

## Rôles respectifs des facteurs de croissance sériques de haut et faible poids moléculaire dans le métabolisme des protéoglycannes et d'autres macromolécules du cartilage

F Maachi \*, MH Heulin, O El Farricha, F Belleville, P Nabet

*Faculté de Médecine, laboratoire de biochimie médicale I,  
BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France*

(15<sup>e</sup> réunion du groupe Développement, INRA, Paris, 24-26 mai 1989)

**Résumé** — Le marquage au <sup>35</sup>S des macromolécules néosynthétisées par le cartilage d'embryon de poulet en culture est évalué en l'absence et en présence de facteurs de croissance de haut poids moléculaire (PM) (rétentat 1 000 de sérum humain), additionnés ou non de leurs activateurs de petit PM (ultrafiltrat à 1 000). Cette évaluation est effectuée dans le milieu d'incubation et dans le cartilage.

En absence de facteur de croissance, le <sup>35</sup>S est principalement incorporé, pour le milieu, dans les glycosaminoglycannes (GAG) et pour le cartilage, dans les macromolécules non extractibles par le chlorure de guanidine. En présence de rétentat > 1 000, dans le cartilage, l'incorporation de <sup>35</sup>S est stimulée et cette stimulation porte sur tous les GAG alors que dans le milieu, celle-ci est principalement retrouvée dans les macromolécules autres que les GAG. L'effet stimulateur de l'ultrafiltrat 1 000 porte exclusivement sur les macromolécules non extraites par le chlorure de guanidine. En ce qui concerne le milieu, ces facteurs semblent n'avoir aucun effet.

Ces résultats indiqueraient que les facteurs de croissance du sérum humain de haut et de faible PM ont, au niveau cellulaire, des sites d'actions différents.

**glycosaminoglycane / protéoglycane / cartilage / facteur de croissance**

**Summary** — **Respective roles of high and low molecular weight growth factors from human serum in metabolism of proteoglycans and other cartilage macromolecules.** <sup>35</sup>S radiolabeling allowed an evaluation to be made of neosynthesized macromolecules in chick embryo cartilage cultures. Activities for growth factors of high (serum retentate) or low (ultrafiltrate below 1 000) molecular weight (MW) were assessed in pelvic cartilage explants and in corresponding incubation media.

In the absence of growth factor, <sup>35</sup>S was mostly incorporated in glycosaminoglycans (GAGs) as regards the medium and for cartilage, in guanidinium chloride unextractable material. In retentate-enriched medium, <sup>35</sup>S incorporation was enhanced in all cartilage GAGs while in the medium, stimulation essentially occurred in macromolecules other than GAGs. Low MW growth factors exclusively enhanced cartilage levels of macromolecules which were insoluble in guanidinium chloride. In the medium, these factors did not display any significant effect. These results indicate that human serum growth factors with high and low MW possess different metabolic targets at the cellular level.

**glycosaminoglycan / proteoglycan / cartilage / growth factor**

---

\* Correspondance et tirés à part.

## INTRODUCTION

Le cartilage est un tissu complexe riche en protéoglycannes (PGs), collagènes et différentes glycoprotéines structurales. Les PG, sécrétés sous forme monomérique dans la matrice extracellulaire, se lient de façon non covalente à l'acide hyaluronique par le domaine N-terminal de leur protéine centrale. Il existe un processus physiologique normal qui implique un *turnover* régulier des PGs à partir de la matrice extracellulaire.

Certains facteurs de croissance présents dans le sérum humain entier sont caractérisés par leur effet stimulant sur le métabolisme des PG du cartilage pelvien d'embryon de poulet *in vitro*, mesuré par l'incorporation de  $^{35}\text{S}$  (Nevo *et al*, 1978). L'effet sur la biosynthèse des PGs par les chondrocytes est principalement attribué aux somatomédines (Corvol *et al*, 1980; Schalkwijk *et al*, 1989). Or, on sait que les facteurs qui, à l'inverse, inhibent cette biosynthèse – interleukine I (Benton et Tyler, 1988), tumor necrosis factor  $\alpha$  (Saklatvala, 1986), fibroblast growth factor (Phadke, 1987), rétinol (Jubb, 1984), et certaines prostaglandines (Lippiello *et al*, 1978) – agissent par ailleurs en stimulant la dégradation de la matrice extracellulaire par activation de protéases (Evans *et al*, 1987).

Il nous paraissait donc intéressant de déterminer comment 2 catégories de facteurs de croissance sériques humains, respectivement de haut poids moléculaire (PM), contenus dans un rétentat de sérum humain après ultrafiltration à seuil de coupure 1 000 (R 1 000) et de faible PM, récupérés dans l'ultrafiltrat (UF 1 000), agissent au sein du cartilage entier. Nous avons montré en effet (Heulin *et al*, 1984) que ces 2 fractions sériques stimulaient en synergie l'incorporation totale de  $^{35}\text{S}$  dans des explants de cartilages entiers. Ici,

nous étudions leurs sites métaboliques respectifs (synthèse ou renouvellement tissulaire) dans les cellules et/ou la matrice extracellulaire.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Cultures de cartilages*

Les cartilages pelviens d'embryons de poulets de 11 j sont cultivés selon la technique déjà décrite (Heulin *et al*, 1984). 8 cartilages pour chaque dose de produits testés sont incubés dans 8 ml de MEM avec sels de Earle (Seromed) tamponné (HEPES pH 7,4) et additionné de glutamine (2 mmol.l $^{-1}$ ), d'acides aminés non essentiels (0,1 mmol.l $^{-1}$ ) et d'antibiotiques. L'incorporation de  $^{35}\text{S}$  est mesurée après une incubation de 20 h à 37 °C en présence de R 1 000 aux concentrations finales de 1,25 et 5% (v/v), en absence ou en présence de facteurs d'UF < 1 000 à 10%.

### *Mesure de l'incorporation du $^{35}\text{S}$ dans les protéoglycannes (PG)*

Après l'incubation, les cartilages sont broyés à l'aide d'un potter et extraits durant 5 j à 4 °C dans du chlorure de guanidine 4 mol.l $^{-1}$  (GuHCl) (Jubb, 1984).

### *Mesure de l'incorporation du $^{35}\text{S}$ dans les glycosaminoglycannes (GAG)*

La radioactivité incorporée dans les GAG est mesurée dans le milieu d'incubation dans les cartilages entiers ou dans la fraction tissulaire résiduelle, après extraction par GuHCl. L'extraction des GAG nécessite une action préalable de la papaïne selon la technique de Farndale *et al* (1986), à 65 °C pendant 2 h. Les GAG sont alors précipités par 1% de chlorure de cetylpyridinium (CPC).

### **Détermination des GAG totaux**

Les GAG totaux (néosynthétisés et préexistants) sont dosés par le bleu 1.9 diméthylméthylène (DMB) selon la technique spectrophotométrique de Farndale *et al* (1986).

### **Détermination des macromolécules précipitables à l'acide trichloracétique (TCA)**

Le milieu récupéré après 20 h d'incubation est précipité par le TCA à 4%.

## **RÉSULTATS**

Nous avons étudié simultanément les macromolécules dans le milieu (excrétion) et dans les cartilages, en absence et en présence de facteurs de croissance.

### **Dans le milieu**

Lorsque les cartilages sont incubés dans un milieu sans sérum on constate que les GAG excrétés ne représentent que 13% de la totalité (milieu = M et cartilage = C) des GAG mesurés par le DMB (figs 1A, 2A). Les GAG néosynthétisés du milieu, c'est-à-dire ceux marqués au <sup>35</sup>S, qui sont évalués par le comptage de la radioactivité après traitement du milieu par la papaïne et précipitation au CPC, représentent 30% de la totalité (M + C) des GAG néosynthétisés (figs 1B, 2B). Le traitement du milieu par le TCA, qui précipite l'ensemble des macromolécules (glycoprotéines, PG) excepté les GAG libres, ne permet de récupérer que 15% de la radioactivité du milieu (fig 1B). Ceci indique que, dans le milieu, le <sup>35</sup>S est principalement incorporé dans des GAG issus de PG plus ou moins dégradés.

R 1 000 diminue, significativement et de manière dépendant de la dose, la quantité de GAG totaux relargués dans le milieu par les explants de cartilage (fig 1A) alors qu'il est sans effet sur la teneur en GAG néosynthétisés. Il stimule par ailleurs significativement la sécrétion de protéines ou glycoprotéines marquées au <sup>35</sup>S, donc néosynthétisées, et cet effet croît avec la dose (fig 1B).

L'UF 1 000 n'exerce aucun effet significatif sur la néosynthèse des macromolécules des GAG totaux et-ou sur les GAG préexistants dans le milieu, qu'ils soient additionnés seuls au milieu ou en présence de rétentat.

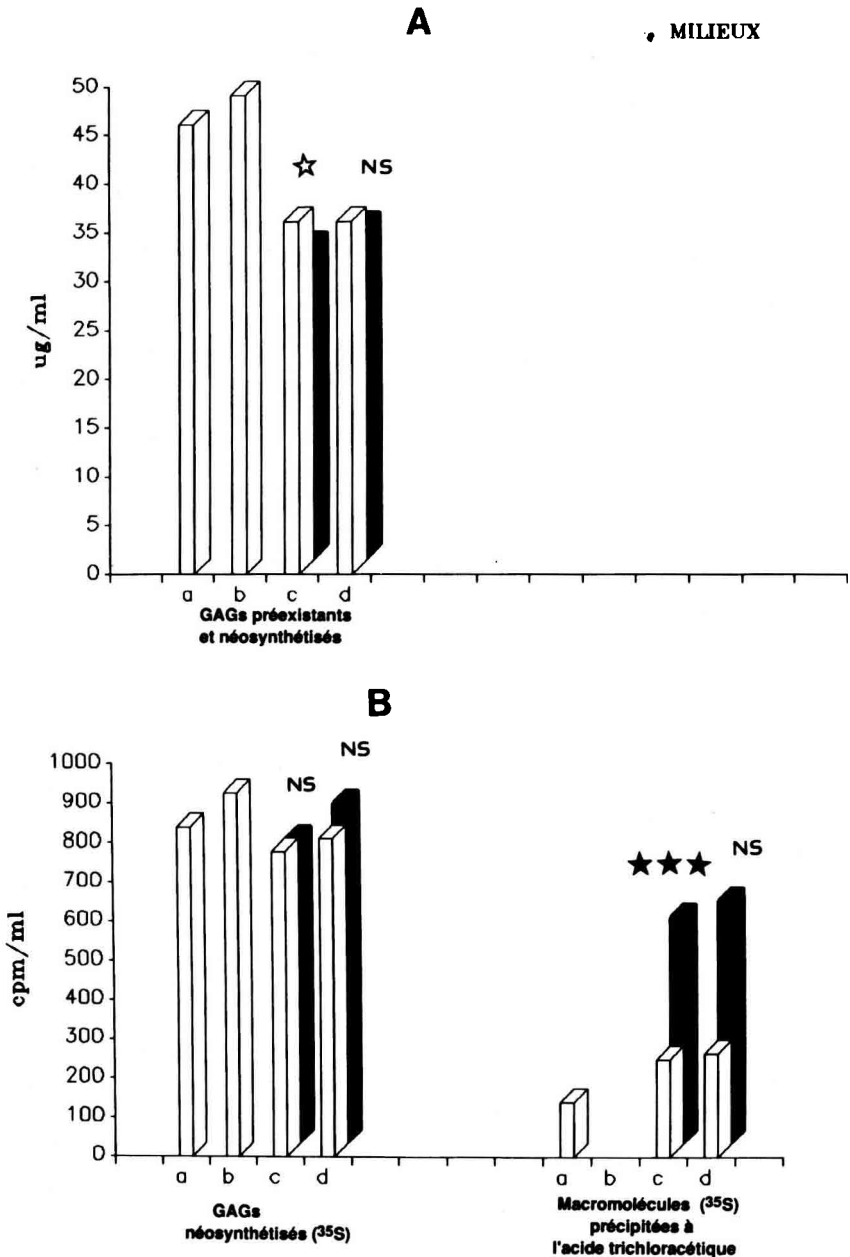
### **Dans les cartilages**

Les GAGs totaux (fig 2A) et les GAG néosynthétisés (fig 2B) ont été mesurés et nous avons différencié au sein de ces ensembles, les molécules extractibles et non extractibles par le GuHCl. C'est dans la fraction non extractible que l'on retrouve la majorité des GAG totaux ou néosynthétisés.

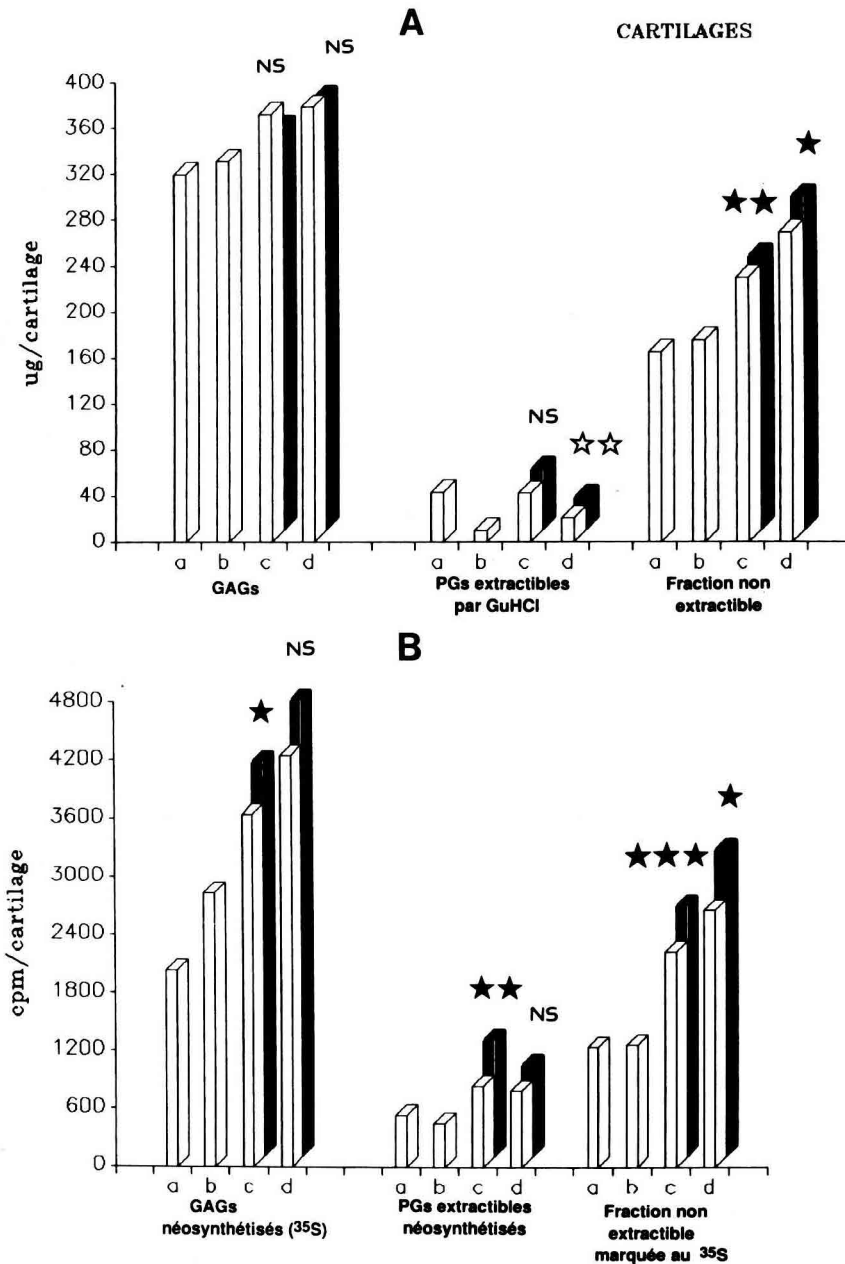
### **En présence de facteurs de croissance**

La teneur en GAG néosynthétisés est augmentée sous l'effet de doses croissantes de R 1 000 (fig 2B); cette substance stimule significativement l'incorporation de <sup>35</sup>S dans les PG extractibles par le GuHCl (fig 2B). C'est dans cette population de macromolécules que l'amplitude de stimulation par R 1 000 est la plus grande. L'UF, en revanche, tend à diminuer cet effet.

Par contre, l'UF en synergie avec R 1 000 augmente le taux des GAG non extractibles par GuHCl. Cet effet correspond



**Fig 1.** Études effectuées sur le milieu d'incubation des cartilages d'embryon de poulet de 11 j. a) milieu seul, b) UF 1 000 à 10% v/v seul, c) R 1 000 seul (□ 1,25 et ■ 5% v/v), d) R 1 000 + UF 1 000. Les activités (moyennes de 3 ou 5 déterminations) sont déterminées par analyse de variance multifactorielle : celle du rétentat en comparant statistiquement (c) à (a); celle de l'UF en comparant (d) à (c). A: Mesure colorimétrique (DMB) des GAG préexistants et néosynthésés. ☆ effet inhibiteur significatif  $P < 0,05$ ; NS : non significatif; B : Radioactivité incorporée dans les GAG néosynthésés et macromolécules précipitées par l'acide trichloracétique; ☆☆☆ Effet stimulateur significatif  $P < 0,001$ .



**Fig 2.** Études effectuées sur le cartilage. A : Mesure colorimétrique des différentes populations de GAG du cartilage. ☆☆☆ effet inhibiteur significatif  $P < 0,01$ ; ☆ effet stimulateur significatif  $P < 0,05$ ; ☆☆☆ effet stimulateur significatif  $P < 0,01$ ; B : Radioactivité incorporée dans les différentes populations de GAGs du cartilage; ☆☆☆ effet stimulateur significatif  $P < 0,001$ .

à celui mis en évidence lors de la mesure de la radioactivité totale sur cartilages entiers (Heulin *et al*, 1984).

## DISCUSSION

Les mesures réalisées dans le cartilage entier correspondent à une approche globale d'un équilibre entre les mécanismes de néosynthèse et de dégradation, par différentes cellules (chondrocytes, fibroblastes), des constituants de la matrice extracellulaire.

Les PG, par leur abondance et surtout par la rapidité de leur *turnover* (comparé à celui du collagène, autre constituant majeur de ce tissu) représentent un des éléments essentiels de mesure de l'activité métabolique biosynthétique du chondrocyte. C'est pourquoi l'utilisation du marquage au  $^{35}\text{S}$  est une méthode efficace pour traduire ces néosynthèses. Nous proposons également ici un dosage spectrophotométrique des GAG totaux (après action de la papaïne), afin de mieux étudier la dégradation concomitante.

Les PG de la matrice extracellulaire du cartilage tendent à se dégrader selon un mécanisme de clivage sélectif, à proximité de la région de fixation à l'acide hyaluronique, en PG de taille légèrement inférieure qui, perdant leur capacité à s'agréger, deviennent mobiles (Poole, 1986). Physiologiquement, le devenir de ces PG est, soit un transit vers le foie par la circulation sanguine, soit une endocytose par les cellules locales en vue d'un catabolisme plus complet de la protéine centrale, au sein des lysosomes, par différentes protéases.

Les résultats de notre expérience *in vitro* réalisée sur le cartilage confirment ce mécanisme conservatif de dégradation qui, dans la matrice extracellulaire, préserve les propriétés physiques liées aux

domaines fixant les GAG (Hardingham *et al*, 1986).

La faible proportion de GAG relargués dans le milieu pendant une incubation de courte durée ne correspond qu'à un phénomène de diffusion passive des grands fragments de PG non agrégés (Hardingham *et al*, 1986; Sandy *et al*, 1987), qui n'est pas du tout régulé par les facteurs de croissance étudiés ici. Toutefois, la détermination des GAG totaux dans le milieu indique que le R 1 000 a tendance à diminuer leur taux, probablement par inhibition des protéases responsables du clivage action antiprotéolytique (Silbergeld *et al*, 1981), inverse de celle de l'interleukine 1 et du tumor necrosis factor  $\alpha$ . L'UF ne modifie en rien l'effet du rétentat.

Dans le cartilage, l'extraction par GuHCl montre que l'ensemble des GAG ne constitue pas une population homogène. Les facteurs de croissance sériques de différents PM semblent avoir, dans leurs processus métaboliques, des sites d'action différents : R 1 000 agit sur la synthèse de tous les PG tandis que l'UF n'agit que sur la population de GAG non extractibles et ce, en synergie avec le rétentat. Cette fraction non extractible pourrait représenter, soit des PG de structure particulière, soit des GAG libres issus du catabolisme intracellulaire de la protéine centrale. Cette hypothèse implique que l'UF agit en augmentant le *turnover* des PG de la matrice tandis que le rétentat stimule leur biosynthèse; l'UF, lui, diminuerait le contenu du cartilage en PG tout en augmentant parallèlement la teneur en GAG libres récupérés après endocytose au cours du catabolisme intracellulaire.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier T Fontaine, C et S Chaigneau pour leur efficace collaboration.

Les crédits affectés à notre recherche proviennent de la Région Lorraine, Université Nancy I, Contrat BAP 0129 F.

## RÉFÉRENCES

- Benton HP, Tyler JA (1988) Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I. *Biochem Biophys Res Commun* 154, 1, 421-428
- Corvol M, Postel-Vinay MC, Rappaport R, Guyda H, Posner B (1980) Symposium : Régulation hormonale de la croissance : activités des facteurs de croissance dans les chondrocytes en culture. *Ann Endocrinol* 41, 495-501
- Evans CH, Georgescu HI, Mendelow D, Sung K, Tsao M, Watanabe S (1987) Modulation of chondrocyte metabolism by cytokines produced by a synovial cell line. In: *Development and Diseases of Cartilage and Bone Matrix*. Alan R Liss, Inc, 319-329
- Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ (1986) Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 883, 173-177
- Hardingham TE, Beardmore-Gray M, Dunham DG, Ratcliffe A (1986) Cartilage proteoglycans. In: *Functions of the proteoglycans*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 124)
- Heulin MH, Artur M, Geschier C, Straczek J, Vescovi G, Belleville F, Paysant P, Nabet P (1984) The biological assay of human somatomedin A: improvement by small molecular weight nature molecules. *Acta Endocrinol* 106, 43-51
- Jubb RW (1984) Differential responses of human articular cartilage to retinol. *Ann Rheum Dis* 43, 833-840
- Lippiello L, Yamamoto K, Robinson D, Mankin HJ (1978) Involvement of prostaglandins from rheumatoid synovium in inhibition of articular cartilage metabolism. *Arthritis Rheum* 21, 909-917
- Nevo Z, Silbergeld AK, Mamet R (1978) The effect of normal human serum on proteoglycan synthesis. *Biochim Biophys Acta* 541, 76-83
- Phadke K (1987) Fibroblast growth factor enhances the interleukin-1 mediated chondrocytic protease release. *Biochem Biophys Res Commun* 142, 2, 448-453
- Poole AR (1986) Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J* 236, 1-14
- Saklatvala J (1986) Tumour necrosis factor  $\alpha$  stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 322, 547-549
- Sandy JD, Flannery CR, Plaas AHK (1987) Structural studies on proteoglycan catabolism in rabbit articular cartilage explant cultures. *Biochim Biophys Acta* 931, 255-261
- Schaikwijk J, Joosten LAB, Berg W, Wyk JV, Putte LBA (1989) Insulin-like growth factor stimulation of chondrocyte proteoglycan synthesis by human synovial fluid. *Arthritis Rheum* 32, 66-71
- Silbergeld A, Mamet R, Laron Z, Nevo Z (1981) The effect of insulin-like growth factor (IGF) and of human serum on steps in proteoglycan synthesis. *Acta Endocrinol* 97, 503-507