

## L'agrécane, enzyme-clé de la dégradation du cartilage dans l'arthrose ?

Les ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*), récemment présentées dans *médecine/sciences* (m/s 1999, n° 1, p. 117-8), constituent une nouvelle famille de métalloprotéases regroupant au moins 18 membres ayant des caractéristiques de protéines membranaires et une dualité fonctionnelle puisqu'elles ont une activité protéolytique et une activité dans l'adhérence [1]. Les chondrocytes humains expriment quatre d'entre elles: les ADAM-9, -10, -12 et -15 [2]. Les ADAMT (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) forment un sous-groupe de la famille ADAM dont les 5 membres (ADAMT-1 à -5) possèdent en plus un domaine de répétition du motif thrombospondine de type 1 (TSP-1) [3] qui leur permet d'interagir avec les glycosaminoglycans sulfatés (figure 1). Ces enzymes présentent toutes la séquence consensus du site catalytique de type protéinase-Zn mais leurs substrats et leur régulation sont encore mal connus. Les ADAM sont exprimées par de très nombreuses cellules et leur rôle a été invoqué dans la dégradation des composants matriciels, que ce soit lors du développement, de l'invasion tumorale ou encore dans la physiopathologie articulaire. Or, cette capacité de dégrader les principaux constituants de la matrice extracellulaire, tels que les collagènes et les protéoglycans [4], caractérise aussi les MMP (*matrix metalloproteinases*), connues depuis plusieurs années et dont il existe au moins 20 formes. Ces MMP requièrent la présence d'un ion zinc au niveau du site catalytique, sont sécrétées sous forme de pro-enzymes et sont spécifiquement inhibées par des inhibiteurs tissulaires, les TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Cette capacité qu'ont certaines MMP de

dégrader les composants structuraux de la matrice extracellulaire, a fait envisager leur responsabilité dans la dégradation du cartilage articulaire dans l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde, sans toutefois qu'il y ait de preuve définitive que l'une d'entre elles soit l'élément-clé du processus. L'histoire rebondit aujourd'hui avec la caractérisation de deux agrécannes, membres de la famille ADAMT, et de nouvelles perspectives s'ouvrent tant pour la connaissance des mécanismes moléculaires responsables de l'érosion du cartilage que pour la définition de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies ostéo-articulaires.

### MMP, ADAMT et cartilage articulaire

Les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire sont assurées par

des agrégats multimoléculaires de grande taille formés par des protéoglycans liés à l'acide hyaluronique et stabilisés par des protéines de liaison: les agrécannes.

L'axe protéique des agrécannes est le point d'ancrage d'un grand nombre de chaînes de glycosaminoglycans chargées négativement, formées de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate. De ce fait, ces protéoglycans sont très hydratés et contribuent, à l'intérieur du réseau de fibrilles de collagène qui les emprisonne, à dissiper les forces de compression, ce qui permet au cartilage de se déformer en réponse à la charge exercée sur l'articulation. La dégradation des agrécannes, et la perte de fragments de glycosaminoglycans qui en résulte, surviennent précocement après la lésion de l'articulation, et persistent au cours du développement du processus arthrosique. Un prérequis

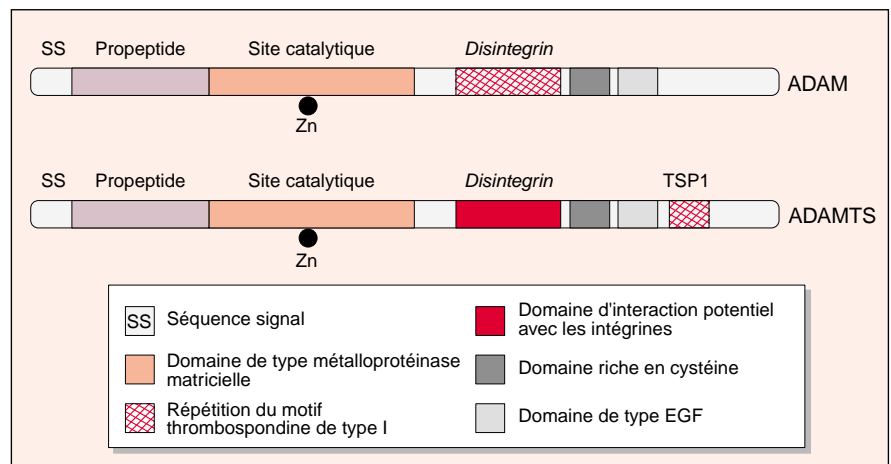


Figure 1. Représentation schématique des différents domaines des familles ADAM et ADAMT. Ces enzymes possèdent des domaines de type pro- et métalloprotéinase, un domaine de type disintégrin qui pourrait régler la signalisation intracellulaire médiée par les intégrines, un domaine riche en cystéine et un domaine de type EGF.

pour la définition de nouvelles stratégies thérapeutiques destinées à limiter la dégradation du cartilage articulaire, est donc de déterminer quelles sont les enzymes responsables du catabolisme des agrécanes. Jusqu'à ces dernières années, certaines MMP, comme la stromélysine, étaient tenues pour responsables et, de fait, celles-ci sont capables de cliver l'axe protéique des agrécanes au site  $\text{Asn}^{341}\text{-Phe}^{342}$  [5], c'est-à-dire dans le domaine interglobulaire (IGD) très conservé chez les mammifères (figure 2). Cependant, les fragments de dégradation observés dans le liquide synovial ne sont pas de la taille attendue. Il fallait donc imaginer l'existence d'une autre enzyme, une « agrécanase », capable de couper l'axe protéique en un deuxième site de clivage,  $\text{Glu}^{373}\text{-Ala}^{374}$  [6]. La découverte récente, par le groupe d'Arner *et al.*, d'une activité agrécanase, et sa caractérisation, ont permis de faire un grand pas dans ce domaine. Cette équipe a utilisé des anticorps contre des « néo-épitopes », dans les séquences amino-ou carboxy-terminales produites par protéolyse [7]. Des explants de cartilage nasal bovin ont été traités par l'interleukine-1, une cytokine pro-inflammatoire connue pour induire l'expression d'un grand nombre de MMP, et donc pour stimuler la dégradation du cartilage. Une activité agrécanase a été isolée, après avoir bloqué les MMP par un inhibiteur. Les 10 microgrammes de protéine pure obtenus ont permis de caractériser l'enzyme et de montrer qu'elle clivait bien l'axe protéique des agrécanes au niveau  $\text{Glu}^{373}\text{-Ala}^{374}$ , libérant les fragments habituellement détectés dans le liquide synovial arthrosique. Après avoir déterminé une séquence partielle de la protéine et la séquence théorique de l'ADN correspondant, l'équipe d'Arner a recherché et trouvé le gène humain, dans une banque de données établie à partir de tissu cardiaque. Enfin, une étude vient de paraître montrant nettement que l'agrécanase, et non pas les MMP, est responsable de la dégradation précoce des protéoglycannes du cartilage normal stimulé par l'acide rétinolique, l'interleukine-1 (IL-1) ou le *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) [8].

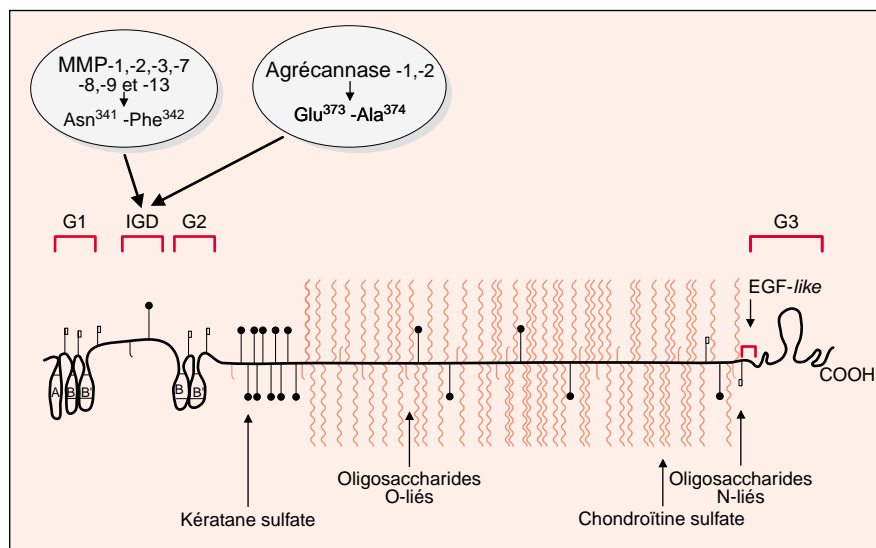


Figure 2. **Structure schématique de l'axe protéique et des chaînes de glycosaminoglycane de l'agrécan.** L'axe protéique est représenté en noir et les chaînes latérales de glycosaminoglycane en rose (chondroïtine sulfate) ou en gris (kératane sulfate). L'emplacement des sites de clivage par les MMP et les agrécanases sont indiqués. G1, G2 et G3: domaines globulaires; IGD: domaine interglobulaire.

#### Agrécanase-1, Agrécanase-2, quel est le coupable dans l'arthrose ?

L'agrécanase-1, isolée par l'équipe d'Arner, est une métalloprotéinase de la famille des ADAMT (ADAMT-4), c'est-à-dire comportant des motifs thrombospondine de type I [7]. Elle donne naissance à un produit de dégradation possédant une extrémité N-terminale AGRS (Alanine-Arginine-Glycine-Sérine) et à un second produit avec une extrémité carboxy-terminale NITEGE (Asparagine-Isoleucine-Thréonine-Acide glutamique-Glycine-Acide glutamique). La question qui se pose actuellement est de savoir si cette enzyme est le principal coupable dans le processus de dégradation arthrosique du cartilage articulaire. En effet, le même groupe a récemment cloné le gène codant pour une deuxième enzyme, l'agrécanase-2, qui partage les propriétés de l'agrécanase-1. De plus, de récents travaux montrent qu'au moins cinq transcrits d'ADAMT sont exprimés dans le tissu cartilagineux fraîchement excisé, et dans les explants utilisés *in vitro* pour les études de dégradation [9]. Il faudra donc dans l'avenir déterminer si d'autres ADAMT, en dehors des agrécanases 1

et 2, peuvent fonctionner comme « agrécanase » avec la même spécificité de clivage peptidique. De même, la contribution relative de ces agrécanases, ou d'agrécanases encore inconnues, dans les différentes régions du cartilage articulaire normal et arthrosique devra être estimée. L'inactivation des gènes codant pour les agrécanases-1 et 2 chez la souris permettra probablement de déterminer si, en leur absence, le développement d'une arthrite expérimentale dans cette espèce peut être retardé. Cependant, les stratégies thérapeutiques futures devront être établies en prenant en compte le fait que ces activités enzymatiques peuvent être contrôlées à plusieurs niveaux : transcriptionnel, mais aussi post-traductionnel au niveau du zymogène, de l'activation/inhibition de celui-ci ou de l'inhibition de l'enzyme par des inhibiteurs naturels (TIMP). Il est aussi très important de noter que la distribution tissulaire des ADAM, et en particulier de l'agrécanase-1, n'est pas limitée au cartilage. La modulation pharmacologique de leurs activités afin de réduire la destruction du cartilage dans l'arthrose pourrait donc avoir des conséquences secondaires néfastes au niveau des activités

physiologiques normales qu'elles exercent dans d'autres tissus. A cet égard, il a été montré que le métabolisme du brévicane, un protéoglycane du cerveau, fait intervenir une activité de type « agrécanase » [10].

Comme on le voit, malgré l'importance de la découverte des agrécanases, il reste encore bien du chemin à parcourir avant de pouvoir envisager de nouvelles approches thérapeutiques des maladies ostéoarticulaires fondées sur l'inhibition sélective de ces enzymes au niveau du cartilage articulaire. Mais les perspectives sont enthousiasmantes !

1. Blobel CA. Metalloprotease-disintegrins: link to cell adhesion and cleavage of TNF- $\alpha$  and Notch. *Cell* 1997; 90: 589-92.

2. Chubinskaya S, Cs-Szabo G, Kuettner. ADAM-10 message is expressed in human articular cartilage. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 723-9.

3. Tang BL, Hong W. ADAMTs: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and a thrombospondin 1 repeats. *FEBS Lett* 1999; 445: 223-5.

4. Praillet C, Grimaud JA, Lortat-Jacob H. Les protéoglycans: rôles en pathologie. *Med Sci* 1998; 14: 421-8.

5. Flannery CR, Lark MW, Sandy JD. Identification of a stromelysin site within the interglobular domain of human aggrecan. Evidence for proteolysis at this site *in vivo* in human articular cartilage. *J Biol Chem* 1992; 267: 1008-14.

6. Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ, Lohmander LS. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* 1992; 89: 1512-6.

7. Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 1999; 284: 1664-6.

8. Little CB, Flannery CR, Hughes CE, et al.

Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan *in vitro*. *Biochem J* 1999; 344: 61-8.

9. Abbaszade I, Liv RQ, Yang F, et al. Cloning and characterization of ADAMTS 11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* 1999; 274: 23443-50.

10. Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B. Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 318-22.

11. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamasaki M, Yamaguchi Y. cDNA cloning and the identification of an aggrecanase-like cleavage site in rat brevican. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 957-63.

### Jean-Pierre Pujol

Laboratoire de biochimie du tissu conjonctif, Faculté de médecine Côte de Nacre, Niveau 3, 14032 Caen Cedex, France.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Destruction osseuse et activation lymphocytaire T: un coupable, l'OPGL.** On connaît depuis longtemps l'association d'une résorption osseuse exagérée à des maladies impliquant une activation du système immunitaire. Deux articles montrent aujourd'hui qu'OPGL (*osteoprotegerin ligand*), un facteur de différenciation ostéoclastique récemment identifié, pourrait bien être le coupable [1, 2]. *medecine/sciences* a récemment consacré une *minisynthèse* à l'identification de l'OPGL et de ses récepteurs, avancée qui a bouleversé notre approche de la biologie de l'os et des maladies osseuses (*m/s* 1999, n° 8-9, p. 990-3). L'OPGL est une protéine membranaire de la famille des TNF (*tumor necrosis factor*), exprimée par les cellules stromales, dont la liaison à son récepteur RANK, présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques, stimule leur différenciation en ostéoclastes. Un autre récepteur, soluble de l'OPGL, l'OPG (*osteoprotegerin*), bloque la liaison OPGL-RANK, et donc module la différenciation ostéoclastique. L'équipe d'AMGEN,

associée à des chercheurs de Toronto (Canada) montre aujourd'hui que les lymphocytes T activés produisent de l'OPGL, membranaire et soluble, parfaitement fonctionnel, capable d'induire la formation d'ostéoclastes à partir de précurseurs hématopoïétiques de souris soit normales soit mutantes *Opgt<sup>-/-</sup>* et donc spontanément dépourvues d'ostéoclastes. Cela est corroboré par l'observation, chez la souris *ctla4<sup>-/-</sup>* – dont les cellules T sont constitutivement activées (*m/s* 1996, n° 1 p. 119) – de signes d'ostéoporose sévère. Si la moelle osseuse des souris *ctla4<sup>-/-</sup>* est greffée à des souris receveuses *Rag<sup>-/-</sup>* (dépourvues de lymphocytes T et B), ces dernières développent, quelques semaines après la greffe, une ostéoporose sévère qu'accompagne une augmentation significative du nombre des ostéoclastes. Un résultat identique est observé après transfert de lymphocytes *ctla4<sup>-/-</sup>* à des receveurs *Rag<sup>-/-</sup>* ou *opgl<sup>-/-</sup>*. L'injection quotidienne à ces souris d'OPG, le récepteur « leurre » soluble, s'oppose au développement de l'ostéoporose (*voir aussi*

*m/s* 2000, n° 2, p. 289). Ce même traitement par OPG a eu un effet spectaculaire sur les destructions cartilagineuse et osseuse observées dans un modèle d'arthrite créé chez le rat par l'injection de *Mycobacterium tuberculosis* [1]. Cette arthrite, qui réalise un tableau clinique proche de celui de l'arthrite rhumatoïde humaine, associe une inflammation synoviale et une destruction de l'os et du cartilage adjacent, et une augmentation très importante du nombre d'ostéoclastes, secondaire à la libération d'OPGL par les lymphocytes T activés. Un point intéressant est que si l'injection d'OPG à ces animaux bloque la destruction de l'os et du cartilage articulaire, elle n'a en revanche aucun effet sur la sévérité de l'inflammation. Reste que l'utilisation de l'OPG sera probablement envisagée chez l'homme.

[1. Kong Y, et al. *Nature* 1999; 402: 304-8.]

[2. Horwood NJ, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 144-50.]