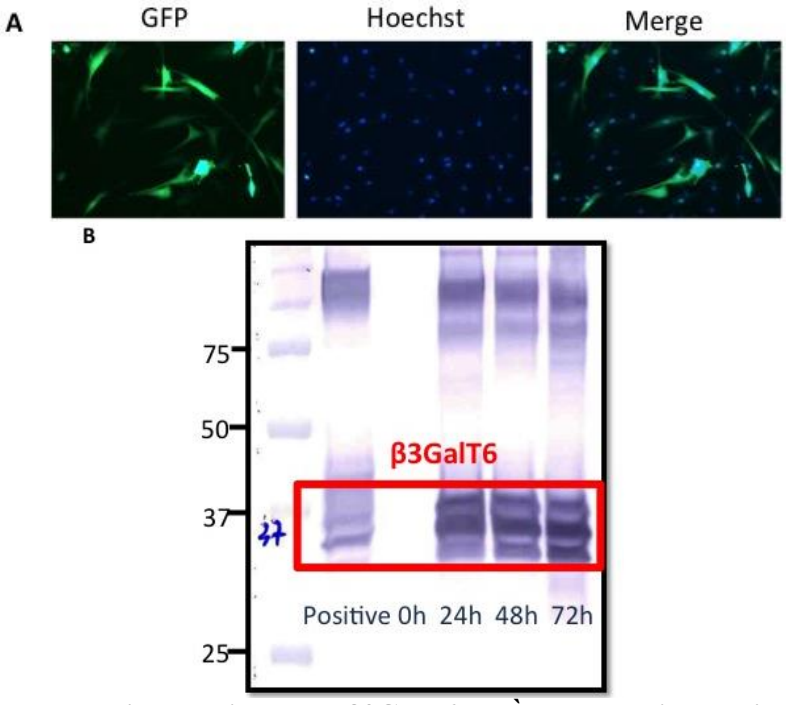


Figure 24 Analyse de l'expression de la β3GalT6 aprè restauration de l'expression de son gè e dans les fibroblastes de patient.
(A) Evaluation de l'efficacité de la transfection dans les fibroblastes des patients. L'électroporation d'un plasmide contenant la séquence codant la GFP (*green fluorescent protein*) (vert) a été analysée 24h, 48h ou 72h post-transfection. Les cellules sont fixées avec une solution de PFA (*para*formaldéhyde) à 4% (p/v), et incubées en présence d'une solution de Hoechst (intercalant) à 2 mg/mL afin de colorer les noyaux cellulaires en bleu. Les images sont analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica DMI3000 B, objectif 10x). (B) Analyse de la restauration de l'expression de la β3GalT6 étiquetée HA (β3GalT6-HA) par western blot en utilisant un anticorps anti-HA. Les fibroblastes des patients ont été transfectés transitoirement par le plasmide contenant la séquence codant la β3GalT6-HA. Après 24, 48 et 72h d'incubation, les cellules sont récupérées et lysées. Les cellules HeLa surexprimant la β3GalT6-HA recombinante humaine sauvage sont utilisées comme témoin positif d'expression (noté « positive »). Le lysat cellulaire est déposé sur gel à raison de 30µg de protéines totales par puits comme décrit dans

la partie *Matériels et Méthodes*. Les bandes correspondant à la β3GalT6-HA présentent une masse molaire apparente de 35-40kDa. Plusieurs bandes pouvant correspondre à différentes formes de maturation (produits de *N*-glycosylation par exemple) de la β3GalT6-HA sont également révélées dans ces conditions.

Nous avons tout d'abord mis au point et optimisé les conditions expérimentales permettant une électroporation optimale des fibroblastes des patients en termes de temps, quantité d'ADN et protocole de transfection. Les mises au point ont été effectuées en utilisant un plasmide contenant la séquence codant la GFP transfecté dans les fibroblastes de patients. Au final et après optimisation, environ 30% des fibroblastes de patients électroporés expriment la GFP (Figure 24A). L'expression de la GFP reste de plus stable pendant au moins 72h après transfection (*résultat non montré*).

Nous avons ensuite utilisé les conditions de transfection précédemment déterminées pour évaluer le taux d'expression de la β3GalT6 sauvage dans les fibroblastes des patients après électroporation par un vecteur contenant la séquence codant la β3GalT6-HA. Les immunoblots réalisés à partir des homogénats des cellules électroporées montrent que l'expression de la β3GalT6-HA est importante et stable pendant 72h après la transfection (Figure 24B). Ces résultats indiquent une bonne efficacité et une stabilité de l'expression de la β3GalT6 après restauration de l'expression de l'enzyme dans les conditions expérimentales utilisées. Ces expériences nous permettent donc d'analyser l'impact de la restauration de l'expression d'une enzyme sauvage dans les cellules déficientes sur le taux de synthèse des GAGs, le niveau d'expression de HS membranaires et la capacité de migration de ces cellules génétiquement modifiées.

IV.2 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs matriciels à partir de 4-MOX dans les fibroblastes de derme de peau des patients (Patient 2, 3 et 5).

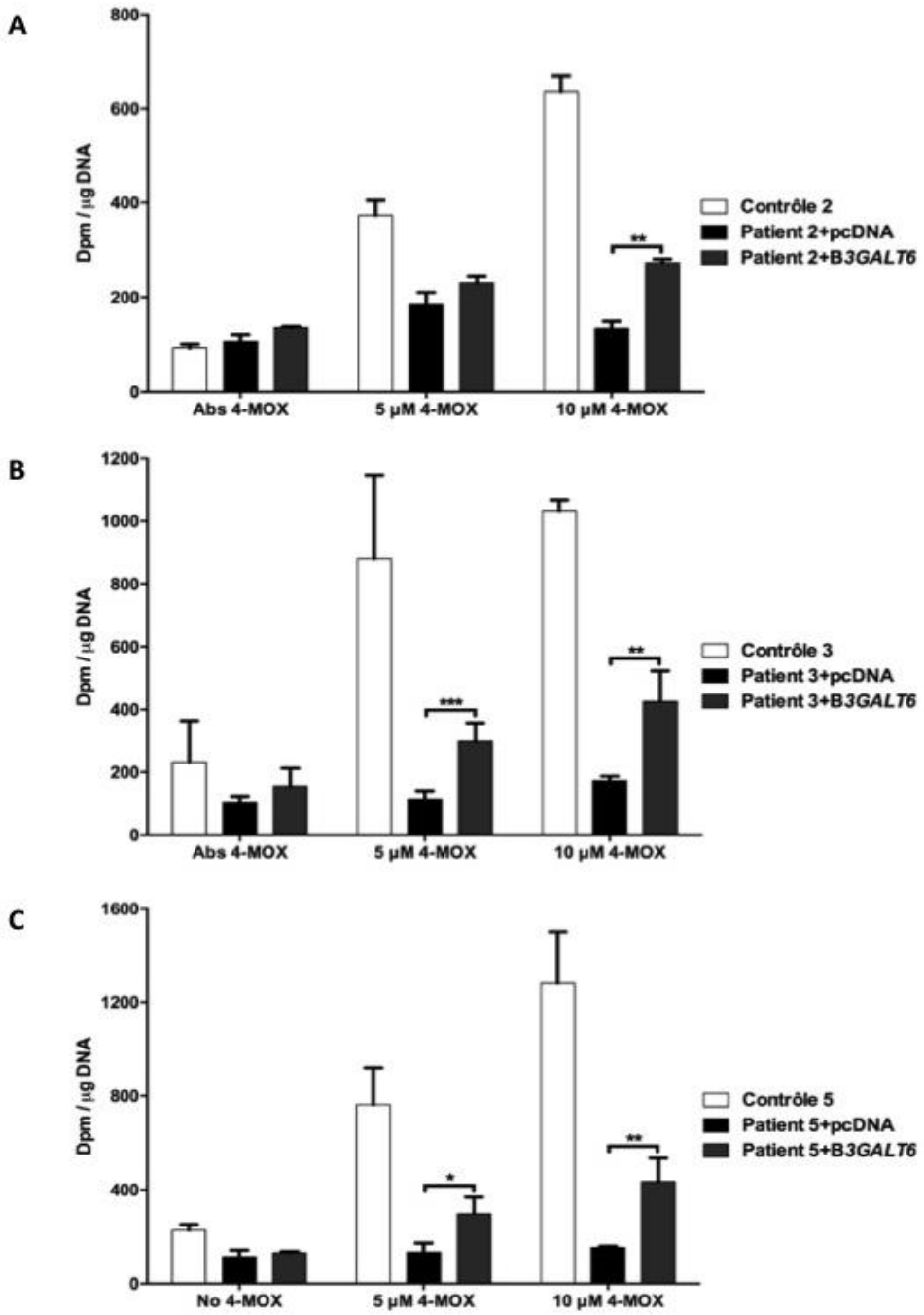


Figure 25 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes des patients.
Le taux de synthèse des GAGs matriciels est analysé après électroporation du plasmide contenant la séquence codant la β3GalT6-HA ou du vecteur vide dans les cellules fibroblastiques des patients (patients 2(A), 3(B) et 5(C), Tableau 11), en présence (ou absence) de xyloside exogène (4-MOX) et de soufre radiomarqué comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les cellules contrôle ont également été analysées dans les mêmes conditions expérimentales. n=3 (expériences indépendantes réalisées en duplicat), *$p<0.05$, **$p<0.01$ et ***$p<0.001$, test *t* de Student.

Pour analyser les conséquences de la restauration du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs dans les fibroblastes des patients (patients 2, 3 et 5, Tableau 11), nous avons tout d'abord évalué le taux d'incorporation du soufre radiomarqué dans les chaînes de GAGs néosynthétisées à partir du 4-MOX dans les fibroblastes électroporés par le plasmide contenant la séquence codant la β3GalT6 sauvage ou par le vecteur vide.

Les résultats de la figure 25 montrent qu'il n'y a pas de différence significative du taux de synthèse des GAGs entre les fibroblastes des patients transfectés par le plasmide contenant la séquence codant la β3GalT6 et celui des cellules transfectées par le plasmide vide en absence de xyloside exogène dans le milieu de culture. Une augmentation significative du taux de synthèse des GAGs est observée en présence de 5µM final de 4-MOX, dans les fibroblastes des patients 3 et 5, mais n'est pas significative pour le patient 2 après électroporation dans nos conditions expérimentales. Les différences sont plus marquées à la plus forte concentration du 4-MOX testée (10µM final). Dans ces conditions, les résultats montrent que le taux de synthèse des GAGs dans les fibroblastes des patients transfectés par le plasmide *B3GALT6* est 2 à 3 fois plus important que celui des cellules transfectées par le plasmide vide. Malgré tout, la transfection du plasmide *B3GALT6* restaure environ la moitié du taux de synthèse des GAGs dans les fibroblastes des patients par rapport aux cellules contrôle, ce qui peut être liée à l'efficacité de transfection du plasmide (qui a précédemment été estimée à environ 30%).

En conclusion de cette série d'expérimentations, nos résultats montrent une augmentation de la synthèse des GAGs dans les fibroblastes de peau de tous les patients étudiés (Patient 2, 3 et 5) après électroporation du plasmide contenant le gène *B3GALT6,* Figure 25). Ces résultats sont prometteurs car ils semblent indiquer qu'une restauration de l'expression de la β3GalT6 sauvage dans des cellules porteuses d'une altération génétique pourrait permettre de s'opposer, au moins partiellement, au défaut de synthèse des GAGs observés dans les cellules des patients.

IV.3 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes des patients (Patient 2, 3 et 5).

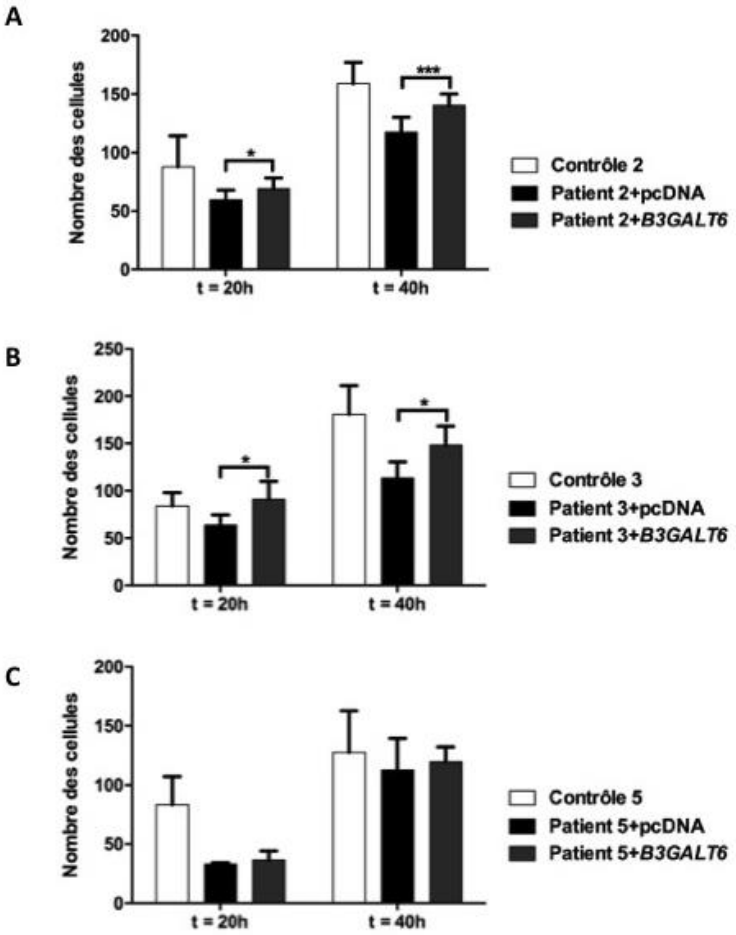


Figure 26 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* après transfection du plasmide contenant le gène *B3GALT6* sur la capacité migratoire des fibroblastes de derme des patients 2(A), 3(B) et 5(C).
Après transfection par le plasmide vide ou le plasmide *B3GALT6*, les fibroblastes sont ensemencés séparément dans chacune des deux chambres de l'insert en boîte de culture *µ-Dish 35mm, high* (Ibidi®), et placés durant toute la nuit à l'incubateur à 37°C afin d'obtenir une adhésion complète. A confluence, la pellicule de silicone est retirée de la boîte de culture, créant une brèche entre les cellules (correspondant au temps de migration de 0h) comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les observations sont réalisées aux temps de migration de 20h et 40h. Les cellules proliférant et migrant dans la brèche cellulaire générée au temps 20h et 40h sont comptées à l'aide du logiciel photoshop. n=3 (expériences réalisées en duplicat), *$p<0.05$ et *** $p<0.001$, test *t* de Student.

Pour analyser les conséquences de la restauration du gène *B3GALT6* sur la capacité de migration des fibroblastes des patients (Patients 2, 3 et 5) transfectés par le plasmide contenant le gène *B3GALT6* ou le plasmide vide, nous avons réalisé un test de blessure, comme décrit dans la section *Matériels et Méthodes*.

Nous observons que la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* entraine une augmentation respective de 16% et 20% de la migration des fibroblastes du patient 2 par rapport aux cellules transfectées par le plasmide vide dans nos conditions expérimentales aux temps de migration de 20h et 40h (Figure 26A). De la même façon, nous observons une augmentation plus importante (de 43% et 30%) de migration dans les fibroblastes du patient 3 transfectés par le plasmide *B3GALT6* par rapport aux cellules transfectées par le plasmide vide aux temps de migration de 20h et 40h respectivement (Figure 26B). Il est intéressant de noter qu'aucune différence significative du nombre de cellules migrant dans la brèche n'est observée entre les fibroblastes contrôle et les cellules des patients 2 et 3 après une transfection du plasmide *B3GALT6*. Il n'y a pas de différence significative non plus de la migration entre les cellules contrôle et celle des cellules génétiquement modifiées du patient 5 (Figure 26C), résultat qui avait déjà été observé pour ce patient (Figure 19), et qui n'est pas modifié par la surexpression de la β3GalT6.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux évaluant le taux de synthèse des GAGs dans les cellules déficientes après transfection par le plasmide contenant le gène *B3GALT6*. L'ensemble de ces résultats suggère donc que, dans nos conditions expérimentales, l'électroporation du plasmide contenant le gène *B3GALT6* peut restaurer partiellement la synthèse des GAGs et conduit à une augmentation de la capacité migratoire des fibroblastes de peau des patients. Pour les patients 2 et 3, la transfection semble pouvoir restaurer le niveau de migration des fibroblastes contrôle. Une restauration d'environ 30% du taux de l'expression de la β3GalT6 dans les fibroblastes pourrait permettre de s'opposer, au moins partiellement, au défaut de biosynthèse des GAGs et même entièrement à la capacité migratoire des cellules de patients. Ceci confirme que la β3GalT6 joue un rôle important dans le processus de biosynthèse des GAGs, et que la modulation de son expression (ici sa restauration) permet de compenser un déficit associé à une déficience génétique. Des fonctions cellulaires, comme la migration, peuvent ainsi être régulées dans ce contexte et ouvrir des perspectives prometteuses dans la mise en place de stratégies utilisant des cellules génétiquement modifiées pour combler un déficit associé à la mutation d'un gène dans une pathologie.

IV.4 Analyse des conséquences de la restauration de l'expression du gène *B3GALT6* sur l'expression des HS membranaires dans les fibroblastes de derme de peau des patients (Patient F1400276) par immunofluorescence.

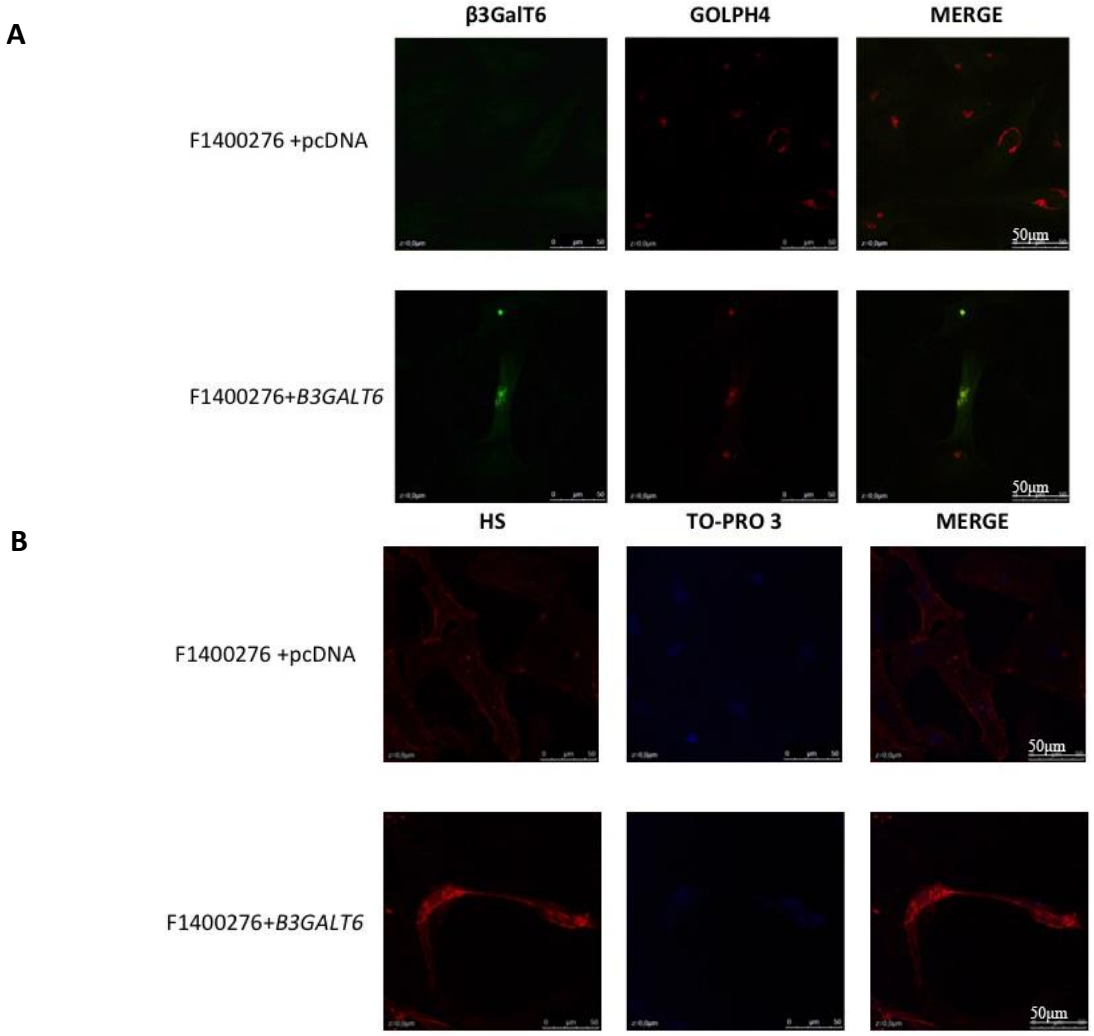


Figure 27 Analyse par microscopie confocale de l'expression de la β3GalT6 et des HS membranaires dans les fibroblastes de patient (F1400276, Tableau 11) après la restauration de l'expression du gèn *B3GALT6*.
(A) Analyse de l'expression de la β3GalT6 marquée par l'anticorps anti-β3GalT6 (vert) après transfection du plasmide contenant le'ADNc *B3GALT6* ou le plasmide vide. L'anticorps anti-GOLPH4 est utilisé pour marquer l'appareil de Golgi (rouge). (B) Analyse de l'expression des HS membranaires marqués par l'anticorps anti-HS (10E4) (rouge). Les noyaux cellulaires ont été marqués par un agent intercalent, le TO-PRO3 (bleu), comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. L'analyse microscopique est réalisée à l'aide du microscope confocal SP5-X laser. n=2, échelle=50µm

L'analyse de l'expression de la β3GalT6 et des chaînes de HS membranaires a été réalisée par immunofluorescence dans les fibroblastes du patient F1400276 (Tableau 11, Figure 27) après la restauration de l'expression de la β3GalT6. La figure 27 montre une faible expression de la β3GalT6 (en vert) dans les fibroblastes du **patient F1400276** transfectés par le plasmide vide.

Par contre, nous observons une augmentation importante de l'expression de cette enzyme dans les cellules électroporées par le plasmide contenant la séquence codant la β3GalT6 par rapport aux celles transfectées par le plasmide vide. Il est important de noter que la surexpression de la β3GalT6 dans les cellules déficientes ne modifie pas leur localisation subcellulaire car les protéines exprimées suite à la transfection co-localisent avec le marqueur GOLPH4 (en rouge). Elles sont donc bien localisées dans l'appareil de Golgi, là où doit s'excercer leur activité biologique. L'expression des chaînes de HS membranaires est également augmentée dans les fibroblastes de patient après électroporation du plasmide *B3GALT6* par rapport aux cellules transfectées par le plasmide vide. Nos résultats indiquent donc que, dans nos conditions expérimentales, l'électroporation du plasmide contenant le gène *B3GALT6* peut restaurer l'expression de la β3GalT6 et conduit à une augmentation de la biosynthèse des chaînes des HS membranaires dans les fibroblastes de peau des patients. Ces résultats sont cohérents avec les précédents obtenus sur un autre lot de cellules (patients 2, 3 et 5) pour lesquels la mesure du taux de synthèse des GAGs (Figure 25) et la capacité migratoire des cellules déficientes (Figure 26) étaient augmentées après restauration de l'expression de la β3GalT6. Pour compléter cette partie, la mesure du taux de synthèse des GAGs et de la capacité migratoire sera effectuée prochainement sur les cellules de ce patient.

L'analyse de l'activité GalT pourra être envisagée en parallèle et testée dans les cellules déficientes après une restauration de l'expression de la β3GalT6 sauvage pour confirmer que l'augmentation du taux de synthèse des GAGs (matriciels et membranaires) associée à la restauration de la migration des cellules sont liées à la réexpression d'une enzyme sauvage active dans les cellules déficientes.

La restauration de l'expression de la β3GalT6 par une technique utilisant l'électroporation peut toutefois être discutée. En effet, cette méthode peut s'avérer relativement efficace dans certains cas car elle permet de créer transitoirement des pores membranaires par lesquels l'ADN plasmidique peut entrer dans la cellule.

Malgré tout, l'électroporation peut conduire à un changement du phénotype cellulaire et surtout à une mortalité cellulaire élevée, en particulier vis-à-vis de cellules porteuses d'une déficience génétique, qui sont souvent plus fragiles que des cellules non déficientes. Nous avons observé que certains fibroblastes présentent une forme ronde après électroporation, au lieu d'une forme fusiforme, étoilée, aplatie ou allongée, indiquant un impact de la technique de transfert de gène sur la morphologie des cellules. Nous avons été confrontés à ce problème avec les cellules du

patient F1400359 pour lesquelles la mesure de l'anabolisme des GAGs et l'analyse de la migration cellulaire n'ont pas pu être réalisées car les cellules ne possédaient plus une morphologie de type fibroblastique. Cette technique n'a également pas pu être mise en œuvre sur les cellules du **patient F1500081** car les cellules n'ont pas pu être remises en culture suite à l'électroporation à cause d'un taux de mortalité trop important.

L'efficacité de cette méthode de restauration de l'expression de la β3GalT6 dans les cellules déficientes des patients, bien qu'optimisée, ne nous a pas permis de disposer de plus de 30% de cellules transfectées, ce qui est correct dans un contexte fondamental, mais non suffisantdans un contexte appliqué à la thérapie cellulaire par exemple. D'autres méthodes de transfert de gènes pourraient donc être envisagées pour introduire l'ADNc de la β3GalT6 dans les fibroblastes des patients pour (i) limiter la mortalité, (ii) ne pas modifier la morphologie et (iii) pour essayer d'augmenter l'efficacité de transfection. Le transfert de gènes utilisant des agents lipidiques comme les liposomes, qui sont des vésicules artificielles possédant des propriétés structurelles analogues à celles des membranes cellulaires, pourraient permettre de limiter la mortalité cellulaire car le transfert de l'ADN dans la cellule s'effectue par endocytose suite à une fusion membranaire. Des agents chimiques, comme des polymères cationiques, comme le polyéthlènimine (PEI) qui se lie aux molécules anioniques (comme l'ADN) et favorisent leur transport à la membrane, pourraient également être utilisés pour la transfection cellulaire, même s'ils sont souvent connus pour présenter une toxicité cellulaire supérieure aux liposomes. En dernier lieu, la transduction (une technique utilsant les virus comme vecteurs) est souvent appliquée sur des types de cellules difficiles à transfecter et présente l'avantage de cibler les cellules qui seront génétiquement modifiées. La transduction est souvent envisagéedans le contexte de la recherche clinique, en utilisant des vecteurs comme des adénovirus (virus possédant un génôme ADN) dont le génôme a été préalablement modifié pour contenir le gène d'intérêt (virus recombinants). Plus récemment, les lentivirus, virus possédant un génôme ARN et présentant la particularité de produire efficacement la protéine d'intérêt, ont été testés dans des modèles de thérapie cellulaire. La transduction est donc une méthode de transfert de gènes qui possède une bonne efficacité de transfert de gènes *in cellulo,* qui peut également conduire à l'intégration du matériel génétique viral (ou du gène d'intérêt) dans le génome de la cellule hôte. Toutes ces techniques pourraient être envisagées et testées dans notre contexte en raison (i) de la fragilité des cellules déficientes par rapport aux cellules contrôle, (ii) de la différence de morphologie et de la croissance cellulaire plus ou moins lente des différentes cellules de

patients et (iii) de la variabilité de réponse des cellules à la technique de transfert de gènes utilisée (ici, l'électroporation).

Conclusions et Perspectives

I. Conclusion

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude de la déficience génétique en β3GalT6 dans les cellules fibroblastiques de patients atteints d'une forme pléiotropique de SED à transmission autosomale récessive. Ces patients présentent des signes cliniques communs avec ceux du SED tels que l'hypermobilité articulaires, les luxations fréquentes, l'aspect mince et fragile de la peau, les défauts de cicatrisation. Ils présentent en outre des contractures articulaires, une scoliose sévère et une hypotonie musculaire. Nous avions précédemment observé que des mutations du gène *B3GALT6* étaient à l'origine d'une diminution de synthèse des GAGs et d'une réduction de la capacité de migration des fibroblastes de derme humain issus de patients atteints d'une forme pléiotropique de SED par rapport aux fibroblastes contrôle non déficients (Malfait, Kariminejad et al. 2013). De façon complémentaire, nous avons analysé, dans ce travail de thèse, les conséquences de la déficience génétique en β3GalT6 (i) chez trois nouveaux patients atteints de formes pléiotropiques de SED et de SEMD-JL1 et présentant des symptômes cliniques modérés à sévères et (ii) dans des cellules fibroblastiques fœtales, porteuses de mutations non décrites jusqu'alors.

Comme pour les premiers patients analysés, nous avons observé que la synthèse des GAGs matriciels à partir d'un xyloside exogène (le 4-MOX) est globalement réduite dans les fibroblastes de ces nouveaux patients ainsi que dans les cellules fœtales déficientes par rapport aux fibroblastes contrôle. Il en est de même pour l'expression des HS membranaires dans la mesure où une réduction du marquage fluorescent des chaînes de HS à la surface des fibroblastes des patients a été détectée par rapport aux cellules contrôle. Une réduction de la capacité migratoire des fibroblastes des patients est également observée par rapport aux fibroblastes contrôle. Ces résultats indiquent que la présence de la β3GalT6 mutée entraîne une réduction globale de la synthèse des GAGs matriciels et membranaires qui contribue au retard de migration des fibroblastes de derme de peau observé chez les patients. Ces résultats pourraient permettre d'expliquer, au moins en partie, les symptômes observés chez ces patients, comme leur retard de cicatrisation. Cette hypothèse est confirmée par la restauration de l'expression de cette enzyme qui permet de contrecarrer les défauts précédemment observés en termes d'anabolisme des GAGs et de migration cellulaire.

La mesure de l'activité galactosyltransférase de la β3GalT6 vis-à-vis d'un analogue de substrat phosphorylé (Gal-Xyl(2P)-OMN) a montré une réduction très marquée de l'activité enzymatique de la β3GalT6 dans les homogénats cellulaires préparés à partir des cellules de

patients par rapport aux homogénats issus des fibroblastes contrôle, indiquant que la β3GalT6 n'est pas capable de transférer le résidu galactose sur l'accepteur disaccharidique. Ce résultat témoigne de l'incapacité de la β3GalT6 mutée à initier la biosynthèse des GAGs et explique la baisse d'anabolisme observée dans les fibroblastes de derme des patients.

Au vu des effets observés pour ces mutations (les plus délétères parmi les nouveaux patients), il est possible que les résidus mutés, en particulier ceux présents dans les motifs conservés ou à leur proximité, soient des résidus impliqués dans le mécanisme catalytique et/ou dans la fixation des substrats et/ou le maintien de la conformation active de l'enzyme, ce qui pourra être exploré par la suite grâce à la production (et la purification) des enzymes recombinantes (voir partie Perspectives). La mesure de la spécificité de substrats et les paramètres cinétiques de l'enzyme sauvage et de ses mutants (enzymes recombinantes porteuses des mutations décrites chez les patients) devraient nous permettre d'obtenir des renseignements complémentaires sur ces différents points.

Pour mieux comprendre le rôle de la β3GalT6 et les conséquences des mutations présentes chez les patients dans la pathogénie du SED, nous avons réalisé, dans la deuxième partie de ce travail de thèse, des expériences de type « gain et perte de fonction » en (i) éteignant l'expression de l'ARNm de la β3GalT6 dans des fibroblastes contrôle grâce à des siRNA et (ii) en restaurant l'expression de la β3GalT6, par électroporation d'un vecteur contenant le gène d'intérêt, dans des fibroblastes des patients.

Nous avons d'abord montré une forte diminution de l'expression du gène *B3GALT6* suite à l'extinction par des siRNA (extinction d'environ 80% stable pendant 72h). Cependant, cette forte réduction d'expression affecte peu, voire n'affecte pas, la synthèse des GAGs à partir un xyloside exogène (4-MOX) et ne modifie pas non plus la capacité migratoire des fibroblastes des cellules contrôle non déficientes. Par contre, une analyse par l'immunofluorescence des HS membranaires et de la β3GalT6 a montré que la réduction de l'expression du gène *B3GALT6* conduit une diminution de la production des HS à la surface cellulaire dans les fibroblastes transfectés par le siRNA β3GalT6 par rapport aux cellules transfectées par le siRNA contrôle. Ces résultats sont cohérents avec la baisse d'anabolisme précédemment observée chez les patients et atteste que la β3GalT6 est une enzyme jouant un rôle très important dans la biosynthèse des chaînes de GAGs.

Nous avons parallèlement pu mettre en évidence une restauration (stable pendant au moins 72h) de l'expression de la β3GalT6 dans les fibroblastes des patients suite à l'électroporation des cellules déficientes par un plasmide contenant la séquence codant la β3GalT6 recombinante humaine. Cette restauration a eu pour conséquence une augmentation de 2 à 3 fois du taux de synthèse des GAGs matriciels, mais n'arrive tout de même pas à la hauteur de l'anabolisme mesuré dans les cellules contrôle. Ce résultat est associé à une augmentation significative de la capacité de migration des fibroblastes dans un test de blessure (*wound healing test*) par rapport aux cellules déficientes transfectées par un plasmide vide, ce qui permet aux cellules génétiquement modifiées de retrouver les capacités de migration des cellules contrôle étudiées dans les mêmes conditions. Par contre, la restauration de l'expression de la β3GalT6 n'a que faiblement augmenté la production des HS à la surface des fibroblastes de patients (par rapport aux cellules contrôle) malgré une bonne expression de la β3GalT6. Ces résultats peuvent peut être s'expliquer par l'efficacité de la technique de transfection utilisée (l'électroporation) qui n'est que 30% et qui reste une méthode agressive de transfert de gènes. D'autres pistes pourront être explorées dans ce contexte (voir partie Perspectives).

II. Perspectives

Nous savons que les PGs sont impliqués dans de nombreux processus biologiques comme la migration et la prolifération cellulaires et qu'ils jouent un rôle essentiel dans le processus de cicatrisation grâce aux interactions qu'ils développent avec multiples effecteurs de la MEC, comme les facteurs de croissance et les intégrines.

Ces travaux pourront être complétés par des essais de production (et de la purification) d'une **forme tronquée soluble** de la β3GalT6 humaine dans un système d'expression bactérien, ce qui nous permettra de disposer (i) d'une plus grande quantité d'enzyme et (ii) d'une protéine purifiée avec laquelle pourront être réalisée des tests d'interactions enzyme/substrat et des mesures des paramètres cinétiques (vitesse maximale transformation du produit (Vmax) et constante apparente d'affinité (Km)). Les mutants de cette enzyme pourront de la même façon être produits, purifiés et caractérisés de la même façon.

Ces travaux seront poursuivis à court et moyen terme sur les **cellules de mammifères recombinantes** surexprimant de façon transitoire la β3GalT6 sauvage et ses mutants (mutations décrites chez les patients). Ces travaux doivent nous permettre d'étudier individuellement les conséquences de chacune des mutations du gène *B3GALT6* sur la synthèse des GAGs, le niveau

de production des HS membranaires, la glycanation de la protéine *core* de la décorine (petit PG matriciel portant une chaine de DS) et la prise en charge des substrats (accepteur et donneur) par ces enzymes mutées ainsi que sur leur efficacité enzymatique.

Nous avons également commencé des essais de caractérisation des **collagènes** dans les MEC des fibroblastes des patients, en collaboration avec la plateforme de protéomique du Laboratoire. Ces résultats devraient nous permettre d'évaluer l'impact des mutations du gène *B3GALT6* sur la composition de la MEC produite par ces cellules déficientes par rapport aux cellules contrôle. Ces travaux pourraient également fournir un certain nombre d'informations importantes nous permettant d'établir un lien entre la diminution du taux de synthèse des GAGs et l'altération du réseau collagénique décrit pour certains patients (en termes de composition et d'organisation matricielle), défauts qui sont à l'origine de la perte de fonctionnalité globale des tissus conjonctifs observés chez les patients atteints de SED.

L'ensemble des résultats obtenus devrait nous permettre de mieux comprendre l'implication de cette enzyme dans le processus physiopathologique du SED et le cas échéant, de proposer différentes stratégies thérapeutiques visant à s'opposer entre autres à la perte d'anabolisme des GAGs et au défaut de migration cellulaire observé dans ce syndrome. Nous aimerions ainsi comprendre la relation existant entre (i) la nature des mutations du gène *B3GALT6*, (ii) l'altération de la structure et de la fonction de la MEC (en lien avec les modifications du métabolisme des GAGs (et des PGs qui les portent) et des collagènes) et (iii) la sévérité des symptômes cliniques observés chez les patients. A plus long terme, il est possible que ces travaux puissent fournir des informations préliminaires au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à s'opposer au défaut de synthèse matricielle (en termes d'anabolisme des GAGs en particulier) et de migration des cellules porteuses de la déficience génétique.

REFERENCES

Abrink, M., M. Grujic and G. Pejler (2004). "Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule." J Biol Chem **279**(39): 40897-40905.

Almeida, R., S. B. Levery, U. Mandel, H. Kresse, T. Schwientek, E. P. Bennett and H. Clausen (1999). "Cloning and Expression of a Proteoglycan UDP-Galactose: -Xylose 1,4-Galactosyltransferase I: a seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family." J Biol Chem **274**(37): 26165-26171.

Amado, M. (1999). "Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1473**(1): 35-53.

Amado, M., R. Almeida, F. Carneiro, S. B. Levery, E. H. Holmes, M. Nomoto, M. A. Hollingsworth, H. Hassan, T. Schwientek, P. A. Nielsen, E. P. Bennett and H. Clausen (1998). "A Family of Human 3-Galactosyltransferases: Characterization of four members of a UDP-Galactose: beta-N-acetyl-glucosamine/ beta-N-acetyl-galactosamine-1,3-galactosyltransferase family." J Biol Chem **273**(21): 12770-12778.

Arikawa-Hirasawa, E., H. Watanabe, H. Takami, J. R. Hassell and Y. Yamada (1999). "Perlecan is essential for cartilage and cephalic development." Nat Genet **23**(3): 354-358.

Aspberg, A. (2012). "The different roles of aggrecan interaction domains." J Histochem Cytochem **60**(12): 987-996.

Aspberg, A., R. Miura, S. Bourdoulous, M. Shimonaka, D. Heinegard, M. Schachner, E. Ruoslahti and Y. Yamaguchi (1997). "The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10116-10121.

Bachy, S., F. Letourneur and P. Rousselle (2008). "Syndecan-1 interaction with the LG4/5 domain in laminin-332 is essential for keratinocyte migration." J Cell Physiol **214**(1): 238-249.

Baghy, K., K. Dezso, V. Laszlo, A. Fullar, B. Peterfia, S. Paku, P. Nagy, Z. Schaff, R. V. Iozzo and I. Kovalszky (2011). "Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice." Lab Invest **91**(3): 439-451.

Baghy, K., Z. Horvath, E. Regos, K. Kiss, Z. Schaff, R. V. Iozzo and I. Kovalszky (2013). "Decorin interferes with platelet-derived growth factor receptor signaling in experimental hepatocarcinogenesis." Febs j **280**(10): 2150-2164.

Baghy, K., R. V. Iozzo and I. Kovalszky (2012). "Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis." J Histochem Cytochem **60**(4): 262-268.

Bai, X., D. Zhou, J. R. Brown, B. E. Crawford, T. Hennet and J. D. Esko (2001). "Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6)." J Biol Chem **276**(51): 48189-48195.

Bame, K. J., L. Zhang, G. David and J. D. Esko (1994). "Sulphated and undersulphated heparan sulphate proteoglycans in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in N-sulphotransferase." Biochem J **303 (Pt 1)**: 81-87.

Beighton, P., A. De Paepe, B. Steinmann, P. Tsipouras and R. J. Wenstrup (1998). "Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK)." Am J Med Genet **77**(1): 31-37.

Beighton, P. and K. Kozlowski (1980). "Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia with joint laxity and severe, progressive kyphoscoliosis." Skeletal Radiol **5**(4): 205-212.

Bi, Y., C. H. Stuelten, T. Kilts, S. Wadhwa, R. V. Iozzo, P. G. Robey, X. D. Chen and M. F. Young (2005). "Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells." J Biol Chem **280**(34): 30481-30489.

Binnerts, M. E., X. Wen, K. Cante-Barrett, J. Bright, H. T. Chen, V. Asundi, P. Sattari, T. Tang, B. Boyle, W. Funk and F. Rupp (2004). "Human Crossveinless-2 is a novel inhibitor of bone morphogenetic proteins."

Biochem Biophys Res Commun **315**(2): 272-280.

Bocian, C., A. K. Urbanowitz, R. T. Owens, R. V. Iozzo, M. Gotte and D. G. Seidler (2013). "Decorin potentiates interferon-gamma activity in a model of allergic inflammation." J Biol Chem **288**(18): 12699-12711.

Bork, P. and L. Patthy (1995). "The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation." Protein Sci **4**(7): 1421-1425.

Breton, C., S. Fournel-Gigleux and M. M. Palcic (2012). "Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases." Curr Opin Struct Biol **22**(5): 540-549.

Briggs, M. D., S. M. Hoffman, L. M. King, A. S. Olsen, H. Mohrenweiser, J. G. Leroy, G. R. Mortier, D. L. Rimoin, R. S. Lachman, E. S. Gaines and et al. (1995). "Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene." Nat Genet **10**(3): 330-336.

Brown, E. L., R. M. Wooten, B. J. Johnson, R. V. Iozzo, A. Smith, M. C. Dolan, B. P. Guo, J. J. Weis and M. Hook (2001). "Resistance to Lyme disease in decorin-deficient mice." J Clin Invest **107**(7): 845-852.

Brule, S., V. Friand, A. Sutton, F. Baleux, L. Gattegno and N. Charnaux (2009). "Glycosaminoglycans and syndecan-4 are involved in SDF-1/CXCL12-mediated invasion of human epitheloid carcinoma HeLa cells." Biochim Biophys Acta **1790**(12): 1643-1650.

Bui, C., I. Talhaoui, M. Chabel, G. Mulliert, M. W. Coughtrie, M. Ouzzine and S. Fournel-Gigleux (2010). "Molecular characterization of beta1,4-galactosyltransferase 7 genetic mutations linked to the progeroid form of Ehlers-Danlos syndrome (EDS)." FEBS Lett **584**(18): 3962-3968.

Byers, P. H. and M. L. Murray (2014). "Ehlers-Danlos syndrome: a showcase of conditions that lead to understanding matrix biology." Matrix Biol **33**: 10-15.

Calmus, M. L., E. E. Macksoud, R. Tucker, R. V. Iozzo and B. E. Lechner (2011). "A mouse model of spontaneous preterm birth based on the genetic ablation of biglycan and decorin." Reproduction **142**(1): 183-194.

Cartault, F., P. Munier, M. L. Jacquemont, J. Vellayoudom, B. Doray, C. Payet, H. Randrianaivo, J. M. Laville, A. Munnich and V. Cormier-Daire (2015). "Expanding the clinical spectrum of B4GALT7 deficiency: homozygous p.R270C mutation with founder effect causes Larsen of Reunion Island syndrome." Eur J Hum Genet **23**(1): 49-53.

Castori, M. (2012). "Ehlers-danlos syndrome, hypermobility type: an underdiagnosed hereditary connective tissue disorder with mucocutaneous, articular, and systemic manifestations." ISRN Dermatol **2012**: 751768.

Chen, D., M. Zhao and G. R. Mundy (2004). "Bone morphogenetic proteins." Growth Factors **22**(4): 233-241.

Chen, S. and D. E. Birk (2013). "The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly." FEBS J **280**(10): 2120-2137.

Cheng, B., M. Montmasson, L. Terradot and P. Rousselle (2016). "Syndecans as Cell Surface Receptors in Cancer Biology. A Focus on their Interaction with PDZ Domain Proteins." Front Pharmacol **7**: 10.

Choi, S., J. Y. Kim, J. H. Park, S. T. Lee, I. O. Han and E. S. Oh (2012). "The matrix metalloproteinase-7 regulates the extracellular shedding of syndecan-2 from colon cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **417**(4): 1260-1264.

Choi, Y., H. Chung, H. Jung, J. R. Couchman and E. S. Oh (2011). "Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity." Matrix Biol **30**(2): 93-99.

Cikrit, D. F., J. H. Miles and D. Silver (1987). "Spontaneous arterial perforation: the Ehlers-Danlos specter." J Vasc Surg **5**(2): 248-255.

Clasper, S., S. Vekemans, M. Fiore, M. Plebanski, P. Wordsworth, G. David and D. G. Jackson (1999). "Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action." J Biol Chem **274**(34): 24113-24123.

Colige, A., L. Nuytinck, I. Hausser, A. J. van Essen, M. Thiry, C. Herens, L. C. Ades, F. Malfait, A. D. Paepe, P. Franck, G. Wolff, J. C. Oosterwijk, J. H. Smitt, C. M. Lapiere and B. V. Nusgens (2004). "Novel types of

mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIC) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene." J Invest Dermatol **123**(4): 656-663.

Colige, A., A. L. Sieron, S. W. Li, U. Schwarze, E. Petty, W. Wertelecki, W. Wilcox, D. Krakow, D. H. Cohn, W. Reardon, P. H. Byers, C. M. Lapiere, D. J. Prockop and B. V. Nusgens (1999). "Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene." Am J Hum Genet **65**(2): 308-317.

Couchman, J. R. (2010). "Transmembrane signaling proteoglycans." Annu Rev Cell Dev Biol **26**: 89-114.

Danielson, K. G., H. Baribault, D. F. Holmes, H. Graham, K. E. Kadler and R. V. Iozzo (1997). "Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility." J Cell Biol **136**(3): 729-743.

Datta, S., M. Pierce and M. W. Datta (2006). "Perlecan signaling: helping hedgehog stimulate prostate cancer growth." Int J Biochem Cell Biol **38**(11): 1855-1861.

De Paepe, A. and F. Malfait (2012). "The Ehlers-Danlos syndrome, a disorder with many faces." Clin Genet **82**(1): 1-11.

De Paepe, A., L. Nuytinck, I. Hausser, I. Anton-Lamprecht and J. M. Naeyaert (1997). "Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II." Am J Hum Genet **60**(3): 547-554.

Echtermeyer, F., J. Bertrand, R. Dreier, I. Meinecke, K. Neugebauer, M. Fuerst, Y. J. Lee, Y. W. Song, C. Herzog, G. Theilmeier and T. Pap (2009). "Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis." Nat Med **15**(9): 1072-1076.

Elliott, D. M., P. S. Robinson, J. A. Gimbel, J. J. Sarver, J. A. Abboud, R. V. Iozzo and L. J. Soslowsky (2003). "Effect of altered matrix proteins on quasilinear viscoelastic properties in transgenic mouse tail tendons." Ann Biomed Eng **31**(5): 599-605.

Evers, M. R., G. Xia, H. G. Kang, M. Schachner and J. U. Baenziger (2001). "Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase." J Biol Chem **276**(39): 36344-36353.

Faber, P., W. L. Craig, J. L. Duncan and K. Holliday (2007). "The successful use of recombinant factor VIIa in a patient with vascular-type Ehlers-Danlos syndrome." Acta Anaesthesiol Scand **51**(9): 1277-1279.

Faiyaz-Ul-Haque, M., S. H. Zaidi, M. Al-Ali, M. S. Al-Mureikhi, S. Kennedy, G. Al-Thani, L. C. Tsui and A. S. Teebi (2004). "A novel missense mutation in the galactosyltransferase-I (B4GALT7) gene in a family exhibiting facioskeletal anomalies and Ehlers-Danlos syndrome resembling the progeroid type." Am J Med Genet A **128A**(1): 39-45.

Ferdous, Z., L. D. Lazaro, R. V. Iozzo, M. Hook and K. J. Grande-Allen (2008). "Influence of cyclic strain and decorin deficiency on 3D cellularized collagen matrices." Biomaterials **29**(18): 2740-2748.

Ferdous, Z., S. B. Peterson, H. Tseng, D. K. Anderson, R. V. Iozzo and K. J. Grande-Allen (2010). "A role for decorin in controlling proliferation, adhesion, and migration of murine embryonic fibroblasts." J Biomed Mater Res A **93**(2): 419-428.

Fisher, M. C., Y. Li, M. R. Seghatoleslami, C. N. Dealy and R. A. Kosher (2006). "Heparan sulfate proteoglycans including syndecan-3 modulate BMP activity during limb cartilage differentiation." Matrix Biol **25**(1): 27-39.

Freeman, R. K., J. Swegle and M. J. Sise (1996). "The surgical complications of Ehlers-Danlos syndrome." Am Surg **62**(10): 869-873.

Fukuta, M., Y. Kobayashi, K. Uchimura, K. Kimata and O. Habuchi (1998). "Molecular cloning and expression of human chondroitin 6-sulfotransferase." Biochim Biophys Acta **1399**(1): 57-61.

Funderburgh, J. L. (2000). "Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function." Glycobiology **10**(10): 951-958.

Götte, M. and H. Kresse (2005). "Defective Glycosaminoglycan Substitution of Decorin in a Patient With Progeroid Syndrome Is a Direct Consequence of Two Point Mutations in the Galactosyltransferase I (β4galT-7) Gene." Biochemical Genetics **43**(1-2): 65-77.

Gandhi, N. S. and R. L. Mancera (2008). "The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins." Chem Biol Drug Des **72**(6): 455-482.

Gao, G., A. Plaas, V. P. Thompson, S. Jin, F. Zuo and J. D. Sandy (2004). "ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1." J Biol Chem **279**(11): 10042-10051.

Gohring, W., T. Sasaki, C. H. Heldin and R. Timpl (1998). "Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope." Eur J Biochem **255**(1): 60-66.

Goldberg, M., D. Septier, O. Rapoport, R. V. Iozzo, M. F. Young and L. G. Ameye (2005). "Targeted disruption of two small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin, excerpts divergent effects on enamel and dentin formation." Calcif Tissue Int **77**(5): 297-310.

Goldoni, S., D. G. Seidler, J. Heath, M. Fassan, R. Baffa, M. L. Thakur, R. T. Owens, D. J. McQuillan and R. V. Iozzo (2008). "An antimetastatic role for decorin in breast cancer." Am J Pathol **173**(3): 844-855.

Gomez-Garre, P., M. Seijo, E. Gutierrez-Delicado, M. Castro del Rio, C. de la Torre, C. Gomez-Abad, J. Morales-Corraliza, M. Puig and J. M. Serratosa (2006). "Ehlers-Danlos syndrome and periventricular nodular heterotopia in a Spanish family with a single FLNA mutation." J Med Genet **43**(3): 232-237.

Gotte, M., D. Spillmann, G. W. Yip, E. Versteeg, F. G. Echtermeyer, T. H. van Kuppevelt and L. Kiesel (2008). "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 **17**(7): 996-1009.

Gotting, C., J. Kuhn, R. Zahn, T. Brinkmann and K. Kleesiek (2000). "Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II." J Mol Biol **304**(4): 517-528.

Goyal, A., N. Pal, M. Concannon, M. Paul, M. Doran, C. Poluzzi, K. Sekiguchi, J. M. Whitelock, T. Neill and R. V. Iozzo (2011). "Endorepellin, the angiostatic module of perlecan, interacts with both the alpha2beta1 integrin and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2): a dual receptor antagonism." J Biol Chem **286**(29): 25947-25962.

Grant, D. S., C. Yenisey, R. W. Rose, M. Tootell, M. Santra and R. V. Iozzo (2002). "Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis." Oncogene **21**(31): 4765-4777.

Gubbiotti, M. A., S. D. Vallet, S. Ricard-Blum and R. V. Iozzo (2016). "Decorin interacting network: A comprehensive analysis of decorin-binding partners and their versatile functions." Matrix Biol **55**: 7-21.

Guo, M. H., J. Stoler, J. Lui, O. Nilsson, D. W. Bianchi, J. N. Hirschhorn and A. Dauber (2013). "Redefining the progeroid form of Ehlers-Danlos syndrome: report of the fourth patient with B4GALT7 deficiency and review of the literature." Am J Med Genet A **161A**(10): 2519-2527.

Hakkinen, L., S. Strassburger, V. M. Kahari, P. G. Scott, I. Eichstetter, R. V. Lozzo and H. Larjava (2000). "A role for decorin in the structural organization of periodontal ligament." Lab Invest **80**(12): 1869-1880.

Han, C., T. Y. Belenkaya, M. Khodoun, M. Tauchi, X. Lin and X. Lin (2004). "Distinct and collaborative roles of Drosophila EXT family proteins in morphogen signalling and gradient formation." Development **131**(7): 1563-1575.

Haruyama, N., T. L. Sreenath, S. Suzuki, X. Yao, Z. Wang, Y. Wang, C. Honeycutt, R. V. Iozzo, M. F. Young and A. B. Kulkarni (2009). "Genetic evidence for key roles of decorin and biglycan in dentin mineralization." Matrix Biol **28**(3): 129-136.

Hennet, T. (2002). "The galactosyltransferase family." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **59**(7): 1081-1095.

Hennet, T., A. Dinter, P. Kuhnert, T. S. Mattu, P. M. Rudd and E. G. Berger (1998). "Genomic Cloning and Expression of Three Murine UDP-galactose: -N-Acetylglucosamine 1,3-Galactosyltransferase Genes." J Biol Chem **273**(1): 58-65.

Hinoi, E., H. Ochi, T. Takarada, E. Nakatani, T. Iezaki, H. Nakajima, H. Fujita, Y. Takahata, S. Hidano, T.

Kobayashi, S. Takeda and Y. Yoneda (2012). "Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor 15 upregulated in osteocytic cells under hypoxia." J Bone Miner Res **27**(4): 938-949.

Hiraoka, N., H. Nakagawa, E. Ong, T. O. Akama, M. N. Fukuda and M. Fukuda (2000). "Molecular cloning and expression of two distinct human chondroitin 4-O-sulfotransferases that belong to the HNK-1 sulfotransferase gene family." J Biol Chem **275**(26): 20188-20196.

Holmborn, K., J. Habicher, Z. Kasza, A. S. Eriksson, B. Filipek-Gorniok, S. Gopal, J. R. Couchman, P. E. Ahlberg, M. Wiweger, D. Spillmann, J. Kreuger and J. Ledin (2012). "On the roles and regulation of chondroitin sulfate and heparan sulfate in zebrafish pharyngeal cartilage morphogenesis." J Biol Chem **287**(40): 33905-33916.

Horvath, Z., I. Kovalszky, A. Fullar, K. Kiss, Z. Schaff, R. V. Iozzo and K. Baghy (2014). "Decorin deficiency promotes hepatic carcinogenesis." Matrix Biol **35**: 194-205.

Huang, W., R. Chiquet-Ehrismann, J. V. Moyano, A. Garcia-Pardo and G. Orend (2001). "Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation." Cancer Res **61**(23): 8586-8594.

Hwang, H. Y., S. K. Olson, J. R. Brown, J. D. Esko and H. R. Horvitz (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**(14): 11735-11738.

Iozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." Annu Rev Biochem **67**: 609-652.

Iozzo, R. V. (2005). "Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 646-656.

Iozzo, R. V., S. Goldoni, A. D. Berendsen and M. F. Young (2011). "Small Leucine-Rich Proteoglycans." 197-231.

Iozzo, R. V. and L. Schaefer (2015). "Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans." Matrix Biol **42**: 11-55.

Isshiki, S., A. Togayachi, T. Kudo, S. Nishihara, M. Watanabe, T. Kubota, M. Kitajima, N. Shiraishi, K. Sasaki and T. Andoh (1999). "Cloning, expression, and characterization of a novel UDP-galactose: β-N-acetylglucosamine β1, 3-galactosyltransferase (β3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom." J Biol Chem **274**(18): 12499-12507.

Izumikawa, T., T. Koike and H. Kitagawa (2012). "Chondroitin 4-O-sulfotransferase-2 regulates the number of chondroitin sulfate chains initiated by chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1." Biochem J **441**(2): 697-705.

Izumikawa, T., T. Koike, S. Shiozawa, K. Sugahara, J. Tamura and H. Kitagawa (2008). "Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization: chondroitin polymerization is achieved by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members." J Biol Chem **283**(17): 11396-11406.

Izumikawa, T., Y. Okuura, T. Koike, N. Sakoda and H. Kitagawa (2011). "Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates the chain length of chondroitin sulfate in co-operation with chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-2." Biochem J **434**(2): 321-331.

Izumikawa, T., T. Uyama, Y. Okuura, K. Sugahara and H. Kitagawa (2007). "Involvement of chondroitin sulfate synthase-3 (chondroitin synthase-2) in chondroitin polymerization through its interaction with chondroitin synthase-1 or chondroitin-polymerizing factor." Biochem J **403**(3): 545-552.

Jarvelainen, H., P. Puolakkainen, S. Pakkanen, E. L. Brown, M. Hook, R. V. Iozzo, E. H. Sage and T. N. Wight (2006). "A role for decorin in cutaneous wound healing and angiogenesis." Wound Repair Regen **14**(4): 443-452.

Jarvelainen, H., A. Sainio and T. N. Wight (2015). "Pivotal role for decorin in angiogenesis." Matrix Biol **43**: 15-26.

Jiang, D., J. Liang, G. S. Campanella, R. Guo, S. Yu, T. Xie, N. Liu, Y. Jung, R. Homer, E. B. Meltzer, Y. Li, A. M. Tager, P. F. Goetinck, A. D. Luster and P. W. Noble (2010). "Inhibition of pulmonary fibrosis in mice

by CXCL10 requires glycosaminoglycan binding and syndecan-4." J Clin Invest **120**(6): 2049-2057.

Jiang, D., J. Liang and P. W. Noble (2011). "Hyaluronan as an immune regulator in human diseases." Physiol Rev **91**(1): 221-264.

Ju, T., K. Brewer, A. D'Souza, R. D. Cummings and W. M. Canfield (2002). "Cloning and expression of human core 1 beta1,3-galactosyltransferase." J Biol Chem **277**(1): 178-186.

Kang, H. G., M. R. Evers, G. Xia, J. U. Baenziger and M. Schachner (2002). "Molecular cloning and characterization of chondroitin-4-O-sulfotransferase-3. A novel member of the HNK-1 family of sulfotransferases." J Biol Chem **277**(38): 34766-34772.

Kim, B. T., H. Kitagawa, J. Tamura, T. Saito, M. Kusche-Gullberg, U. Lindahl and K. Sugahara (2001). "Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7176-7181.

Kitagawa, H., T. Izumikawa, T. Uyama and K. Sugahara (2003). "Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization." J Biol Chem **278**(26): 23666-23671.

Kitagawa, H., H. Shimakawa and K. Sugahara (1999). "The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate." J Biol Chem **274**(20): 13933-13937.

Kitagawa, H., Y. Tone, J. Tamura, K. W. Neumann, T. Ogawa, S. Oka, T. Kawasaki and K. Sugahara (1998). "Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans." J Biol Chem **273**(12): 6615-6618.

Kitagawa, H., K. Tsutsumi, A. Ikegami-Kuzuhara, S. Nadanaka, F. Goto, T. Ogawa and K. Sugahara (2008). "Sulfation of the galactose residues in the glycosaminoglycan-protein linkage region by recombinant human chondroitin 6-O-sulfotransferase-1." J Biol Chem **283**(41): 27438-27443.

Klass, C. M., J. R. Couchman and A. Woods (2000). "Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan." J Cell Sci **113 (Pt 3)**: 493-506.

Knox, S., C. Merry, S. Stringer, J. Melrose and J. Whitelock (2002). "Not all perlecans are created equal: interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors." J Biol Chem **277**(17): 14657-14665.

Kobayashi, M., G. Sugumaran, J. Liu, N. W. Shworak, J. E. Silbert and R. D. Rosenberg (1999). "Molecular cloning and characterization of a human uronyl 2-sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate." J Biol Chem **274**(15): 10474-10480.

Koelling, S., T. S. Clauditz, M. Kaste and N. Miosge (2006). "Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis." Arthritis Res Ther **8**(3): R56.

Koike, T., T. Izumikawa, J. Tamura and H. Kitagawa (2009). "FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region." Biochem J **421**(2): 157-162.

Kolbinger, F., M. B. Streiff and A. G. Katopodis (1998). "Cloning of a human UDP-galactose:2-acetamido-2-deoxy-D-glucose 3beta-galactosyltransferase catalyzing the formation of type 1 chains." J Biol Chem **273**(1): 433-440.

Kolset, S. O. and G. Pejler (2011). "Serglycin: a structural and functional chameleon with wide impact on immune cells." J Immunol **187**(10): 4927-4933.

Korb-Pap, A., A. Stratis, K. Muhlenberg, B. Niederreiter, S. Hayer, F. Echtermeyer, R. Stange, J. Zwerina, T. Pap, H. Pavenstadt, G. Schett, J. S. Smolen and K. Redlich (2012). "Early structural changes in cartilage and bone are required for the attachment and invasion of inflamed synovial tissue during destructive inflammatory arthritis." Ann Rheum Dis **71**(6): 1004-1011.

Korpetinou, A., S. S. Skandalis, V. T. Labropoulou, G. Smirlaki, A. Noulas, N. K. Karamanos and A. D. Theocharis (2014). "Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy." Front Oncol **3**: 327.

Korpetinou, A., S. S. Skandalis, A. Moustakas, K. E. Happonen, H. Tveit, K. Prydz, V. T. Labropoulou, E.

Giannopoulou, H. P. Kalofonos, A. M. Blom, N. K. Karamanos and A. D. Theocharis (2013). "Serglycin is implicated in the promotion of aggressive phenotype of breast cancer cells." PLoS One **8**(10): e78157.

Kosir, M. A., C. C. Quinn, W. Wang and G. Tromp (2000). "Matrix glycosaminoglycans in the growth phase of fibroblasts: more of the story in wound healing." J Surg Res **92**(1): 45-52.

Kresse, H., S. Rosthoj, E. Quentin, J. Hollmann, J. Glossl, S. Okada and T. Tonnesen (1987). "Glycosaminoglycan-free small proteoglycan core protein is secreted by fibroblasts from a patient with a syndrome resembling progeroid." Am J Hum Genet **41**(3): 436-453.

Kreuger, J. and L. Kjellen (2012). "Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability." J Histochem Cytochem **60**(12): 898-907.

Lampe, A. K. and K. M. Bushby (2005). "Collagen VI related muscle disorders." J Med Genet **42**(9): 673-685.

Lauder, R. M. (2009). "Chondroitin sulphate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems." Complement Ther Med **17**(1): 56-62.

Lavrijsen, I. C., P. A. Leegwater, A. J. Martin, S. J. Harris, M. A. Tryfonidou, H. C. Heuven and H. A. Hazewinkel (2014). "Genome wide analysis indicates genes for basement membrane and cartilage matrix proteins as candidates for hip dysplasia in Labrador Retrievers." PLoS One **9**(1): e87735.

Li, L., M. Ly and R. J. Linhardt (2012). "Proteoglycan sequence." Mol Biosyst **8**(6): 1613-1625.

Lin, E. A. and C. J. Liu (2010). "The role of ADAMTSs in arthritis." Protein Cell **1**(1): 33-47.

Liu, C., J. Sheng, J. M. Krahn, L. Perera, Y. Xu, P. H. Hsieh, W. Dou, J. Liu and L. C. Pedersen (2014). "Molecular mechanism of substrate specificity for heparan sulfate 2-O-sulfotransferase." J Biol Chem **289**(19): 13407-13418.

Liu, X., L. Meng, Q. Shi, S. Liu, C. Cui, S. Hu and Y. Wei (2013). "Dermatopontin promotes adhesion, spreading and migration of cardiac fibroblasts in vitro." Matrix Biol **32**(1): 23-31.

Malfait, F., P. De Coster, I. Hausser, A. J. van Essen, P. Franck, A. Colige, B. Nusgens, L. Martens and A. De Paepe (2004). "The natural history, including orofacial features of three patients with Ehlers-Danlos syndrome, dermatosparaxis type (EDS type VIIC)." Am J Med Genet A **131**(1): 18-28.

Malfait, F., A. Kariminejad, T. Van Damme, C. Gauche, D. Syx, F. Merhi-Soussi, S. Gulberti, S. Symoens, S. Vanhauwaert, A. Willaert, B. Bozorgmehr, M. H. Kariminejad, N. Ebrahimiadib, I. Hausser, A. Huysseune, S. Fournel-Gigleux and A. De Paepe (2013). "Defective initiation of glycosaminoglycan synthesis due to B3GALT6 mutations causes a pleiotropic Ehlers-Danlos-syndrome-like connective tissue disorder." Am J Hum Genet **92**(6): 935-945.

Malfait, F., S. Symoens, P. Coucke, L. Nunes, S. De Almeida and A. De Paepe (2006). "Total absence of the alpha2(I) chain of collagen type I causes a rare form of Ehlers-Danlos syndrome with hypermobility and propensity to cardiac valvular problems." J Med Genet **43**(7): e36.

Malfait, F., S. Symoens, J. De Backer, T. Hermanns-Le, N. Sakalihasan, C. M. Lapiere, P. Coucke and A. De Paepe (2007). "Three arginine to cysteine substitutions in the pro-alpha (I)-collagen chain cause Ehlers-Danlos syndrome with a propensity to arterial rupture in early adulthood." Hum Mutat **28**(4): 387-395.

Malmstrom, A., B. Bartolini, M. A. Thelin, B. Pacheco and M. Maccarana (2012). "Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate: biosynthesis and biological function." J Histochem Cytochem **60**(12): 916-925.

Mantle, D., R. M. Wilkins and V. Preedy (2005). "A novel therapeutic strategy for Ehlers-Danlos syndrome based on nutritional supplements." Med Hypotheses **64**(2): 279-283.

Mao, X., C. Gauche, M. W. Coughtrie, C. Bui, S. Gulberti, F. Merhi-Soussi, N. Ramalanjaona, I. Bertin-Jung, A. Diot, D. Dumas, N. De Freitas Caires, A. M. Thompson, J. C. Bourdon, M. Ouzzine and S. Fournel-Gigleux (2016). "The heparan sulfate sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A) is a novel tumor regulator and a prognostic marker in breast cancer." Oncogene **35**(38): 5043-5055.

Marchica, C. L., V. Pinelli, M. Borges, J. Zummer, V. Narayanan, R. V. Iozzo and M. S. Ludwig (2011). "A role for decorin in a murine model of allergen-induced asthma." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **300**(6): L863-873.

Melo, F. R., I. Waern, E. Ronnberg, M. Abrink, D. M. Lee, S. M. Schlenner, T. B. Feyerabend, H. R. Rodewald, B. Turk, S. Wernersson and G. Pejler (2011). "A role for serglycin proteoglycan in mast cell apoptosis induced by a secretory granule-mediated pathway." J Biol Chem **286**(7): 5423-5433.

Merline, R., S. Lazaroski, A. Babelova, W. Tsalastra-Greul, J. Pfeilschifter, K. D. Schluter, A. Gunther, R. V. Iozzo, R. M. Schaefer and L. Schaefer (2009). "Decorin deficiency in diabetic mice: aggravation of nephropathy due to overexpression of profibrotic factors, enhanced apoptosis and mononuclear cell infiltration." J Physiol Pharmacol **60 Suppl 4**: 5-13.

Merline, R., K. Moreth, J. Beckmann, M. V. Nastase, J. Zeng-Brouwers, J. G. Tralhao, P. Lemarchand, J. Pfeilschifter, R. M. Schaefer, R. V. Iozzo and L. Schaefer (2011). "Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21." Sci Signal **4**(199): ra75.

Mikami, T. and H. Kitagawa (2013). "Biosynthesis and function of chondroitin sulfate." Biochim Biophys Acta **1830**(10): 4719-4733.

Mikami, T., S. Mizumoto, N. Kago, H. Kitagawa and K. Sugahara (2003). "Specificities of three distinct human chondroitin/dermatan N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferases demonstrated using partially desulfated dermatan sulfate as an acceptor: implication of differential roles in dermatan sulfate biosynthesis." J Biol Chem **278**(38): 36115-36127.

Miyake, N., T. Kosho and N. Matsumoto (2014). "Ehlers-Danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities." Adv Exp Med Biol **802**: 145-159.

Miyazaki, H., S. Fukumoto, M. Okada, T. Hasegawa and K. Furukawa (1997). "Expression cloning of rat cDNA encoding UDP-galactose:GD2 beta1,3-galactosyltransferase that determines the expression of GD1b/GM1/GA1." J Biol Chem **272**(40): 24794-24799.

Mongiat, M., K. Taylor, J. Otto, S. Aho, J. Uitto, J. M. Whitelock and R. V. Iozzo (2000). "The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7." J Biol Chem **275**(10): 7095-7100.

Mukhopadhyay, A., M. Y. Wong, S. Y. Chan, D. V. Do, A. Khoo, C. T. Ong, H. H. Cheong, I. J. Lim and T. T. Phan (2010). "Syndecan-2 and decorin: proteoglycans with a difference--implications in keloid pathogenesis." J Trauma **68**(4): 999-1008.

Mythreye, K. and G. C. Blobe (2009). "Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion." Cell Signal **21**(11): 1548-1558.

Nakajima, M., S. Mizumoto, N. Miyake, R. Kogawa, A. Iida, H. Ito, H. Kitoh, A. Hirayama, H. Mitsubuchi, O. Miyazaki, R. Kosaki, R. Horikawa, A. Lai, R. Mendoza-Londono, L. Dupuis, D. Chitayat, A. Howard, G. F. Leal, D. Cavalcanti, Y. Tsurusaki, H. Saitsu, S. Watanabe, E. Lausch, S. Unger, L. Bonafe, H. Ohashi, A. Superti-Furga, N. Matsumoto, K. Sugahara, G. Nishimura and S. Ikegawa (2013). "Mutations in B3GALT6, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders." Am J Hum Genet **92**(6): 927-934.

Neill, T., H. R. Jones, Z. Crane-Smith, R. T. Owens, L. Schaefer and R. V. Iozzo (2013). "Decorin induces rapid secretion of thrombospondin-1 in basal breast carcinoma cells via inhibition of Ras homolog gene family, member A/Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1." Febs j **280**(10): 2353-2368.

Neill, T., H. Painter, S. Buraschi, R. T. Owens, M. P. Lisanti, L. Schaefer and R. V. Iozzo (2012). "Decorin antagonizes the angiogenic network: concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3." J Biol Chem **287**(8): 5492-5506.

Nuytinck, L., M. Freund, L. Lagae, G. E. Pierard, T. Hermanns-Le and A. De Paepe (2000). "Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen." Am J Hum Genet **66**(4): 1398-1402.

Ogawa, T., Y. Tsubota, J. Hashimoto, Y. Kariya and K. Miyazaki (2007). "The short arm of laminin gamma2 chain of laminin-5 (laminin-332) binds syndecan-1 and regulates cellular adhesion and migration by suppressing phosphorylation of integrin beta4 chain." Mol Biol Cell **18**(5): 1621-1633.

Okajima, T., S. Fukumoto, K. Furukawa, T. Urano and K. Furukawa (1999). "Molecular Basis for the Progeroid Variant of Ehlers-Danlos Syndrome: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TWO MUTATIONS IN GALACTOSYLTRANSFERASE I GENE." J Biol Chem **274**(41): 28841-28844.

Okajima, T., Y. Nakamura, M. Uchikawa, D. B. Haslam, S. I. Numata, K. Furukawa, T. Urano and K. Furukawa (2000). "Expression cloning of human globoside synthase cDNAs. Identification of beta 3Gal-T3 as UDP-N-acetylgalactosamine:globotriaosylceramide beta 1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase." J Biol Chem **275**(51): 40498-40503.

Okajima, T., K. Yoshida, T. Kondo and K. Furukawa (1999). "Human Homolog of Caenorhabditis elegans sqv-3 Gene Is Galactosyltransferase I Involved in the Biosynthesis of the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans." J Biol Chem **274**(33): 22915-22918.

Orend, G., W. Huang, M. A. Olayioye, N. E. Hynes and R. Chiquet-Ehrismann (2003). "Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4." Oncogene **22**(25): 3917-3926.

Pap, T. and J. Bertrand (2013). "Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation." Nat Rev Rheumatol **9**(1): 43-55.

Patel, R. Y. and P. V. Balaji (2007). "Fold-recognition and comparative modeling of human beta3GalT I, II, IV, V and VI and beta3GalNAcT I: prediction of residues conferring acceptor substrate specificity." J Mol Graph Model **26**(1): 255-268.

Patterson, A. M., L. Gardner, J. Shaw, G. David, E. Loreau, L. Aguilar, B. A. Ashton and J. Middleton (2005). "Induction of a CXCL8 binding site on endothelial syndecan-3 in rheumatoid synovium." Arthritis Rheum **52**(8): 2331-2342.

Pepin, M., U. Schwarze, A. Superti-Furga and P. H. Byers (2000). "Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type." N Engl J Med **342**(10): 673-680.

Petitou, M., B. Casu and U. Lindahl (2003). "1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site." Biochimie **85**(1-2): 83-89.

Poulain, F. E. and H. J. Yost (2015). "Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development?" Development **142**(20): 3456-3467.

Purushothaman, A. and B. P. Toole (2014). "Serglycin proteoglycan is required for multiple myeloma cell adhesion, in vivo growth, and vascularization." J Biol Chem **289**(9): 5499-5509.

Rada, J. A., P. K. Cornuet and J. R. Hassell (1993). "Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins." Exp Eye Res **56**(6): 635-648.

Rahuel-Clermont, S., F. Daligault, M. H. Piet, S. Gulberti, P. Netter, G. Branlant, J. Magdalou and V. Lattard (2010). "Biochemical and thermodynamic characterization of mutated beta1,4-galactosyltransferase 7 involved in the progeroid form of the Ehlers-Danlos syndrome." Biochem J **432**(2): 303-311.

Ramakrishnan, B. and P. K. Qasba (2010). "Structure-based evolutionary relationship of glycosyltransferases: a case study of vertebrate beta1,4-galactosyltransferase, invertebrate beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase and alpha-polypeptidyl-N-acetylgalactosaminyltransferase." Curr Opin Struct Biol **20**(5): 536-542.

Rapraeger, A. C., A. Krufka and B. B. Olwin (1991). "Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation." Science **252**(5013): 1705-1708.

Ritelli, M., N. Chiarelli, N. Zoppi, C. Dordoni, S. Quinzani, M. Traversa, M. Venturini, P. Calzavara-Pinton and M. Colombi (2015). "Insights in the etiopathology of galactosyltransferase II (GalT-II) deficiency from transcriptome-wide expression profiling of skin fibroblasts of two sisters with compound heterozygosity for two novel B3GALT6 mutations." Molecular Genetics and Metabolism Reports **2**: 1-15.

Roberts, J., M. P. Kahle and G. J. Bix (2012). "Perlecan and the blood-brain barrier: beneficial proteolysis?" Front Pharmacol **3**: 155.

Robinson, P. S., T. F. Huang, E. Kazam, R. V. Iozzo, D. E. Birk and L. J. Soslowsky (2005). "Influence of decorin and biglycan on mechanical properties of multiple tendons in knockout mice." J Biomech Eng **127**(1): 181-185.

Robinson, P. S., T. W. Lin, A. F. Jawad, R. V. Iozzo and L. J. Soslowsky (2004). "Investigating tendon fascicle structure-function relationships in a transgenic-age mouse model using multiple regression models." Ann Biomed Eng **32**(7): 924-931.

Rohrbach, M., A. Vandersteen, U. Yis, G. Serdaroglu, E. Ataman, M. Chopra, S. Garcia, K. Jones, A. Kariminejad, M. Kraenzlin, C. Marcelis, M. Baumgartner and C. Giunta (2011). "Phenotypic variability of the kyphoscoliotic type of Ehlers-Danlos syndrome (EDS VIA): clinical, molecular and biochemical delineation." Orphanet J Rare Dis **6**: 46.

Ruhland, C., E. Schonherr, H. Robenek, U. Hansen, R. V. Iozzo, P. Bruckner and D. G. Seidler (2007). "The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis." Febs j **274**(16): 4246-4255.

Ryu, H. Y., J. Lee, S. Yang, H. Park, S. Choi, K. C. Jung, S. T. Lee, J. K. Seong, I. O. Han and E. S. Oh (2009). "Syndecan-2 functions as a docking receptor for pro-matrix metalloproteinase-7 in human colon cancer cells." J Biol Chem **284**(51): 35692-35701.

Salter, C. G., J. H. Davies, R. J. Moon, J. Fairhurst, D. Bunyan, D. D. D. Study and N. Foulds (2016). "Further defining the phenotypic spectrum of B4GALT7 mutations." Am J Med Genet A.

Sawhney, R. S., T. M. Hering and L. J. Sandell (1991). "Biosynthesis of small proteoglycan II (decorin) by chondrocytes and evidence for a procore protein." J Biol Chem **266**(14): 9231-9240.

Schaefer, L. and R. V. Iozzo (2008). "Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction." J Biol Chem **283**(31): 21305-21309.

Schaefer, L., K. Macakova, I. Raslik, M. Micegova, H. J. Grone, E. Schonherr, H. Robenek, F. G. Echtermeyer, S. Grassel, P. Bruckner, R. M. Schaefer, R. V. Iozzo and H. Kresse (2002). "Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction." Am J Pathol **160**(3): 1181-1191.

Schaefer, L., D. Mihalik, A. Babelova, M. Krzyzankova, H. J. Grone, R. V. Iozzo, M. F. Young, D. G. Seidler, G. Lin, D. P. Reinhardt and R. M. Schaefer (2004). "Regulation of fibrillin-1 by biglycan and decorin is important for tissue preservation in the kidney during pressure-induced injury." Am J Pathol **165**(2): 383-396.

Schonherr, E., C. Sunderkotter, L. Schaefer, S. Thanos, S. Grassel, A. Oldberg, R. V. Iozzo, M. F. Young and H. Kresse (2004). "Decorin deficiency leads to impaired angiogenesis in injured mouse cornea." J Vasc Res **41**(6): 499-508.

Schwarze, U., R. Hata, V. A. McKusick, H. Shinkai, H. E. Hoyme, R. E. Pyeritz and P. H. Byers (2004). "Rare autosomal recessive cardiac valvular form of Ehlers-Danlos syndrome results from mutations in the COL1A2 gene that activate the nonsense-mediated RNA decay pathway." Am J Hum Genet **74**(5): 917-930.

Scott, P. G., N. Winterbottom, C. M. Dodd, E. Edwards and C. H. Pearson (1986). "A role for disulphide bridges in the protein core in the interaction of proteodermatan sulphate and collagen." Biochem Biophys Res Commun **138**(3): 1348-1354.

Sebestyen, A., M. Gallai, T. Knittel, T. Ambrust, G. Ramadori and I. Kovalszky (2000). "Cytokine regulation of syndecan expression in cells of liver origin." Cytokine **12**(10): 1557-1560.

Seidler, D. G., M. Faiyaz-Ul-Haque, U. Hansen, G. W. Yip, S. H. Zaidi, A. S. Teebi, L. Kiesel and M. Gotte (2006). "Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (beta4GalT-7)." J Mol Med (Berl) **84**(7): 583-594.

Seidler, D. G., N. A. Mohamed, C. Bocian, A. Stadtmann, S. Hermann, K. Schafers, M. Schafers, R. V. Iozzo, A. Zarbock and M. Gotte (2011). "The role for decorin in delayed-type hypersensitivity." J Immunol **187**(11): 6108-6119.

Seidler, D. G., L. Schaefer, H. Robenek, R. V. Iozzo, H. Kresse and E. Schonherr (2005). "A physiologic three-dimensional cell culture system to investigate the role of decorin in matrix organisation and cell survival." Biochem Biophys Res Commun **332**(4): 1162-1170.

Shashikiran, U., A. Rastogi, R. P. Gupta and M. Sabir (1999). "Ehler-Danlos syndrome type VI variant presenting with recurrent respiratory infections and responding to high dose vitamin C." J Assoc Physicians India **47**(5): 554-555.

Shen, B., D. Bhargav, A. Wei, L. A. Williams, H. Tao, D. D. Ma and A. D. Diwan (2009). "BMP-13 emerges

as a potential inhibitor of bone formation." Int J Biol Sci **5**(2): 192-200.

Shi, Y. and J. Massagué (2003). "Mechanisms of TGF-β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus." Cell **113**(6): 685-700.

Shimazu, A., H. D. Nah, T. Kirsch, E. Koyama, J. L. Leatherman, E. B. Golden, R. A. Kosher and M. Pacifici (1996). "Syndecan-3 and the control of chondrocyte proliferation during endochondral ossification." Exp Cell Res **229**(1): 126-136.

Shimo, T., C. Gentili, M. Iwamoto, C. Wu, E. Koyama and M. Pacifici (2004). "Indian hedgehog and syndecans-3 coregulate chondrocyte proliferation and function during chick limb skeletogenesis." Dev Dyn **229**(3): 607-617.

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

Shworak, N. W., J. Liu, L. M. Petros, L. Zhang, M. Kobayashi, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and R. D. Rosenberg (1999). "Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci." J Biol Chem **274**(8): 5170-5184.

Skliris, A., V. T. Labropoulou, D. J. Papachristou, A. Aletras, N. K. Karamanos and A. D. Theocharis (2013). "Cell-surface serglycin promotes adhesion of myeloma cells to collagen type I and affects the expression of matrix metalloproteinases." Febs j **280**(10): 2342-2352.

Sofeu Feugaing, D. D., M. Gotte and M. Viola (2013). "More than matrix: the multifaceted role of decorin in cancer." Eur J Cell Biol **92**(1): 1-11.

Staples, G. O., X. Shi and J. Zaia (2010). "Extended N-sulfated domains reside at the nonreducing end of heparan sulfate chains." J Biol Chem **285**(24): 18336-18343.

Stine, K. C. and D. L. Becton (1997). "DDAVP therapy controls bleeding in Ehlers-Danlos syndrome." J Pediatr Hematol Oncol **19**(2): 156-158.

Subramanian, S. V., M. L. Fitzgerald and M. Bernfield (1997). "Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation." J Biol Chem **272**(23): 14713-14720.

Suffee, N., H. Hlawaty, A. Meddahi-Pelle, L. Maillard, L. Louedec, O. Haddad, L. Martin, C. Laguillier, B. Richard, O. Oudar, D. Letourneur, N. Charnaux and A. Sutton (2012). "RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans." Angiogenesis **15**(4): 727-744.

Sutton, A., V. Friand, S. Brule-Donneger, T. Chaigneau, M. Ziol, O. Sainte-Catherine, A. Poire, L. Saffar, M. Kraemer, J. Vassy, P. Nahon, J. L. Salzmann, L. Gattegno and N. Charnaux (2007). "Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion." Mol Cancer Res **5**(1): 21-33.

Takeda, U., A. Utani, J. Wu, E. Adachi, H. Koseki, M. Taniguchi, T. Matsumoto, T. Ohashi, M. Sato and H. Shinkai (2002). "Targeted disruption of dermatopontin causes abnormal collagen fibrillogenesis." J Invest Dermatol **119**(3): 678-683.

Tkachenko, E., A. Elfenbein, D. Tirziu and M. Simons (2006). "Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner." Circ Res **98**(11): 1398-1404.

Tone, Y., L. C. Pedersen, T. Yamamoto, T. Izumikawa, H. Kitagawa, J. Nishihara, J. Tamura, M. Negishi and K. Sugahara (2008). "2-o-phosphorylation of xylose and 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis." J Biol Chem **283**(24): 16801-16807.

Toriello, H. V., T. W. Glover, K. Takahara, P. H. Byers, D. E. Miller, J. V. Higgins and D. S. Greenspan (1996). "A translocation interrupts the COL5A1 gene in a patient with Ehlers-Danlos syndrome and hypomelanosis of Ito." Nat Genet **13**(3): 361-365.

Troup, S., C. Njue, E. V. Kliewer, M. Parisien, C. Roskelley, S. Chakravarti, P. J. Roughley, L. C. Murphy and P. H. Watson (2003). "Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer." Clin Cancer Res **9**(1): 207-214.

Tsutsui, Y., B. Ramakrishnan and P. K. Qasba (2013). "Crystal structures of beta-1,4-galactosyltransferase 7 enzyme reveal conformational changes and substrate binding." J Biol Chem **288**(44): 31963-31970.

Uchimura, K., K. Kadomatsu, H. Nishimura, H. Muramatsu, E. Nakamura, N. Kurosawa, O. Habuchi, F. M. El-Fasakhany, Y. Yoshikai and T. Muramatsu (2002). "Functional analysis of the chondroitin 6-sulfotransferase gene in relation to lymphocyte subpopulations, brain development, and oversulfated chondroitin sulfates." J Biol Chem **277**(2): 1443-1450.

Ueyama, M., H. Takemae, Y. Ohmae, H. Yoshida, H. Toyoda, R. Ueda and S. Nishihara (2008). "Functional analysis of proteoglycan galactosyltransferase II RNA interference mutant flies." J Biol Chem **283**(10): 6076-6084.

Vanpouille, C., A. Deligny, M. Delehedde, A. Denys, A. Melchior, X. Lienard, M. Lyon, J. Mazurier, D. G. Fernig and F. Allain (2007). "The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-O-sulfated N-unsubstituted glucosamine residue." J Biol Chem **282**(33): 24416-24429.

Vertel, B. M. (1995). "The ins and outs of aggrecan." Trends Cell Biol **5**(12): 458-464.

Vorster, A. A., P. Beighton and R. S. Ramesar (2015). "Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity (Beighton type); mutation analysis in eight affected South African families." Clin Genet **87**(5): 492-495.

Wang, J., D. Markova, D. G. Anderson, Z. Zheng, I. M. Shapiro and M. V. Risbud (2011). "TNF-alpha and IL-1beta promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc." J Biol Chem **286**(46): 39738-39749.

Wang, S., K. Sugahara and F. Li (2016). "Chondroitin sulfate/dermatan sulfate sulfatases from mammals and bacteria." Glycoconj J.

Weis, S. M., S. D. Zimmerman, M. Shah, J. W. Covell, J. H. Omens, J. Ross, Jr., N. Dalton, Y. Jones, C. C. Reed, R. V. Iozzo and A. D. McCulloch (2005). "A role for decorin in the remodeling of myocardial infarction." Matrix Biol **24**(4): 313-324.

Wen, J., J. Xiao, M. Rahdar, B. P. Choudhury, J. Cui, G. S. Taylor, J. D. Esko and J. E. Dixon (2014). "Xylose phosphorylation functions as a molecular switch to regulate proteoglycan biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(44): 15723-15728.

Wenstrup, R. J., G. T. Langland, M. C. Willing, V. N. D'Souza and W. G. Cole (1996). "A splice-junction mutation in the region of COL5A1 that codes for the carboxyl propeptide of pro alpha 1(V) chains results in the gravis form of the Ehlers-Danlos syndrome (type I)." Hum Mol Genet **5**(11): 1733-1736.

Whitelock, J. M., A. D. Murdoch, R. V. Iozzo and P. A. Underwood (1996). "The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases." J Biol Chem **271**(17): 10079-10086.

Wiberg, C., A. R. Klatt, R. Wagener, M. Paulsson, J. F. Bateman, D. Heinegard and M. Morgelin (2003). "Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan." J Biol Chem **278**(39): 37698-37704.

Wight, T. N., B. P. Toole and V. C. Hascall (2011). Hyaluronan and the Aggregating Proteoglycans. The Extracellular Matrix: an Overview. P. R. Mecham. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg**:** 147-195.

Wilkins-Port, C. E., R. D. Sanderson, E. Tominna-Sebald and P. J. McKeown-Longo (2003). "Vitronectin's basic domain is a syndecan ligand which functions in trans to regulate vitronectin turnover." Cell Commun Adhes **10**(2): 85-103.

Williams, K. J., G. Qiu, H. K. Usui, S. R. Dunn, P. McCue, E. Bottinger, R. V. Iozzo and K. Sharma (2007). "Decorin deficiency enhances progressive nephropathy in diabetic mice." Am J Pathol **171**(5): 1441-1450.

Woods, A., R. L. Longley, S. Tumova and J. R. Couchman (2000). "Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts." Arch Biochem Biophys **374**(1): 66-72.

Worapamorn, W., H. R. Haase, H. Li and P. M. Bartold (2001). "Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells." J Cell Physiol **186**(3): 448-456.

Wu, Z., A. W. Aron, E. E. Macksoud, R. V. Iozzo, C. M. Hai and B. E. Lechner (2012). "Uterine dysfunction in biglycan and decorin deficient mice leads to dystocia during parturition." PLoS One **7**(1): e29627.

Wu, Z., C. E. Horgan, O. Carr, R. T. Owens, R. V. Iozzo and B. E. Lechner (2014). "Biglycan and decorin differentially regulate signaling in the fetal membranes." Matrix Biol **35**: 266-275.

Xian, X., S. Gopal and J. R. Couchman (2010). "Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix." Cell Tissue Res **339**(1): 31-46.

Yada, T., M. Gotoh, T. Sato, M. Shionyu, M. Go, H. Kaseyama, H. Iwasaki, N. Kikuchi, Y. D. Kwon, A. Togayachi, T. Kudo, H. Watanabe, H. Narimatsu and K. Kimata (2003). "Chondroitin sulfate synthase-2. Molecular cloning and characterization of a novel human glycosyltransferase homologous to chondroitin sulfate glucuronyltransferase, which has dual enzymatic activities." J Biol Chem **278**(32): 30235-30247.

Yada, T., T. Sato, H. Kaseyama, M. Gotoh, H. Iwasaki, N. Kikuchi, Y. D. Kwon, A. Togayachi, T. Kudo, H. Watanabe, H. Narimatsu and K. Kimata (2003). "Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization." J Biol Chem **278**(41): 39711-39725.

Yamaguchi, Y., D. M. Mann and E. Ruoslahti (1990). "Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin." Nature **346**(6281): 281-284.

Yamaguchi, Y. and E. Ruoslahti (1988). "Expression of human proteoglycan in Chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation." Nature **336**(6196): 244-246.

Yayon, A., M. Klagsbrun, J. D. Esko, P. Leder and D. M. Ornitz (1991). "Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor." Cell **64**(4): 841-848.

Zhang, G., S. Chen, S. Goldoni, B. W. Calder, H. C. Simpson, R. T. Owens, D. J. McQuillan, M. F. Young, R. V. Iozzo and D. E. Birk (2009). "Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan." J Biol Chem **284**(13): 8888-8897.

Zhang, G., Y. Ezura, I. Chervoneva, P. S. Robinson, D. P. Beason, E. T. Carine, L. J. Soslowsky, R. V. Iozzo and D. E. Birk (2006). "Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development." J Cell Biochem **98**(6): 1436-1449.

Zhang, L., M. Yang, D. Yang, G. Cavey, P. Davidson and G. Gibson (2010). "Molecular interactions of MMP-13 C-terminal domain with chondrocyte proteins." Connect Tissue Res **51**(3): 230-239.

Zhou, D., E. G. Berger and T. Hennet (1999). "Molecular cloning of a human UDP‐galactose: GlcNAcβ1, 3GalNAc β1, 3 galactosyltransferase gene encoding an O‐linked core3‐elongation enzyme." European Journal of Biochemistry **263**(2): 571-576.

Zhou, D., T. R. Henion, F. B. Jungalwala, E. G. Berger and T. Hennet (2000). "The beta 1,3-galactosyltransferase beta 3GalT-V is a stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) synthase." J Biol Chem **275**(30): 22631-22634.

Zhou, Z., J. Wang, R. Cao, H. Morita, R. Soininen, K. M. Chan, B. Liu, Y. Cao and K. Tryggvason (2004). "Impaired angiogenesis, delayed wound healing and retarded tumor growth in perlecan heparan sulfate-deficient mice." Cancer Res **64**(14): 4699-4702.

Résumé

Les protéoglycanes (PGs) jouent un rôle important dans de multiples processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaires. Les PGs sont constitués d'une protéine porteuse sur laquelle sont fixées de façon covalente des chaînes hétéropolyssacharidiques de glycosaminoglycanes (GAGs). L'initiation de la biosynthèse des GAGs sur les PGs implique une glycosyltransférase, la β1,3-galactosyltransférase 6 (β3GalT6) qui catalyse l'addition d'un résidu galactose sur un disaccharide accepteur (Gal-Xyl) fixé au niveau de motifs d'ancrage des GAGs sur la protéine porteuse du PG. Des mutations de la β3GalT6 ont été récemment associées à une forme pléiotropique du syndrome d'Ehlers-Danlos (SED), un groupe hétérogène de maladies génétiques rares touchant les constituants matriciels des tissus conjonctifs. L'implication de la β3GalT6 dans la pathogénie du SED n'est cependant pas encore connue à ce jour, point qui sera exploré au cours de ce travail de thèse. Nous avons montré que la mutation du gène *B3GALT6* conduit à une diminution de la biosynthèse des GAGs matriciels et membranaires, associée à une réduction de la capacité migratoire des fibroblastes de derme humain issus de patients atteints de SED par rapport aux fibroblastes contrôle, non porteurs de l'altération génétique. Une étude "gain et perte de fonction" a montré que l'extinction du gène *B3GALT6* dans des fibroblastes contrôle impacte la biosynthèse des GAGs. De façon complémentaire, la restauration de l'expression de la β3GalT6 dans les fibroblastes des patients a eu pour conséquences une augmentation du taux de synthèse des GAGs matriciels et membranaires, associée à une augmentation significative de la capacité de migration des cellules équivalente à celle des cellules non déficientes. Les résultats obtenus nous permettent de mieux comprendre le rôle de la β3GalT6 dans la pathogénie du SED. Ces travaux ciblant la β3GalT6 peuvent ouvrir la perspective de proposer des stratégies thérapeutiques visant à s'opposer à la perte d'anabolisme des GAGs et au défaut de migration observés dans le SED.

Mots-clés : β3GalT6, Syndrome d'Ehlers-Danlos, Glycosaminoglycanes, Migration cellulaire.

Abstract

Proteoglycans (PGs) play important roles in many physiological processes, including cell proliferation, differentiation and migration. PGs are composed of linear heteropolysaccharide chains, called glycosaminoglycans (GAGs), which are covalently attached to a core protein through a tetrasaccharide linkage. The addition of the third residue (galactose) of the linkage is catalyzed by β1,3-galactosyltransferase 6 (β3GalT6), a key glycosyltransferase in GAG initiation. Recently, mutations of β3GalT6 have been associated to Ehlers-Danlos Syndrome (EDS), a group of rare and severe genetic connective tissue disorders. However, the role of β3GalT6 defects in EDS pathogeny remains unknown. In my thesis, we showed that β3GalT6 defective dermal fibroblasts of affected patients exhibited a marked reduction in GAG anabolism associated to a significant delay in wound closure compared to control cells. The β3GalT6 gain- and loss-of-function studies demonstrated that *B3GALT6* gene deletion in control fibroblasts affects the synthesis of GAGs chains. Interestingly, GAG anabolism and cell migration were restored when β3GalT6 is overexpressed in patient fibroblasts, which could be the starting point to the development of therapeutic strategies against the loss of GAG synthesis and defect of cell migration observed in EDS. This work provides a better understanding of the crucial role of β3GalT6 in EDS pathogeny.

Key words : β3GalT6, Ehlers-Danlos Syndrome, Glycosaminoglycans, Cell migration.