



**HAL**  
open science

# Une nouvelle mutation du collagène V conduisant, chez le patient, à des atteintes cutanées et musculaires

Steven Nindorera Badara

► **To cite this version:**

Steven Nindorera Badara. Une nouvelle mutation du collagène V conduisant, chez le patient, à des atteintes cutanées et musculaires. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSEN064 . tel-01674246

**HAL Id: tel-01674246**

**<https://theses.hal.science/tel-01674246v1>**

Submitted on 2 Jan 2018

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

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



Numéro national de thèse : 2016LYSEN064

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée par

l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

École Doctorale no 340  
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire de Lyon

**Discipline : Sciences de la vie**

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2016, par :

**Steven NINDORERA-BADARA**

---

**Une nouvelle mutation du collagène V conduisant, chez  
le patient, à des atteintes cutanées et musculaires**

---

Devant le jury composé de :

Pr Xavier JEUNEMAÎTRE, PU PH, Université Paris Descartes  
Pr Frank ANTONICELLI, PU PH, Université de Reims Champagne Ardenne  
Dr Valérie ALLAMAND, DR, Institut de myologie  
Pr Jérôme LAMARTINE, PU, UCBL  
Dr Christelle BONOD-BIDAUD, MC UCBL  
Dr Florence RUGGIERO, DR CNRS, IGFL

rapporteur  
rapporteur  
examinatrice  
examineur  
co-encadrante  
directrice de thèse



## **REMERCIEMENTS**

En premier lieu, je tiens à remercier les Pr. Xavier JEUNEMAÎTRE et Frank ANTONICELLI d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon manuscrit de thèse.

Je remercie également le Pr. Jérôme LAMARTINE et le Dr. Valérie ALLAMAND de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Merci au Dr. Carole Kretz et au Dr. Valérie Allamand pour les conseils et les remarques avisés que vous m'avez donné durant mes comités de thèse.

Merci Florence Ruggiero et Christelle Bonod-Bidaud pour l'opportunité donnée de rejoindre votre équipe. Si je suis devenu chercheur, c'est grâce à la chance vous m'avez donné.

Je remercie la région Rhône-Alpes pour avoir financé mes 3 premières années de thèse et la fondation pour la recherche médicale (FRM) de m'avoir accordé une bourse qui m'a permis de poursuivre mes études une année supplémentaire.

Merci beaucoup beaucoup beaucoup Christelle. Comme pour pas mal de thésards et d'encadrants, notre relation n'a pas toujours été évidente. Je n'ai pas toujours été facile à gérer et tu t'es impliquée personnellement, à fond, du tout début à la toute fin, pour la réussite de mon doctorat. Un étudiant ne peut demander plus. Sois sûre que le prochain apprenti chercheur aura la chance de t'avoir comme encadrante.

Merci Florence pour l'encyclopédie de la MEC que tu es, et aussi d'avoir toujours été à l'écoute et disponible malgré tout le boulot que tu pouvais avoir.

Un immense merci à l'ensemble de l'équipe Ruggiero, les anciens comme les actuels membres, vous m'avez tous beaucoup apporté. Une pensée particulière aux occupants du bureau des « jeunes ». Merci Emilie pour ton sourire, ton enthousiasme et ton amour pour la science si communicatif. Alex, pour tes conseils techniques et scientifiques, pour m'avoir rassuré, soutenu et aussi pour avoir fait semblant de t'intéresser au foot. Pauline, merci pour tout ! Et dans tout, il y a beaucoup de choses, tu as été ma femme de ménage, mon agenda, mon réveil et mon amie (Je te kiffe). Ruth, You have been my support in the lab and outside. Giving me confidence and always behind me no matter what. Thank you.

Merci Elisabeth pour les nombreuses purif et les longs brainstormings devant un film de western blot. Marilyne, pour la microscopie, les formations, les coupes et les discussions amicales et légères.

J'aimerais également remercier tous les membres de l'IGFL. Le service administratif, toujours disponible, efficace et le tout avec le sourire. Tout les autres occupants de ce beau bâtiment pour les discussions scientifiques (ou non) au milieu du couloir ou dans la cafète, les formations et le support professionnel et amical. Merci d'avoir créé et entretenue cet environnement scientifique et humain riche qu'il y a à l'IGFL.

Je pense aux anciens doctorants de l'institut, Dan, Emilien, Julianna, la manière dont vous avez géré vos thèses a été une source d'inspiration. Mélisandre, ton tour arrive.

Merci à tout ceux qui m'ont permis d'en arriver là : Thomas Dougnac et Loïc Fort pour vos cours si bien écrit ; Alison pour la confiance en moi que tu as su me redonner ; et Adèle, merci d'être toi, d'avoir été là cette dernière année.

Enfin, ma famille. Quand j'ai eu mon bac, je me suis d'abord félicité moi-même, 10 ans plus tard, je sais que vous avez au moins autant de mérite que moi.

Josepha, Kay, Shyaka, Kayije, Sine, Inshongore, Mucyo, Ganji, Iman et Alika, grâce à vous je ne me suis jamais senti seul même si loin de mes origines. Mes frères Olivier et Joey, mon âme sœur Brice, mon fils Jeremy, Benoît je t'ai dans la peau et Matthieu pour tout le rêve que tu as vendu... Je vous aime mes Kiffeurs.

Kenny, tour à tour mon petit frère, mon grand frère, mon jumeau, mon colloc et mon meilleur ami ; Koffi mon acolyte et mon complice (dans le bien comme dans le mal); et Shaka, turikumwe, nous sommes ensemble.

Papa, maman, mes modèles, vous m'avez donné plus que je n'espérais, de l'amour, un soutien, beaucoup de patience.

Mamy izo myaka zose, ntaho ntaguhamagaye kenshi sinakwibagiye. Ndacari cheri wawe, uracari uwanje.

Cette thèse est pour toi Papy, nous aurons l'occasion de parler science quand nous nous retrouverons.

**SOMMAIRE**

<b><u>LISTE DES ABRÉVIATIONS</u></b>	<b>7</b>
<b><u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u></b>	<b>11</b>
<b><u>RÉSUMÉ</u></b>	<b>13</b>
<b><u>INTRODUCTION GÉNÉRALE</u></b>	<b>15</b>
<b><u>DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>17</b>
<b>I. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.....</b>	<b>18</b>
<b>I.1. Définition et généralités .....</b>	<b>20</b>
<b>I.1.1. Les Collagènes .....</b>	<b>22</b>
I.1.1.1. Définition et structure.....	22
I.1.1.2. Fonctions et pathologies associées .....	29
<b>I.1.2. Les protéoglycanes .....</b>	<b>33</b>
I.1.2.1. Définition et structure.....	33
I.1.2.2. Fonctions et pathologies associées .....	35
<b>I.1.3. Autres glycoprotéines de la MEC .....</b>	<b>37</b>
I.1.3.1. Définition .....	37
I.1.3.2. Les Ténascines.....	38
<b>I.2. Les collagènes fibrillaires.....</b>	<b>43</b>
<b>I.2.1. Structure générale des collagènes fibrillaires .....</b>	<b>43</b>
<b>I.2.2. Biosynthèse des procollagènes fibrillaires .....</b>	<b>46</b>
<b>I.2.3. Maturation des procollagènes fibrillaires et fibrillogénèse.....</b>	<b>48</b>
<b>I.3. Cas particulier du collagène V.....</b>	<b>52</b>
<b>I.3.1. Chaînes et isoformes .....</b>	<b>52</b>
<b>I.3.2. La maturation particulière du collagène V.....</b>	<b>53</b>
<b>I.3.3. Rôle des différentes isoformes du collagène V.....</b>	<b>55</b>
<b>I.4. Collagènes et Autophagie.....</b>	<b>64</b>
<b>I.4.1. L'Autophagie .....</b>	<b>64</b>
<b>I.4.2. L'autophagie régule le dépôt du collagène dans la MEC.....</b>	<b>67</b>
<b>I.4.3. Une régulation de l'autophagie par le collagène.....</b>	<b>68</b>

<b>II. PATHOLOGIES HEREDITAIRES DE LA MEC : CAS DE L'EDSc ET DE L'UCMD</b> .....	<b>69</b>
<b>II.1. Le Syndrome d'Ehlers-Danlos</b> .....	<b>70</b>
<b>II.1.1. Nosologie</b> .....	<b>70</b>
<b>II.1.2. Le syndrome d'Ehlers-Danlos de type classique (EDSc)</b> .....	<b>74</b>
II.1.2.1. Prévalence, diagnostic clinique et gènes candidats .....	74
II.1.2.2. Aspects moléculaires et cellulaires de l'EDSc .....	79
II.1.2.3. Relation génotype-phénotype dans le syndrome d'Ehlers-Danlos .....	81
<b>II.1.3. Syndromes de type EDSc et/ou chevauchants non associés à des mutations sur COL5A1 et COL5A2</b> .....	<b>83</b>
<b>II.2. Myopathies liées au collagène VI</b> .....	<b>85</b>
<b>II.2.1. Le collagène VI</b> .....	<b>85</b>
II.2.1.1. Structure et assemblage .....	85
II.2.1.2. Fonctions et distribution tissulaire .....	88
<b>II.2.2. Myopathies liées au collagène VI : UCMD/BM</b> .....	<b>91</b>
II.2.2.1. Aspects cliniques et moléculaires .....	92
II.2.2.2. Relations génotype/phénotype et aspects moléculaires et cellulaires .....	96
<b>II.3. Cas d'une mutation de COL5A1 induisant un syndrome chevauchant EDSc/myopathie liée au collagène VI</b> .....	<b>97</b>
 <b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	 <b>99</b>
- Fiche Technique n°1 : Techniques de biologie moléculaire.....	100
- Fiche Technique n°2 : Techniques de biologie cellulaire.....	106
- Fiche technique n°3 : Microscopie électronique à transmission sur cellules en culture.....	110
- Fiche technique n°4 : Étude in cellulo du clivage de $\alpha 1(V)$ et de $N\alpha 1(V)$ par l'enzyme BMP-1.....	113
- Fiche technique n°5 : Production et purification des peptides $N\alpha 1$ .....	116
- Fiche technique n°6 : Test de migration et de cicatrisation sur couche cellulaire.....	120
- Fiche technique n°7 : Marquage métabolique des collagènes à la [Proline] <sup>14</sup> C.....	122
- Fiche technique n°8 : Immunomarquages des protéines intra-cellulaires sur cellules en culture..	125
- Fiche technique n°9 : Analyse des contacts focaux des fibroblastes de peau humaine.....	127
- Fiche technique n°10 : Mesure de la prolifération des fibroblastes de peau humaine.....	128
- Fiche technique n°11 : Immunomarquages fluorescents des collagènes sur cellules en culture.....	129
- Fiche technique n°12 : Analyse du flux autophagique.....	132
 <b>RESULTATS</b> .....	 <b>137</b>
<b>DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS</b> .....	<b>169</b>
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>189</b>
<b>PUBLICATION SCIENTIFIQUE ANNEXE</b> .....	<b>205</b>

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**



<b><u>Liste des abréviations</u></b>	
°C	degré Celsius
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
BDMA	Benzyl DiMéthylAmine
BiP	Binding Immunoglobulin Protein
BM	Myopathie de Bethlem
BMP	Bone Morphogenic Protein
BMP-1	Bone Morphogenic Protein 1
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl	Chlorure de Calcium
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CAM	Cell adhesion Molecule (Protéine d'adhésion cellulaire)
CAPS	3-CyclohexylAmino-1-PropaneSulfonic acid
CH <sub>3</sub> COONa	Acétate de Sodium
CLAC	Collagen-Like Alzheimer amyloid plaque Component
COL	domaine COLlagénique
CRR	domaine Cystein Rich Region
CS	Chondroïtine Sulfate
CSc	Cellules de Schwann
DDR	Discoïdin Domain Receptor
DEJ	Jonction Dermo-Épidermique
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medim
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
dNTP	desoxyNucleotide Tri-Phosphate
DO	Densité Optique
DPP	DecaPentaPlegic
DS	Dermatan Sulfate
DTT	DiThrioTréitol
EBA	Épidermolyse Bulleuse Acquise
EBC	Épidermolyse Bulleuse Congénitale
EBNA-1	Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1
EDS	Syndrome d'Ehlers-Danlos
EDSc	Ehlers-Danlos Syndrom classic
EDSv	Syndrome d'Ehlers-Danlos de type vasculaire
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFL	Epidermal Growth factor-like
ETP	EndoTroPhine
FACIT	Fibrillar Associated Collagen With Interrupted Triple helix
FAK	Focal Adhesion Kinase

*Liste des abréviations*

Fb	Fibroblaste
FGF-8	Fibroblast Growth Factor 8
FN	Fibronectine
FNI	domaine fibronectine de type I
FNII	domaine fibronectine de type II
FNIII	domaine fibronectine de type III
Fph	Fibroblastes de peau humaine
GAG	GlycosAminoGlycanes
Gly	Glycine
GMEM	Glial/ Mesenchymal Extracellular Matrix protein
GPC	Golgi-to-PM Carriers
GPI	GlycosylPhosphatIdylinositol
HA	acide Hyaluronique
HCl	Acide chlorhydrique
HEK	Human Embryonic Kidney
HRP	Horse Radish Peroxydase
HS	Héparane Sulfate
HSC	Cellules souches hépatiques
HSP	Heat Shock Protein
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
kb	kilobases
KO	Knock-Out
KS	Kératane Sulfate
LB	Lysogeny Broth
LRR	Leucine-Rich Region
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MM	Myoscléroses
MMP	Métalloprotéase
MPT	Modification Post-Traductionnelle
mTL	mammalian ToLloid
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Citrate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxide de sodium
NC	domaine Non Collagénique
OI	Ostéogénèse Imparfaite
OsO <sub>4</sub>	Tetroxyde d'osmium
P4H	Prolyl-4-Hydroxylase
PAGE	PolyAcrylamide Gel
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Citrate de plomb
PBS	Phosphate Buffered Salite
PBS-Tx	PBS-Tween 20 à x%
PDI	Protéine Disulfure Isomérase
PFA	Paraformaldéhyde
PG	Protéoglycane
pH	potentiel Hydrogène

## *Liste des abréviations*

Plxnd1	Plexin D1
PPI	PeptidyProline cis-trans Isomérase
PVDF	PolyVinyliDene Fluoride
Qsp	Quantité suffisante pour
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
rpm	rotation par minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SLRP	Small Leucine-Rich Proteoglycan
SNP	Système Nerveux Périphérique
SS	Sclérodémie Systémique
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TA	Tenascin Assembly domain
TCA	Acide trichloracétique
TEM	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
TG	Tris Glycine
TGF-b	Transforming Growth factor b
TGN	Trans Golgi Network
TLL	ToLloid-Like-1
TLR	Toll-Like Receptor
TN	Ténascine
TSPN	Domaine homologue à l'extrémité N-terminale de la thrombospondine-1
UCMD	Dystrophie Congénitale Musculaire d'Ullrich
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VTC	Vesicular Tubular Clusters
vWA	domaine von Willebrand factor A-like

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

## TABLES DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1 :</b> Organisation de la matrice extracellulaire et ses interactions avec les cellules.....	<b>20</b>
<b>Figure 2 :</b> Composition et organisation de la membrane basale et de la matrice interstitielle .....	<b>21</b>
<b>Figure 3 :</b> Sous-familles et organisations supramoléculaires de la superfamille des collagènes non défini.	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 4 :</b> Classification des protéoglycanes.....	<b>34</b>
<b>Figure 5 :</b> Exemples de structure des glycoprotéines de la MEC : Représentation schématique des molécules de fibronectine, ténaïcine et thrombospondine.....	<b>38</b>
<b>Figure 6 :</b> Structure des ténaïcines chez les vertébrés.....	<b>44</b>
<b>Figure 8 :</b> Modélisation du domaine C-propeptide (NC1) des chaînes pro $\alpha$ de collagène I.....	<b>45</b>
<b>Figure 9 :</b> Biosynthèse et modifications post-traductionnelles des collagènes fibrillaires .....	<b>47</b>
<b>Figure 10 :</b> Synthèse des collagène et fibrillogénèse .....	<b>50</b>
<b>Figure 11 :</b> Organisation des fibres de collagènes dans la MEC.....	<b>51</b>
<b>Figure 12 :</b> Structure primaire des chaînes pro $\alpha$ du collagène V.....	<b>52</b>
<b>Figure 13 :</b> Enzymes de maturation et sites de clivage du procollagène V.....	<b>55</b>
<b>Figure 14 :</b> Modèle de régulation du diamètre des fibres par le collagène V.....	<b>57</b>
<b>Figure 15 :</b> Structure des fibres de collagène du stroma cornéen chez les souris <i>pN</i> .....	<b>58</b>
<b>Figure 16 :</b> Micrographie électronique du derme de souris au 10 <sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire.. .....	<b>59</b>
<b>Figure 17 :</b> Effet de la mutation de <i>Col5a1</i> sur la peau des souris.....	<b>60</b>
<b>Figure 18 :</b> Modèle proposé pour la fonction du collagène V dans la stabilité de l'interface derme-épiderme .....	<b>61</b>
<b>Figure 19 :</b> Initiation et formation d'une vésicule autophagique .....	<b>66</b>
<b>Figure 20 :</b> Manifestations cliniques du Syndrome d'Ehlers-Danlos de type classique.....	<b>76</b>
<b>Figure 21 :</b> Aspect ultrastructural des fibres de collagène issues de patients EDS observé par microscopie électronique à transmission .....	<b>77</b>
<b>Figure 22 :</b> Logigramme de diagnostic du Syndrome d'Ehlers-Danlos classique .....	<b>79</b>
<b>Figure 23 :</b> Les chaînes du collagène VI, leur assemblage et organisation supramoléculaire.. .....	<b>86</b>
<b>Figure 24 :</b> Observation de filaments perlés de collagène VI par microscopie électronique à transmission.. .....	<b>88</b>
<b>Figure 25 :</b> Aspect ultrastructural des fibres de collagène du derme.....	<b>91</b>
<b>Figure 26 :</b> Manifestations cliniques de la myopathie de Bethlem et de la Dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich .....	<b>93</b>
<b>Figure 27 :</b> Immunomarquage du collagène VI sur des biopsies musculaires.....	<b>95</b>
<b>Figure 28 :</b> IRM des muscles de la cuisse de patients atteints de myopathies liées au collagène VI.....	<b>95</b>
<b>Figure 29 :</b> Constructions N $\alpha$ 1-pCEP4 et N $\alpha$ 1-pcDNA.....	<b>100</b>
<b>Figure 30 :</b> Localisation des mutations EDSc étudiées du N-propeptide de la chaîne $\alpha$ 1(V). .....	<b>171</b>
<b>Figure 31 :</b> Modèle proposé pour l'interaction entre le collagène V et le collagène VI.....	<b>172</b>
<b>Figure 32 :</b> Suivi du clivage <i>in cellulo</i> du peptide N $\alpha$ 1 sauvage et porteur de la mutation G493R... .....	<b>174</b>

<b>Figure 33</b> : Test de cicatrisation <i>in cellulo</i> sur les fibroblastes. ....	<b>180</b>
<b>Figure 34</b> : Cytoplasme de fibroblastes issus du derme du patient G530S, observé en microscopie électronique à transmission. ....	<b>184</b>
<b>Figure 35</b> : Impact de la mutation S254L sur l'organisation de la MEC et l'intégrité des fibroblastes. ....	<b>185</b>
<b>Tableau 1</b> : Les différentes familles de collagènes, chaînes et isoformes. ....	<b>24</b>
<b>Tableau 2</b> : Pathologies héréditaires associées aux mutations sur les gènes des collagènes et autres maladies associées. ....	<b>31</b>
<b>Tableau 3</b> : Profil d'expression, fonctions et pathologies associées des 4 ténascines des vertébrés. ....	<b>41</b>
<b>Tableau 4</b> : Site de clivage des procollagènes fibrillaires par l'enzyme BMP-1. ....	<b>54</b>
<b>Tableau 5</b> : Première nosologie des syndromes d'Ehlers-Danlos. ....	<b>71</b>
<b>Tableau 6</b> : Nouvelle nosologie du syndrome d'Ehlers-Danlos. ....	<b>73</b>



# **RÉSUMÉ**



## **RÉSUMÉ**

Le Syndrome d'Ehlers-Danlos classique (EDSc) est une maladie génétique du tissu conjonctif lié, dans 90% des cas, à des mutations sur les gènes du collagène V (COLV). Elle se caractérise par une peau fine, vulnérable et hyper-extensible, des défauts de cicatrisation et une hypermobilité articulaire. Afin d'établir un lien entre le génotype et le tableau clinique des patients, j'ai étudié l'impact de mutations identifiées sur le N-propeptide de la chaîne  $\alpha_1$  de COLV, particulièrement la mutation S254L, associée à un nouveau syndrome caractérisée par des atteintes cutanées et neuromusculaire, sur la maturation de COLV, la production et l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC), et sur l'intégrité et la fonction des fibroblastes du derme.

J'ai ainsi montré que seule la mutation S254L abolit le clivage BMP-1 du N-propeptide, étape importante de la maturation de COLV. Le COLV muté est normalement sécrété dans la MEC qui va toutefois présenter une organisation anarchique des fibres de collagène et du réseau de collagène VI. À l'aide de tests de blessure sur couche cellulaire, j'ai observé que les fibroblastes EDSc (fb/EDSc) et S254L (fb/SL) ont un niveau de cicatrisation inférieur à celui observé chez les fibroblastes sains (fb/WT). Ce défaut de recouvrement est associé à des défauts de migration et à un plus faible niveau de prolifération. De plus, les fb/SL ont une surface d'adhésion inférieure à celle des fb/WT. J'ai également observé une augmentation du flux autophagique chez les fb/EDSc et fb/SL par rapport aux fb/WT. L'autophagie des fb/SL, contrairement au fb/EDSc, n'est pas associée à un stress du réticulum endoplasmique mais à la mitophagie, un mécanisme permettant la dégradation spécifique des mitochondries qui sont altérées chez les fb/SL.

Mon étude portant sur les mutations du N-propeptide a ainsi permis de caractériser certains des processus biologiques associés à la pathogénèse de l'EDSc et ceux spécifiquement liés à la pathologie induite par la mutation S254L.

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Je vous présente ma thèse que j'ai effectué au sein de l'équipe « Biologie et pathologie de la matrice extracellulaire » sous la direction de Florence Ruggiero et Christelle Bonod-Bidaud.

L'objectif initial de ce projet visait à établir une relation génotype-phénotype dans la forme classique du syndrome d'Ehlers-Danlos (EDSc). Cette pathologie héréditaire est très hétérogène dans la sévérité de ses symptômes, qui affectent essentiellement la peau et les articulations, mais également par la présence, chez les mêmes patients, d'altérations dites secondaires. Bien que les causes aient été identifiées, à savoir des mutations du collagène V dans 90% des cas, aucune relation entre le type de mutation et les symptômes observés chez les patients n'a pu être établie.

Afin de répondre à cette question, nous avons choisi de tirer profit de l'expérience de notre laboratoire sur l'étude des collagènes, pour évaluer l'impact de 6 mutations, localisées dans le domaine N-propeptidique de la chaîne  $\alpha 1(V)$ , sur la formation de la matrice extracellulaire (MEC) et l'intégrité des fibroblastes du derme.

Toutefois, et sans oublier ce but, je me suis plus particulièrement intéressé à une mutation qui a la particularité d'induire, chez le patient, des symptômes musculaires associés à une autre famille de pathologie de la matrice, les myopathies liées au collagène VI. Et ce sont les résultats obtenus dans la caractérisation de cette mutation que je vais vous présenter ici.

J'ai fait le choix de diviser la partie bibliographique en 2 grandes parties. La première qui porte sur la MEC et qui introduit ce que sont : (i) la MEC et les différentes familles de protéines qui la composent ; (ii) les collagènes fibrillaires ; et (iii) le collagène V, la seconde sur les connaissances actuelles concernant l'aspect clinique et moléculaire, et la relation génotype/ phénotype de l'EDSc et des myopathies du collagène VI.

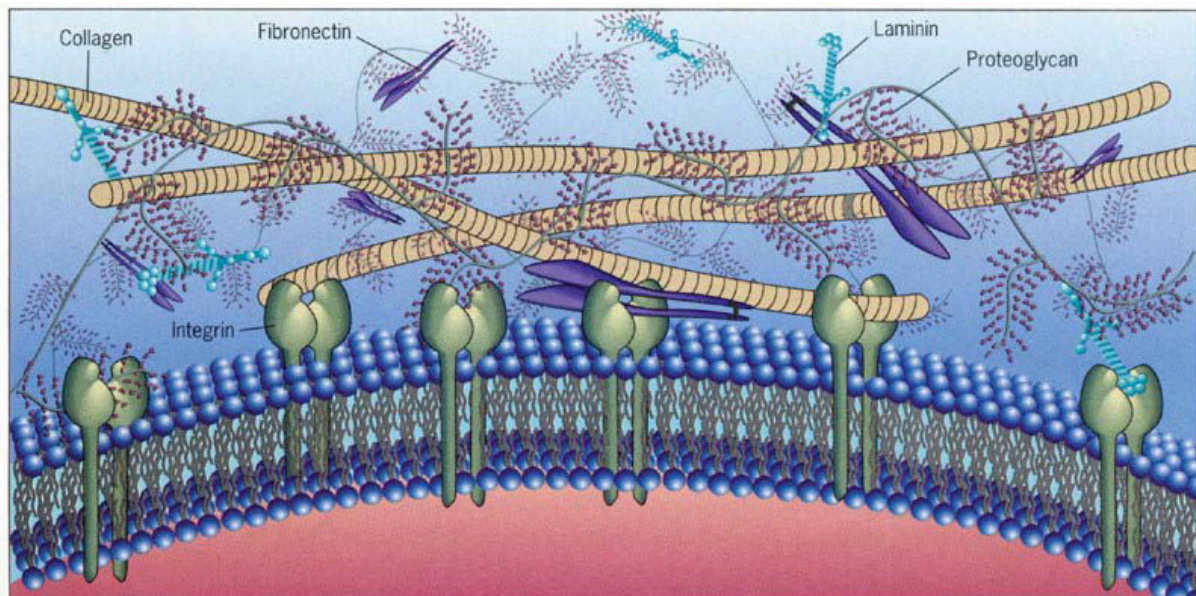
## **DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **I. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE**

### **I.1. Définition et généralités**

La matrice extracellulaire (MEC) est le composant non cellulaire présent dans tous les tissus des organismes pluricellulaires au sein desquels elle remplit des fonctions importantes d'échafaudage, assurant le maintien et la cohésion tissulaire. En plus de cette fonction structurale, la MEC joue un rôle majeur dans les voies de signalisation biochimiques et biomécaniques et régule ainsi plusieurs processus biologiques tels que le développement, la morphogénèse, l'homéostasie et la réparation tissulaire (Hynes 2009; Frantz et al. 2010).

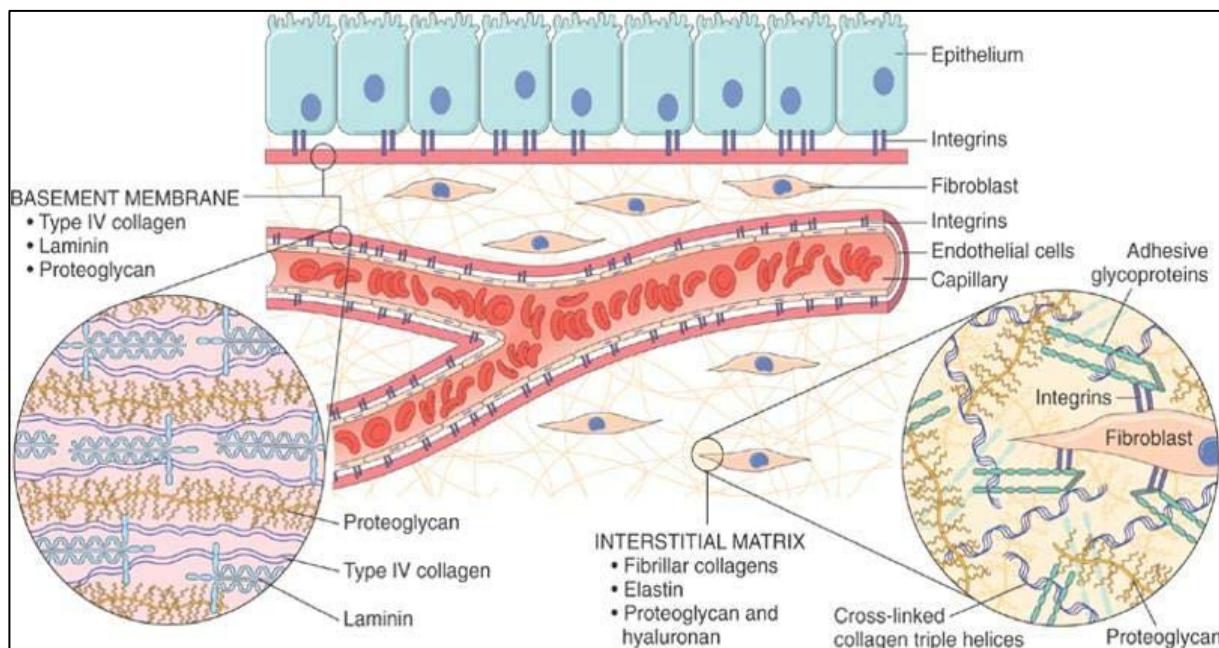
La MEC est composée d'eau, de protéoglycanes, de glycoprotéines telles que les collagènes, les laminines, les ténascines et la fibronectine (Figure 1). La MEC, synthétisée durant le développement, est une structure hétérogène, dynamique et tissu spécifique. Elle varie dans sa composition et son organisation topologique au cours du développement, mais également dans les tissus adultes, en réponse à des stimuli biochimiques et biomécaniques (Frantz et al. 2010).



**Figure 1** : Organisation de la matrice extracellulaire et ses interactions avec les cellules (<http://nptel.ac.in/courses/102103012/8>).

Les composants de la MEC interagissent avec les cellules environnantes via des récepteurs spécifiques comme les intégrines (Figure 1), les récepteurs à domaine discoïdine (Discoïdin Domain Receptor, DDR) et les protéoglycanes (PG) membranaires (Harburger & Calderwood 2009; Hynes 2009). Ces récepteurs vont permettre à la MEC d'interagir avec les cellules et ainsi réguler par exemple l'adhérence et la migration cellulaire, ou dans le cas des DDR, récepteurs à activité tyrosine-kinase, de réguler l'expression de gènes dont ceux codant pour les métalloprotéases (MMPs), enzymes ayant la capacité de dégrader les protéines de la MEC (Leitinger 2014).

Deux types de MEC peuvent être distingués en fonction de la localisation tissulaire et de l'organisation topologique : Les lames basales et les matrices interstitielles (Bonnans et al. 2014) (Figure 2). Les lames basales sont des couches spécialisées de MEC qui vont séparer les cellules épithéliales ou endothéliales du tissu conjonctif sous-jacent. Elles entourent également les cellules nerveuses et musculaires (Yurchenco 2011). Les matrices interstitielles sont des structures fibreuses entourant les cellules et fournissant un échafaudage structural permettant l'organisation des tissus.



**Figure 2 :** Composition et organisation de la membrane basale et de la matrice interstitielle (<https://www.studyblue.com/notes/note/n/9-regeneration-repair2/deck/11924281?blurry=e&ads=true>).

L'importance de la MEC est attestée par le grand nombre de pathologies qui lui sont associées. Des mutations de gènes codant pour des composants matriciels entraînent

des maladies héréditaires affectant différents organes tels que la peau et les tendons (syndromes d'Ehlers-Danlos), les os (ostéogénèse imparfaite), les muscles (myopathie de Bethlem, Dystrophie Musculaire Congénitale d'Ullrich), la rétine (syndrome de Knobloch) ou plusieurs organes comme le syndrome de Marfan, pour lequel, des atteintes ophtalmiques, squelettiques et cardiaques sont observées. Une dérégulation de la MEC est également retrouvée dans d'autres pathologies telles que les fibroses et le cancer (Järveläinen et al. 2009) et les maladies neurodégénératives (Ricard-Blum & Ruggiero 2005).

Pour montrer l'extrême hétérogénéité de la MEC, j'ai choisi de décrire brièvement, dans ce premier chapitre, les différentes familles de protéines qui la composent, leurs fonctions et les pathologies associées.

### I.1.1. Les Collagènes

#### I.1.1.1. Définition et structure

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes de l'organisme où ils représentent jusqu'à 30% de la masse protéique. La famille des collagènes est composée de 28 membres génétiquement distincts qui ont en commun le fait de former des protéines trimériques, de posséder au moins un domaine en triple hélice et d'être sécrétés dans la matrice extracellulaire. Les collagènes ont également, pour la plupart, la capacité de s'agréger et former ainsi des structures supramoléculaires (Ricard-Blum & Ruggiero 2005). Ils sont divisés en sous-familles sur la base de d'une organisation supramoléculaire commune ou de caractéristiques structurales (Figure 3). Les 28 collagènes sont codés par 46 gènes codant chacun pour une chaîne polypeptidiques, nommée chaîne  $\alpha$ . La molécule de collagène est sécrétée dans la matrice extracellulaire sous la forme d'un trimère, issue de l'association de 3 chaînes  $\alpha$ . Chaque chaîne  $\alpha$  contient au moins un domaine collagénique (COL) qui est constitué de la répétition du triplet Gly-X-Y où X est le plus souvent une proline et Y une hydroxyproline. Les collagènes sont des protéines modulaires composées par un ou plusieurs domaines COL flanqués ou interrompus par des domaines dit non-collagéniques (NC) qui sont, dans la plupart des cas, des domaines protéiques retrouvés dans d'autres protéines de la MEC ou des régions dites « linkers », courtes séquences peptidiques reliant deux domaines COL (Gordon & Hahn 2010; Hynes & Naba 2012). La molécule de collagène est donc une succession de domaines COL et NC

qui vont être numérotés de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Cette annotation particulière provient de la caractérisation des premiers collagènes qui a été réalisée par séquençage partiel sur des séquences où les régions codantes de l'extrémité N-terminale étaient absentes (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005).

Au cours de la synthèse du collagène, la chaîne  $\alpha$ , localisée dans le réticulum endoplasmique, va subir des modifications post-traductionnelles (MPT) telles que des glycosylations, la formation de ponts disulfures et l'hydroxylation des résidus proline et lysine (Lamande & Bateman 1999). Par la suite, les 3 chaînes  $\alpha$  vont former une molécule de collagène grâce à la présence de domaines de trimérisation qui vont permettre la sélection des 3 chaînes à assembler, l'alignement des domaines COL et la formation de la triple hélice.

Ces domaines de trimérisation ne sont pas identifiés pour tous les collagènes. Ils sont situés à l'extrémité C-terminale pour la plupart des collagènes dont les collagènes fibrillaires (domaine NC1), les FACITs (collagènes IX et XIX, domaine NC2) et à l'extrémité N-terminale des collagènes membranaires.

Les collagènes sont présents, dans la MEC, sous forme d'homotrimères issus de l'association de 3 chaînes  $\alpha$  identiques ou d'hétérotrimères formés par l'association de 2 ou 3 chaînes  $\alpha$  différentes (Tableau 1). Bien que la majorité des hétérotrimères de collagène soient formés par l'association de chaînes  $\alpha$  du même collagène, on peut retrouver des molécules hybrides issues de l'association de chaîne  $\alpha$  de collagènes différents. Par exemple, la chaîne  $\alpha_1$  du collagène V peut s'associer avec la chaîne  $\alpha_2$  du même collagène et former l'hétérotrimère  $[\alpha_1(V)]_2\alpha_2(V)$ . Mais elle peut également dans certains cas, s'associer avec les chaînes  $\alpha_1$  et  $\alpha_3$  du collagène XI et former l'hétérotrimère hybride  $\alpha_1(XI)\alpha_1(V)\alpha_3(XI)$  (Wu et al. 2009) (Tableau 1)



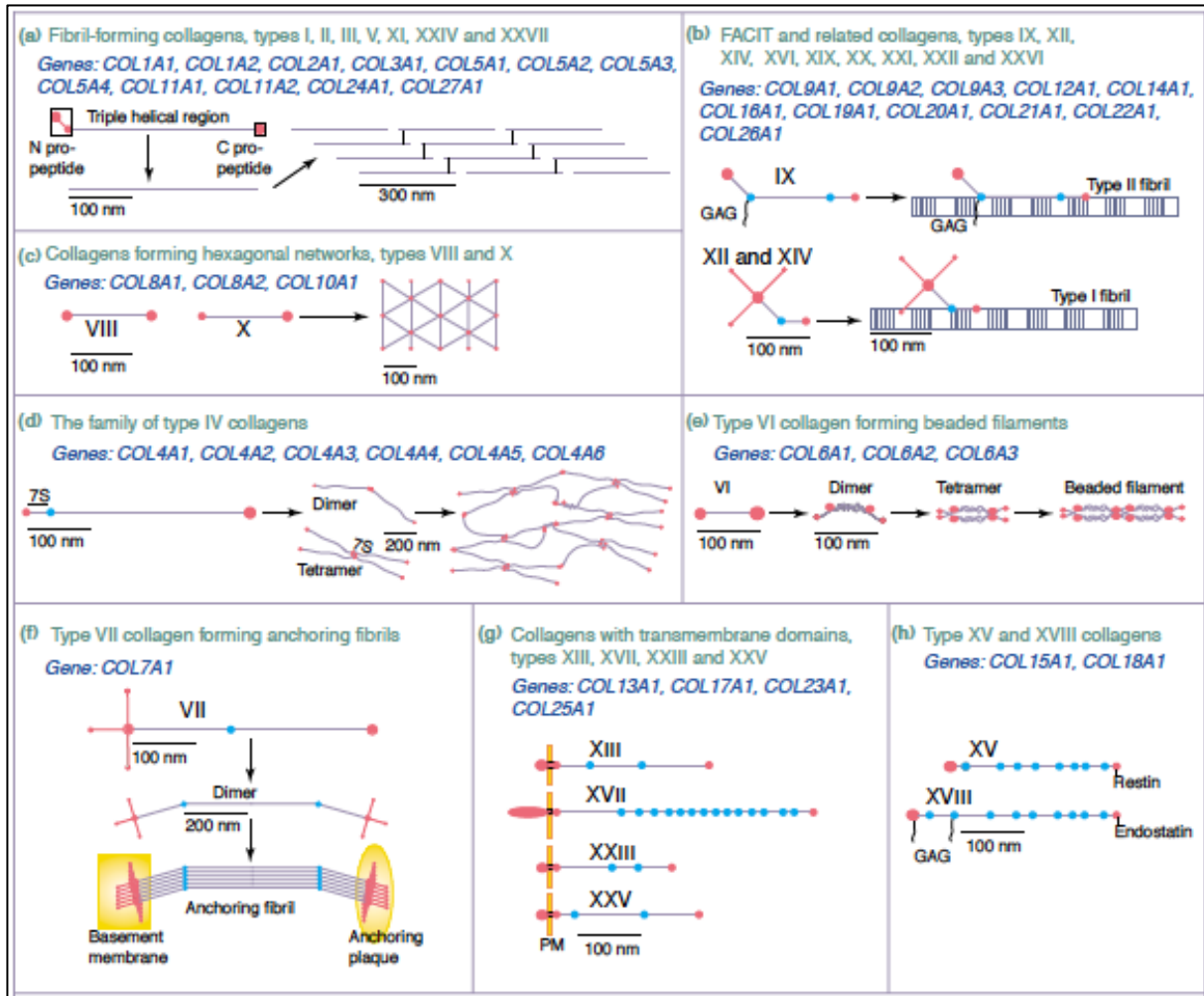
Collagènes	Chaînes $\alpha$	Isoformes	Organisation supramoléculaire
Collagène I	$\alpha_1(\text{I}), \alpha_2(\text{I})$	$[\alpha_1(\text{I})]_2 \alpha_2(\text{I}),$ $[\alpha_1(\text{I})]_3$	Collagène fibrillaire
Collagène II	$\alpha_1(\text{II})$	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	Collagène fibrillaire
Collagène III	$\alpha_1(\text{III})$	$[\alpha_1(\text{III})]_3$	Collagène fibrillaire
Collagène IV	$\alpha_1(\text{IV}), \alpha_2(\text{IV}),$ $\alpha_3(\text{IV}), \alpha_4(\text{IV}),$ $\alpha_5(\text{IV}), \alpha_6(\text{IV})$	$[\alpha_1(\text{IV})]_2 \alpha_2(\text{IV}),$ $\alpha_3(\text{IV})\alpha_4(\text{IV})\alpha_5(\text{IV})$ $[\alpha_5(\text{IV})]_2 \alpha_6(\text{IV})$	Réseau de collagène
Collagène V	$\alpha_1(\text{V}), \alpha_2(\text{V}),$ $\alpha_3(\text{V}), \alpha_4(\text{V})$	$[\alpha_1(\text{V})]_2 \alpha_2(\text{V}), [\alpha_1(\text{V})]_3,$ $[\alpha_1(\text{V})]_2 \alpha_4(\text{V}),$ $\alpha_1(\text{XI})\alpha_1(\text{V})\alpha_3(\text{XI})$	Collagène fibrillaire
Collagène VI	$\alpha_1(\text{VI}), \alpha_2(\text{VI}),$ $\alpha_3(\text{VI}), \alpha_4(\text{VI}),$ $\alpha_5(\text{VI}), \alpha_6(\text{VI})$	$\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_3(\text{VI}),$ $\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_4(\text{VI}),$ $\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_5(\text{VI}),$ $\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_6(\text{VI})$	Collagène non conventionnel
Collagène VII	$\alpha_1(\text{VII})$	$[\alpha_1(\text{VII})]_3$	Collagène non conventionnel
Collagène VIII	$\alpha_1(\text{VIII}), \alpha_2(\text{VIII})$	$[\alpha_1(\text{VIII})]_2 \alpha_2(\text{VIII}),$ $\alpha_1(\text{VIII}) [\alpha_2(\text{VIII})]_2,$ $[\alpha_1(\text{VIII})]_3$	Réseau de collagène
Collagène IX	$\alpha_1(\text{IX}), \alpha_2(\text{IX}),$ $\alpha_3(\text{IX})$	$\alpha_1(\text{IX})\alpha_2(\text{IX})\alpha_3(\text{IX}),$ $[\alpha_1(\text{IX})]_3$	FACIT
Collagène X	$\alpha_1(\text{X})$	$[\alpha_1(\text{X})]_3$	Réseau de collagène
Collagène XI	$\alpha_1(\text{XI}), \alpha_2(\text{XI}),$ $\alpha_3(\text{XI})$	$\alpha_1(\text{XI})\alpha_2(\text{XI})\alpha_3(\text{XI}),$ $\alpha_1(\text{XI})\alpha_2(\text{V})\alpha_3(\text{XI})$	Collagène fibrillaire
Collagène XII	$\alpha_1(\text{XII})$	$[\alpha_1(\text{XII})]_3$	FACIT
Collagène XIII	$\alpha_1(\text{XIII})$	$[\alpha_1(\text{XIII})]_3$	Collagène transmembranaire
Collagène XIV	$\alpha_1(\text{XIV})$	$[\alpha_1(\text{XIV})]_3$	FACIT
Collagène XV	$\alpha_1(\text{XV})$	$[\alpha_1(\text{XV})]_3$	Multiplexine
Collagène XVI	$\alpha_1(\text{XVI})$	$[\alpha_1(\text{XVI})]_3$	FACIT
Collagène XVII	$\alpha_1(\text{XVII})$	$[\alpha_1(\text{XVII})]_3$	Collagène transmembranaire
Collagène XVIII	$\alpha_1(\text{XVIII})$	$[\alpha_1(\text{XVIII})]_3$	Multiplexine
Collagène XIX	$\alpha_1(\text{XIX})$	$[\alpha_1(\text{XIX})]_3$	FACIT
Collagène XX	$\alpha_1(\text{XX})$	$[\alpha_1(\text{XX})]_3$	FACIT
Collagène XXI	$\alpha_1(\text{XXI})$	$[\alpha_1(\text{XXI})]_3$	FACIT
Collagène XXII	$\alpha_1(\text{XXII})$	$[\alpha_1(\text{XXII})]_3$	FACIT
Collagène XXIII	$\alpha_1(\text{XXIII})$	$[\alpha_1(\text{XXIII})]_3$	Collagène transmembranaire
Collagène XXIV	$\alpha_1(\text{XXIV})$	$[\alpha_1(\text{XXIV})]_3$	Collagène fibrillaire
Collagène XXV	$\alpha_1(\text{XXV})$	$[\alpha_1(\text{XXV})]_3$	Collagène transmembranaire
Collagène XXVI	$\alpha_1(\text{XXVI})$	$[\alpha_1(\text{XXVI})]_3$	Collagène non conventionnel
Collagène XXVII	$\alpha_1(\text{XXVII})$	$[\alpha_1(\text{XXVII})]_3$	Collagène fibrillaire
Collagène XXVIII	$\alpha_1(\text{XXVIII})$	$[\alpha_1(\text{XXVIII})]_3$	Collagène non conventionnel

Tableau 1 : Les différentes familles de collagènes, chaînes et isoformes.

Les collagènes sont classés en 6 sous-familles distinctes selon des critères de fonction et d'homologie de domaines (Ricard-Blum & Ruggiero 2005; Ricard-Blum 2011) (Figure 3). On distingue ainsi :

- Les collagènes fibrillaires, nommés ainsi parce qu'ils ont la capacité de former des fibres qui apparaissent striées en microscopie électronique à transmission (Figure 3.a). Cette sous-famille regroupe les collagènes I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII. Les collagènes fibrillaires se caractérisent par un large domaine en triple hélice (COL1), de plus de 1000 résidus et généralement ininterrompu à l'exception des collagènes XXIV et XXVII. Le domaine COL1 est généralement bordé par 2 régions non collagéniques, le N-propeptide à l'extrémité N-terminale et le C-propeptide à l'extrémité C-terminale. Lors de la biosynthèse, l'ARNm des collagènes fibrillaires est traduit sous forme de chaînes  $\alpha$  qui vont subir des modifications post-traductionnelles (glycosylation, hydroxylation des résidus proline/lysine) et s'assembler pour former une molécule de procollagène non mature. Au cours de la maturation, les N- et C-propeptides vont être clivés pour l'ensemble des collagènes fibrillaires à l'exception du N-propeptide des collagènes V et XI qui sont partiellement ou non clivés. Les collagènes fibrillaires vont, par la suite, s'agréger pour former des fibres de collagène. Ces fibres de collagène sont, pour la plupart, hétérotypiques car composées de différents collagènes fibrillaires et non fibrillaires dans le cas des fibres de collagène II/ XI/ IX.

On va distinguer 2 types de collagènes fibrillaires : (1) les collagènes fibrillaires majeurs (collagènes I, II et III) qui sont les composants quantitativement majoritaires des fibres hétérotypiques, par opposition aux (2) collagènes fibrillaires mineurs (collagènes V et XI) dont la concentration relative dans les fibres hétérotypiques est faible. L'ensemble des collagènes fibrillaires représente la sous-famille de collagène la plus abondante des organismes pluricellulaires qui sera évoquée plus en détails dans le chapitre suivant (Ricard-Blum & Ruggiero 2005).



**Figure 3 :** Sous-familles et organisations supramoléculaires de la superfamille des collagènes (Myllyharju & Kivirikko 2004).

- Les FACITs (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix) qui comprennent les collagènes IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII (Figure 3.b et Tableau 1). Les FACITs ont en commun : (i) de pouvoir s'associer avec des fibres de collagène, à la surface desquelles ils vont se retrouver liés soit de manière covalente (COLIX) ou par l'intermédiaire de protéoglycanes (COLXII et COLXIV) ; (ii) la présence dans la jonction NC1-COL1 de 2 résidus cystéines séparés par 4 acides aminés ; (iii) la présence d'au moins 2 domaines COL connectés par un court domaine NC ; (iv) la présence dans le COL2 de 2 imperfections dans la répétition du triplet G-X-Y ; et (v) la présence d'un large domaine N-terminal dans lequel on retrouve un sous-domaine TSPN (Thrombospondin N-terminal-like domain) à l'exception des chaînes  $\alpha 2(\text{IX})$  et  $\alpha 3(\text{IX})$  (Ricard-Blum & Ruggiero 2005). Au-delà de ces caractères communs, les FACITs diffèrent dans le nombre de domaines COL, la composition et la taille du domaine N-terminal qui peut ne contenir que le domaine TSPN ou être plus long avec

la présence de modules supplémentaires comme les domaines von Willebrand factor A-like (vWA) et les domaines fibronectine de type III (FNIII) (Ricard-Blum & Ruggiero 2005; Ricard-Blum 2011).

- Les collagènes formant des réseaux comme les collagènes IV, VIII et X (Figure 3.c-d). Le collagène IV est un composant majeur des membranes basales. Il présente une organisation supramoléculaire en un réseau de mailles. Pour ce faire, le collagène IV va s'associer en dimère, d'un côté, par association tête-à-tête de 2 domaines NC1, et former des tétramères, de l'autre côté, par interaction de 4 domaines N-terminaux 7S (Figure 3.d) (Khoshnoodi et al. 2008).

Les collagènes VIII et X forment un maillage hexagonal (Shuttleworth 1997; Kwan et al. 1991). Néanmoins, aucune évidence de réseau de collagène X n'a été observée *in vivo* où il a été montré comme étant associé à des fibres de collagène II sous la forme de filaments fins. L'hypothèse retenue pour expliquer les observations *in vivo*, serait que les filaments fins observés correspondraient au produit de la dégradation des mailles de collagène X lors de la préparation des échantillons (Kwan et al. 1991).

Les collagènes transmembranaires qui regroupent les collagènes XIII, XVII, XXIII et XXV (Figure 1.g et Tableau 1). Ce sont tous des homotrimères Il s'agit de protéines transmembranaires de type II constituées d'une partie N-terminale cytosolique, généralement courte (environ 10% de la taille de la chaîne  $\alpha$  à l'exception du collagène XVII où il représente 30% de la taille de la protéine), un domaine transmembranaire unique et un ectodomaine extracellulaire qui consiste en une succession de domaines COL en nombre variable allant de 3 pour les collagène XIII, XXIII et XXV à 15 pour le collagène XVII (Franzke et al. 2003). La région comprise entre la membrane plasmique et le premier domaine COL est appelée « linker-region ». Ce domaine coiled-coil est impliqué dans la trimérisation des collagènes transmembranaires. Ainsi contrairement aux autres collagènes, l'enroulement des domaines en triple hélice des collagènes transmembranaires se fait de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale (Snellman et al. 2000). L'ectodomaine de l'ensemble des collagènes membranaires peut également être clivé, généralement par une furine, et libérer un peptide dans l'environnement cellulaire. C'est le cas, par exemple, du collagène neuronal de type XXV qui libère par activité protéolytique un peptide nommé CLAC (pour « Collagen-Like Alzheimer amyloid plaque Component »). CLAC est retrouvé associé aux plaques amyloïdes qui s'accumulent dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Söderberg et al. 2005).

- Les multiplexines (multiple triple helix domains and interruptions) comprennent les collagènes XV et XVIII (Figure 3.h). Les collagènes XV et XVIII sont sécrétés et déposés dans les membranes basales sous forme d'homotrimères. Ce sont tout deux des protéoglycanes dans la mesure où ils portent de chaînes glycosaminoglycanes (GAG) (cf. sous-chapitre protéoglycanes). Ils ont en commun le fait de pouvoir libérer par protéolyse un fragment C-terminal bioactif, appelé endostatine pour le collagène XVIII et restine pour le collagène XV.

- Les collagènes non conventionnels regroupent les collagènes VI, VII, XXVI et XXVIII, qui n'entrent pas dans les sous-familles citées ci-dessus. Ils adoptent chacun une organisation supramoléculaire particulière. Le collagène VI est retrouvé dans la MEC sous-forme d'hétérotrimère  $\alpha 1(\text{VI})\alpha 2(\text{VI})\alpha 3(\text{VI})$ , la chaîne  $\alpha 3(\text{VI})$  plus longue que les deux autres, peut-être remplacée par les chaînes  $\alpha 5(\text{VI})$  ou  $\alpha 6(\text{VI})$ , mais également par la chaîne  $\alpha 4(\text{VI})$  chez la souris. Les chaînes  $\alpha$  de collagène VI sont formées d'un unique domaine COL flanqué de part et d'autre par des domaines von Willebrand de type A (vWA). Deux molécules de collagène VI s'agrègent tête-bêche pour former un dimère, les dimères formant par la suite des tétramères qui vont être sécrétés dans la MEC puis s'assembler à leur tour pour former un filament où chacune des extrémités de tétramère confère un aspect perlé observable en microscopie électronique à transmission (Figure 3.e) (Cescon et al. 2015).

La chaîne  $\alpha$  du collagène XXVIII présente une organisation similaire à celle du collagène VI, à savoir un domaine COL flanqué par des domaines vWA. Tout comme le collagène VI, son unique domaine COL possède de multiples petites interruptions. Toutefois, il ne semble former aucune structure en filaments perlés contrairement au collagène VI (Veit et al. 2006; Gebauer et al. 2016).

Le collagène VII est présent dans la membrane basale de l'épiderme où il va être un composant principal des filaments d'ancrage (Figure 3.f). Le collagène VII est sécrété sous la forme d'un homotrimère  $[\alpha 1(\text{VII})]_3$ . Le domaine COL de la chaîne  $\alpha$  du collagène VII est longue de plus de 1500 résidus et contient, à l'inverse des collagènes fibrillaires, 19 imperfections dans l'enchaînement des répétitions du triplet (Gly-X-Y) dues à des insertions-délétions d'acides aminés. Le domaine COL est flanqué par une extrémité N-terminale modulaire composée de 9 domaines Fibronectine de type-III like (FNIII) et un domaine vWA, et d'une extrémité C-terminale plus courte. Après sécrétion, l'extrémité C-terminale est clivée et deux homotrimères  $[\alpha 1(\text{VII})]_3$  vont s'associer de manière anti-parallèle pour former un dimère. Plusieurs dimères vont

ensuite s'associer de manière latérale pour former les fibres d'ancrage qui entourent les fibres de collagène du derme et s'insèrent dans la membrane basale par ses 2 extrémités en trident, formant une boucle qui est reconnaissable en microscopie électronique à transmission (Chung & Uitto 2010).

Le collagène XXVI est, quant à lui, le plus petit des collagènes constitué de seulement 438 acides aminés. Très peu d'informations sont actuellement disponibles sur sa structure et son organisation. Il est retrouvé dans le testicule et les ovaires des souris nouveau-nés, sous la forme d'un homotrimère contenant deux domaines COL (Sato et al. 2002).

#### I.1.1.2. Fonctions et pathologies associées

Les collagènes sont les principaux constituants de la MEC. Ce sont des protéines ubiquitaires qui vont jouer un rôle structural essentiel chez les organismes pluricellulaires. Ce sont principalement les collagènes fibrillaires qui vont porter cette fonction structurale majeure dans la définition de l'architecture et de la forme des tissus. Ils vont conférer les propriétés biomécaniques telles que l'élasticité et la résistance aux tractions dans différents tissus des vertébrés tel que le tendon, le cartilage, l'os et la peau (Ricard-Blum 2011). D'autres familles de collagène vont également avoir un rôle structural important. Ainsi le collagène VII est le composant principal des fibres d'ancrage qui stabilisent la liaison derme-épiderme (Chung & Uitto 2010), le collagène XXII joue un rôle important dans la stabilisation de la jonction myotendineuse dans le muscle squelettique (Charvet et al. 2013) et le collagène XVII, collagène membranaire, est un composant majeur des hémidesmosomes reliant la couche basale de l'épiderme à la membrane basale sous-jacente au niveau de la jonction dermo-épidermique (Has & Kern 2010).

Au-delà d'un rôle structural, les collagènes interviennent dans plusieurs voies de signalisation, régulant ainsi plusieurs processus biologiques. Les collagènes interagissent avec les cellules via leurs récepteurs parmi lesquels les intégrines, les syndécans et les récepteurs à domaine discoïdine 1 et 2 (DDR1 et DDR2). Les collagènes vont, via ces interactions, réguler l'adhérence, la prolifération, la migration, la différenciation, la mort et la survie cellulaire (Mohan et al. 2001; Humphries et al. 2006; Harburger & Calderwood 2009). Les collagènes ont la capacité d'interagir avec les facteurs de croissance et/ou leurs récepteurs pour réguler les voies de signalisation

associées. Par exemple, le collagène IV, présent dans la membrane basale, interagit avec DPP (Decapentaplegic), l'homologue chez les drosophiles de la BMP (Bone Morphogenic Protein) et va moduler sa voie de signalisation. Ainsi, au cours du développement embryonnaire, il va permettre réguler positivement DPP en facilitant son interaction avec son récepteur. Dans la chambre ovarienne, il permet de restreindre le domaine d'action du DPP à son lieu d'expression (Wang et al. 2008).

La diversité de fonction des collagènes est accrue par le fait que certains d'entre eux, vont libérer, par activité enzymatique, des fragments bioactifs qui vont avoir une activité biologique propre et distincte de la protéine d'origine. Ces fragments bioactifs libérés vont former la famille des matricryptines (Ricard-Blum 2011). La plupart des matricryptines d'origine collagénique sont issues du clivage enzymatique des membres de la famille de multiplexines (COLXV et COLXVIII), et de ceux associés à la membrane basale (COLIV, COLVIII et COXIX). Les fragments dérivés, la restine (collagène XV) et l'endostatine (collagène XVIII), évoqués plus haut, ou encore l'arrestène (chaîne  $\alpha 1(IV)$ ), la canstatine (chaîne  $\alpha 2(IV)$ ), la tumstatine (chaîne  $\alpha 3(IV)$ ) et la vastatine (collagène VIII) présentent des propriétés anti-angiogéniques et/ou anti-tumorales (Ricard-Blum & Ballut 2011).

Le grand nombre de pathologies associées à une altération de la synthèse et/ou de l'organisation des collagènes dans la MEC traduit leur importance dans la morphogénèse et l'homéostasie tissulaire. On retrouve parmi ces pathologies, un grand nombre de syndromes héréditaires associés à des mutations affectant les gènes codant pour des chaînes  $\alpha$  de collagène (Tableau 2). On peut citer parmi ceux-ci l'ostéogénèse imparfaite (OI), une maladie se caractérisant principalement par une fragilité osseuse et induite par des mutations sur les gènes codants pour les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du collagène I ; les syndromes d'Ehlers-Danlos (EDS), qui forment un groupe hétérogène de pathologies du tissu conjonctif qui, en fonction des types, correspondent à des altérations de la peau, des ligaments, des vaisseaux sanguins et des organes internes (Bateman et al. 2009). L'EDS est, dans la plupart des cas, associé à des mutations affectant les gènes codant pour les collagènes fibrillaires ou les enzymes impliquées dans leur maturation. La forme classique de l'EDS (EDSc), que nous évoquerons plus en détail dans un prochain chapitre, est associée aux mutations des gènes *COL5A1*, *COL5A2*, *COL1A1* et *TN-X*, codant respectivement pour les chaînes  $\alpha 1(V)$ ,  $\alpha 2(V)$  et  $\alpha 1(I)$  ainsi que pour la ténascine-X. L'EDS vasculaire est associé, quant à lui, à des mutations sur *COL3A1* (De Paepe & Malfait 2012).

	<b>Maladies génétiques (gènes)</b>	<b>Autres maladies associées</b>
<b>Collagène I</b>	Ostéogénèse imparfaite ( <i>COL1A1</i> ), Syndrome d'Ehlers-Danlos ( <i>COL1A2</i> )	Athérosclérose, Ostéo-arthrite, Pathologies fibrotiques
<b>Collagène II</b>	Dysplasies (spondylo-épiphysaire spondylo-métaphysaire et de Kniest) achondrogénèse, hypochondrogénèse ( <i>COL2A1</i> )	Ostéoarthrite
<b>Collagène III</b>	Syndrome d'Ehlers-Danlos ( <i>COL3A1</i> )	Athérosclérose
<b>Collagène IV</b>	Porencéphalie familiale, Syndrome AHNAC ( <i>COL4A1</i> ); Syndrome d'Alport ( <i>COL4A3</i> , <i>COL4A5</i> ); Hématurie familiale bénigne ( <i>COL4A3</i> ), Léiomyomatose ( <i>COL4A6</i> )	Néphropathies liées au diabète, fibroses tumorales, progression tumorale
<b>Collagène V</b>	Syndrome d'Ehlers-Danlos ( <i>COL5A1</i> / <i>COL5A2</i> )	Athérosclérose, syndrome de bronchiolite oblitérante, pathologies fibrotiques (athérosclérose, sclérodermie), carcinomes (colo-rectal, du sein)
<b>Collagène VI</b>	Myopathie de Bethlem et dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich ( <i>COL6A1</i> / <i>COL6A2</i> , <i>COL6A3</i> )	Athéroscléroses
<b>Collagène VII</b>	Epidermolyse bulleuse dystrophique ( <i>COL7A1</i> )	Epidermolyse bulleuse acquise
<b>Collagène VIII</b>	Dystrophie cornéale endothéliale ( <i>COL8A1</i> )	Athérosclérose, progression tumorale
<b>Collagène IX</b>	Dysplasie épiphysaire multiple ( <i>COL9A1</i> / <i>COL9A2</i> , <i>COL9A3</i> ); Syndrome de Stickler ( <i>COL9A3</i> )	
<b>Collagène X</b>	Chondrodysplasie métaphysaire de Schmid ( <i>COL10A1</i> )	Ostéochondrite disséquante
<b>Collagène XI</b>	Syndrome de Stickler ( <i>COL11A1</i> , <i>COL11A2</i> ) Syndrome de Marshall ( <i>COL11A1</i> / <i>COL11A2</i> ); Dysplasie oto-spondylo-méga- épiphysaire ( <i>COL11A2</i> ); surdité ( <i>COL11A2</i> )	Hernie discale
<b>Collagène XII</b>	Syndrome d'Ehlers-Danlos ( <i>COL12A1</i> )	Rétinopathie liée au diabète, kératocônes
<b>Collagène XIII</b>		Développement tumoral, ophtalmopathie dysthyroïdienne
<b>Collagène XIV</b>		Rétinopathie liée au diabète
<b>Collagène XV</b>		Tumorigénèse
<b>Collagène XVII</b>	Epidermolyse bulleuse jonctionnelle ( <i>COL17A1</i> )	Epidermolyse bulleuse jonctionnelle
<b>Collagène XVIII</b>	Syndrome de Knobloch ( <i>COL18A1</i> )	
<b>Collagène XIX</b>		Rhabdomyosarcomes, cancer du sein
<b>Collagène XXIII</b>		Cancer de la prostate
<b>Collagène XXV</b>	Maladie d'Alzheimer ( <i>COL25A1</i> ) Congenital cranial dysinnervation disorder ( <i>COL25A1</i> )	Maladie d'Alzheimer

**Tableau 2 :** Pathologies héréditaires associées aux mutations sur les gènes des collagènes et autres maladies associées.

Il existe également des pathologies héréditaires associées à des mutations sur des collagènes non fibrillaires, tel que la myopathie de Bethlem (BM) et la Dystrophie Congénitale Musculaire d'Ullrich (UCMD), toutes deux associées à des mutations sur les gènes codant pour le collagène VI (*COL6A1*, *COL6A2* et *COL6A3*) (Allamand et al. 2011). Des mutations récessives sur *COL18A1* codant pour la chaîne  $\alpha 1$  du collagène



XVIII entraînent le syndrome de Knobloch, une pathologie associée à une myopie sévère, un décollement de la rétine et un encéphalocèle occipital (Sertié et al. 2000).

En plus des pathologies associées à des mutations, plusieurs maladies auto-immunes ont été caractérisées. Les deux exemples les plus étudiés concernent deux collagènes de la membrane basale : le collagène VII et le collagène XVII. L'épidermolyse bulleuse est une maladie qui va affecter la peau, où la fragilité de la jonction dermo-épidermique (DEJ) entraîne la formation de bulles flasques et hémorragiques à la suite de chocs même légers. En plus de la forme congénitale de l'épidermolyse bulleuse (EBC), associée à des mutations de *COL7A1*, il existe une forme dite acquise (EBA) qui est due à la présence d'anticorps dirigés contre les protéines composant la DEJ parmi lesquelles le collagène VII (Chung & Uitto 2010). De même, des mutations sur le gène codant pour la chaîne  $\alpha 1(\text{XVII})$ , ou également la présence d'anticorps dirigés contre ce même collagène, entraînent une autre forme d'épidermolyse bulleuse dite jonctionnelle de type non-Herlitz (Has & Kern 2010).

Enfin, la fibrose qui est causée par le dépôt excessif de protéines de la MEC dont essentiellement des collagènes, touche différents organes tels que la peau, les reins, les poumons ou le foie. Au niveau de la peau par exemple, un dépôt excessif de collagène lors de la cicatrisation est responsable de la formation de chéloïdes. Dans la plupart des cas, la fibrose est causée par une dérégulation des facteurs de croissance et cytokines contrôlant la biosynthèse des collagènes. Parmi ceux-ci le facteur de croissance transformant  $\beta$  (« Transforming Growth factor  $\beta$  », TGF- $\beta$ ) qui contrôle directement la transcription de gènes codant pour des collagènes et réprime l'expression des collagénases (Verrecchia & Mauviel 2007).

## I.1.2. Les protéoglycanes

### I.1.2.1. Définition et structure

Les protéoglycanes (PG) sont regroupés au sein d'une famille de molécules qui ont la caractéristique de présenter une chaîne glycosaminoglycane (GAG) fixée de manière covalente à une protéine cœur. Les chaînes GAG se fixent à la protéine cœur par l'intermédiaire d'une région « linker » composée du tétrasaccharide, acide glucuronique-galactose-galactose-xylose, lié de manière covalente à des résidus Sérine de la protéine cœur présents au sein d'une séquence consensus (Ser-Gly)<sub>n</sub> avec n>1 et Ser-Gly-X-Ser-Gly où X peut-être n'importe quel acide aminé à l'exception d'une proline.

Les PG sont classés en fonction de leur localisation, de la nature de la protéine cœur et du type des GAG fixés (Iozzo & Schaefer 2015). La nature de la protéine cœur permet de classer les PG extracellulaires en 3 catégories : les petits protéoglycanes riche en leucine (Small Leucine-Rich Proteoglycan, SLRP), les protéoglycanes modulaires et les protéoglycanes membranaires (Schaefer & Schaefer 2009) (Figure 4). Il existe un PG qui ne rentre dans aucune de ces catégories : la serglycine qui est, à ce jour, l'unique PG intracellulaire que l'on retrouve dans le cytoplasme des cellules endothéliales et de la lignée hématopoïétique. Cette classification n'empêche pas l'existence de chevauchements. Ainsi la nyctolapine, un PG classé dans les SLRP est également ancrée à la surface des cellules bipolaires de la rétine, faisant de lui un PG membranaire (Pearing et al. 2011).

Le GAG est une chaîne linéaire polysaccharidique formée par la répétition d'unités disaccharidiques. Celles-ci sont issues de l'association d'un osamine acétylé, à savoir le N-acétylglucosamine ou le N-acétylgalactosamine, avec un acide uronique, l'acide D-glucuronique ou L-iduronique. Les GAG peuvent être sulfatés ou non, ce qui va permettre de les distinguer en deux catégories : Les GAG sulfatés à savoir les Chondroïtine Sulfate (CS), Héparane Sulfate (HS), Kératane Sulfate (KS), Dermatan Sulfate (DS) et l'Héparine ; et GAG non sulfatés comme l'acide Hyaluronique (AH) (Prydz & Dalen 2000).

Les SLRP sont caractérisées par une protéine cœur relativement petite, entre 36 et 42 kDa. Leurs protéines cœur sont composées d'une région N-terminale riche en résidus cystéine et la présence d'un domaine Leucine-rich region (LRR), essentiel pour les

interactions protéine/protéine, qui sous-tendent les propriétés biologiques des SLRP (Schaefer & Iozzo 2008) (Figure 4).

Les PG modulaires forment une famille variée et très hétérogène de PG qui a en commun de pouvoir s'agrèger et former des modules multiprotéiques. On distingue pour les PG modulaires : Les hyalectanes qui regroupe les PG dont l'assemblage dépend de l'interaction avec l'acide hyaluronique et la lectine ; et les non-hyalectanes dont l'assemblage supramoléculaire est indépendant de l'acide hyaluronique (Iozzo & Schaefer 2015) (Figure 4).

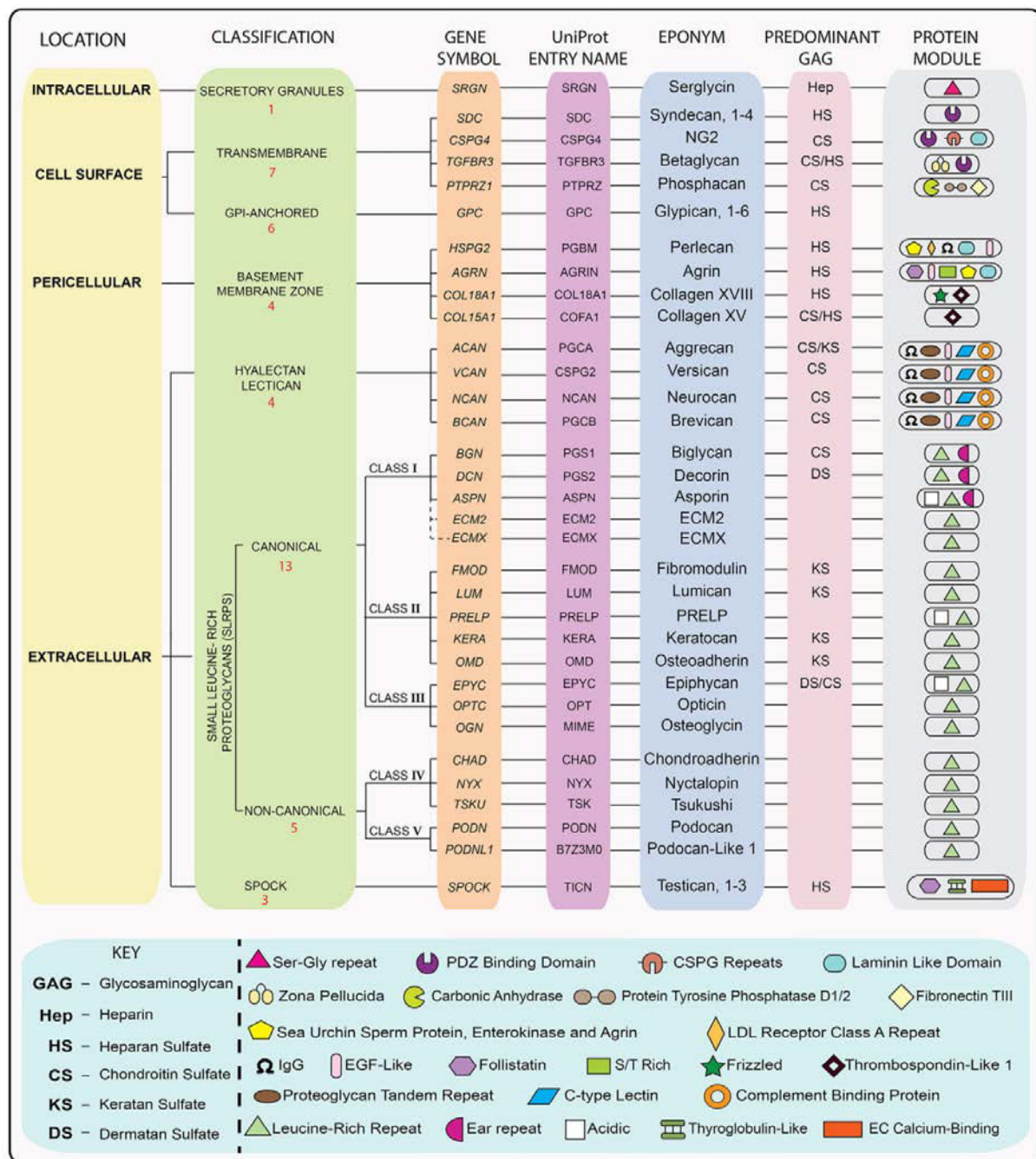


Figure 4 : Classification des protéoglycans (Iozzo & Schaefer 2015).

Les hyalectanes ont une structure commune pouvant être décomposée en 3 domaines. Un domaine central sur lequel va se fixer la majorité des GAG, la longueur de ce domaine central déterminera le nombre de GAG fixés. Ce domaine central est flanqué par deux domaines globulaires, le domaine N-terminal qui se lie à l'acide hyaluronique et un domaine C-terminal qui interagit avec les lectines.

Dans la famille des non-hyalectanes, sont retrouvées 2 molécules hybrides collagène/PG particulières, les collagènes XV et XVIII, membre de la sous-famille des collagènes : les multiplexines que nous avons déjà évoqué au point I.1.1.1. Le collagène XVIII contient 11 domaines NC parmi lesquels 3, le NC11, le NC9 et le NC8, possèdent des sites (Ser-Gly)<sub>n</sub> sur lesquels se fixent des chaînes HS et CS (Dong et al. 2003). Le collagène XV, quant à lui, a la particularité de porter, en fonction de sa localisation tissulaire, des chaînes HS et/ou CS. Ces chaînes GAG vont se fixer principalement au niveau du domaine NC situé en N-terminal mais aussi dans les domaine NC intercalés entre les multiples domaines COL de la protéine (Myers et al. 2007).

Enfin, les 13 PG membranaires sont eux-mêmes subdivisés en 2 groupes : les PG dont la protéine cœur possède un domaine transmembranaire (Syndecan 1-4, nerve/glia antigen 2(NG2), Betaglycan et Phosphacan) et les PG liés à la membrane via une ancre-GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Glypican 1-6) (Iozzo & Schaefer 2015). Les premiers, sont des protéines transmembranaires de type I, ne possédant un seul segment transmembranaire qui sépare le domaine cytosolique de l'ectodomaine extracellulaire. Les sites de fixation des GAG se situent dans l'ectodomaine sur lequel se lient des CS (Phosphacan, NG2) ou des HS et des CS (syndecans, betaglycan) (Iozzo & Schaefer 2015).

#### I.1.2.2. Fonctions et pathologies associées

Les PG sont exprimés de manière ubiquitaire dans les organismes pluricellulaires, dont ils sont des composants majeurs des matrices interstitielles et des membranes basales. Les PGs peuvent avoir des fonctions biologiques communes liées notamment aux propriétés physico-chimiques des GAG qui font des PG des molécules très hydrophiles ayant la capacité de former des hydrogels. De par ces propriétés, les PG vont réguler : (i) l'hydratation des tissus, (ii) la résistance des tissus aux forces de

compression, et (iii) la bio-disponibilité des facteurs hydrosolubles et/ou de leurs récepteurs (Frantz et al. 2010).

Les PG sont impliqués dans plusieurs processus biologiques. Les SLRP et certains hyalectanes interagissent avec les collagènes fibrillaires et leurs récepteurs membranaires (intégrines, TLR2) pour réguler la fibrillogénèse d'une part et l'interaction cellules/MEC d'autre part, régulant ainsi la prolifération, l'adhérence et la migration cellulaire (Iozzo & Schaefer 2015; Itano 2008). Les PGs ont également un rôle dans la réponse immunitaire soit en se liant directement à leur récepteurs comme le biglycan, un SLRP qui va induire une réponse pro-inflammatoire via les récepteurs membranaires TLR2/TLR4 (Schaefer et al. 2005) soit en tant que co-récepteur (Park et al. 2000).

Les mutations affectant les gènes codant pour les PG sont essentiellement responsables de pathologies oculaires. Ainsi des mutations perte de fonction sur plusieurs SLRP (Luminican, fibromoduline, PRELP, Opticine) vont causer des myopies (Schaefer & Schaefer 2009), une mutation sur la Décorine (SLRP) est la source d'un cas de dystrophie congénitale de la cornée (Bredrup et al. 2005) et le syndrome de Knobloch, qui se caractérise par un détachement de la rétine et une atrophie crânienne, est associé à des mutations sur *COL18A1*, gène codant COLXVIII (Sertié et al. 2000). Par ailleurs, une mutation sur le gène *ACAN* codant l'aggrécane (un hyalectane), composant essentiel du cartilage, a été identifiée chez plusieurs patients d'une même famille souffrant de dysplasie spondyloépiphyse, un type de chondrodysplasie (Gleghorn et al. 2005).

Les PGs vont également être impliqués dans le développement tumoral et avoir leur expression modulée au cours de la tumorigénèse. C'est le cas de la décorine, dont l'expression est marqueur de pronostic. Elle a notamment une fonction anti-tumorale en se liant à l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) entraînant sa dimérisation et son internalisation (Zhu et al. 2005). Il a été montré *in vivo*, que la décorine, via son interaction avec l'EGFR, inhibait la progression tumorale et induisait l'apoptose dans le cas d'un carcinome à cellule squameuse (Seidler et al. 2006).

Le syndecan-1 a vu son expression dérégulée dans nombres de cancer. Une diminution de son expression est associée à l'adhésion cellulaire et la migration de cellules MDA-MB-231 issues de cancers du sein. Il est également négativement régulé dans le carcinome à cellules squameuses et cela va avoir pour conséquence d'accroître les capacités invasives du cancer (Cheng et al. 2016).

### I.1.3. Autres glycoprotéines de la MEC

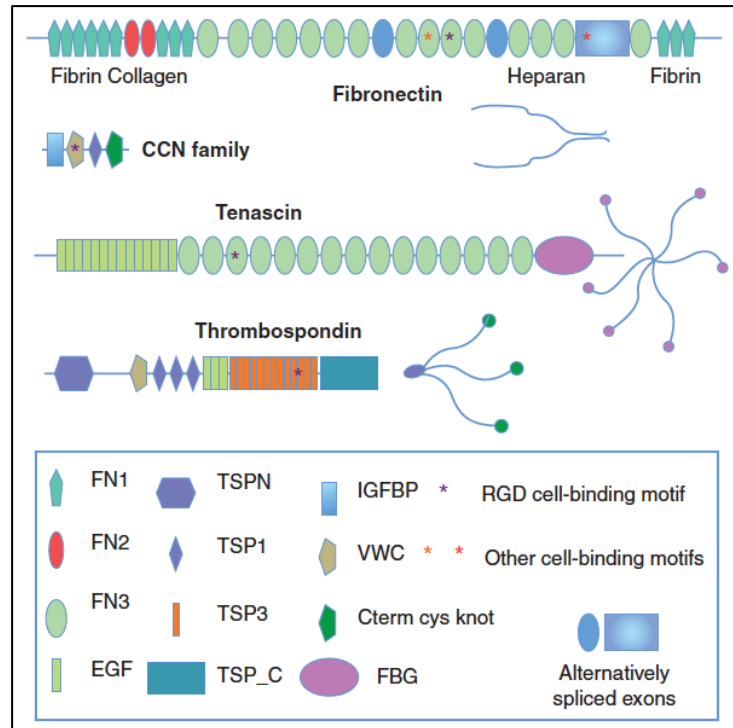
#### I.1.3.1. Définition

Les glycoprotéines regroupent l'ensemble des protéines de la MEC, qui comprend les protéines adhésives et les protéines élastiques, à l'exclusion des collagènes et des protéoglycanes qui sont, d'un point de vue biochimique également des glycoprotéines mais qui sont, comme nous l'avons vu, classés à part.

Le matrisome des mammifères, qui regroupe l'ensemble des protéines qui contribuent à la formation de la MEC, est formé par plus de 200 protéines différentes qui vont avoir des rôles variés dans l'assemblage des molécules de la MEC, l'adhésion cellulaire, les voies de signalisation notamment dans leur capacité à lier les facteurs de croissance et à agir comme un réservoir de stockage et de libération de molécules bioactives (Hynes & Naba 2012). Certaines glycoprotéines ont été particulièrement étudiées : c'est le cas des laminines, protéines essentielles à la formation des membranes basales (Hohenester & Yurchenco 2013), de l'élastine, composant des fibres élastiques que l'on retrouve notamment dans le derme (Wise et al. 2014), la fibronectine ou encore les ténascines (Halper & Kjaer 2014).

Les glycoprotéines sont, pour la plupart, des protéines modulaires composées de multiples domaines répétés, conservés au cours de l'évolution. Par exemple le domaine FNIII est présent à la fois dans la fibronectine et dans les ténascines qui possèdent également des domaines EGFL tout comme la thrombospondine (Figure 5). Toutefois, nous ne disposons pas de beaucoup d'information sur bon nombre des 200 glycoprotéines identifiés à ce jour, parmi lesquelles, certaines auraient des fonctions importantes car leurs dérégulations sont observées dans de nombreuses pathologies (Bateman et al. 2009; Hynes & Naba 2012).

On retrouve parmi les glycoprotéines, des protéines à l'expression ubiquitaire, telle que la fibronectine, exprimée dans presque tous les tissus mais également dans le plasma sanguin, ou les laminines composants majeurs de toutes les membranes basales. À l'inverse, d'autres glycoprotéines sont tissu-spécifiques comme par exemple les nétrines et l'agrine localisées dans le système nerveux (Barros et al. 2011) ou le facteur de Von Willebrand et la vitronectine qui sont spécifiques des protéines du système hémostatique (Bergmeier and Hynes, 2011).



**Figure 5 :** Exemples de structure des glycoprotéines de la MEC : Représentation schématique des molécules de fibronectine, ténascine et thrombospondine (Hynes & Naba 2012).

Dans ce chapitre, j'ai choisi d'évoquer plus en détails les ténascines dont un des membres, la ténascine-X, est mutée dans des cas d'EDS de type classique/hypermobile (Valcourt et al. 2015).

### I.1.3.2. Les Ténascines

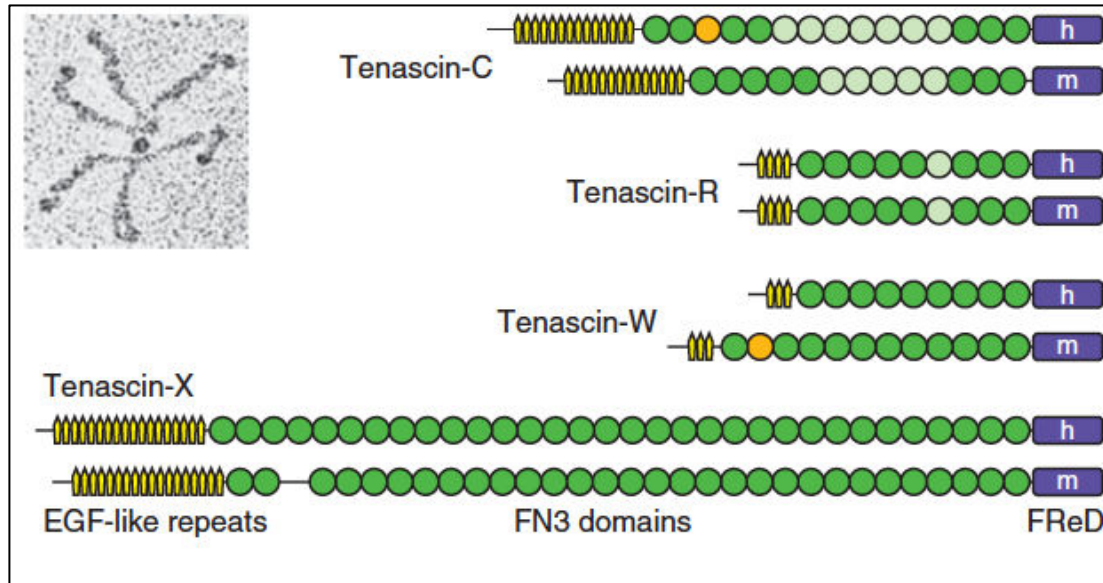
Les ténascines sont des glycoprotéines modulaires composées d'un domaine N-terminal d'oligomérisation appelé domaine « Tenascin Assembly » (TA), suivi successivement d'une répétition de domaines « Epidermal Growth factor-like » (EGFL), de plusieurs domaines FN de type III (FNIII) et d'un domaine C-terminal globulaire « fibrinogen-like » (Figure 6) (Jones & Jones 2000). La ténascine-C (TN-C) fût la première protéine de cette famille à être identifiée, et ce, de manière indépendante par différentes équipes travaillant sur la biologie cellulaire, le développement ou la tumorigénèse. En fonction du contexte de l'étude, la TN-C s'est ainsi appelée « Glial/Mesenchymal Extracellular Matrix protein » (GMEM), « myotendinous antigen » ou encore cytotactine d'où vient le « C » de ténascine-C (Jones & Jones 2000; Bourdon et al. 1983; Chiquet & Fambrough 1984; Grumet et al.

1985). Par la suite, 3 autres protéines chez les mammifères, TN-R, TN-W, TN-X, ont été classées dans la famille des ténascines car elles partagent le même enchaînement de domaines et la même structure que la TN-C (Chiquet-Ehrismann & Tucker 2011). Chaque ténascine est codée par un gène unique dont l'ARNm peut subir un épissage alternatif (*TN-C*, *TN-X* et *TN-R*) ou non (*TN-W*). Les ténascines sont sécrétées dans la matrice extracellulaire où elles vont s'assembler pour former un trimère. Cette trimérisation est rendue possible grâce au domaine TA dont la structure en hélice  $\alpha$ , formée par une répétition d'heptades de résidus hydrophobes (3-4 pour la TN-C), va servir de base structurale à la trimérisation. Les répétitions d'heptades sont flanquées par 7 résidus cystéines formant des ponts disulfures qui vont permettre la stabilisation du trimère.

Deux trimères de TN-C vont par la suite s'assembler pour former une structure symétrique à 6 branches, à l'origine du nom donné initialement donné à la TN-C, « hexabrachion », observable en microscopie électronique par ombrage tournant (Figure 6). La stabilisation de cet hexamère se fait grâce à la formation d'un pont disulfure, dans le domaine TA de la TN-C au niveau du résidu cystéine en position 64 (Luczak et al. 1998). En dehors de la TN-C, la TN-W est le seul membre de la famille formant des hexamères (Scherberich et al. 2004).

La partie centrale du trimère (ou de l'hexabrachion) est composée des domaines TA, les branches sont composées d'une partie fine et rigide correspondant à l'enchaînement de domaines EGFL et d'une partie plus épaisse et flexible correspondant à la succession de domaines FNIII (Jones & Jones 2000) (Figure 6). Il existe plusieurs variants d'épissage pour les TN-C, TN-R et TN-X principalement au niveau des exons codant pour les domaines FNIII. La présence et la fréquence des différentes isoformes sont régulées au cours du développement. Par exemple, 27 isoformes de la TN-C résultant de l'épissage alternatif de 9 domaines FNIII sont exprimés au cours du développement du cerveau chez la souris (Jones & Jones 2000).





**Figure 6** : Structure des ténascines chez les vertébrés. **En haut à gauche**, cliché d'un hémère de TN-C observé par microscopie en ombrage tournant. Représentation schématique des TN-C, TN-R, TN-W et TN-X humaines et souris signalées par un h et un m au niveau du domaine C-terminal globulaire « fibrinogen-like » (**rectangle violet**). Domaine TA (**barre noire en N-terminal**), domaines EPGL (**pentagone jaune**), domaines FNIII conservés (**rond vert foncé**), soumis à épissage alternatif (**rond vert clair**), contenant une séquence RGD (**rond orange**) (Chiquet-Ehrismann & Tucker 2011).

La TN-X et la TN-C sont deux protéines ubiquitaires qui présentent, dans la plupart des cas, un profil d'expression opposé. La TN-C est présente dans les tissus nerveux tels que la moëlle épinière et le télencéphale alors que la TN-X n'est que faiblement exprimée dans le système nerveux central (Geffrotin et al. 1995). Dans la peau, la TN-X est détectée en abondance dans le derme, son signal disparaît dans l'épiderme quand la TN-C est, elle, détectée en abondance à proximité de l'épiderme et que son signal décroît dans le derme (Matsumoto et al. 1994). Des études sur la cicatrisation cutanée suggèrent qu'elles auraient des fonctions opposées, durant la cicatrisation, la TN-C étant fortement exprimée au cours premiers jours de la cicatrisation où elle se localise au niveau des kératinocytes en cours de migration, suggérant un rôle dans la migration et la prolifération de ces cellules (Mackie et al. 1988). La ténascine X est, elle, exprimée à partir du 7<sup>ème</sup> jour de la cicatrisation chez le rat où elle va limiter la migration des fibroblastes et des kératinocytes et régulerait la formation de la MEC du tissu cicatriciel (Egging et al. 2007).

La TN-W et la TN-R ont un profil d'expression beaucoup plus restreint et se retrouvent partiellement co-localisées avec la TN-C au cours du développement. Ainsi, la TN-R est

produite par les oligodendrocytes durant la myélinisation au cours du développement tardif du système nerveux où sa localisation chevauche partiellement celle de la TN-C (Jones & Jones 2000). De même, la TN-W, tout comme la TN-C, est exprimée, au cours du développement du poisson zèbre, par les cellules migratoires issues du sclérotome et de la crête neurale à 24-25 heures post-fertilisation, puis faiblement exprimée dans les cellules du myosepte et plus fortement dans les cellules non neuronales du ganglion spinal chez le poisson zèbre juvénile (Weber et al. 1998). Par ailleurs, la TN-W est également exprimée dans les tissus adultes au niveau des tubules rénaux, de la valve aortique, du limbe cornéen et du périoste.

<b>Ténascines</b>	<b>Sites d'expression</b>	<b>Processus biologiques et pathologies associées</b>
<b>Ténascine-C</b>	- Embryon : systèmes nerveux, squelettique et vasculaire durant la morphogénèse - Adulte : tissu conjonctif dense, muscle lisse, niches de cellules souches nerveuses et moëlle osseuse	Asthme, fibroses, Régénération nerveuse, infection et inflammation, cancer (stroma tumoral, angiogénèse tumorale, invasion tumorale et métastase)
<b>Ténascine-R</b>	Système nerveux central et périphérique	
<b>Ténascine-W</b>	Os, rein, muscles lisses	Stroma tumoral, Angiogenèse tumorale
<b>Ténascine-X</b>	Épimysium, muscles lisses et tissu conjonctif lâche	Syndrome d'Ehlers-Danlos, Prolapsus rectal et utérine

**Tableau 3 :** Profil d'expression, fonctions et pathologies associées des 4 ténascines des vertébrés. Adapté de (Chiquet-Ehrismann & Tucker 2011).

La fonction exercée par les TN dans les différents tissus est fortement liée à leur capacité à interagir avec :

- Les récepteurs cellulaires parmi lesquels on retrouve les intégrines, les protéines d'adhésion cellulaire (CAM) de la famille des immunoglobulines et l'annexine II.
- Les protéines de la MEC parmi lesquelles on retrouve des collagènes (I, V, XII, XIV), des PG ( perlecan, syndecans, neurocan) ou encore la fibronectine (Jones & Jones 2000).

Ces interactions, qui se font au niveau des domaines FNIII et EGFL, sont fortement dépendantes de : (i) la conformation de la protéine ; (ii) l'isoforme présente et ; (iii) dans le cas de la TN-C, du domaine fibrinogen-like qui peut capter des ions Ca<sup>2+</sup> et ainsi moduler les propriété interactives des autres domaines de la TN-C (Jones & Jones 2000).

La TN-X présente une fonction structurale importante. En 2005, deux patients présentant un syndrome d'Ehlers-Danlos de type classique ont été décrits comme porteurs de mutations du gène codant pour la TN-X (Lindor & Bristow 2005). Les patients atteints de cette forme d'EDS présentent une hyper-mobilité articulaire et une fragilité cutanée associée à une hyper-extensibilité de la peau. Ce syndrome était alors presque exclusivement associé à des mutations sur les gènes *COL5A1* et *COL5A2* du collagène V (Beighton et al. 1998). Une étude ultrastructurale de la peau issue de ces patients, ainsi que des souris déficientes en TN-X, a montré qu'elle présentait, au niveau du derme, des fibres de collagène à l'aspect régulier mais anormalement espacées, comparé à l'organisation observée dans un tissu sain (Mao et al. 2002). Il a été montré, *in vitro*, que la TN-X interagit avec les collagènes fibrillaires I et V ainsi qu'avec le collagène XII, dont les mutations sont associées à différentes formes du syndrome d'Ehlers-Danlos (Nuytinck et al. 2000; Lethias et al. 2006; Zou et al. 2014). De plus, la TN-X régulerait le niveau d'expression de l'ARNm du collagène I, VI et XII. Cela a été démontré pour les fibroblastes issus de souris déficientes en TN-X qui présentent un niveau d'expression de ces collagènes très inférieur à celui observé chez les fibroblastes issus de souris sauvages. Inversement, la surexpression de la TN-X permet de restaurer le niveau d'expression (Minamitani, Ariga, et al. 2004).

Ces données suggèrent que la TN-X module les propriétés biomécaniques des tissus conjonctifs d'une part en régulant l'expression de protéines de la MEC et d'autre part en régulant l'organisation des fibres de collagène et l'assemblage de ces mêmes protéines de la MEC. Les symptômes observés chez les patients EDS peuvent également être liés aux propriétés intrinsèques de la TN-X. En effet les domaines FNIII, formé par deux feuillet  $\beta$ , sont des structures élastiques capables de s'allonger en réponse à un stress mécanique avant de reprendre leur conformation initiale pendant la phase de relâchement (Oberhauser et al. 1998).

La TN-C a été une des premières molécules de la MEC à être classée parmi les protéines anti-adhésives. En effet, il a été montré que les cellules n'adhéraient pas sur un substrat composé de TN-C. De plus, la TN-C limite également l'adhérence cellulaire sur une matrice de fibronectine via son domaine HepII (Chiquet-Ehrismann & Tucker 2011).

Enfin, la TN-C et la TN-W sont fortement exprimées par les fibroblastes dans le microenvironnement tumoral des cancers du colon et du sein, ou sont directement secrétées par les cellules tumorales dans le cas de mélanomes et glioblastomes. La

présence des deux TN est associée à des tumeurs agressives. La TN-W et la TN-C stimulent l'angiogénèse *in vivo* et la présence de TN-C serait associée au caractère invasif du glioblastome et du cancer du sein (Chiquet-Ehrismann & Tucker 2011).

## **I.2. Les collagènes fibrillaires**

### **I.2.1. Structure générale des collagènes fibrillaires**

La sous-famille des collagènes fibrillaires est formée par les collagènes I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII, qui ont la particularité de s'assembler en de larges structures supramoléculaires, appelées fibres. Observées en microscopie électronique à transmission, les fibres sont striées, d'une périodicité de 64-67 nm et d'un diamètre compris entre 15 et 500 nm (Kadler et al., 2007; Bruckner 2009). Le collagène XXVII, et très certainement le collagène XXIV, qui montre une forte homologie de structure avec le XXVII, représentent toutefois une exception car il forme des fibres non striées d'environ 10 nm de diamètre (Plumb et al. 2007). C'est également le cas du collagène V qui peut former des fibres homotypiques dont le diamètre est inférieur à 15-20 nm est aussi observé (Chanut-Delalande et al. 2004)

Les fibres de collagène sont le plus souvent formées par l'assemblage d'au moins deux collagènes différents, elles sont alors dites hétérotypiques. On distingue au sein des collagènes fibrillaires, les collagènes dit majeurs (Collagènes I, II et III) qui vont être quantitativement les principaux composants des fibres hétérotypiques, et les collagènes dit mineurs (Collagènes V, XI et XXIV) selon le même critère quantitatif.

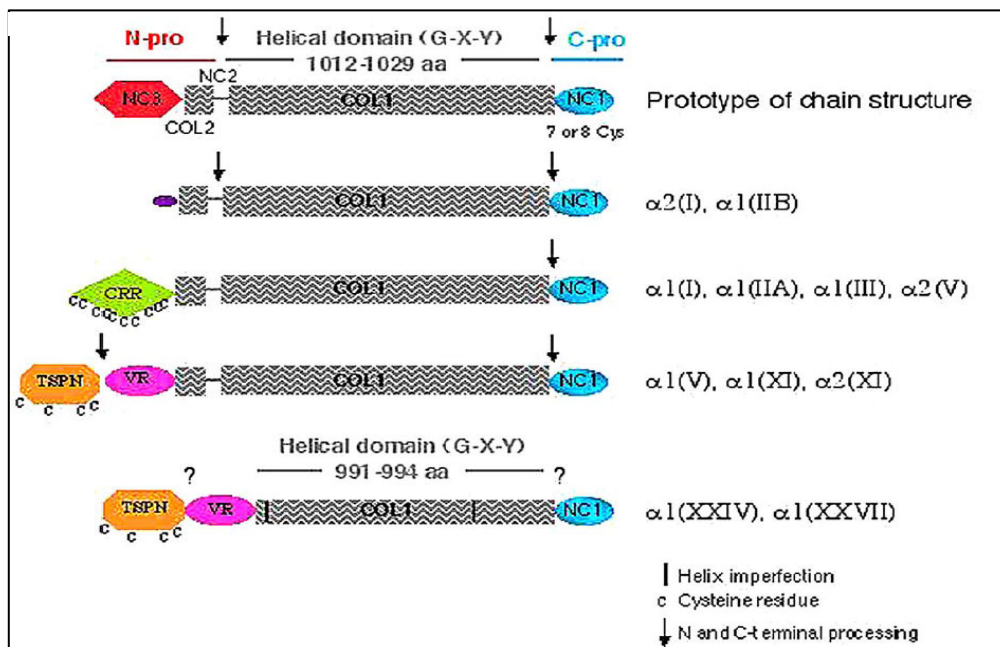
Les fibres de collagène sont présentes dans tous les tissus, où leur organisation et leur composition en collagène peuvent être différentes et ces fibres vont déterminer les propriétés biomécaniques et fonctionnelles des tissus dans lesquels elles sont exprimées.

Le collagène I est le composant majeur des fibres de la matrice extracellulaire de la plupart des tissus, à l'exception du cartilage où les fibres de collagène sont majoritairement composées de collagène II qui va également former des fibres dans la cornée, uniquement dans le stroma primaire de l'embryon de poulet et dans le corps vitré de l'œil. Le collagène III est aussi retrouvé dans les fibres de collagène présentes dans la paroi des gros vaisseaux comme l'aorte, et des organes creux où il est le plus souvent associé avec le collagène I. Les collagènes V et XI, sont des collagènes

quantitativement mineurs, qui forment des fibres en association avec les collagène I et III pour le collagène V, et le collagène II pour le collagène XI. Bien qu'étant faiblement représentés, les collagènes V et XI ont un rôle essentiel dans la nucléation et la régulation du diamètre des fibres (Kadler et al. 1996; Smith & Birk 2012).

Les gènes de ces collagènes codent pour des chaînes pro $\alpha$  dont la chaîne polypeptidique est composée d'un large domaine collagénique (COL1) flanqué de 2 domaines N- et C-terminaux globulaires (Figure 7).

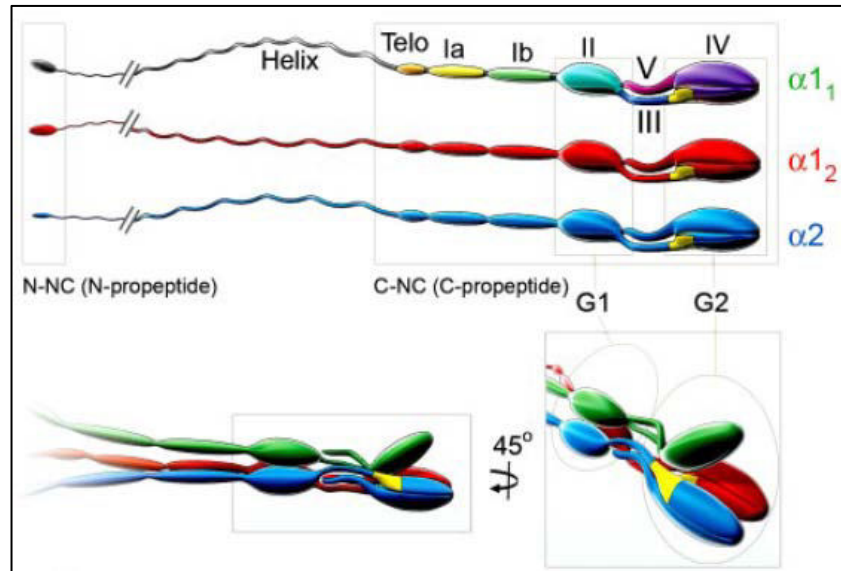
Le domaine COL1 est composé de plus de 1000 résidus dont la séquence se caractérise par l'enchaînement parfait de triplets (Gly-X-Y) sans interruption. Ce domaine COL1 est plus petit pour les collagènes XXIV et XXVII qui possèdent tous deux une interruption dans ce domaine (Figure 7).



**Figure 7 :** Structure des collagènes fibrillaires (Ricard-Blum & Ruggiero 2005).

Le domaine C-terminal, également appelé NC1 (domaine non-collagénique 1) contient les séquences essentielles à la trimérisation des collagènes. Il est subdivisé en 5 sous-domaines que sont le sous-domaine I, composé d'une partie Ia et une partie Ib contenant des résidus cystéine qui vont former des ponts disulfure importants pour la nucléation de la triple hélice et la formation d'hétérotrimère ou homotrimère (la présence de 8 cystéines permettent la formation d'un homotrimère alors que 7 cystéines favorisent la formation d'un hétérotrimère); et les sous-domaines globulaires

II et IV qui sont reliés par les sous-domaines III et V composés par 2 feuillets  $\beta$  antiparallèles les sous-domaine III et V (Figure 8) (Khoshnoodi et al. 2006).



**Figure 8** : Modélisation du domaine C-propeptide (NC1) des chaînes pro $\alpha$  de collagène I (Khoshnoodi et al. 2006).

Si l'extrémité C-terminale et le domaine COL1 sont relativement conservés entre les collagènes fibrillaires, le domaine N-terminal est, lui, plus hétérogène. Ce domaine est formé d'un domaine NC2 séparant le domaine COL1 d'un plus petit domaine collagénique COL2 et d'un domaine NC3 globulaire (Figure 7). Le domaine NC3 varie au sein des collagènes fibrillaires de par sa longueur, de 200 à plus de 500 acides aminés, et par les domaines qui le compose. Selon les chaînes pro $\alpha$ , sont retrouvés :

- Un domaine Cystein Rich Region (CRR) qui se caractérise par la présence de résidus cystéine qui vont avoir la capacité de former des ponts disulfure. Le domaine CRR est présent à l'extrémité N-terminale des chaînes pro $\alpha$ 1(I), pro $\alpha$ 1(II), pro $\alpha$ 1(III) et pro $\alpha$ 2(V) (Figure 7) (Bornstein 2002).
- Un domaine Thrombospondin N-terminal-like (TSPN) décrit, dans un premier temps, dans la partie N-terminale de la thrombospondine, une glycoprotéine de la MEC, qui est présent dans le domaine NC3 des chaînes pro $\alpha$ 1(V), pro $\alpha$  3(V), pro $\alpha$ 4(V), pro $\alpha$ 1(XI), pro $\alpha$ 2(XI), pro $\alpha$ 1(XXIV) et pro $\alpha$ 1(XXVII) (Figure 7) (Bornstein 2002).
- Une région variable à la suite du domaine TSPN (Figure 7).

La variabilité du domaine NC3 peut-être accrue par la possibilité pour certaines chaînes de subir un épissage alternatif comme c'est le cas pour les collagènes II, XI et XXIV (Eyre et al. 2002; Matsuo et al. 2006).

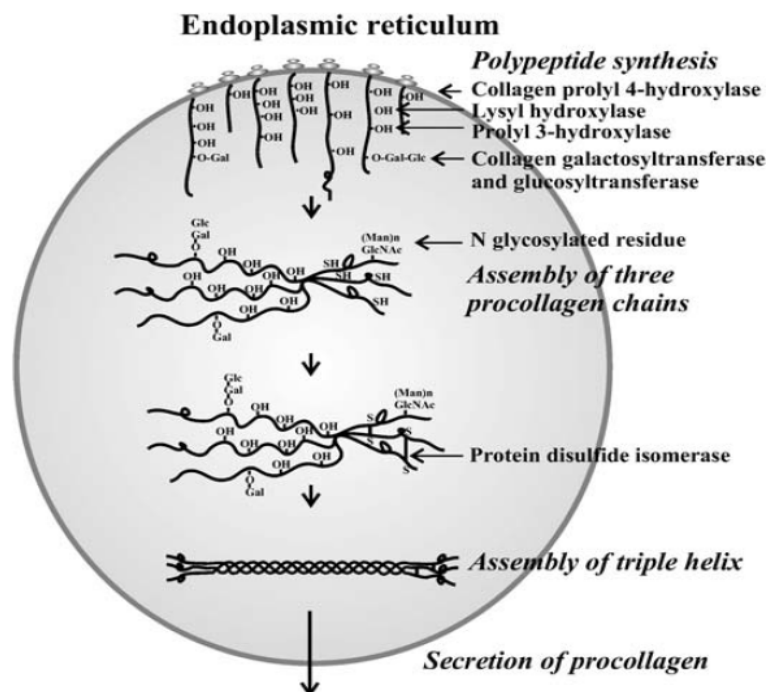
### I.2.2. Biosynthèse des procollagènes fibrillaires

Après transcription des gènes de collagène, les ribosomes présents à la surface du réticulum endoplasmique granuleux (REG) vont permettre une traduction/translocation de l'ARNm codant pour les chaînes  $\text{pro}\alpha$  de collagène, localisant ces dernières dans la lumière du REG. Les chaînes  $\text{pro}\alpha$  subissent alors des modifications post-traductionnelles (MPT) avant de trimériser pour former d'une molécule de procollagène (Figure 9). Ces MPT vont impliquer plusieurs protéines localisées dans le REG. Dans un premier temps et très vite après la traduction, BiP, une protéine chaperonne de la famille des HSP70, va se fixer au C-propeptide des chaînes  $\text{pro}\alpha$  et ainsi inhiber la trimérisation précoce. De même, HSP47, une protéine chaperonne spécifique des collagènes, va également se fixer aux chaînes  $\text{pro}\alpha$  non trimérisées afin de les protéger d'une éventuelle dégradation (Lamande & Bateman 1999).

La Protéine Disulfure Isomérase (PDI) va catalyser la formation de ponts disulfure intra-chaîne entre les résidus cystéine dans les N/C-propeptides. Au niveau du domaine collagénique, la peptidylproline cis-trans isomérase (PPI) va convertir les résidus proline d'une conformation cis vers une forme trans. Ces résidus proline sont, par la suite, hydroxylés par l'action de la prolyl-4-hydroxylase (P4H) et dans une moindre mesure par la prolyl-3-hydroxylase (Myllyharju & Kivirikko 2004) (Figure 9). L'acide ascorbique est un cofacteur important pour l'action de la P4H et l'hydroxylation des résidus proline qui est essentielle à la stabilité de la triple hélice. En absence d'hydroxylation, P4H reste liée aux procollagènes non conformés qui sont alors retenus dans la lumière du REG (Walmsley et al. 1999). Il a toutefois été montré, dans un système hétérologue, que l'absence d'hydroxylation des prolines n'empêchait pas la formation de la triple hélice et la sécrétion de la molécule mais affecte sa stabilité thermique (Perret et al. 2001).

Certains résidus lysine vont également être hydroxylés par les lysyl hydroxylases. Également, l'addition de galactose et de glucose sur une partie des résidus lysine et hydroxylysine va être catalysée par les galactosyl transférases et la

galactosylhydroxylysyl-glucosyl transférase (Figure 9). À l'issue des MPT du domaine collagénique, la trimérisation et la formation de la triple hélice est initiée par le C-propeptide. Une étude réalisée sur le C-propeptide des chaîne pro $\alpha$ 1(I), pro $\alpha$ 2(I) et pro $\alpha$ 1(III) a permis d'identifier une séquence putative de 15 résidus dans le C-propeptide qui va permettre la reconnaissance des chaînes à assembler et leur rapprochement (Lees 1997). Cette interaction entre les C-propeptides va être stabilisée par la formation des ponts disulfures inter-chaînes au niveau des domaines Ib du C-propeptide ce qui va initier la formation de la triple hélice à la manière d'une fermeture éclair (Figure 8) (Khoshnoodi et al. 2006). La formation des ponts disulfure inter-chaînes catalysée par la PDI, est importante mais pas nécessaire à la trimérisation des chaînes pro $\alpha$  qui peuvent trimériser spontanément *in vitro* en absence de PDI (Bulleid et al. 1996). La formation de la triple hélice du collagène se fait de l'extrémité C-terminale vers le N-propeptide. Au cours de la trimérisation, le domaine collagénique COL1 d'une chaîne pro $\alpha$ , caractérisé par une hélice poly-proline de type II, avec un pas de rotation à droite, va s'assembler en une super hélice de pas de rotation gauche avec les domaines COL1 de 2 autres chaînes pro $\alpha$ .



**Figure 9 :** Biosynthèse et modifications post-traductionnelles des collagènes fibrillaires (Myllyharju 2005).



La structure en triple hélice va être stabilisée par :

- La présence stricte de résidus glycine en 3<sup>ème</sup> position du triplet et située au centre de la triple hélice.
- Les résidus hydroxyproline qui interagissent avec des molécules d'eau et former des liaisons hydrogène intra-chaînes.
- Des liaisons électrostatiques impliquant les résidus hydroxylysine et aspartate en position latérale (Persikov et al. 2005; Fallas et al. 2009).

Tout au long du processus de trimérisation, la protéine chaperonne spécifique des collagènes, HSP47, d'abord fixée aux pro $\alpha$  monomériques, reste fixée aux trimères de collagène. Elle permettrait ainsi de stabiliser la triple hélice avant la formation des liaisons hydrogène et des liaisons électrostatiques (Lamande & Bateman 1999).

### I.2.3. Maturation des procollagènes fibrillaires et fibrillogénèse

Une fois le procollagène correctement conformé, il va être transporté vers l'appareil de Golgi. Ce transport se fait *via* des vésicules particulières appelées « Vesicular Tubular Clusters » (VTC), qui se forment par bourgeonnement à partir de la membrane du REG (Figure 10). Les VTC contenant le procollagène vont se déplacer le long des microtubules puis fusionner avec la face cis de l'appareil de Golgi. La formation des VTC, leur migration et la fusion avec l'appareil de Golgi est dépendante des complexes protéiques, COPI et COPII, qui seront localisés de manière transitoire à la surface des VTC (Bonfanti et al. 1998; Stephens & Pepperkok 2002). Plus spécifiquement, TANGO-1, une protéine localisée à la membrane du REG du côté trans, est essentielle aux transport des collagènes du REG vers l'appareil de Golgi. La mutation de TANGO-1 chez la souris, induit une désorganisation de la MEC qui se traduit notamment par un défaut de sécrétion des collagène I,II,III IV, VII et IX qui vont s'accumuler dans le REG (Wilson et al. 2011).

L'appareil de Golgi est formé de plusieurs dictyosomes, soit l'empilement de citernes aplaties reliées entre elles par un réseau de canalicules appelé réseau trans-golgien (TGN pour Trans Golgi Network). Le procollagène va migrer des citernes en partie cis vers la partie trans de l'appareil de Golgi via les TGN sans jamais quitter la lumière de l'appareil de golgi. Au cours de la migration, les molécules de procollagène vont s'agréger et former des amas de procollagènes entraînant une distorsion des citernes golgiennes (Leblond 1989). Les paquets de procollagènes vont se concentrer

notamment grâce à la diminution du volume des citernes associée à la libération des lipides membranaires lors de la formation des vésicules de sécrétion.

Arrivés à la face trans de l'appareil de Golgi, les amas de procollagène sont libérés via des vésicules de sécrétion appelées Golgi-to-PM Carriers (GPC) (Figure 12) (Canty et al. 2004).

Le procollagène situé dans le GPC doit subir une ultime étape qui consiste en un clivage des N- et C-propeptides. Cette étape essentielle va permettre d'obtenir, à partir d'une molécule de procollagène, un collagène mature, et diminuer de près 10000 fois la solubilité de la molécule permettant ainsi de diminuer la concentration de collagène requise pour l'assemblage des fibres (Banos et al. 2008).

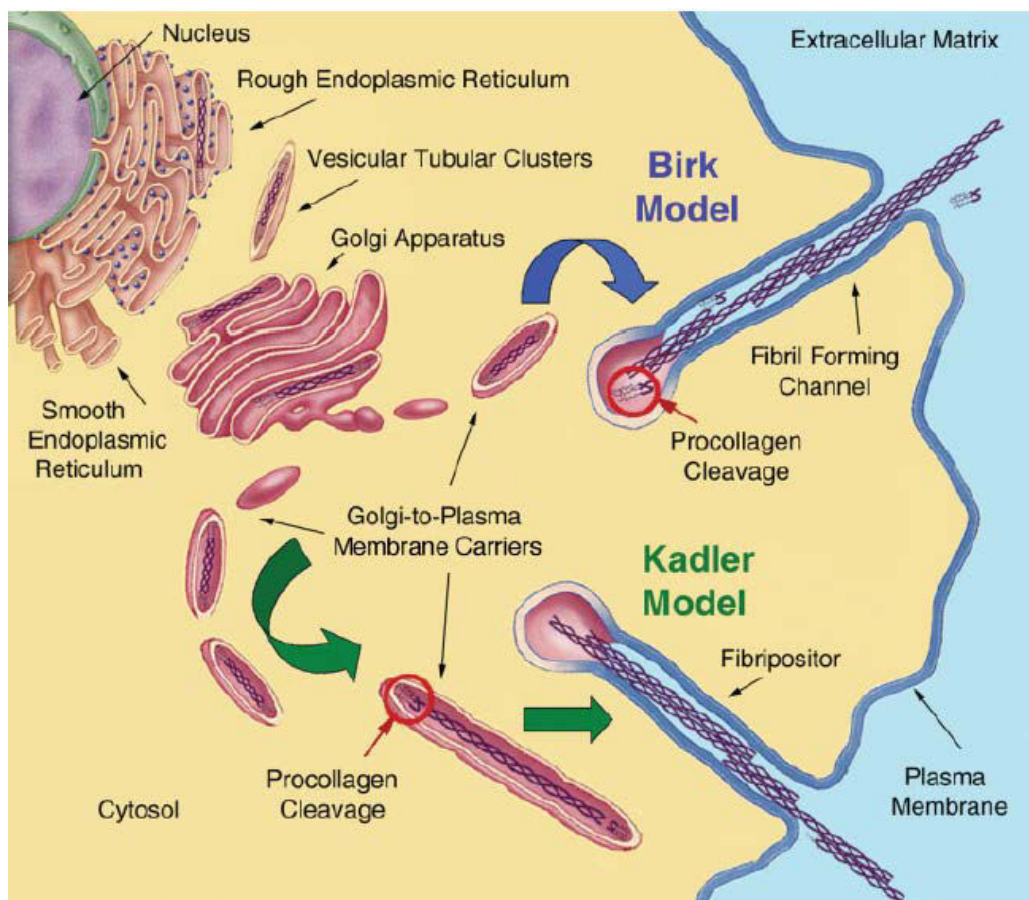
Le clivage du C-propeptide des procollagènes est effectué par des protéinases de la famille des tolloïdes à savoir la BMP-1 (Bone Morphogenetic Protein-1), la mTLD (mammalian ToLloid) et TLL-1 (ToLloid-Like-1) (Humphries et al. 2008). Le clivage du N-propeptide des procollagènes est effectué essentiellement par les membres de la famille ADAMTS (« A Disintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs ») que sont les ADAMTS-2, ADAMTS-3 et ADAMTS-14 (Colige et al. 2002). Le collagène V et le collagène XI montrent une maturation particulière (Medeck et al. 2003; Ricard-Blum & Ruggiero 2005) que l'on détaillera dans le chapitre suivant.

C'est à l'issue de cette ultime phase de maturation que la formation des fibres de collagène aura lieu. Le compartiment dans lequel se déroulent l'initiation et la formation des fibres de collagène est sujet à controverse selon Banos et al (2008). À l'heure actuelle 2 théories subsistent:

- Dans la première hypothèse, le clivage du procollagène et l'initiation de la formation des fibres de collagène se dérouleraient intracellulairement. À partir d'expériences de « pulse-chase » réalisées lors de la formation des tendons chez des embryons de poulet et de souris, Kadler et al. proposent une formation des fibres en deux étapes. Tout d'abord le clivage des extrémités N/C-propeptides au niveau des GPC entraînerait la nucléation des fibres de collagène à l'intérieur de ces compartiments. Ensuite, les GPC contenant les fibres de collagène fusionneraient (i) soit avec la membrane plasmique pour former un compartiment appelé « fibripositor » à partir duquel les fibres de collagène seraient libérées dans la MEC, (ii) soit avec des fibripositors déjà formés (Canty & Kadler 2005) (Figure 10). Deux points remettent en cause le modèle proposé : (1) les enzymes responsables du clivage des N/C propeptides ont été localisées dans la MEC et, (2) il y aurait une incompatibilité entre le pH à l'intérieur des GPC et celui

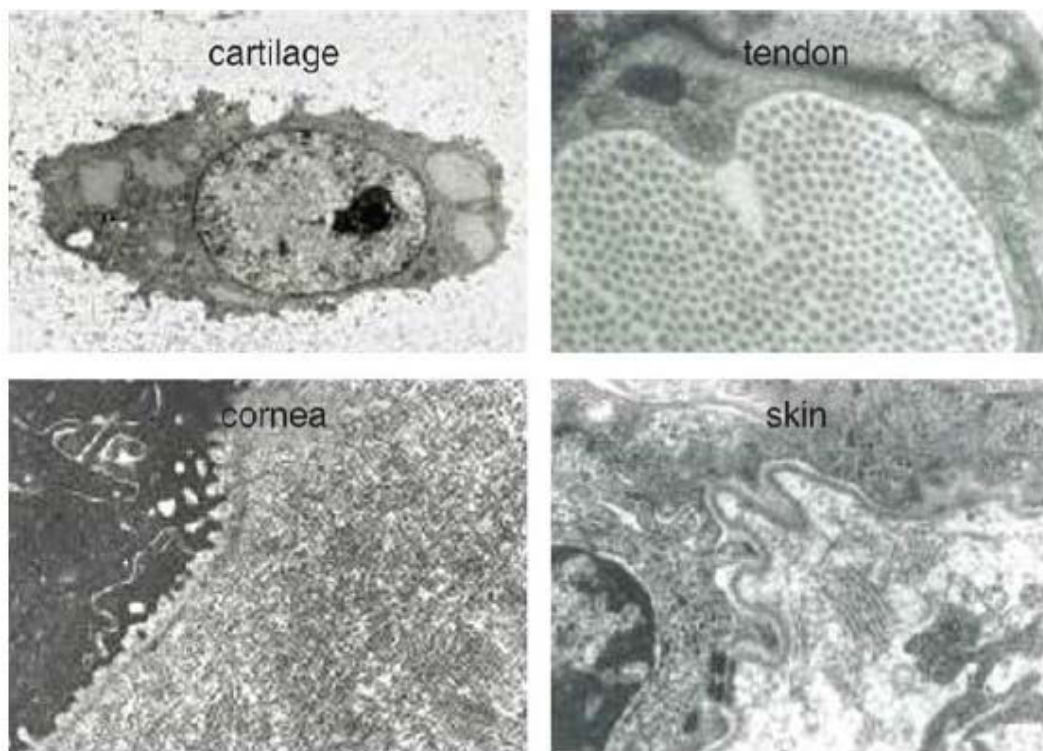
nécessaire à l'activité enzymatique des N/C-protéinases (Banos et al. 2008). Même si la présence extracellulaire des enzymes de maturation peut-être expliquée par leur libération des fibripositors en même temps que les fibres de collagène, la question sur la compatibilité du pH reste en suspens. Toutefois, des travaux réalisés sur les fibroblastes de tendon de souris, ont montré la présence de collagènes clivés et de fibres de collagène dans les compartiments intracellulaires (Humphries et al. 2008).

- La 2<sup>ème</sup> théorie est basée sur des travaux réalisés sur des fibroblastes de tendon et des tendons d'embryons de poulet. Le modèle suggère que la formation des fibres de collagène se ferait dans un compartiment extracellulaire situé à la surface des fibroblastes. L'initiation de l'assemblage des fibres de collagène se ferait dans des invaginations de la membrane des fibroblastes où une fibre unique de collagène se formerait par fusion des collagènes dont les N/C-propeptides ont été préalablement clivés (Birk & Zycband 1994). Dans ce modèle le clivage serait extracellulaire. Il est conforté par la présence dans l'environnement extracellulaire des enzymes de maturation (Hojima et al. 1985) (Figure 10).



**Figure 10** : Synthèse des collagène et fibrillogénèse (Banos et al. 2008).

L'échafaudage matriciel résultant de l'arrangement des fibres de collagène entre elles est tissu-spécifique. Il va dépendre d'une part de la nature des collagènes fibrillaires qui la compose mais également d'autres protéines de la MEC et des cellules environnantes (Ottani et al. 2002). Selon les tissus, le diamètre des fibres de collagène va ainsi varier de 15-20 nm dans la cornée à près de 500 nm dans le tendon. Egalement, les fibres de collagène s'organisent en des couches orthogonales successives dans la cornée, en de larges faisceaux parallèles dans le tendon, ou en de petite fibres de diamètre constant qui ne présentent aucune direction particulière dans le cartilage, ou sont de diamètre et d'orientation variable dans le derme (Ricard-Blum & Ruggiero 2005)(Figure 11). Cette organisation est dynamique et peut varier selon les forces mécaniques exercées sur le tissu, comme montré pour la peau de souris *ex-vivo*, par une approche multi-échelles où l'étirement exercé de façon uni-axiale conduit à un alignement des fibres de collagène dans le derme (Bancelin et al. 2015).



**Figure 11 :** Organisation des fibres de collagènes dans la MEC (Ricard-Blum & Ruggiero 2005).

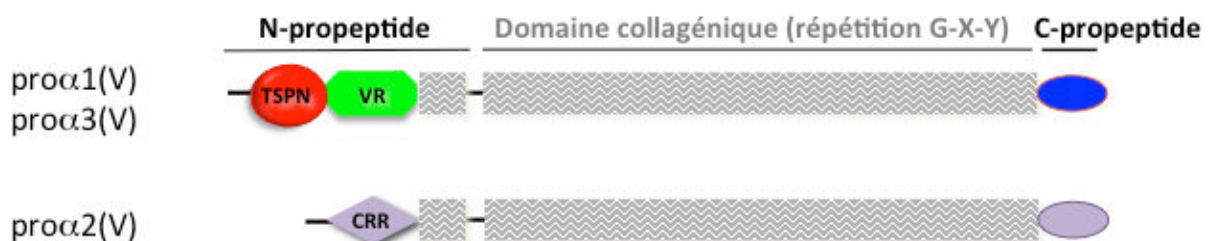
### I.3. Cas particulier du collagène V

#### I.3.1. Chaînes et isoformes

Le collagène V est présent dans la MEC de tissus tels que la peau, les os, la cornée ou les tendons où il est un composant des fibres hétérotypiques formées en association avec le collagène I et/ou le collagène III (Mak et al. 2016). Le collagène V est un collagène mineur qui représente de 1-3% des collagènes de la peau et des os et jusqu'à 25% des collagènes dans la cornée (Birk 2001a; Fichard et al. 1995).

Le collagène V est codé par 3 gènes *COL5A1*, *COL5A2*, *COL5A3* codant respectivement pour les chaînes  $\text{pro}\alpha 1(\text{V})$ ,  $\text{pro}\alpha 2(\text{V})$ ,  $\text{pro}\alpha 3(\text{V})$ . D'un point de vue évolutif, les 3 gènes présents chez l'homme et la plupart des mammifères, *COL5A1*, *COL5A2* et *COL5A3*, ont des origines phylogénétiques distinctes. À partir du gène ancestral commun des collagènes chez les métazoaires, *COL5A1* et *COL5A3* ont évolué pour former un clade différent de celui de *COL5A2* et cela se traduit notamment dans la structure du domaine NC3 des chaînes  $\alpha$  (Exposito et al. 2010).

Le domaine NC3 des chaînes  $\text{pro}\alpha 1$  et  $\text{pro}\alpha 3$  du collagène V, précédé par un peptide signal, est constitué d'un domaine TSPN et d'une région variable. Le domaine NC3 de la chaîne  $\text{pro}\alpha 2$ , plus court, est composé d'un domaine globulaire riche en résidus cystéines CRR (« Cystein Rich Region ») (Fichard et al. 1995) (Figure 12). À la suite du domaine NC3, on trouve un court domaine collagénique (COL2) dont l'enchaînement de triplet Gly-X-Y présente 2 interruptions faisant du domaine COL2 une succession de 3 petits domaines collagéniques, suivi d'un domaine NC2 le reliant au large domaine collagène COL1 (Fichard et al. 1995) (Figure 12).



**Figure 12** : Structure primaire des chaînes  $\text{pro}\alpha$  du collagène V (Ricard-Blum & Ruggiero 2005).

Les 3 chaînes du collagène V vont contribuer à la diversité moléculaire du collagène V qui peut être présent dans les tissus sous différentes isoformes dont la composition exacte n'est pas toujours connue :

- L'hétérotrimère  $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ , isoforme la plus fréquente du collagène V. Il est localisé de manière ubiquitaire dans les tissus où il s'associe avec le collagène I uniquement ou avec les collagènes I et III pour former des fibres hétérotypiques de collagène (Fichard et al. 1995).
- L'homotrimère  $[\alpha 1(V)]_3$  présent dans le derme (Bonod-Bidaud et al. 2012), le placenta et dans certains tissus embryonnaires. Il forme des filaments fins localisés à la surface des fibres hétérotypiques de collagène (Chanut-Delalande et al. 2001).
- L'hétérotrimère  $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$  qui, au cours du développement, est exprimé dans les ligaments, les nerfs périphériques et le muscle squelettique (Imamura et al. 2000). On le retrouve également dans le placenta (Niyibizi et al. 1984) et dans les îlots pancréatiques, le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique (Huang et al. 2011).
- La chaîne  $\alpha 3(V)$  a également été décrite associée avec la chaîne  $\alpha 1$  dans le système nerveux du rat où elle est synthétisée par les cellules de Schwann (Chernousov et al. 2000).

### I.3.2. La maturation particulière du collagène V

À l'instar de tous les collagènes fibrillaires, le collagène V est synthétisé dans le REG sous la forme d'un procollagène et subit une ultime phase de maturation avant le début de la fibrillogénèse. Toutefois, le collagène V, tout comme le collagène XI, va avoir une maturation particulière comparée à celle des autres collagènes fibrillaires dont le collagène I avec lequel il s'associe pour former des fibres.

Au niveau du C-propeptide, la chaîne  $\text{pro}\alpha 2(V)$  est clivée par la Bone Morphogenetic Protein-1 (BMP-1) comme c'est le cas pour les collagènes I/III/III. Toutefois, contrairement aux autres collagène fibrillaires, le C-propeptide de la chaîne  $\text{pro}\alpha 1(V)$  est clivé par une enzyme de la famille des furines (Unsöld et al. 2002). Néanmoins, la présence au niveau de l'extrémité C-terminale d'un site consensus de clivage par la BMP-1, situé en amont du site de clivage par la furine, a conduit à une étude du clivage du C-propeptide par la BMP-1 qui a montré que cette enzyme est capable de cliver le fragment du C-propeptide libéré après clivage par la furine mais également la chaîne

$\alpha 1(V)$  en l'absence de furine. Ainsi le C-propeptide peut également être clivé par la BMP-1 et ce clivage est indépendant de la conformation en triple hélice de la chaîne  $\alpha 1(V)$  (Kessler et al. 2001).

Des études portant sur la maturation de l'hétérotrimère  $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$  ont montré que le NC3 de la chaîne  $\text{pro}\alpha 2(V)$  n'était pas clivé contrairement aux chaînes des collagènes I et III, dont il partage pourtant l'organisation structurale, et qui sont clivées par les N-protéinases de la famille des ADAMTS (Moradi-Ameli et al. 1994; Canty et al. 2004).

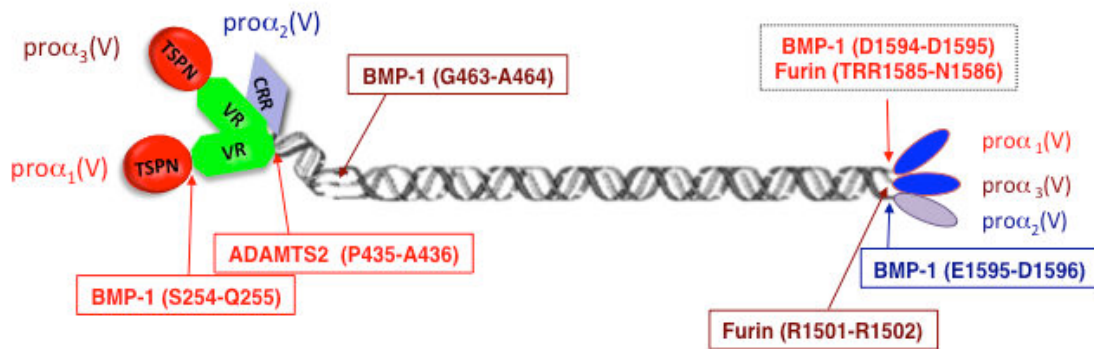
L'extrémité N-terminale de la chaîne  $\text{pro}\alpha 1(V)$  est partiellement clivée par la BMP-1. De manière étonnante, la BMP-1 va cliver le domaine NC3 de la chaîne  $\text{pro}\alpha 1(V)$  entre la sérine en position 254 et l'acide aspartique 255 au niveau d'une séquence SQD située entre le domaine TSPN et la région variable (Imamura et al. 1998) (Tableau 4). Ce site de clivage est différent de celui reconnu traditionnellement par la BMP-1 notamment sur les collagènes I, II et III, où le site de clivage se situe en amont d'un résidu aspartate en position P1' et est caractérisé par la présence d'acide aminé à chaîne aromatique en amont du site (Tableau 4 et Figure 13).

		P5	P4	P3	P2	P1	↓	P1'	P2'	P3'
N-ter	$\text{Pro}\alpha 1(V)$	D	T	P	Q	S		Q	D	P
C-ter	$\text{Pro}\alpha 2(V)$	P	E	F	T	E		D	Q	A
C-ter	$\text{Pro}\alpha 1(I)$	R	Y	Y	R	A		D	D	A
C-ter	$\text{Pro}\alpha 2(I)$	F	Y	R	R	A		D	Q	P
C-ter	$\text{Pro}\alpha 1(II)$	Q	Y	M	R	A		D	Q	A
C-ter	$\text{Pro}\alpha 1(III)$	A	P	Y	Y	G		D	E	P
N-ter	$\text{Pro}\alpha 1(XI)$	K	A	A	Q	A		Q	E	P
N-ter	$\text{Pro}\alpha 2(XI)$	E	R	P	Q	N		Q	Q	P

**Tableau 4** : Site de clivage des procollagènes fibrillaires par l'enzyme BMP-1 (Ge & Greenspan 2006).

La présence d'un résidu aspartate en P2', à amener mon équipe à étudier plus précisément ce site de clivage. Il a été ainsi démontré que, tout comme pour le clivage du C-propeptide, la présence de la région en triple hélice n'est pas essentielle au clivage de la chaîne  $\alpha 1(V)$  par la BMP-1 (Bonod-Bidaud et al. 2007). Par mutagenèse dirigée,

Bonod-Bidaud et al ont généré différents mutants d'une construction comprenant le N-propeptide de la chaîne  $\alpha 1(V)$  entier, substituant les acides aminés autour du site de clivage par la BMP-1. Il a été ainsi démontré que seul l'acide aspartique en position P2' est essentiel pour le clivage du domaine NC3 par la BMP-1. La BMP-1 est aussi responsable du clivage du domaine NC3 de pro $\alpha 1(XI)$  entre un résidu alanine en position 254 et l'acide aspartique en position 255 (Tableau 4). Dans la peau, la chaîne pro $\alpha 1(V)$  peut également être clivée par ADAMTS-2. Ce clivage est partiel contrairement au clivage ADAMTS-2 du N-propeptide des collagènes I/II/III. ADAMTS-2 clive le N-propeptide de la chaîne pro $\alpha 1(V)$  en fin de la région variable au niveau d'un site P $\downarrow$ A différent de celui connu chez les autres collagènes fibrillaires (P/A) $\downarrow$ Q (Colige et al. 2005) (Figure 13).



**Figure 13 :** Enzymes de maturation et sites de clivage du procollagène V.

### I.3.3. Rôle des différentes isoformes du collagène V

Le collagène V est important dans le développement et l'homéostasie des tissus. Des mutations sur les gènes codant pour le collagène V humain, *COL5A1* et dans une moindre mesure *COL5A2*, induisent dans plus de 90% des cas, un syndrome d'Ehlers-Danlos classique (EDSc). L'EDSc est une maladie génétique qui est caractérisée principalement par une hyper-mobilité articulaire, une hyper-extensibilité de la peau et des défauts de cicatrisation ( Malfait et al. 2005 ; Malfait et al. 2010).

Des études réalisées sur la cornée du poulet, ont permis de montrer que le collagène V se retrouvait à l'intérieur de ces fibres hétérotypiques et que seule la région N-terminale partiellement clivée du collagène V émergeait à la surface des fibres (Linsenmayer et al. 1983; Linsenmayer et al. 1984). Le collagène V régulerait ainsi le

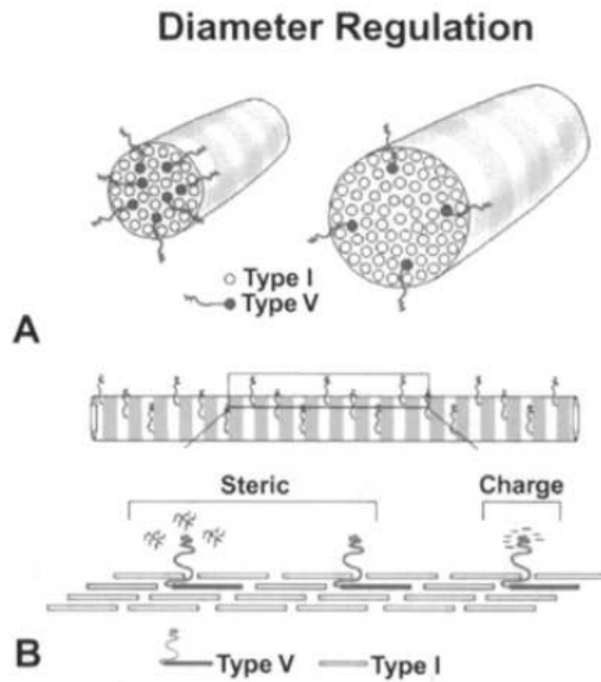


diamètre des fibres formées avec le collagène I. Cela a, dans un premier temps, été montré *in vitro* où les collagènes I et V purifiés sont capable de former spontanément des fibres présentant la même striation que les fibres de collagène observées dans les tissus. Le diamètre de ces fibres est dépendant de la quantité de collagène V présent. En effet, l'addition de collagène V permet de réduire l'épaisseur des fibres de collagène (Birk et al. 1990). Cette hypothèse a, par la suite, été confirmée en utilisant des fibroblastes de cornée de poulet en culture pour lesquels l'expression du collagène V a été inhibée à l'aide d'une construction rétrovirale exprimant une forme tronquée dominant-négative du collagène V. Il a été montré que le diamètre des fibres de collagène I/V augmentaient en présence de la forme tronquée du collagène V (Marchant et al. 1996).

Le diamètre des fibres est régulé par l'hétérotrimère  $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$  qui serait la seule isoforme entrant dans la composition des fibres hétérotypiques. Ces différentes expériences ont permis de conclure que l'impact de l'hétérotrimère de collagène V sur le diamètre des fibres de collagène est dépendant de :

- La concentration de collagène V présent. En effet, comme dit précédemment, l'épaisseur des fibres de collagène produit *in vitro* et *in cellulo* est directement corrélée à la quantité de collagène V présent. C'est également le cas *in vivo* où les fibres observées dans la cornée, où le collagène V représente 25% des collagènes, sont plus fines que celles observées dans la peau ou le tendon, où le collagène V ne représente que 1 à 3 % des collagènes (Birk 2001a).
- La structure primaire de la triple hélice du collagène V. En effet, une étude réalisée par mon équipe a montré que l'hétérotrimère  $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$  pepsinisé, donc dépourvu des extrémités N/C-terminales, régulait l'épaisseur des fibres formées par le collagène I (Chanut-Delalande et al. 2001).
- La présence ou non du domaine N-terminal. Il a été montré qu'en l'absence du domaine N-terminal, la réduction du diamètre des fibres de collagène I était inférieure à celle induite par le collagène V entier (Birk 2001a).

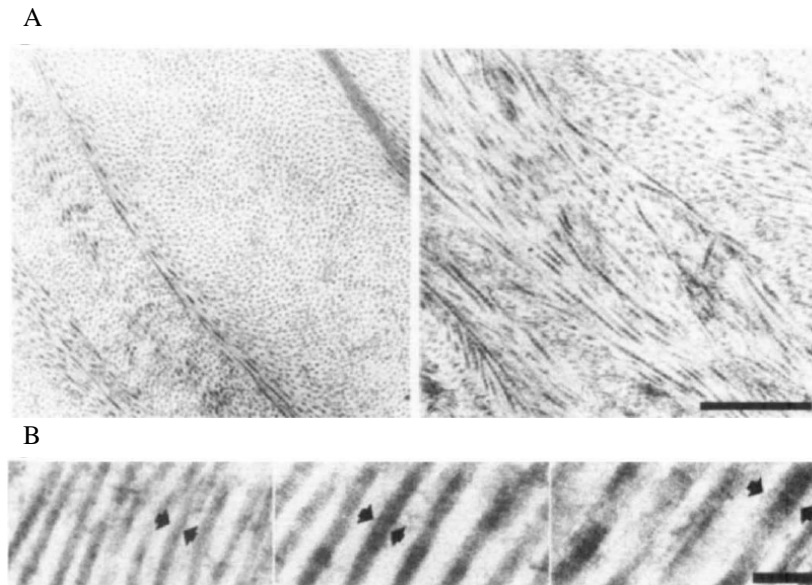
Ainsi selon le modèle proposé par Marchant et al (1996), la quantité de collagène V présent contrôlerait le diamètre des fibres au moment de leur nucléation, via le domaine N-terminal qui émerge en dehors des fibres et qui va réguler l'addition de nouvelles molécules par encombrement stérique ou par répulsion électrostatique (Figure 14)



**Figure 14** : Modèle de régulation du diamètre des fibres par le collagène V. (A) Le diamètre des fibres est inversement proportionnel à la concentration de collagène V (B) Le domaine N-terminal du collagène V émerge à la surface des fibres et régule son diamètre par encombrement stérique ou par répulsion de charge (Marchant et al. 1996).

Plusieurs études réalisées chez la souris ont permis de caractériser le rôle de l'hétérotrimère *in vivo*.

Des souris knock-in ont été générées par Andrikopoulos et al. en 1995. Ces souris, nommées *pN*, présentent une délétion de l'exon 6 au niveau du gène *Col5a2* qui code pour le domaine COL2 de la chaîne  $\alpha 2$ . Elle se retrouve ainsi dépourvue de la région linker responsable de la flexibilité du domaine N-propeptidique. Les souris homozygotes présentent une déformation de la colonne vertébrale, des problèmes osseux et ligamentaires qui vont entraîner la mort des souris généralement 5 jours après la naissance à la suite de problèmes respiratoires. Ces souris présentent également une peau fragile et plus étirable que celles des souris sauvages et des défauts oculaires (Andrikopoulos et al. 1995). Ce phénotype est associé à une désorganisation de la MEC qui présente, chez les souris hétérozygote *pN/+*, des fibres de collagène plus épaisses que chez les souris sauvages, et mal organisées notamment au niveau de la cornée (Figure 15), soulignant l'importance de l'hétérotrimère  $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$  dans la formation de la matrice et la régulation des propriétés biomécaniques des tissus osseux, du tendon et de la peau.

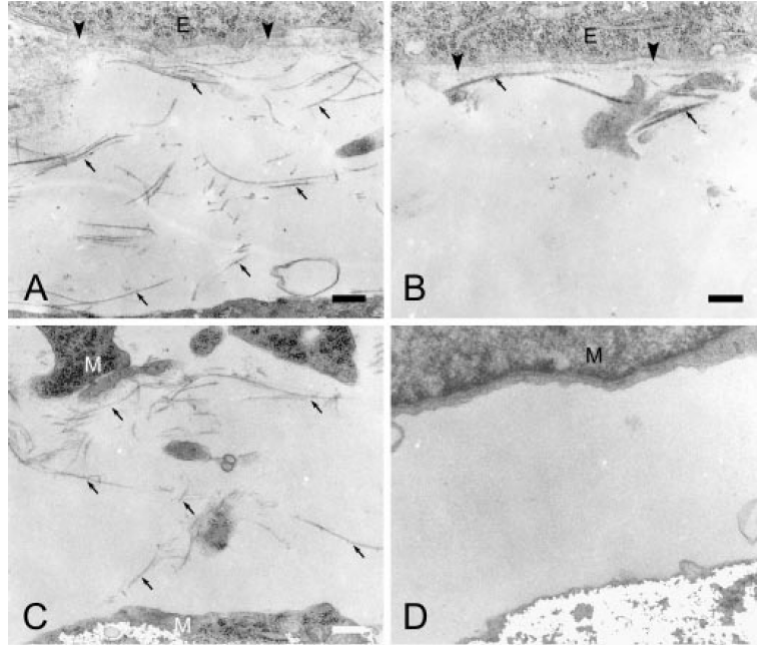


**Figure 15** : Structure des fibres de collagène du stroma cornéen chez les souris *pN*. (A) souris sauvage (gauche) et homozygote *pN/pN* (droite) observées par microscopie électronique à transmission. (B) Comparaison du diamètre des fibres de la cornée issue de souris : sauvage (gauche), hétérozygote *pN/+* et homozygote *pN/pN* (Andrikopoulos et al. 1995).

Une étude visant à analyser l'impact de cette mutation au niveau du derme a montré que le derme des souris *pN/pN* présentait, par comparaison aux souris sauvages, beaucoup moins de fibres de collagène indiquant que cette isoforme est importante pour initier la formation des fibres hétérotypiques. Une analyse biochimique a révélé que la MEC produit par les fibroblastes du derme en culture, ne contenait pas d'hétérotrimère  $[\alpha 1(\text{V})]_2\alpha 2(\text{V})$ . De manière intéressante, les fibroblastes *pN/pN* vont surexprimer *Col5a1* et sécréter du collagène V sous forme d'homotrimère  $[\alpha 1(\text{V})]_3$  suggérant que l'absence de la chaîne  $\alpha 2(\text{V})$  dans la MEC exercerait un rétrocontrôle positif sur l'expression de *Col5a1* (Chanut-Delalande et al. 2004). Toutefois, la surexpression et l'expression ectopique de l'homotrimère ne va pas compenser la perte de fonction liée à l'absence de la chaîne  $\alpha 2(\text{V})$  qui se traduit notamment par une diminution de la densité des fibres de collagènes et de l'épaisseur de la membrane basale épidermique et un effet négatif sur la survie des fibroblastes du derme en culture (Chanut-Delalande et al. 2004). Ces résultats soulignent l'importance du collagène V, et de l'hétérotrimère  $[\alpha 1(\text{V})]_2\alpha 2(\text{V})$  dans la formation et l'homéostasie du tissu cutané.

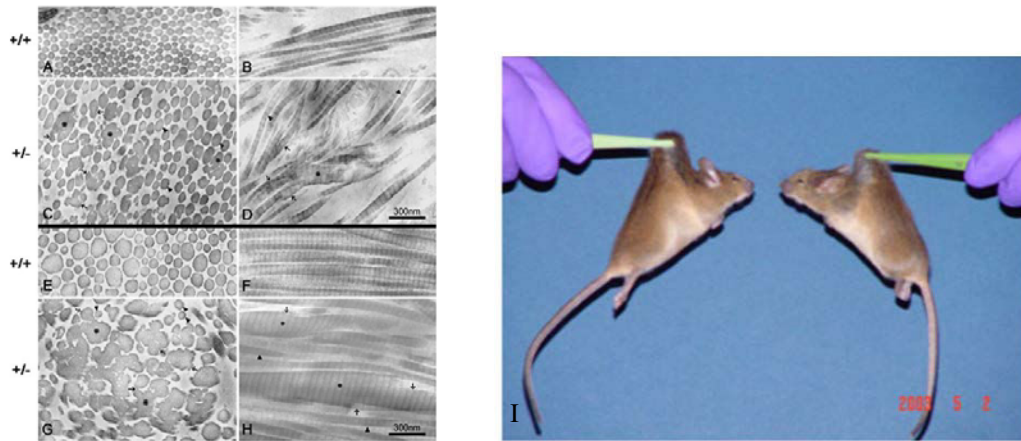
L'étude des souris KO pour le gène *Col5a1* a confirmé le rôle de  $[\alpha 1(\text{V})]_2\alpha 2(\text{V})$  dans la nucléation des fibres. Les souris *Col5a1<sup>-/-</sup>* ne sont pas viables et meurent au dixième

jour du développement embryonnaire d'une insuffisance cardiaque. L'analyse du tissu conjonctif des embryons a montré que celui-ci ne contenait pratiquement pas de fibres de collagène (Figure 16) (Wenstrup et al. 2004).



**Figure 16** : Micrographie électronique du derme de souris au 10<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire. Les fibres de collagène (flèches noires) présentes sous l'ectoderme (E) et la membrane basale (têtes de flèche) ou entre les cellules mésenchymateuses du mésenchyme pré-dermal (M) chez les souris sauvages (A-C) et *Col5a1*<sup>-/-</sup> (B-D) (Wenstrup et al. 2004).

Les souris hétérozygotes *Col5a1*<sup>+/-</sup>, viables, présentent une diminution de 50% du nombre de fibres de collagène dont certaines sont anormalement larges (Figure 17) (Wenstrup et al. 2004). Ainsi, en plus de réguler le diamètre des fibres, le collagène V régulerait la nucléation des fibres de collagène confortant les observations de Chanut-Delalande et al. (2004).



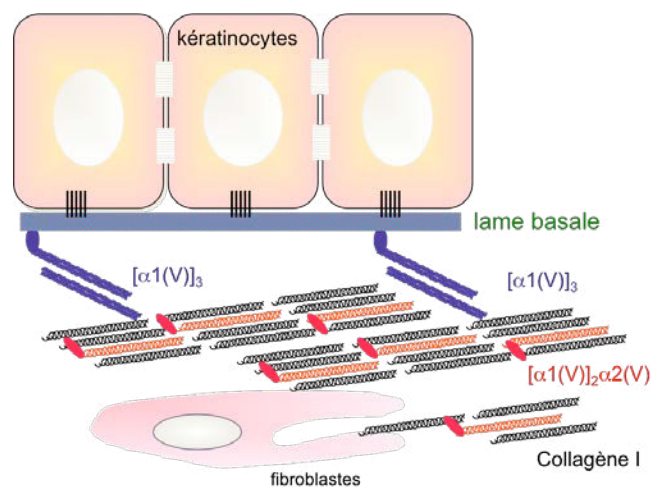
**Figure 17** : Effet de la mutation de *Col5a1* sur la peau des souris. Les souris *Col5a1*<sup>+/-</sup> présentent une peau hyper-extensible (I) et des défauts d'organisation des fibres de collagène. (A-H). Micrographies électroniques à transmission de fibres de collagène en coupe sagittale (A, C, E, G) et longitudinale (B, D, F, H) du derme des souris sauvages (A-B et E-F) et *Col5a1*<sup>+/-</sup> (C-D et G-H) âgées de 10 jours (A-D) et 20 jours (E-H). Fibres anormales (\*) et fibres en chou-fleur (petite flèche) (Wenstrup et al. 2006).

Par ailleurs, la caractérisation des souris mutées sur *Col5a2* et *Col5a1*, a permis de confirmer l'implication du collagène V dans la pathogénèse du syndrome d'Ehlers-Danlos. En effet, tout comme les patients EDS porteurs hétérozygotes de mutations sur *COL5A1* et *COL5A2*, les souris *pN/pN*, *Col5a1*<sup>+/-</sup> et *Col5a2*<sup>+/-</sup> développent une hyper-extensibilité de la peau (Figure 17.I) et des défauts de cicatrisation (souris *Col5a1*<sup>+/-</sup>) (Andricopoulos et al, 1995; Chanut-Delalande et al. 2004; Wenstrup et al. 2006; Park et al. 2015; DeNigris et al. 2016).

L'importance du collagène V dans la fonction et l'intégrité de la cornée, dont il représente près de 25% des collagènes totaux, a été démontré à l'aide de souris knock-out conditionnelles générées grâce au système Cre/Lox. Pour ce faire, des souris floxées sur le gène *Col5a1* ont été croisées avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du kératocane, un gène exprimé spécifiquement dans la cornée. La déplétion de *Col5a1* entraîne une opacification de la cornée, dont le stroma, plus fin, contient des fibres de collagène moins nombreuses, plus épaisses dont l'organisation orthogonale est altérée (Sun et al. 2011). Il en va de même chez l'homme où une étude portant sur la cornée de 8 patients atteints d'un EDSc, porteurs de mutations sur *COL5A1*, a montré que ces patients présentaient une cornée plus fine dont le stroma était moins dense en fibres de collagène, ces dernières étant néanmoins plus épaisses que celles observées dans le stroma issu d'individus sains (Segev et al. 2006).

Afin d'étudier le rôle de l'homotrimère  $[\alpha 1(V)]_3$  dans la peau, des souris transgéniques K14-*COL5A1*, ciblant l'expression ectopique la chaîne  $\alpha 1(V)$  humaine dans les kératinocytes de la couche basale, ont été générées au laboratoire. Cette surexpression va conduire à la sécrétion dans la MEC d'homotrimère  $[\alpha 1(V)]_3$ , la chaîne  $\alpha 2(V)$  n'étant pas produite par les kératinocytes. L'analyse phénotypique de la peau de ces souris a révélé une désorganisation des cellules de la couche basale, un doublement du nombre d'hémidesmosomes et une accumulation de matériel fibrillaire à la jonction dermo-épidermique mais également autour des follicules pileux qui sont, par ailleurs, plus nombreux chez les souris K14-*COL5A1*. Cette dernière observation est en accord avec la caractérisation faite des souris *pN/pN* qui présentent également une augmentation du nombre de follicules pileux associée à une surexpression de l'homotrimère  $[\alpha 1(V)]_3$  (Andrikopoulos et al. 1995; Chanut-Delalande et al. 2004).

Ces observations suggèreraient un rôle de l'homotrimère dans la régulation du cycle pileux. L'homotrimère  $[\alpha 1(V)]_3$  produit est déposé sous la forme de filaments au niveau de la membrane basale et va modifier, mais de manière non significative, les propriétés biomécaniques de la peau suggérant une fonction de l'homotrimère dans la stabilisation de la jonction dermo-épidermique (Bonod-Bidaud et al. 2012). L'homotrimère  $[\alpha 1(V)]_3$  interagit avec des protéines de la membrane basale comme la lamine-111 et le collagène IV mais aussi avec le collagène VI présent dans le derme (Symoens, Renard, et al. 2011; Bonod-Bidaud et al. 2012). Il a ainsi été proposé, que l'homotrimère  $[\alpha 1(V)]_3$  contribuerait à la stabilisation de l'interface derme-épiderme en permettant de lier la membrane basale aux composants de la MEC du derme (Figure 18).



**Figure 18** : Modèle proposé pour la fonction du collagène V dans la stabilité de l'interface derme-épiderme (Bonod-Bidaud et al. 2012).

Un crible réalisé par micro-arrays a révélé que c'est dans les tissus adipeux blancs que la chaîne  $\alpha 3(V)$  est le plus fortement exprimée et, dans une relative moindre mesure, dans les îlots pancréatiques, deux tissus impliqués dans les métabolisme du glucose et de l'insuline (Huang et al. 2011). Le rôle de la chaîne  $\alpha 3(V)$  dans le métabolisme a été étudié au cours de la caractérisation phénotypique des souris KO *Col5a3<sup>-/-</sup>*. Cette étude a montré que les souris *Col5a3<sup>-/-</sup>* femelles ont peu de tissus adipeux dans le derme et sont tolérantes à l'obésité induite par un régime riche. Les souris *Col5a3<sup>-/-</sup>*, mâles et femelles, sont intolérantes au glucose et l'assimilation du glucose par les muscles squelettiques est déficiente. En absence de la chaîne  $\alpha 3(V)$ , les souris développent également une insulino-résistance et vont avoir une hyperglycémie de type diabétique à l'âge de 1 an. De plus, les souris *Col5a3<sup>-/-</sup>* présentent moins d'îlots pancréatiques et ceci est associé à une diminution de fonction des cellules  $\beta$  qui sont également plus sensibles à l'apoptose (Huang et al. 2011). Par ailleurs, une étude effectuée sur le poisson zèbre a montré que, *plxnd1*, un gène codant pour récepteur membranaire, régule la distribution de tissus gras. En effet, sa mutation conduit à une hyperplasie du tissu adipeux viscéral (VAT) associé à une diminution de la taille et une multiplication des gouttelettes lipidiques, ce qui diminue les risques de pathologie métabolique, notamment le diabète de type 2. Par une analyse transcriptomique, cette étude a montré que l'effet de *plxnd1* était médié le collagène V. En effet, la déplétion de *plxnd1* régule positivement l'expression de *Col5a3* mais aussi de *Col5a1* et une inhibition de *Col5a1* annule les effets positifs de la mutation de *plxnd1* sur le VAT (Minchin et al. 2015). Ces 2 travaux soulignent l'importance du collagène V, et de la MEC qu'elle compose, dans l'homéostasie et les fonctions des tissus spécialisés du métabolisme du glucose et de l'insuline que sont les îlots pancréatiques, le tissu adipeux, et les muscles squelettiques.

Le collagène V est surexprimé au cours de la cicatrisation et dans plusieurs contextes pathologiques tels que les cancers, les fibroses (Mak et al. 2016). Au cours de la cicatrisation, la granulation va permettre la formation d'un nouveau tissu conjonctif à l'endroit du tissu lésé. Une analyse par SDS-PAGE des composants protéiques du tissu granulaire, après brûlure de la peau, a révélé que le niveau de collagène V était supérieur à celui présent dans le tissu sain. Les chaînes  $\alpha 1(V)$ ,  $\alpha 2(V)$  et  $\alpha 3(V)$ , synthétisées par les fibroblastes environnants, se localisent au niveau du tissu granulaire (Hashimoto et al. 1986).

L'expression du collagène est également dérégulée dans le derme dans un contexte tumoral. En effet, il a été montré chez la souris, que l'induction de tumeurs de la peau, par un traitement au 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate, était associée à une surexpression du collagène V dans le derme (Marian & Danner 1987). Cette surexpression est spécifique du collagène V, le niveau des collagènes I et III ne variant pas. Il a été proposé que la dérégulation du collagène V déstabiliserait l'interaction derme-épiderme facilitant ainsi la progression tumorale (Marian & Danner 1987). L'accumulation de collagène V a également été observée dans plusieurs tissus tumoraux notamment dans le carcinome colorectal (Fischer et al. 2001), dans des cas de cancer du foie (Yamamoto et al. 1984; Fischer et al. 2001) et également dans le cancer du sein où il va représenter jusqu'à 10% des collagènes de la matrice interstitielle entourant le carcinome contre 0,1% dans la matrice des tissus du sein (Barsky et al. 1982).

La fibrose est un processus pathologique causé par une dérégulation de la balance dépôt/dégradation des protéines de la matrice. Cela va se traduire notamment par un dépôt excessif de protéines de la MEC dont les collagènes. Le collagène V va avoir un rôle central dans la pathogénèse des fibroses de nombreux tissus et organes humains dont la peau, le rein, le foie ou les vaisseaux sanguins (Mak et al. 2016).

C'est le cas notamment pour la sclérodermie systémique, pathologie qui se traduit par une fibrose systémique qui va induire un durcissement de plusieurs organes à commencer par la peau. Le niveau de collagène V observé dans le derme est supérieur de 92% à celui observé dans le tissu sain. De plus, la sclérodermie systémique peut-être induite chez le lapin, par immunisation par injection de collagène V et il existe une corrélation entre le degré de sévérité de cette pathologie et le niveau de collagène injecté, soulignant l'importance du collagène V dans la pathogénèse de la sclérodermie (Bezerra et al. 2006; Callado et al. 2007). Le collagène joue également un rôle majeur dans l'athérosclérose, maladie inflammatoire chronique associée au dépôt de plaques sur la paroi des artères. Ces plaques, formées essentiellement de lipides, peuvent contenir jusqu'à 60% de collagènes fibrillaires et le collagène V va avoir un niveau relatif, par rapport aux collagènes fibrillaires I et III, 3 fois supérieur à celui observé dans le tissu conjonctif des vaisseaux sanguins sains (Lawrence et al. 1994).

L'auto-immunité contribue à la progression et la pathogénèse de l'athérosclérose et des scléroses en général et le collagène V, qui est retrouvé surexprimé dans la plupart des



tissus affectés, fonctionne comme un auto-antigène qui va jouer un rôle central dans la pathogénèse de l'athérosclérose (Dart et al. 2010).

#### **I.4. Collagènes et Autophagie**

Du fait de son importance dans le développement, l'homéostasie cellulaire et tissulaire, la synthèse et le dépôt de collagène dans la MEC sont hautement régulés. Cette régulation s'effectue par une balance fine entre la synthèse du collagène et sa dégradation. Ce contrôle est notamment effectué par des facteurs de croissance dont le TGF- $\beta$  qui régule positivement l'expression des gènes codant pour les collagènes et réprime l'expression des MMP (Matrix Metalloprotease), enzymes ayant la capacité de dégrader les différents composants de la MEC (Leask & Abraham 2004).

La collagène peut également être dégradé au niveau intracellulaire afin de contrôler la quantité sécrétée dans la MEC, mais également d'éviter la synthèse de molécules mutées et/ou mal conformées. Plusieurs mécanismes biologiques peuvent intervenir à cette échelle, dont l'autophagie, qui joue un rôle important dans le contrôle de la quantité et la qualité du collagène produit en contexte physiologique et pathologique (Ishida et al. 2009; Kim et al. 2012).

##### **I.4.1. L'Autophagie**

L'autophagie est un processus biologique conservé chez les cellules eucaryotes qui va permettre de dégrader une partie du cytoplasme via les lysosomes. La voie de l'autophagie se caractérise par la formation d'un autophagosome, c'est à dire une vésicule composée d'une double membrane lipidique qui va isoler les composants ciblés du reste du cytoplasme (Figure 19). Cette vésicule autophagique va ensuite fusionner avec un ou plusieurs lysosomes pour former un autolysosome dont le contenu est dégradé grâce à l'action des enzymes lysosomales. Les produits de la dégradation sont ensuite libérés dans le cytoplasme où ils pourront être ré-utilisés par la cellule.

L'autophagie joue un rôle dans le maintien de l'intégrité cellulaire dans un contexte physiologique et pathologique. C'est un mécanisme dynamique régulé par des stimuli intracellulaires comme le niveau énergétique (Meijer & Codogno 2011), l'absence de

nutriments et/ou d'acides aminés (Ecker et al. 2010), le stress du REG (Nijholt et al. 2011) ou par des stimuli extracellulaires tel que la présence de facteur de croissances (Ding et al. 2010), l'hypoxie (Bellot et al. 2009) ou la présence d'un organisme pathogène (Mizushima 2009).

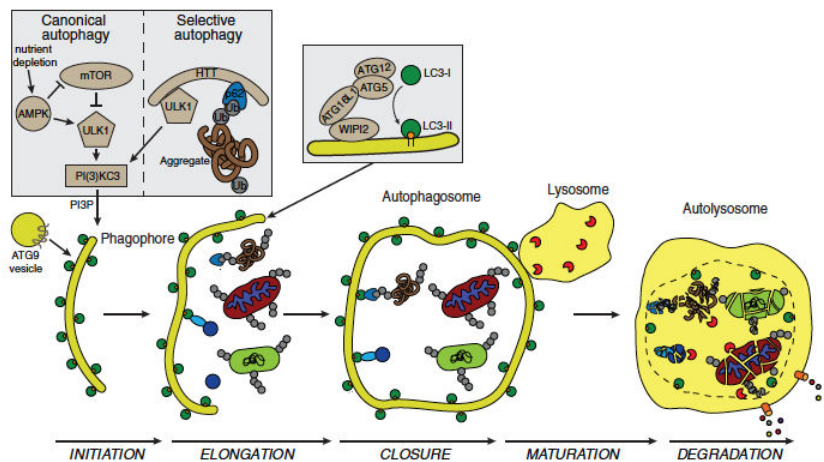
On va distinguer 2 types d'autophagie : (1) une autophagie dite canonique, qui va dégrader de manière aspécifique des composants cytoplasmiques, et (2) une autophagie dites sélective lorsque le contenu visé est spécifique. On parle alors en fonction des cibles à dégrader de : la xénophagie qui cible les organismes pathogènes étrangers, l'agrégophagie qui agit sur les agrégats protéiques (Hytinen et al. 2014), la lipophagie sur le contenu lipidique (Liu & Czaja 2013), ou encore la mitophagie qui va spécifiquement dégrader les mitochondries endommagées ou surnuméraires (Ding & Yin 2012).

La formation des vésicules autophagiques se déroule en plusieurs étapes (initiation, élongation, maturation) coordonnées par l'activité des protéines de la famille ATG (Autophagy-Related Gene).

La phase d'initiation se traduit par la nucléation d'une double membrane lipidique appelé phagophore. Cette étape est contrôlée par ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1) qui va phosphoryler et activer le complexe PI(3)KC3 (formé par les protéines vps134, p150, ATG14 et Beclin-1) qui catalyse la formation du phagophore. Dans le cas de l'autophagie canonique, l'activation d'ULK-1 est contrôlée par 2 voies différentes. La première est dépendante de le complexe mTORC. mTORC inhibe ULK-1 et par conséquent, la baisse du taux d'acides aminés, de nutriments, ou encore l'absence de signal des récepteurs des facteurs de croissance va conduire à une inactivation du complexe, levant ainsi l'inhibition exercé sur ULK1. La deuxième voie d'activation est contrôlée par l'AMPK et, dans ce cas de figure, c'est une diminution de la balance énergétique cellulaire qui entraîne une augmentation du taux d'AMP qui va alors activer l'AMPK (5' AMP-activated protein Kinase). AMPK va alors positivement réguler ULK-1 en activant directement ULK-1 et en inhibant mTORC (Kim et al. 2011). Le mécanisme d'activation d'ULK-1 durant l'autophagie sélective est moins connu. Des travaux réalisés chez la drosophile semblent indiquer qu'elle serait dépendante de HTT (Huntingtin) qui d'une part active ULK-1 et d'autre part interagit avec la cible à dégrader via la protéine adaptatrice p62 (Figure 19)(Rui et al. 2015).

La phase d'élongation du phagophore et de fermeture de l'autophagosome est initiée par l'ATG-12 qui se conjugue à l'ATG-5 pour former le complexe ATG5-ATG12 par

l'action successive des enzymes ATG-7 et ATG-10. Le complexe formé se lie à l'ATG16L1 localisée à la membrane de l'autophagosome en formation grâce à WIPI12 (Figure 19)(Dooley et al. 2014). Par la suite, LC3B (homologue chez les mammifères d'ATG8) joue un rôle essentiel dans l'élongation du phagophore. Synthétisée sous la forme du précurseur proLC3B, elle subit une étape de maturation au cours de laquelle elle est clivée au niveau de l'extrémité C-terminale pour former LC3B-I. ATG7, ATG3, et le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 vont agir successivement et catalyser l'addition d'un groupement PE (PhosphatidylEthanolamine) à l'extrémité C-terminale de LC3B-I qui devient alors LC3B-II, ancrée à la surface interne et externe de l'autophagosome. LC3-B-II permet alors, d'une part, l'élongation du phagophore et la formation de l'autophagosome, et d'autre part, l'interaction avec les cibles de l'autophagie qui vont se retrouver séquestrées à l'intérieur de la vésicule autophagique (Klionsky & Schulman 2014). La phase d'élongation est également dépendante de l'ATG9 qui contrôle l'apport de membrane nécessaire à la formation de la vésicule autophagique (Rao et al. 2016).



**Figure 19** : Initiation et formation d'une vésicule autophagique. La voie canonique (non sélective) est contrôlée par l'AMPK et mTOR qui régulent respectivement négativement et positivement la Kinase ULK1. L'autophagie sélective est en partie liée à HTT (Huntingtin) qui va également activer ULK1. ULK1 agit positivement sur le complexe PI(3)KC3 conduisant à l'initiation de l'autophagie. L'élongation du phagophore est possible grâce au complexe WIPI12-ATG16L1-ATG5-ATG12 qui catalyse l'insertion dans la membrane de l'autophagosome de LC3-II. LC3-II permet l'élongation du phagophore, le recrutement du chargement cellulaire à dégrader et la fermeture de l'autophagosome qui va, par la suite, fusionner avec le lysosome, entraînant la dégradation de son contenu dans l'autolysosome (Mancias & Kimmelman 2016).

L'autophagosome ainsi formé va, au cours de sa maturation, fusionner avec un lysosome et former un autolysosome dont le chargement est dégradé par l'action des enzymes lysosomales.

#### I.4.2. L'autophagie régule le dépôt du collagène dans la MEC

Les gènes codant pour les molécules de collagène peuvent subir des mutations qui vont altérer la synthèse du collagène ou conduire à la formation d'un collagène muté qui peut être mal conformé. Afin d'identifier les mécanismes régulant le devenir des collagènes mal conformés et/ou mutés, une étude a été réalisée sur la lignée cellulaire MOV13. Il s'agit de fibroblastes embryonnaires de souris dans lesquels, le gène *Colla1* a été invalidé à l'aide d'un rétrovirus (Barker et al. 1991). La transfection de ces cellules avec une construction permettant l'expression d'une chaîne  $\alpha 1(I)$  mutée au niveau de son large domaine collagénique conduit à la formation d'un procollagène I dont la triple hélice est instable. Les trimères ainsi formés ne sont pas sécrétés dans la MEC, s'accumulent dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG) et activent la voie UPR (Unfolded Protein Response) qui va permettre leur conformation correcte ou mener à leur dégradation soit par la voie ERAD dépendante du protéasome soit par autophagie (Boot-Handford & Briggs 2009). L'inhibition de la voie ERAD dans les cellules MOV13 transfectées n'a aucun effet sur l'accumulation du collagène mutant dans le REG. À l'inverse, l'inhibition de la voie autophagique, par un traitement pharmacologique ou par répression de l'expression d'ATG, est associée à un stress du REG et une apoptose accrue. Cette étude démontre ainsi que le procollagène mal conformé est spécifiquement dégradé par un mécanisme d'autophagie.

L'autophagie permet également de dégrader le collagène mal conformé suite à l'absence des protéines chaperonnes importantes à sa synthèse. Cela a été démontré dans les HSC (cellules souches hépatiques) où la mutation de Hsp47, protéine chaperonne spécifique des collagènes, va être associée à un défaut de conformation du procollagène. Malgré l'absence de Hsp47, aucune accumulation de collagène n'est observée dans le REG. Kawasaki et al (2015) ont montré que le procollagène mal conformé était spécifiquement dégradé par la voie autophagique. En effet, une inhibition de l'autophagie, par traitement à la chloroquine, entraîne une accumulation du collagène dans le REG dilaté. Le stress du REG provoqué va être associé à une augmentation du taux d'apoptose chez les HSC (Kawasaki et al. 2015).

De même, l'autophagie régule la production de collagène dans les tissus. En effet, la déplétion de la *Beclin-1* (composant du complexe PI(3)KC3) est associée, *in vivo* chez la souris, et *in vitro* dans les cellules mésenchymateuses à une surproduction de

collagène (Kim et al. 2012). La même étude a également révélé que l'autophagie permet de réduire la quantité de collagène I déposé dans la MEC à l'état basal ou après traitement au TGF- $\beta$ . De manière intéressante, l'autophagie est également régulée positivement par la voie du TGF- $\beta$  et va exercer un contrôle négatif de la quantité de collagène induit par cette même voie. Il représente ainsi une piste thérapeutique dans le traitement des fibroses dont les causes sont souvent associées à une dérégulation de la voie du TGF- $\beta$  (Kim et al. 2012).

Il est toutefois important de préciser que l'autophagie n'est pas le seul mécanisme permettant la dégradation des collagènes mal conformés. Il a été montré, dans les cellules MOV13, que les monomères de collagène I qui s'accumulent dans le REG sont dégradés de manière indépendante de l'autophagie. En effet, la transfection de ces cellules avec un gène codant pour une chaîne  $\alpha_1(I)$  porteuse d'une mutation au niveau du C-propeptide empêchant sa trimérisation, va avoir pour conséquence une accumulation du monomère dans le REG qui va être dégradé, indépendamment de l'autophagie, via la voie ERAD et le protéasome (Fitzgerald et al. 1999). De même l'étude de l'impact d'une mutation structurale de *COL4A2*, identifiée chez un patient atteint de porencéphalie, a montré que le collagène muté s'accumulait dans le REG avant d'être dégradé par la voie du protéasome (Murray et al. 2014).

#### I.4.3. Une régulation de l'autophagie par le collagène

L'autophagie, qui régule la production de collagène, va également être régulée par la matrice environnante (Neill et al. 2014) et notamment par le collagène VI dont les mutations entraînent un type particulier de myopathies, l'UCMD et la BM. Ces pathologies, que j'évoquerai plus en détail plus tard, se caractérisent par une dystrophie musculaire associée à une altération latente des mitochondries et une autophagie défectueuse (Bönnemann 2011).

Des études réalisées sur des souris *Col6a*<sup>-/-</sup> ont montré que l'activité autophagique était défectueuse dans le tissu musculaire, et que ce défaut était associé à une apoptose accrue dans les cellules musculaires issues de ces souris. Cette baisse du niveau d'autophagie est associée à une diminution de la quantité de Beclin-1 présente dans le tissu (Grumati et al. 2010). L'activation de l'autophagie de manière pharmacologique par déplétion de nutriments ou après transfection de la Beclin-1 permet de restaurer l'activité autophagique et a un effet bénéfique sur le phénotype dystrophique des

souris. Ces résultats suggèrent que le collagène VI régule la voie de l'autophagie, et ce, en amont de la Beclin. Le, ou les, récepteurs et la voie de signalisation par laquelle le collagène VI va réguler l'autophagie, n'a néanmoins pas encore été identifiée.

## **II. PATHOLOGIES HEREDITAIRES DE LA MEC : CAS DE L'EDSc ET DE L'UCMD**

### **II.1. Le Syndrome d'Ehlers-Danlos**

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS) regroupe un ensemble hétérogène de maladies génétiques caractérisées par une hyper-mobilité articulaire, une hyper-extensibilité de la peau et une fragilité de différents tissus liées à des altérations du tissu conjonctif. Ce syndrome doit son nom à 2 dermatologues, le Dr. Edverd Ehlers (Danemark) et le Dr. Henri-Alexandre Danlos (France), qui ont été les premiers à décrire cette pathologie au début du 20<sup>ème</sup> siècle. Les EDS sont des pathologies héréditaires monogéniques associées à des mutations des gènes codant pour les collagènes fibrillaires (collagènes I, III et V) ou des enzymes participant à la biosynthèse, la formation et/ou la maturation des fibres de collagène. Les altérations du tissu conjonctif vont affecter différents tissus/organes tels que la peau, les tendons, les vaisseaux sanguins et les organes internes (Fichard et al, 2003; De Paepe & Malfait 2012).

#### **II.1.1. Nosologie**

Les maladies monogéniques regroupées au sein du syndrome d'Ehlers-Danlos ont en commun d'être associées à une fragilité des tissus conjonctifs, d'induire une hyper-laxité articulaire et une hyper-extensibilité de la peau. L'EDS regroupe des pathologies très hétérogènes de par les tissus/organes affectés (peau, tendon, os, vaisseaux sanguins) et la sévérité de ces atteintes. Une première nosologie, basée sur les manifestations cliniques et, lorsque ceux-ci étaient présents, des outils de diagnostic moléculaire, a été établie en 1987 (Beighton et al. 1988). L'EDS était alors subdivisé en 11 types, qui ont comme symptomatologie commune une peau fine, hyper-extensible à la texture velouté ; une cicatrisation atrophique ; des ecchymoses fréquentes et une hyper-laxité articulaire. La nosologie établie distingue notamment les EDS de type I et II qui présentent les caractéristiques générales de l'EDS à un degré de sévérité respectivement sévère et modéré. L'EDS de type III, dit hypermobile, est associé à une hyper-mobilité articulaire sévère et une hyper-laxité de la peau modérée. L'EDS vasculaire de type IV se caractérise par une peau fine, très pigmentée, fragile,

présentant de nombreux bleus, des cicatrices atrophiques et une fragilité tissulaire pouvant se traduire par des ruptures vasculaires et des perforations du colon (Tableau 5).

<b>Caractéristiques communes</b>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyper-extensibilité de la peau</li> <li>- Cicatrisation atrophique</li> <li>- Ecchymoses fréquentes</li> <li>- Hyper-mobilité articulaire</li> <li>- Fragilité du tissu conjonctif</li> </ul>				
<b>Type</b>		<b>Critères de diagnostic</b>	<b>Données biochimiques</b>	<b>Mode de transmission (Réf. OMIM)</b>
<b>EDS I</b>	Gravis type	Caractéristiques communes d'un EDS à un degré sévère		AD (13000)
<b>EDS II</b>	Mitis type	Caractéristiques communes d'un EDS à un degré modéré		AD (130010)
<b>EDS III</b>	Hypermobile	- Hyper-mobilité articulaire sévère - Hyper-extensibilité modérée de la peau		AD (130020)
<b>EDS IV</b>	Vasculaire	- Ecchymoses sévères - Hyper-pigmentation - Peau fine aux réseaux veineux visibles - Rupture vasculaire - Perforation du colon	Défaut du collagène III	Hétérogène AD/AR (130050)
<b>EDS V</b>	Lié à l'X	Caractéristiques communes d'un EDS à un degré modéré	Lié au chromosome X	LX (305200)
<b>EDS VI</b>	Oculaire sciolotique	- Caractéristiques communes d'un EDS à un degré sévère - Altérations oculaires (micro-cornée, détachement de la rétine, perforation sclérale)	Diminution de l'activité lysyl hydroxylase (VI-A) Activité lysyl hydroxylase normale (VI-B)	AR (225400)
<b>EDS VII</b>	Arthrochlasique	- Caractéristiques communes d'un EDS associées à une hyper-mobilité articulaire marquée - Stature courte - Micrognathie	Défaut structural de la chaîne pro $\alpha$ 1 de COL1 Défaut structural de la pro-chaîne $\alpha$ 2 de COL1	Hétérogène AD (130060)
<b>EDS VIII</b>	Périodontique	- Caractéristiques communes d'un EDS à un degré modéré - Périodontite sévère		AD (130080)
<b>EDS IX</b>	Vacant. Reclassifié « Maladie de Wilson » et anciennement « Syndrome de la cornée occipitale »			
<b>EDS X</b>	Lié à la fibronectine	- Caractéristiques communes d'un EDS associées à une texture cutanée normale - Pétéchie - Vergetures - Thrombocytose lié à la fibronectine	Défaut de la matrice de fibronectine	AR (225310)

**Tableau 5 :** Première nosologie des syndromes d'Ehlers-Danlos.



Les EDS de type V présentent les caractéristiques d'un EDS à un degré modéré et leur hérédité est liée au chromosome X. Les EDS de type VI, VII, VIII et X présentent également les symptômes généraux associés à l'EDS à des degrés modérés (VIII), sévères (EDS V), associés à une hyper-mobilité articulaire sévère (EDS VII) ou une texture cutanée normale (X). Par ailleurs les EDS VI, VII, VIII et X ont la particularité d'induire : (i) des altérations oculaires (EDS VI), (ii) une stature courte et une micrognathie (EDS VII), (iii) une périodontite sévère (EDS VIII), et (iv) une organisation moléculaire anormale de la fibronectine (EDS X) (Tableau 5).

En 1997, l'accumulation des données cliniques et les progrès technologiques ont permis une analyse plus poussée de l'aspect biochimique et moléculaire de l'EDS et ont conduit à une réforme de la nosologie établie précédemment. En plus de la prise en compte de l'aspect moléculaire de la maladie, cette nouvelle nosologie s'est basée sur une distinction de critères majeurs et mineurs pour diagnostiquer l'EDS. Les critères majeurs se définissent par leurs spécificités. Il s'agit de symptômes fréquemment associés à un type d'EDS et moins présents chez les individus sains ou les autres types d'EDS. Les critères mineurs sont eux moins spécifiques, leurs observations moins fréquentes mais permettent néanmoins de confirmer le diagnostic issu de la présence des caractéristiques majeures et de discriminer les différents types d'EDS. À cette caractérisation clinique s'ajoute une caractérisation génétique et moléculaire qui va permettre de confirmer le diagnostic préalablement établi à l'issue de l'analyse clinique (Beighton et al. 1998). Cette nouvelle nosologie subdivise le syndrome d'Ehlers-Danlos en 6 catégories que sont les EDS de type : (i) classique (EDSc), (ii) hypermobile, (iii) vasculaire (EDSv), (iv) cypho-scoliotique, (v) arthochalastique et (vi) dermatoparaxique (Tableau 6).

L'EDS classique regroupe les EDS de type I et II de la précédente nosologie qui, en plus d'avoir la même symptomatologie, partagent les mêmes origines génétiques à savoir des mutations sur *COL5A1* et *COL5A2*. En effet, les EDS I et II ne variaient que dans le degré de sévérité (Malfait et al. 2010). L'EDS hypermobile, anciennement de type III, se caractérise par une hyper-mobilité articulaire sévère et généralisée et par des défauts cutanés modérés (une peau à l'aspect velouté et/ou hyper-extensible). Les patients atteints de l'EDS vasculaire présentent une morphologie faciale caractéristique, une peau fine et translucide, une fragilité des tissus au niveau des gros vaisseaux sanguins, de l'intestin et de l'utérus pouvant entraîner la rupture de ceux-ci.

Type D'EDS	Critères majeurs	Critères mineurs	Bases moléculaires	MT	Ancienne nosologie
<b>Classique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyper-élasticité de la peau</li> <li>- Cicatrices larges et atrophiques</li> <li>- Hyper-mobilité articulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peau lisse et velouté</li> <li>- Pseudo-tumeurs molluscoïdes</li> <li>- Sphéroïdes sub-cutanées</li> <li>- Complications liées à l'hyper-mobilité articulaire (luxations, entorses, etc..)</li> <li>- Hypotonie musculaire</li> <li>- Ecchymoses fréquentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutations sur les gènes <i>COL5A1</i> et <i>COL5A2</i></li> <li>- Aspect « en chou-fleur » des fibres de collagènes en MET</li> </ul>	AD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- EDS I</li> <li>- EDS II</li> </ul>
<b>Hypermobile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anomalies de la peau (hyper-extensibilité et/ou peau lisse/ velouté)</li> <li>- Hyper-mobilité articulaire généralisée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dislocations récurrentes des articulations</li> <li>- Douleurs articulaires et/ou des membres</li> </ul>	<i>Inconnue à ce jour</i>	AD	EDS III
<b>Vasculaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peau fine et translucide</li> <li>- Fragilité et/ou rupture artérielle, intestinale et utérine</li> <li>- Morphologie faciale particulière</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acrogéria</li> <li>- Hyper-mobilité articulaire aux extrémités</li> <li>- Ruptures musculaires et tendineuses</li> <li>- Pied bot</li> <li>- Varices précoces</li> <li>- Récession gingivale</li> <li>- Pneumothorax</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutations sur le gène <i>COL3A1</i></li> <li>Production de collagène III présentant des défauts structuraux (défauts de sécrétion, thermo- stabilité modifiée, fort taux de modification post-traductionnelle, sensibilité aux protéases modifiée)</li> </ul>	AD	EDS IV
<b>Cypho-scoliotique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Laxité articulaire généralisée</li> <li>- Hypotonie musculaire aigüe à la naissance</li> <li>- Scoliose progressive</li> <li>- Fragilité sclérale</li> <li>- Rupture du globe oculaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cicatrices atrophiques</li> <li>- Ecchymoses fréquentes</li> <li>- Ruptures artérielles</li> <li>- Habitus marfanoïde</li> <li>- Micro-cornée</li> <li>- Ostéopénie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutations sur le gène <i>PLOD</i> codant pour une lysyl hydroxylase des collagènes</li> </ul>	AR	EDS VI
<b>Arthrochlasique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyper-mobilité articulaire aigüe</li> <li>- Luxations récurrentes</li> <li>- Luxations congénitales de la hanche</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyper-extensibilité de la peau</li> <li>- Cicatrices atrophiques</li> <li>- Ecchymoses fréquentes</li> <li>- Hypotonie musculaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutations de <i>COL1A1</i> ou <i>COL1A2</i> entraînant le saut de l'exon 6 et ainsi l'absence du clivage l'extrémité N-propeptide des pro-chaînes <math>\alpha 1(I)</math> ou <math>\alpha 2(I)</math></li> </ul>	AD	EDS VII
<b>Dermatoparaxique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fragilité cutanée aigüe</li> <li>- Peau flasque et pendante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peau lisse et velouté</li> <li>- Ecchymoses fréquentes</li> <li>- Hernies (ombilicales, inguinales)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutations sur le gène <i>ADAMTS2</i> causant un défaut de maturation du collagène I dû à une altération du clivage de l'extrémité N-propeptidique des pro-chaînes <math>\alpha 1(I)</math> ou <math>\alpha 2(I)</math></li> </ul>	AR	

**Tableau 6 :** Nouvelle nosologie du syndrome d'Ehlers-Danlos. MT, Mode de transmission ; AD, Autosomique Dominante ; AR, Autosomique récessive.

Il est associé à des mutations du gène *COL3A1* entraînant des défauts dans la synthèse et la formation des fibres de collagène III, ces altérations pouvant se produire au niveau de la synthèse, des modifications post-traductionnelles et de la stabilité de la protéine. Les critères de diagnostic des EDS cypho-scoliotique, arthrochalasique et dermatoparaxique sont décrits dans le Tableau 6.

Après révision de la nosologie, plusieurs types d'EDS ont été déclassifiés : L'EDS de type VIII dont les contours cliniques et génétiques sont restés flous ; les EDS de type V et X car leur origine génétique n'a pas pu être identifiée et ils n'ont été caractérisés que dans une seule famille; et enfin les EDS de type IX et XI, l'EDS IX correspondant maintenant à la maladie de Wilson (Beighton et al. 1988).

L'accumulation de nouvelles données sur les patients, et l'affinement des diagnostics, ont menées à l'organisation d'un symposium sur l'EDS qui s'est tenu en mai 2016 à New York avec pour objectif l'établissement d'une nouvelle classification des EDS et des protocoles de prise en charge des patients.

## II.1.2. Le syndrome d'Ehlers-Danlos de type classique (EDSc)

### II.1.2.1. Prévalence, diagnostic clinique et gènes candidats

Les 3 critères majeurs permettant de diagnostiquer un EDSc chez un patient sont : (i) une hyper-extensibilité de la peau, (ii) la présence de cicatrices atrophiques et (iii) une hyper-mobilité articulaire (Beighton et al. 1998; Malfait et al. 2010) (Tableau 6 et Figure 20). L'hyper-extensibilité de la peau est évaluée dans une zone neutre, de préférence la partie intérieure de l'avant-bras (Figure 20.a-d). L'évaluation s'effectue en pinçant et étirant la peau jusqu'au point de résistance. La peau d'un patient EDSc va s'étendre avec une faible résistance et reprendre rapidement sa forme initiale lorsque la pression est relâchée. En plus du caractère hyper-extensible, la peau d'un EDSc est le plus souvent lisse, à l'aspect soyeux, mais également fragile, ce qui se traduit par l'apparition fréquente d'ecchymoses (Figure 20.i-j) à la suite de faibles impacts, et généralement dans les zones du corps exposées tel que le tibia, le genou, le coude ou encore le front. Ces mêmes zones vont être aussi l'objet de blessures dont la cicatrisation va prendre plus de temps qu'habituellement. Ces blessures vont se résorber en des cicatrices atrophiques, caractère majeur d'un EDSc, qui sont larges, avec une texture de papier de cigarette (Figure 20.e-j). Dans un EDSc, la peau se caractérise également, dans certains cas, par la présence de nodules cutanés charnus et

arrondis appelés pseudo-tumeurs molluscoïdes (Figure 20.o-p), et/ou de petites calcifications nodulaires sous-cutanées et mobiles (sphéroïdes sous-cutanées), et/ou de petits nodules adipeux et indolores qui vont se former au niveau du talon (papules piérogéniques) (Figure 20.q) (Tableau 6).

L'hyper-mobilité articulaire d'un EDSc est évaluée selon l'échelle de Beighton (Beighton et al. 1998). Cet examen, réalisé lorsque l'enfant commence à marcher, permet d'évaluer la souplesse des articulations grâce à 5 tests précis au cours desquels on va évaluer :

- 1) La dorsiflexion passive de l'auriculaire : 1 point est attribué pour chaque main où l'auriculaire a une dorsiflexion de plus de 90° (Figure 20.k).
- 2) La dorsiflexion passive du pouce : 1 point est attribué pour chaque main où le pouce se fléchit au point de toucher l'avant-bras (Figure 20.l).
- 3) L'hyper-mobilité des coudes : 1 point étant attribué par coude pouvant se plier vers l'arrière à plus de 10° (Figure 20.m).
- 4) L'Hyper-mobilité des genoux : 1 point pour chaque articulation pouvant se plier à plus de 10° vers l'avant (Figure 20.n).
- 5) Une flexion du buste vers l'avant, debout jambe tendu : 1 point est attribué lorsque l'on est capable de toucher le sol avec la paume des mains.

L'hyper-mobilité articulaire est constatée lorsque l'individu atteint un score supérieur ou égale à 5 (évaluation réalisée sur les deux bras et les deux jambes). Ces défauts articulaires peuvent être associés à d'autres complications musculo-squelettiques telle qu'une fragilité articulaire qui va se traduire par des dislocations fréquentes touchant les épaules, les genoux ou les doigts. Il s'agit le plus souvent de luxations bénignes, bien que douloureuses, où l'articulation se remet en place de manière spontanée ou facilement par le patient lui-même. Ces dislocations peuvent être accompagnées de douleurs des articulations et/ou des membres.

La fragilité tissulaire peut également toucher d'autres organes. Ainsi les patients atteints d'un EDSc peuvent développer une hypotonie musculaire à la naissance pouvant entraîner un retard du développement moteur et des problèmes de mobilité. L'hypotonie musculaire observée chez les patients EDSc peut par la suite évoluer en une fatigue musculaire chronique et l'apparition de crampes. La fragilité des tissus peut également se traduire par le développement fréquent d'hernies de type inguinales, ombilicales, hiatales ou incisionnelles (Malfait et al. 2010).

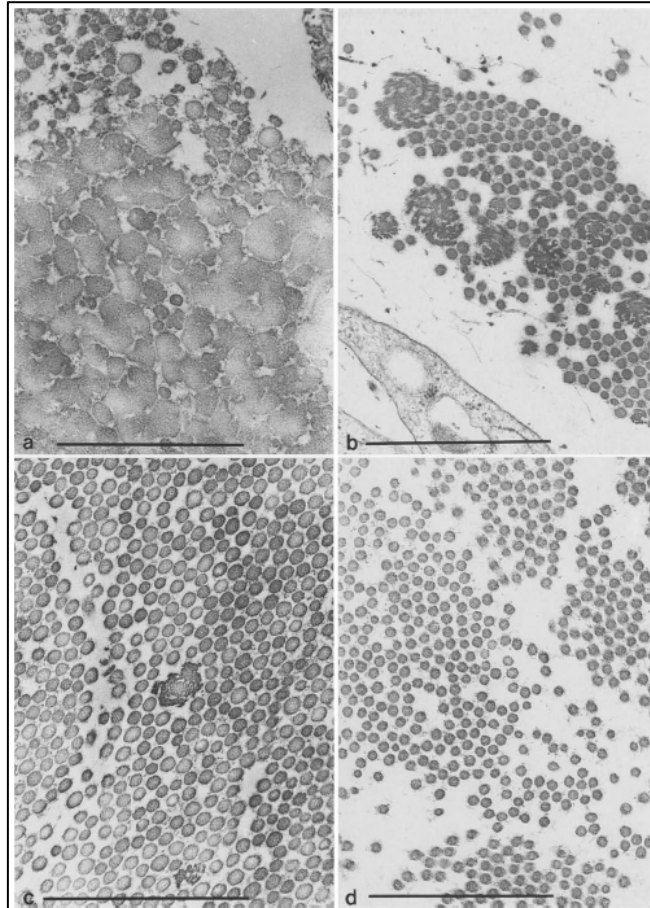
Dans quelques rares cas sévères, la fragilité tissulaire peut affecter les vaisseaux sanguins et se traduire notamment par une rupture artérielle, généralement associée à l'EDSv (causé exclusivement par des mutations sur *COL3A1*). Cette manifestation clinique a été observée dans 4 cas indépendants de patients porteurs de mutations sur *COL5A1* et présentant par ailleurs les signes cliniques d'un EDSv (Borck et al. 2010; Monroe et al. 2015).



**Figure 20** : Manifestations cliniques du Syndrome d'Ehlers-Danlos de type classique. **a-d)** hyper-extensibilité de la peau au niveau du cou, de l'avant-bras, du coude et du genou ; **e-h)** cicatrices atrophiques ; **i,j)** cicatrices atrophiques et ecchymoses chez un patient pédiatrique et adulte ; **k-n)** hyper-mobilité articulaire de l'auriculaire, du pouce, du coude et du genou ; **o,p)** pseudo-tumeurs molluscoïdes, **q)** papules piezogéniques (Ritelli et al. 2013).

Le diagnostic clinique doit par la suite être validé en laboratoire où va être effectuée une étude ultrastructurale des fibres de collagène par MET sur une biopsie de peau et

un dépistage des mutations, priorité étant donné aux gènes codant pour le collagène V. Il a été observé, chez les patients EDS<sub>c</sub>, une désorganisation des fibres de collagène se traduisant par des fibres au diamètre irrégulier et la présence de larges fibres à l'aspect dit en « chou-fleur » issues de la fusion de plusieurs fibres (Hausser & Anton-Lamprecht 1994) (Figure 21).



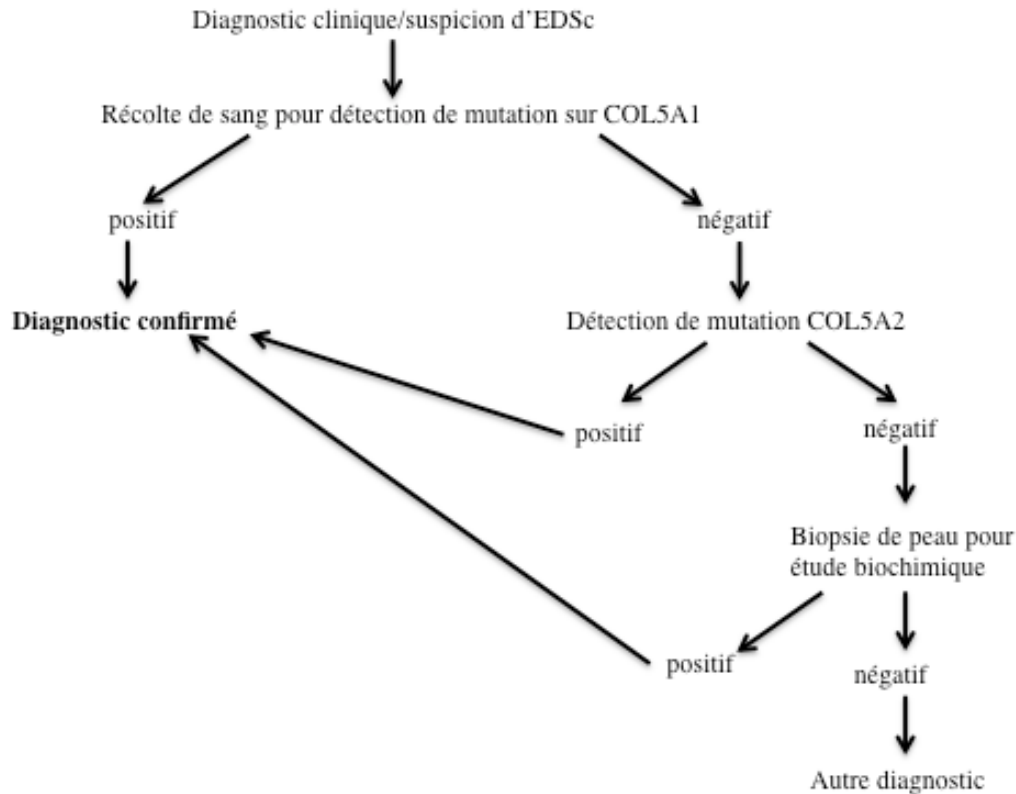
**Figure 21 :** Aspect ultrastructural des fibres de collagène issues de patients EDS observé par microscopie électronique à transmission. **a)** EDS de type I (EDS classique), **b)** EDS de type II (EDS classique), **c)** EDS de type III (hypermobile), **d)** EDS de type IV (vasculaire). Grossissement x50000 (Hausser & Anton-Lamprecht 1994).

L'aspect en chou-fleur des fibres de collagène n'est toutefois pas spécifique à l'EDS<sub>c</sub> car il peut également être observé dans d'autre type d'EDS comme l'EDS hypermobile (Figure 21.a-c).

Les fibres hétérotypiques de collagène présentes dans le derme sont issues de l'assemblage des collagènes fibrillaires I, III et V, le collagène de type I étant le composant majeur de ces fibres hétérotypiques. Le collagène V présent en plus faible proportion, essentiellement sous la forme de l'hétérotrimère  $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ , va avoir

un rôle prépondérant dans la nucléation et la régulation du diamètre des fibres hétérotypiques (Birk 2001b).

Le collagène V a longtemps été le seul collagène fibrillaire à ne pas être associé à une maladie génétique et a représenté dès lors un candidat potentiel pouvant expliquer l'EDSc. Les premiers indices suggérant une implication du collagène V dans la pathogénèse de l'EDSc sont venus de la caractérisation de souris porteuses d'une mutation structurale de la chaîne  $\alpha 2(V)$  qui présentent, à l'état homozygote pour la mutation, un phénotype typique d'un EDSc (Andrikopoulos et al. 1995). Le génotypage a été entrepris chez les patients EDSc et dans un premier temps *COL5A1* a été exclu des gènes candidats pour l'EDS II car aucune mutation sur ce gène n'avait été identifiée suite au génotypage de *COL5A1* par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) chez 41 membres, répartis sur 3 générations, d'une même famille dont certains ont développé un EDS II (Greenspan et al. 1995). Cependant, peu de temps après cette publication, un autre groupe démontra le lien entre la ségrégation d'un allèle de *COL5A1* et le développement d'un EDSc dans 3 grandes familles, faisant ainsi le lien entre la présence de cet allèle et l'apparition de la maladie (Loughlin et al. 1995). L'évolution des technologies de séquençage et de détection des mutations tend à montrer que, de nos jours, plus de 90% des cas d'EDSc serait associés à des mutations affectant le collagène V, parmi lesquelles sont retrouvées majoritairement des mutations conduisant à une haploinsuffisance de la chaîne  $\alpha 1(V)$  mais également des mutations structurales sur *COL5A1* et *COL5A2* (Symoens et al. 2012; Ritelli et al. 2013). À l'heure actuelle, il existe encore des patients EDSc pour lesquels la cause génétique n'a pas été identifiée. Cela peut-être expliqué par 2 raisons : l'absence de mutations sur les gènes du collagène V (mutations situés dans des régions non-codantes par exemple) d'une part, ou la présence de mutations EDSc affectant des gènes autres que *COL5A1* et *COL5A2*. Toutefois, seules les mutations du collagènes V, ont été associées avec une caractérisation clinique correspondant un EDSc strict (Symoens et al. 2012). De par ces informations, un plan de diagnostic a été mis en place. Il consiste premièrement en la caractérisation clinique des manifestations majeures et mineures associées à un EDSc (Tableau 6), qui lorsqu'elle permet de suspecter un EDSc, est suivi d'un séquençage des gènes *COL5A1* puis *COL5A2* afin de confirmer le diagnostic d'un EDSc (Figure 22) (De Paepe & Malfait 2012).



**Figure 22** : Logigramme de diagnostic du Syndrome d'Ehlers-Danlos classique (De Paepe & Malfait 2012).

À l'heure actuelle, la prévalence de l'EDSc est de 1/20000 en Europe (De Paepe & Malfait 2012).

#### II.1.2.2. Aspects moléculaires et cellulaires de l'EDSc

L'EDSc a été, dès la première nosologie, défini comme un syndrome héréditaire au mode de transmission autosomique dominant (Beighton et al. 1988). Après que le premier lien entre l'EDSc et le collagène V ait été établi par Loughlin et al. (1995), les 2 premières mutations identifiées chez des patients EDSc furent des mutations localisées dans la région codant pour le C-propeptide à savoir : une délétion de 4 pb au niveau d'une jonction intron-exon entraînant le saut de l'exon 65 et une mutation faux-sens occasionnant la substitution d'une cystéine conservée par un sérine (Wenstrup et al. 1996; De Paepe et al. 1997). Bien qu'aucune analyse quant aux effets sur la sécrétion du collagène V n'ait été réalisée, il a été supposé que ces 2 mutations impactaient la formation de l'hétérotrimère  $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ , entraînant ainsi une réduction de la quantité de collagène V qui participe à la formation des fibres hétérotypiques. Depuis, ce sont plus de 150 mutations différentes du collagène V qui ont été identifiées.



L'immense majorité des mutations vont affecter *COL5A1*. Il s'agit de mutations non-sens et de délétions décalant le cadre de lecture ou affectant un site d'épissage, qui vont conduire à l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'ARNm qui va rapidement être dégradé par la voie de dégradation des ARNm non-sens (Nonsense-Mediated Decay (NMD)) entraînant un haploinsuffisance du collagène V (Symoens et al. 2012; De Paepe & Malfait 2012).

Des mutations structurales de *COL5A2* et *COL5A1* conduisant à la formation d'une protéine tronquée sont également connues. Il s'agit de mutations faux-sens et de mutations affectant un site d'épissage entraînant des sauts d'exons n'affectant pas le cadre de lecture et des délétions de séquences génomiques qui vont affecter les différents domaines des chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ . Les mutations au niveau du peptide signal de la chaîne  $\alpha 1(V)$  vont altérer sa sécrétion dans l'espace extracellulaire et conduire également à une haploinsuffisance (Symoens et al. 2009). La pathogénèse et le devenir des molécules porteuses de mutations dans les autres domaines du collagène V, à savoir les domaines COL et le N-propeptide, sont moins clairs car elles n'interfèrent pas, à priori, sur la formation de l'hétérotrimère. Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer l'effet délétère de ces mutations : (i) la présence d'hétérotrimères tronqués perturberait les fonctions du collagène V dans la régulation de la formation des fibres hétérotypiques menant à leur désorganisation; (ii) Le collagène V mutant s'accumulerait dans le REG avant d'être dégradé par la machinerie UPR (« Unfolded Protein Response »), menant ainsi à une haploinsuffisance fonctionnelle du collagène V, comme c'est le cas de certaines pathologies associées à des mutations structurales des collagènes telles que l'ostéogénèse imparfaite et les chondrodysplasies (Chessler & Byers 1993; Boot-Handford & Briggs 2009; Symoens, Malfait, et al. 2011).

L'impact des mutations EDS<sub>C</sub> sur la quantité de procollagène retenue dans la cellule ou secrétée dans la MEC a été analysé dans 2 larges études portant sur 48 et 126 patients potentiellement atteints d'un EDS<sub>C</sub> à partir des fibroblastes dermiques des patients. Alors que des mutations sur *COL5A1* et *COL5A2* ont été identifiées dans 50% des cas dans la première études et 90% dans la seconde, une différence au niveau des bandes correspondantes aux chaînes de collagène V, après migration sur SDS-PAGE, n'a été observée que dans seulement 2/48 et 12/121 patients, pour lesquels on a observé une réduction dans la quantité de la chaîne  $\alpha 1(V)$  et la présence d'une bande  $\alpha 2(V)$  plus importante dans 1 cas. Ainsi les effets des mutations sur *COL5A1* et *COL5A2* associées

à un EDSc ne sont pas toujours visibles au niveau protéique par SDS-PAGE (Malfait et al. 2005; Symoens et al. 2012).

À l'inverse, l'observation par MET a permis d'effectuer une corrélation entre la présence d'un EDSc et l'aspect des fibres de collagène. En effet, une variabilité du diamètre des fibres hétérotypiques et la présence de fibres en chou-fleur ont été observées dans 20 patients EDSc sur 21. Cette même étude a permis d'observer la dilatation du REG suggérant une rétention du collagène V muté.

Au delà de ces informations, peu de données sont disponibles sur l'effet des mutations EDSc au niveau cellulaire. Une expérience de cicatrisation *in vitro* réalisée sur des fibroblastes issus de patients EDSc porteurs d'une mutation nulle sur un allèle *COL5A1*, a montré que les fibroblastes des patients avaient une capacité migratoire réduite par rapport à des fibroblastes issus de donneurs sains. L'addition dans le milieu de culture, de collagène V exogène permet de restaurer partiellement le défaut de recouvrement de la blessure suggérant un lien entre la présence de collagène V et la migration des fibroblastes (Viglio et al. 2008).

#### II.1.2.3. Relation génotype-phénotype dans le syndrome d'Ehlers-Danlos

Une analyse d'ensemble des différentes mutations du collagène V associées à un EDSc n'a pas permis d'établir une corrélation entre le génotype et le phénotype (De Paepe & Malfait 2012). Dans une étude réalisée sur 48 patients visant à comprendre les bases moléculaires de l'EDSc, aucune différence dans la sévérité de phénotype n'a été constatée entre les patients porteurs d'une mutation induisant une haploinsuffisance en collagène V et ceux porteurs de mutations structurales. De même, au sein des mutations nulles, aucune corrélation n'a été établie entre le degré de sévérité de l'EDSc et le niveau de diminution de l'expression de l'allèle mutant (Malfait et al. 2005). Néanmoins, il a été observé qu'un phénotype plus sévère était associé aux mutations affectant le N-propeptide, le C-propeptide et *COL5A2*. Toutefois, le faible nombre de cas décrit ne permet pas, à l'heure actuelle, de statuer définitivement sur la sévérité de l'EDS associée à ce type de mutation (Symoens et al. 2012; Ritelli et al. 2013).

À l'inverse, une relation génotype-phénotype a été établie dans d'autres pathologies associées aux collagènes fibrillaires I et III. Les mutations du collagène III sont connues pour induire l'EDS de type vasculaire (EDSv). Dans le but d'établir un lien entre le type de mutations et le phénotype des patients EDSv, différentes mutations

identifiées chez 146 patients ont été réparties dans 5 groupes : Les substitutions de résidus glycine (1), les insertion/délétion/duplication/défaut d'épissage (2), les mutations induisant une haploinsuffisance (3), les substitution de résidus hors glycine de la triple hélice (4) et les mutations sur les domaines N- ou C- terminaux (5). Il a ainsi été observé que les cas les plus sévères étaient associés aux groupes 1 et 2, les groupes 4-5 ne développant pas, par exemple, de complications digestives (Frank et al. 2015).

Les mutations haploinsuffisantes de *COL1A1* sont associées à un OI modéré et les mutations structurales sur *COL1A1*/*COL1A2* à un phénotype OI sévère. Le collagène I étant quantitativement l'un des principaux composant des fibres hétérotypiques, les propriétés de celles-ci sont donc directement impactées par la quantité de collagène I secrété dans la MEC. Ce ne serait donc pas le type ou la localisation des mutations sur le collagène V mais plutôt leurs effets sur les fonctions régulatrices de la fibrillogénèse, notamment dans la capacité du collagène V à interagir avec ses partenaires, qui serait l'élément déterminant de l'impact de ces mutations sur le phénotype observé chez le patient EDS<sub>C</sub> (Symoens et al. 2012; Bonod-Bidaud et al. 2012).

Une étude *in silico* portant sur l'effet de mutations EDS<sub>C</sub> sur l'interactome du collagène V a été réalisée dans le but d'établir une relation génotype-phénotype (Paladin et al. 2015). Pour ce faire, une modélisation de l'impact des mutations sur la structure de la triple hélice et sur l'interaction avec les partenaires du collagène V a été réalisée. Les données obtenues ont ensuite été couplées avec les informations sur le phénotype associé aux mutations du collagène V, d'une part, et de ses partenaires, d'autre part. Cette étude conclue que l'hétérogénéité phénotypique observée dans l'EDS<sub>C</sub> serait liée à l'effet variable des mutations sur 2 clusters de processus biologiques distincts : L'adhésion cellulaire et la réparation tissulaire d'un côté, et la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose, de l'autre. Bien qu'aucune confirmation *in situ* n'ait été fournie, ce modèle construit à partir d'analyses bio-informatiques et des nombreux syndromes associés aux mutations des partenaires identifiés du collagène V, souligne la nécessité de la prise en compte de l'effet des mutations sur les interactions mises en place par le collagène V dans la compréhension de la pathogénèse de l'EDS<sub>C</sub>. Cette étude ne tient pas en compte la partie N-propeptidique de la chaîne  $\alpha_1(V)$  qui persiste dans la molécule mature et pour lequel plusieurs interactants ont été identifiés par mon équipe et celle d'Anne de Paepe en Belgique (Symoens et al, 2010).

### II.1.3.Syndromes de type EDS<sub>c</sub> et/ou chevauchants non associés à des mutations sur *COL5A1* et *COL5A2*

Des mutations, sur des gènes autres que ceux de collagène V, ont été identifiées chez des patients ayant développés un syndrome de type EDS<sub>c</sub>. En 2000, une mutation sur *COL1A1* a été identifiée chez 2 patients indépendants qui présentaient les symptômes d'un EDS<sub>c</sub> (Nuytinck et al. 2000). De plus, plusieurs mutations sur des gènes de la MEC ont été identifiées chez des patients présentant un syndrome de type EDS<sub>c</sub>. Ainsi, des mutations sur le gène *TNXB* entraînant un déficit total de Ténascine-X (TN-X), ont été identifiées chez plusieurs patients présentant les caractéristiques majeurs d'un EDS<sub>c</sub> à l'exception des cicatrices atrophiques (Lindor & Bristow 2005). Une haploinsuffisance en TN-X a, quant à elle, été associée à un EDS hyper-mobile (Zweers et al. 2003). De même, des mutations sur *B3GALT6* codant pour la galactosyltransférase II, une enzyme participant à la formation des chaînes GAG des protéoglycanes, notamment les héparane sulfate, ont été identifiées chez des patients atteints d'un syndrome chevauchant correspondant à plusieurs EDS (classique, hypermobile et cypho-scoliotique) (Malfait et al. 2013).

Par ailleurs, plusieurs syndromes associés à des mutations de protéines de la MEC vont induire, chez les patients, des symptômes similaires à ceux observés chez les patients EDS<sub>c</sub>. De manière intéressante, ces syndromes chevauchants sont, dans la plupart des cas, associés à des mutations affectant des partenaires identifiés du collagène V comme le collagène I et VI (Symoens et al, 2010) ou la TN-X (Lethias et al. 2006).

Les mutations structurales affectant le domaine collagénique du collagène I sont généralement associées à une ostéogénèse imparfaite sévère. Ces mutations vont, dans la plupart des cas, affecter les résidus Glycine du triplet G-X-Y de la triple hélice. Toutefois, des mutations entraînant la substitution d'un résidu arginine en position X par une cystéine ont été identifiées chez des patients présentant un syndrome de type EDS<sub>c</sub> associé à des risques accrus de ruptures artérielles (Malfait et al. 2007) ou un phénotype chevauchant OI/EDS<sub>c</sub> (Cabral et al. 2005).

On retrouve également des symptômes associés à un EDS<sub>c</sub> dans les pathologies associées au collagène VI. Les mutations du collagène VI sont responsables de la dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich (UCMD) et de la myopathie de Bethlem (BM), 2 pathologies qui se caractérisent par une myopathie légère (BM) ou sévère

(UCMD) mais également une hyper-mobilité articulaire et des cicatrices atrophiques de type EDS<sub>c</sub> (Allamand et al. 2011). Une analyse ultrastructurale de la peau de patient UCMD a révélé une désorganisation des fibres de collagène et la présence de fibres en chou-fleur typiques des EDS classique et hypermobile (Kirschner et al. 2005).

De manière intéressante, le collagène VI n'est pas la seule protéine de la MEC dont les mutations sont associées à un syndrome chevauchant EDS/myopathie. La TN-X est une protéine modulaire qui interagit avec les collagènes I, V et VI et participe à la régulation de la fibrillogénèse (Minamitani et al. 2004). L'absence de TN-X liée à une mutation du gène *TNXB* est associée à une forme récessive d'EDS qui se caractérise par une peau fragile (ecchymoses fréquentes), hyperlaxe et une hyper-mobilité articulaire (typique d'un EDS<sub>c</sub>) mais également une hypotonie musculaire. Un syndrome similaire est observé chez les patients porteurs d'une mutation sur le collagène XII, un FACIT qui se fixe aux fibres de collagène, leur permettant ainsi notamment d'interagir avec d'autres composants dans la MEC dont la TN-X (Chiquet et al. 2014). Deux mutations sur *COL12A1*, une récessive et une dominante, ont été identifiées chez 3 patients de 2 familles différentes. Les 2 patients A1 et A2, issus d'une même famille, porteurs d'une mutation récessive présentent une hyperlaxité des membres distaux et une cyphose qui a, par la suite, évolué en une scoliose, caractéristique d'un EDS cypho-scoliotique. Ils présentent également une hypotonie musculaire et des contractures proximales associées normalement à des myopathies. Le 3<sup>ème</sup> patient a développé les mêmes symptômes à un degré moins sévère (Zou et al. 2014; Hicks et al. 2014).

## **II.2. Myopathies liées au collagène VI**

### **II.2.1. Le collagène VI**

Le collagène VI est un collagène qui n'appartient à aucune des sous-familles de la super famille des collagènes. Il adopte une structure supramoléculaire unique. Il s'agence, à la suite d'un assemblage en plusieurs étapes, en de microfilaments qui présentent un aspect perlé observable en MET.

Le collagène VI est exprimé de manière ubiquitaire. Il est retrouvé dans la MEC de différents tissus tel que la peau, les os, le cartilage, le tissu adipeux et les muscles où il joue un rôle d'une part structural et mécanique, et, d'autre part, sur les fonctions et l'intégrité cellulaire, en régulant notamment l'apoptose, la progression tumorale, la différenciation cellulaire et l'autophagie (Cescon et al. 2015).

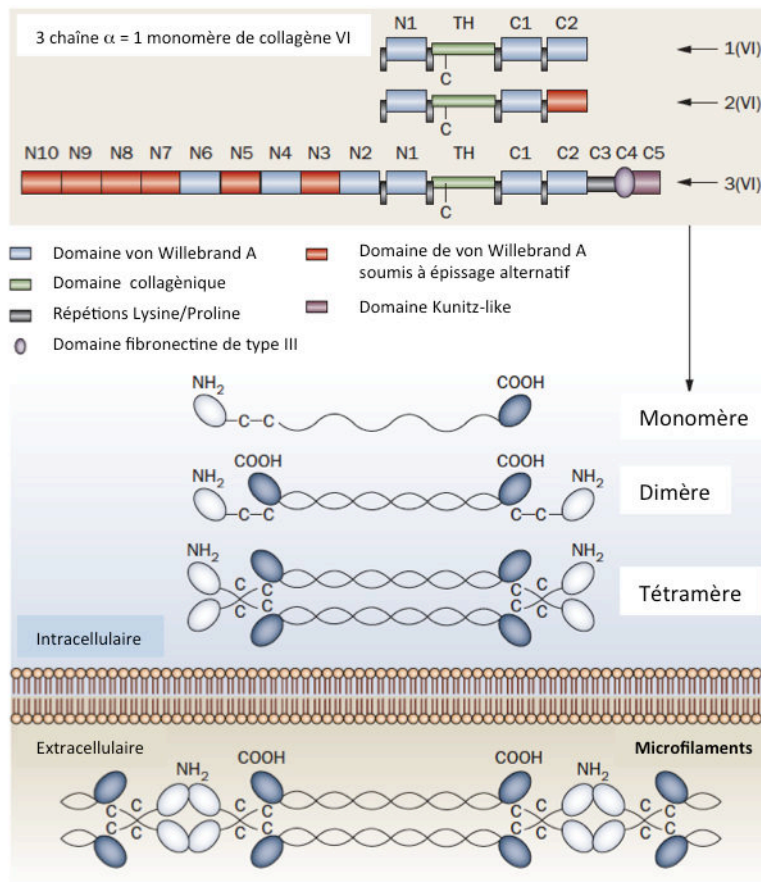
#### **II.2.1.1. Structure et assemblage**

Le collagène VI a tout d'abord été décrit comme comportant 3 chaînes  $\alpha 1(\text{VI})$ ,  $\alpha 2(\text{VI})$  et  $\alpha 3(\text{VI})$  codées respectivement par les gènes *COL6A1*, *COL6A2* et *COL6A3*.

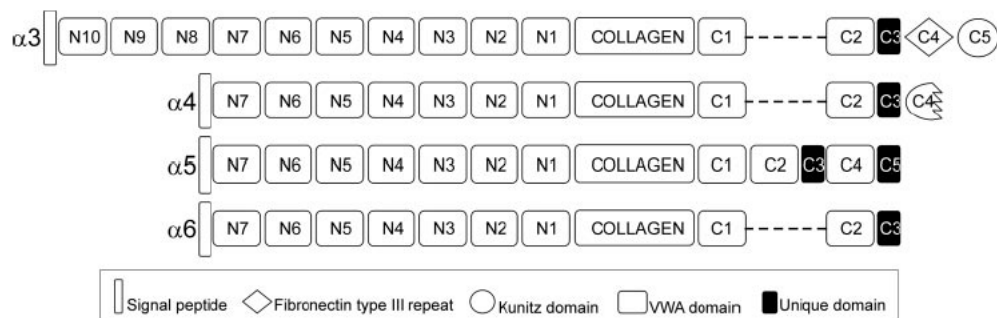
Le séquençage et l'analyse complet du génome humain a mené à la découverte tardive de 3 nouveaux gènes par homologie de séquence avec *COL6A3*. Il s'agit des gènes *COL6A4*, *COL6A5* et *COL6A6* codant pour les chaîne  $\alpha 4(\text{VI})$ ,  $\alpha 5(\text{VI})$  et  $\alpha 6(\text{VI})$  (Fitzgerald et al. 2008). Chez l'homme, le gène *COL6A4* est non fonctionnel à la suite d'une large inversion chromosomique. Le *COL6A5* avait été précédemment décrit à tort comme codant pour un nouveau collagène, le collagène XXIX (Söderhäll et al. 2007).

Toutes les chaînes de collagène VI partagent une même structure formée d'un court domaine collagénique unique (COL1) composé de 333 à 336 acides aminés. Ce domaine est flanqué par des extrémités N- et C-terminales globulaires. Les régions globulaires des chaînes du collagène VI sont constituées d'une répétition de domaines vWF-A (« facteur Von Willebrand de type A-like »), qui peut être soumis à un épissage alternatif (Figure 23). Les chaînes  $\alpha 1(\text{VI})$  et  $\alpha 2(\text{VI})$  contiennent 1 domaine vWF-A (N1) en N-terminal et 2 domaines vWF-A (C1 et C2) en C-terminal (Figure 23). La région N-terminale comprend jusqu'à 7 domaines vWF-A pour les chaînes  $\alpha 4(\text{VI})$ ,  $\alpha 5(\text{VI})$  et  $\alpha 6(\text{VI})$  et jusqu'à 10 pour la chaîne  $\alpha 3(\text{VI})$  (Figure 23).

A



B



**Figure 23** : Les chaînes du collagène VI, leur assemblage et organisation supramoléculaire. (A) Structures des chaînes  $\alpha 1(\text{VI})$ ,  $\alpha 2(\text{VI})$  et  $\alpha 3(\text{VI})$  et les différents étapes de formation des microfilaments de collagène VI. (B) Structure des chaînes  $\alpha 4(\text{VI})$ ,  $\alpha 5(\text{VI})$  et  $\alpha 6(\text{VI})$ . (Gara et al. 2008; Bönnemann 2011).

La région C-terminale des chaînes  $\alpha 3(\text{VI})$ ,  $\alpha 4(\text{VI})$  (sauf chez l'humain),  $\alpha 5(\text{VI})$  et  $\alpha 6(\text{VI})$ , comprend 2 domaines vWF-A (C1 et C2) suivis d'un domaine C3 riche en proline qui correspond au domaine C-terminal de la chaîne  $\alpha 6(\text{VI})$ . Dans la chaîne

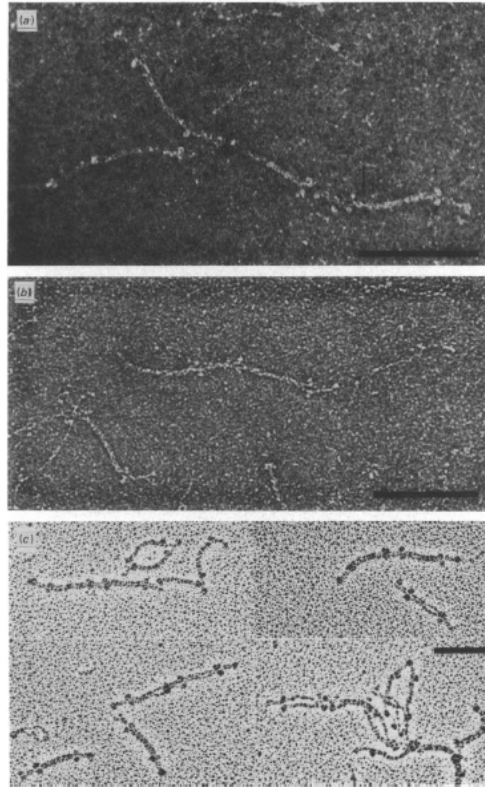
$\alpha 3(\text{VI})$ , le domaine C3 est suivi d'un domaine C4 qui correspond à un domaine fibronectine de type III (FNIII) et d'un domaine C5 qui correspond à un domaine de type Kunitz (Figure 23). La Région C-terminale de la chaîne  $\alpha 4(\text{VI})$  chez la souris est composée successivement d'un domaine C3 et d'un court domaine C4 de 17 résidus similaire à un domaine de type Kunitz partiel. La chaîne  $\alpha 6(\text{VI})$  possède un nouveau domaine vWF-A en C4 et un domaine de type Kuniz en C5 (Cescon et al. 2015).

Le collagène VI est retrouvé sous la forme d'un hétérotrimère issu de l'assemblage des chaînes  $\alpha 1(\text{VI})$  et  $\alpha 2(\text{VI})$  avec une troisième chaîne qui va être, en fonction des tissus, la chaîne  $\alpha 3(\text{VI})$ ,  $\alpha 5(\text{VI})$  ou  $\alpha 6(\text{VI})$  (Cescon et al. 2015). En absence de chaîne  $\alpha 1(\text{VI})$  chez les souris *Col6a1<sup>-/-</sup>*, le collagène VI n'est pas sécrété dans la MEC (Gara et al. 2008).

Comme évoqué en début de ce paragraphe, le collagène VI est retrouvé dans la MEC sous la forme de microfilaments perlés dont la synthèse se fait en plusieurs étapes.

Tout d'abord 3 chaînes de collagène VI,  $\alpha 1(\text{VI})$  et  $\alpha 2(\text{VI})$ , d'un côté, et  $\alpha 3(\text{VI})$ ,  $\alpha 5(\text{VI})$  ou  $\alpha 6(\text{VI})$ , de l'autre, s'assemblent. Cet assemblage va être réalisé à partir du domaine C1 qui permet l'association des 3 chaînes et la formation de la triple hélice de collagène stabilisée par des ponts hydrogènes inter-chaînes et des ponts disulfures (Colombatti et al. 1995). L'assemblage des 3 chaînes va ainsi former un monomère de collagène VI d'environ 500 kDa. Deux monomères vont ensuite s'agréger de manière antiparallèle pour former un dimère de collagène VI d'environ 1000 kDa (Figure 24 et Figure 23). Par la suite 2 dimères vont s'aligner parallèlement pour former un tétramère de 2000 kDa (Figure 24 et Figure 23). La liaison de 2 monomères en 1 dimère et des dimères en tétramère est stabilisée par la formation de ponts disulfure inter-chaînes (Furthmayr et al. 1983; Knupp et al. 2006). Ces premières étapes se déroulent intracellulairement. Puis, Le collagène VI est sécrété dans l'espace extracellulaire où les tétramères s'associent bout à bout pour former les microfilaments de collagène VI, qui se caractérisent en MET, par des filaments d'environ 4,5 nm de diamètre et perlés tout les 105 nm (Figure 24).





**Figure 24** : Observation de filaments perlés de collagène VI par microscopie électronique à transmission. Après (a-b) coloration négative (c) ombrage tournant (Furthmayr et al. 1983).

#### II.2.1.2. Fonctions et distribution tissulaire

Le collagène VI, de par sa structure, a des fonctions très variées tant sur le plan structural que fonctionnel et une implication dans de nombreux processus biologiques. Le collagène VI interagit avec de nombreuses protéines de la MEC parmi lesquelles les collagènes fibrillaires (collagènes I, II et V), les FACITs (collagène XIV), les collagènes de la membrane basale (collagène IV) (Bidanset et al. 1992; Brown et al. 1994; Kuo et al. 1997; Symoens, Renard, et al. 2011; Cescon et al. 2015), ainsi que des protéoglycanes comme le biglycan (Kuo et al. 1997), WARP (Hansen et al. 2012) et la décorine (Bidanset et al. 1992).

De même, le collagène VI interagit avec plusieurs récepteurs cellulaires parmi lesquels les intégrines  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  et avec NG2, un PG transmembranaire (Pfaff et al. 1993; Marcelino & McDevitt 1995; Doane et al. 1998; Tulla et al. 2001).

De par cette grande variété d'interactions que le collagène VI peut nouer avec les cellules, il exerce un rôle structural dans différents tissus tels que les muscles squelettiques, les tendons, les os et le cartilage. Il régule également un grand nombre de fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la survie, la différenciation et la

prolifération cellulaire. Ainsi il a été montré que le collagène VI est important pour l'attachement et l'intégrité des chondrocytes (Wu et al. 1987). De même l'endotrophine (ETP), un peptide issu du clivage du domaine C5 du collagène VI, stimulerait la progression tumorale dans le cancer du sein (Park & Scherer 2012).

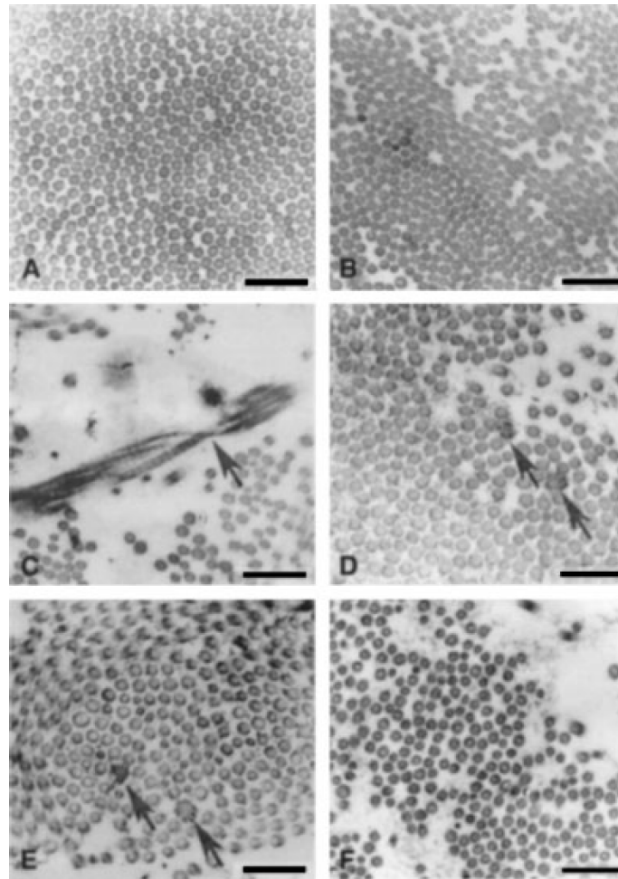
L'importance du collagène VI dans la régulation et l'homéostasie tissulaire est soulignée par les pathologies associées à une dérégulation du collagène VI. Ainsi, les mutations sur les gènes codant pour le collagène VI sont associées à des myopathies que sont la Myopathie de Bethlem (BM) (Jöbsis et al. 1996), la Dystrophie Musculaire Congénitale d'Ullrich (UCMD) (Vanegas et al. 2001) et les myoscléroses (MM) (Merlini et al. 2008). Comme en témoignent les myopathies associées aux mutations du collagène VI, celui-ci est un composant majeur de la MEC du tissu musculaire où il se localise à l'interface entre les fibres musculaires et la membrane basale sous-jacente (Kuo et al. 1997). Le collagène VI est sécrété dans le muscle par les fibroblastes interstitiels et son expression est contrôlée de façon paracrine par des facteurs, non encore identifiés, produit par les cellules musculaires (Braghetta et al. 2008; Zou et al. 2008). En plus de sa fonction d'ancrage des cellules musculaires sur la MEC, le collagène VI joue un rôle cytoprotecteur. L'étude des souris *Col6a1<sup>-/-</sup>* a montré que les cellules musculaires présentent un niveau élevé d'apoptose, associé à la présence d'organelles défectueux, dont les mitochondries, ainsi qu'une machinerie autophagique altérée, ne parvenant pas à dégrader ces organelles (Grumati et al. 2010). Le collagène VI est également un composant essentiel du stroma des niches de cellules souches musculaires. En effet, l'absence de collagène VI entraîne un défaut dans les capacités d'auto-renouvellement et de maintien des cellules souches (Urciuolo et al. 2013).

Le collagène VI joue également un rôle dans la régénération au niveau du système nerveux périphérique où l'absence du collagène VI, chez les souris *Col6a1<sup>-/-</sup>*, entraîne un retard de cette régénération. Ceci serait notamment dû à un défaut de polarisation et de migration des macrophages (Chen et al. 2014).

Le collagène VI joue aussi un rôle dans la formation du système nerveux périphérique. Il est produit par les cellules de Schwann et va réguler la myélinisation des axones. En effet, l'absence de collagène VI va induire une hyper-myélinisation associée à des défauts fonctionnels comme une altération de la coordination motrice (Chen et al. 2014).

Le collagène VI est également présent dans le système nerveux central où il est notamment produit par les cellules méningothéliales (Sievers et al. 1994). Le collagène VI y aurait un rôle cytoprotecteur. En effet, les cellules nerveuses en culture issues des souris *Col6a1<sup>-/-</sup>* sont plus sensibles au rayonnement UV et l'ajout de collagène VI exogène permet de diminuer l'apoptose induite par les UV (Cheng et al. 2009).

Enfin, le collagène VI régulerait le dépôt des molécules de la MEC. Il a notamment été montré sur des cultures de fibroblastes issus de souris *Col6a1<sup>-/-</sup>*, que l'absence de collagène VI entraînait une désorganisation du réseau de fibronectine (Sabatelli et al. 2001). Le collagène VI interagit notamment avec les collagènes fibrillaires I et V (Minamitani et al. 2004a; Symoens et al. 2011) et va réguler la fibrillogénèse. Le collagène VI promeut la cinétique de formation des fibres de collagène I *in vitro* (Minamitani et al. 2004a). En l'absence de collagène VI, la MEC produite par les fibroblastes du derme déficients en collagène VI est désorganisée, la densité des fibres de collagène est diminuée et elles sont plus épaisses (Theocharidis et al. 2016). L'importance du collagène VI peut être également appréciée *in vivo* notamment chez les patients UCMD. Le derme de ces patients présente une MEC désorganisée qui se traduit notamment par des torsions des fibres de collagène (Figure 25.c), une variabilité dans le diamètre et un aspect en chou-fleur de certaines fibres, caractéristique également retrouvée chez les patients EDS (Figure 25.d-e) (Kirschner et al. 2005).



**Figure 25** : Aspect ultrastructural des fibres de collagène du derme. (A) : donneur sain, (B) patient EDS hypermobile, (C-F) : 4 différents patients UCMD (Kirschner et al. 2005).

### II.2.2. Myopathies liées au collagène VI : UCMD/ BM

Comme indiqué plus haut, le collagène VI est un composant majeur du tissu conjonctif du tissu musculaire où on le retrouve principalement localisé au niveau de l'endomysium. Chez l'homme, les mutations sur les gènes du collagène VI sont associées à des myopathies héréditaires caractérisées à la fois par des défauts musculaires mais également par une désorganisation du tissu conjonctif. La dérégulation du collagène VI est la deuxième cause de myopathie la plus fréquente après les dystroglycanopathies. Les mutations affectant les gènes du collagène VI vont induire 2 myopathies : la myopathie de Bethlem (BM) et la Dystrophie Musculaire Congénital d'Ullrich (UCMD). Autrefois vues comme 2 pathologies distinctes, elles sont de plus en plus considérées comme les 2 extrémités d'une pathologie commune, le BM en étant le degré léger et l'UCMD la forme sévère (Allamand et al. 2011).

Des données statistiques montrent que l'UCMD a une prévalence de 0,13/100000 et BM 0,77/100000 au nord de l'Angleterre (Norwood et al. 2009).

#### II.2.2.1. Aspects cliniques et moléculaires

L'UCMD a été décrite en 1930 par Otto Ullrich comme étant une myopathie sévère au mode de transmission autosomique dominant et la BM en 1976 par Jaap Bethlem et George K. van Wijngaarden qui caractérisèrent une myopathie légère au mode de transmission autosomique récessive (Ullrich 1930; Bethlem & Wijngaarden 1976). Les 2 syndromes ont par la suite été liés à des mutations du collagène VI qui vont affecter les gènes *COL6A1*, *COL6A2* et *COL6A3*.

La BM est une myopathie de l'adulte car l'apparition des symptômes va intervenir tardivement à l'issue de la dixième ou vingtième année. Toutefois des signes avant-coureurs de la pathologie sont visibles dès le plus jeune âge. En effet, les patients BM vont avoir moins de mouvements prénataux. Ils présentent également, à la naissance, des torticolis congénitaux, une hypotonie musculaire qui entraîne un retard dans l'acquisition de la marche. Les contractures congénitales vont par la suite se résorber dans les premières 2 années suivant la naissance puis évoluer en une hyper-laxité articulaire (Jöbsis et al. 1996; Bönnemann 2011). L'évolution de la maladie se traduit par l'apparition de contractures qui vont d'abord toucher le tendon d'Achille et le coude (Figure 26.a-b). Les contractures vont progresser et atteindre les épaules, les poignets (Figure 26.d), les doigts et particulièrement le muscle fléchisseur rendant impossible une extension complète des doigts (Figure 26.c). La combinaison des contractures et de la faiblesse articulaire va causer des difficultés de mobilité chez les patients BM à l'âge adulte. Ainsi 2/3 des patients BM de plus de 50 ans auront besoin d'assistance pour se mouvoir (Jöbsis et al. 1996). Les patients BM ne vont pas développer de problème cardiaque, néanmoins ils présentent plus de risque d'atteintes pulmonaires pouvant entraîner une insuffisance respiratoire chronique restrictive, surtout si ces patients présentent également des risques d'apnée du sommeil (Bönnemann 2011).

L'UCMD conduit à des atteintes plus sévères et plus précoces que la myopathie de Bethlem. Les atteintes associées à un UCMD sont évidentes à la naissance. Tout comme pour la BM, l'UCMD est associé avec un défaut de mouvements prénataux. Les signes néonataux d'un UCMD sont une hypotonie musculaire pouvant être associée à un défaut de déglutition, une protrusion du calcaneum (Figure 26.g) et une hyper-laxité

articulaire particulièrement observable au niveau distale (poignets, doigts et chevilles) (Figure 26.i-k) (Bertini & Pepe 2002). Les enfants peuvent également présenter des contractures au niveau des coudes (Figure 26.h), des genoux, une déformation de la colonne vertébrale, une dislocation congénitale de la hanche et une cyphose transitoire.

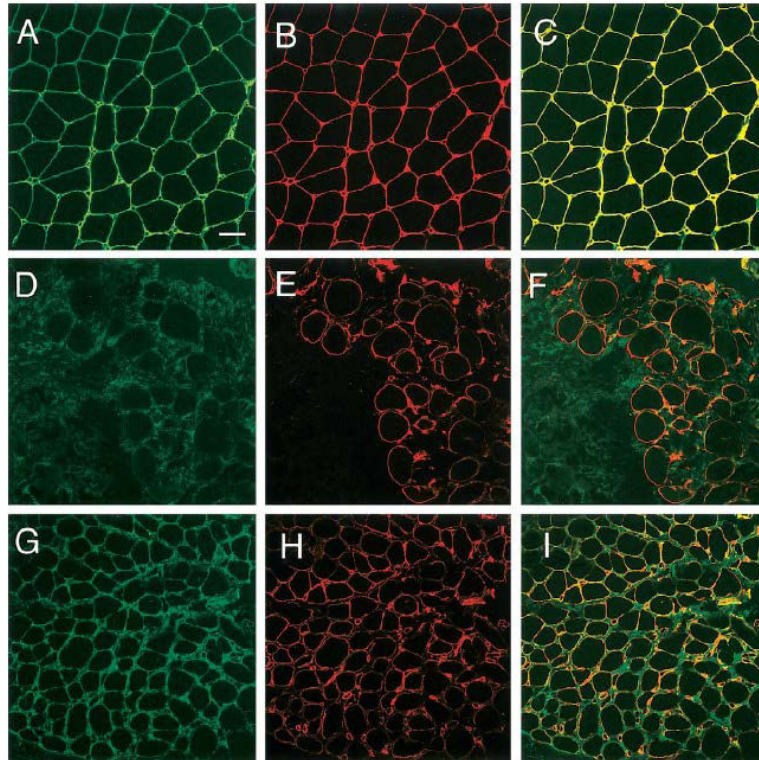


**Figure 26** : Manifestations cliniques de la myopathie de Bethlem et de la Dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich. Signes cliniques de la myopathie de Bethlem (A-E) : Des contractures des coudes (A), du tendon d'achille (B), des doigts (C) et poignets (D) ; Cicatrices keloïdes (E). Manifestation cliniques de la dystrophie congénitale d'Ullrich (F-K) : Cicatrices keloïdes (F), protrusion du calcanéum (G), contracture du coude (H), hyperlaxité articulaire au niveau de la cheville (I), des orteils (J) et des doigts (K) (Lampe & Bushby 2005).

La faiblesse musculaire va avoir une progression lente, l'évolution de la maladie se traduisant par l'apparition de contractures sévères en flexion des doigts, une raideur des tendons qui ne va cesser de s'aggraver même après les pertes des capacités motrices. L'UCMD entraîne également une rigidité spinale, une scoliose et une altération cutanée avec un aspect velouté de la peau au niveau des paumes et de la plante des pieds et des défauts de cicatrisation qui se traduisent notamment par la formation de cicatrices chéloïdes (Figure 26.f) (Lampe & Bushby 2005).

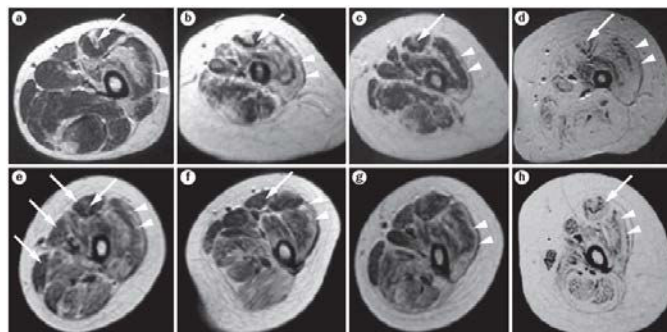
Les patients UCMD développent une insuffisance respiratoire dont les premiers symptômes peuvent intervenir avant la perte de la mobilité. Cette insuffisance respiratoire va être la cause de mortalité de la maladie après 20 ans (Bönnemann 2011).

Les observations des biopsies musculaires de patients évoluent au cours du temps et en fonction de la pathologie. Dans les biopsies issues de patients à un stade avancé de la maladie, on va observer des fibres musculaires en dégénérescence et/ou régénération alors que cette observation est beaucoup moins fréquente à un stade plus précoce où l'on peut néanmoins observer une légère atrophie des fibres musculaires (Schessler et al. 2008). La réalisation d'immuno-marquage du collagène VI, couplé notamment à l'utilisation de marqueurs de la membrane basale, est un bon outil de diagnostic des myopathies liées au collagène VI. En effet, le marquage du collagène VI sur des biopsies issues de patients porteurs de mutations récessives va révéler une forte diminution voir une disparition de l'immuno-réactivité associée au collagène VI. Les mutations dominantes vont, elles, avoir une forte immuno-réactivité du collagène VI mais ce marquage n'aura pas une localisation adéquate au niveau de la zone d'ancrage sur la membrane basale avec notamment une perte de co-localisation, à l'échelle de la microscopie optique, avec les marqueurs de la membrane basale tels que le collagène IV, les laminines ou le perlecan (Figure 27) (Pan et al. 2003). La mise en culture des fibroblastes issus des biopsies de peau des patients va également être un bon outil de diagnostic. En effet, on peut observer par immunofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre le collagène VI, une absence de collagène VI, une diminution de la quantité de collagène VI et/ou une désorganisation des filaments de collagènes VI dans la MEC synthétisé par les fibroblastes issus de patients (Baker et al. 2005).



**Figure 27** : Immunomarquage du collagène VI sur des biopsies musculaires. Immunomarquage du collagène VI (**vert**), du perlecan (**rouge**) et co-localisation (**jaune**) sur des biopsies du muscle issues d'un donneurs sain (**A-C**), d'un patient UCMD-1 (**D-F**) et UCMD-2 (**G-I**) (Pan et al. 2003).

De même, des analyses par IRM réalisées sur le muscle de la cuisse des patients BM et UCMD présentent une caractéristique particulière. Elles ont révélé que ce muscle présente une dégénérescence à la périphérie du muscle au niveau du fascia musculaire. De plus, le muscle droit fémoral présente un signal anormal correspondant à une infiltration du tissu gras en son centre à la fois chez les patients BM et UCMD (Figure 28) (Mercuri et al. 2005).



**Figure 28** : IRM des muscles de la cuisse de patients atteints de myopathies liées au collagène VI. IRM de patients UCMD (**a-d**) et BM (**e-h**) à des degrés de sévérité variés. Une infiltration de tissu adipeux est observée au centre du muscle droit fémoral (**flèches blanches**) et à la périphérie du muscle vaste latéral (**tête de flèches**). Ces observations sont également visibles chez les patients atteints de forme sévère (**d**) et (**h**) (Mercuri et al. 2005)



II.2.2.2. Relations génotype/phénotype et aspects moléculaires et cellulaires

À ce jour, tous les cas répertoriés de BM et UCMD sont associés à des mutations du collagène VI. Ces mutations vont affecter les gènes *COL6A1*, *COL6A2* et *COL6A3* aucune mutation n'ayant été identifiée sur les gènes *COL6A4*, *COL6A5* et *COL6A6* (Bönnemann 2011). Bien qu'ayant une origine génétique commune, la BM et l'UCMD ont longtemps été considérées comme deux pathologies distinctes, la BM étant une myopathie légère associée à des mutations dominantes et l'UCMD une myopathie plus sévère liée à des mutations récessives du collagène VI, suggérant qu'il s'agit plus un continuum dans la sévérité du phénotype que de deux pathologies distinctes (Allamand et al. 2011).

La caractérisation de cas d'UCMD causés par des mutations dominantes d'un côté et de BM liées à des mutations récessives ont conduit à une révision de la nosologie précédemment établie (Pan et al. 2003; Baker et al. 2005; Foley et al. 2009). Il apparaît même que dans les populations à faible taux de consanguinité, les mutations *de novo* dominantes sont les causes les plus communes de l'UCMD (Pan et al. 2003; Baker et al. 2005). Même si des cas engendrés par des mutations récessives ont été référencés, la BM reste, dans la plupart des cas, associée à des mutations dominantes (Merlini et al. 2008).

La pathogénèse des myopathies liées aux mutations du collagène VI va dépendre, d'une part, du type de mutation qui va permettre de déterminer leur caractère dominant ou récessif, et, d'autre part, par le domaine de la chaîne de collagène VI affecté par la mutation qui aura un impact sur la sévérité du phénotype.

Ainsi les mutations non-sens ou les mutations qui changent le cadre de lecture (modification de site d'épissage ou délétion) vont, dans la plupart des cas, être des mutations récessives. Ces mutations vont entraîner, à l'état homozygote, une absence complète de collagène VI dans la MEC du muscle et induire dans l'immense majorité des cas un UCMD (Lampe et al. 2008).

À l'opposé, les mutations non-sens ou les sauts d'exons ne modifiant pas le cadre de lecture, vont avoir un effet dominant et la sévérité du phénotype associé va dépendre du domaine affecté. Ainsi les mutations entraînant un saut d'exon au niveau de la région N-terminale globulaire sont associées à un UCMD. Ces mutations ne vont pas avoir d'effet sur la formation des monomères de collagène VI mais altérer la formation et l'intégrité des tétramères (Lampe et al. 2008). C'est le cas, par exemple, de la mutation entraînant le saut de l'exon 16 de la chaîne  $\alpha 3(\text{VI})$  qui est la mutation la plus

fréquemment identifiée chez les patients atteints d'un UCMD (Baker et al. 2005). À l'inverse, le même type de mutation localisée cette fois dans la région codante pour le domaine en triple hélice est associé à un phénotype moins sévère. Ainsi des mutations entraînant la perte de l'exon 14 de la chaîne  $\alpha 1(\text{VI})$  ont été identifiées chez plusieurs patients atteints de la BM (Pepe et al. 1999; Pepe et al. 2006; Lucioli et al. 2005).

De la même manière que les sauts d'exons n'affectant pas le cadre de lecture, les mutations faux-sens affectant les résidus Glycine du motif G-X-Y de la triple hélice ont un effet dominant négatif. Ces mutations qui entraînent une déstabilisation locale de la triple hélice, ont été identifiées à la fois chez des patients atteints d'un UCMD et d'une BM. L'impact de ces mutations, sur le phénotype du patient, dépend de la région de la triple hélice affectée par la mutations (Briñas et al. 2010; Pace et al. 2008).

Ainsi la relation génotype/phénotype peut être clairement évaluée pour les mutations évoquées ci-dessus, contrairement à l'EDSc. Néanmoins, il demeure des cas pour lesquels la pathogénèse reste encore floue. C'est le cas notamment des mutations faux-sens qui vont affecter les autres résidus de la triple hélice, leur caractère récessif ou dominant tout comme la sévérité du phénotype associé, sont pour l'heure difficile à prédire. De plus, près de 25% des patients diagnostiqués atteints de la BM ou d'une myopathie légère associée à des défauts de collagène VI, ne présentent aucune mutation sur les gènes codant pour le collagène VI. Cette proportion est moins forte chez les patients UCMD mais suggère une éventuelle hétérogénéité génétique dans les pathologies liées au collagène VI (Bönnemann 2011).

### **II.3. Cas d'une mutation de COL5A1 induisant un syndrome chevauchant EDSc/myopathie liée au collagène VI**

Comme indiqué plus haut, la forme classique du syndrome d'Ehlers-Danlos (EDSc) est associée dans 90% des cas à des mutations sur les gènes *COL5A1* et *COL5A2* codant pour le collagène V. Ces mutations affectent indifféremment les régions codant pour le domaine N-terminal, le domaine en triple hélice et l'extrémité C-terminale. L'EDSc est associé à des altérations cutanées, une peau hyper-extensible et des défauts de cicatrisation, ainsi qu'à des défauts articulaires, une hyper-laxité articulaire associée notamment à un risque accru de dislocation articulaire.

Les patients EDS<sub>c</sub> peuvent également montrer une hypotonie musculaire et les myopathies liées au collagène VI peuvent également présenter, en plus des symptômes musculaires, des altérations cutanées similaires à celles observées chez les patients EDS<sub>c</sub>. Ces tableaux cliniques montrent qu'un chevauchement entre les deux pathologies existe, même s'il n'est observé que très rarement.

Mon équipe d'accueil a un long historique sur l'étude des collagènes dans un contexte physiologique et pathologique. Elle a également acquis une grande expérience dans l'étude du collagène V au niveau structural, cellulaire et développemental et dans son implication dans la pathogenèse de l'EDS<sub>c</sub> (pour revues : Fichard et al, 1994 ; Fichard et al, 2003 ; Ricard-Blum et al, 2005 ; Ricard-Blum et Ruggiero, 2005; Bonod-Bidaud et Ruggiero, 2013). Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à une mutation particulière sur la région codant pour le domaine NC3 de la chaîne *COL5A1*. Contrairement aux autres mutations du collagène V identifiées à ce jour, cette mutation faux-sens qui change la sérine en position 254 en une leucine est responsable d'un syndrome chevauchant qui pourrait se caractériser par une symptomatologie se rapprochant de celle observée dans l'EDS<sub>c</sub>, d'une part, et dans les myopathies liées au collagène VI, d'autre part. En effet, le patient a présenté un délai dans l'acquisition de la marche et, au cours de sa deuxième décennie, a développé des contractures au niveau des coudes, poignets et genoux ainsi qu'une faiblesse musculaire. Un examen plus complet et réalisé par un deuxième médecin a redéfini ce premier tableau clinique initial par des défauts cutanés plus légers que ceux déclarés en première intention et des atteintes musculaires qui pourraient être plus d'origine neurologique que musculaires proprement dites (S. Lamandé, communication personnelle). De plus, cette mutation a la particularité de modifier le site de clivage de la chaîne  $\alpha 1(V)$  par la BMP-1. Afin de comprendre la pathogenèse de cette pathologie particulière décrite pour la première fois, j'ai étudié l'impact de cette mutation sur la maturation du collagène V et particulièrement sur le clivage du N-propeptide par la BMP-1 mais également l'effet de la mutation sur l'intégrité et les fonctions des fibroblastes du derme.

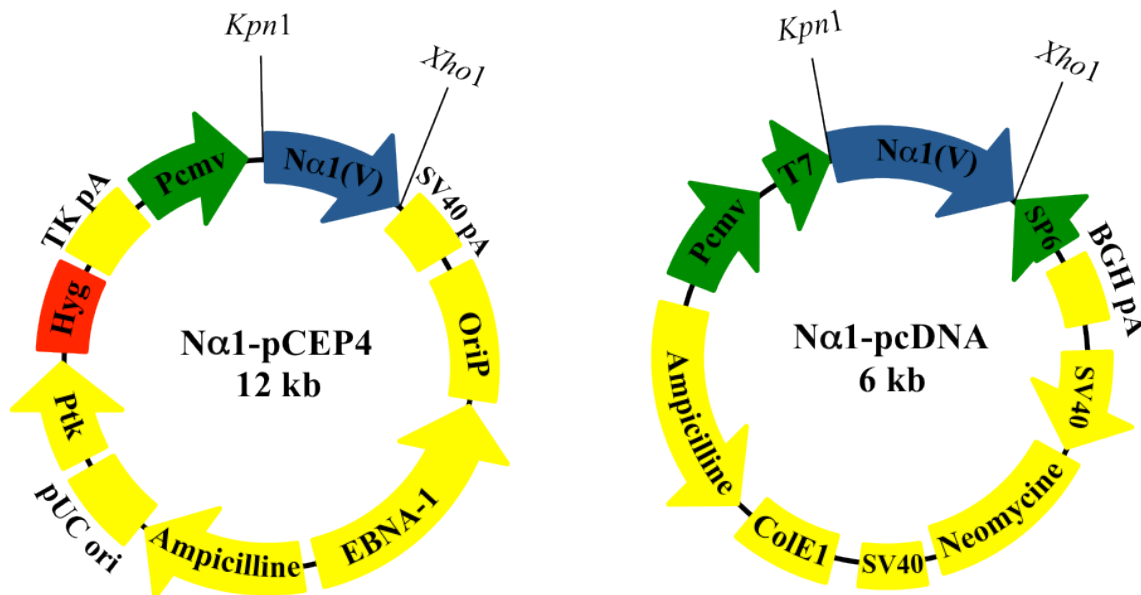
## **MATERIEL ET METHODES**

## Fiche Technique n°1 : Techniques de biologie moléculaire

### a. Clonage de N $\alpha$ 1 dans les plasmides pCEP4 et pCDNA

Le plasmide N $\alpha$ 1-pCEP4 a été construit précédemment au laboratoire (Voir illustration ci-dessous) (Bonod-Bidaud *et al.*, 2007). La séquence N $\alpha$ 1 a été obtenue à partir de la construction pro $\alpha$ 1(V)-pCEP4 (Fichard *et al.*, 1997) après double digestion *Xho*I/*Kpn*I suivie du sous-clonage de la séquence codante dans pCEP4 préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide N $\alpha$ 1-pCEP4 permet l'expression d'un peptide N $\alpha$ 1 contenant les domaines NC3, COL2 et NC2 ainsi que les 11 premiers triplets du domaines NC1 de la chaîne pro $\alpha$ 1(V) (Figure 12).

La séquence N $\alpha$ 1 a également été sous-clonée dans le plasmide pCDNA (Figure 29). N $\alpha$ 1 a été extrait de pCEP4 par double digestion *Xho*I/*Kpn*I, puis sa séquence clonée dans pCDNA préalablement linéarisé par double digestion *Xho*I/*Kpn*I.



**Figure 29** : Constructions N $\alpha$ 1-pCEP4 et N $\alpha$ 1-pcDNA. La séquence N $\alpha$ 1 est sous-clonée dans les plasmides pCEP4 et pcDNA après double digestion par les enzymes *Xho*I/*Kpn*I. La présence du promoteur Pcmv et des séquences de polyadénylation SV40 pA (pCEP4) et BGH pA (pcDNA) permettent la transcription et la traduction de N $\alpha$ 1. LA construction N $\alpha$ 1-pCEP4 a été utilisée pour la transfection semi-stable car elles possèdent la cassette EBNA-1 permettant la répllication épisomale du plasmide en cellules eucaryotes. Le gène Hyg (pCEP4) de résistance à l'Hygromycine a permis de sélectionner les cellules transfectées par la construction N $\alpha$ 1-pCEP4.

### b. Amplification et purification des plasmides

Transformation des bactéries compétentes XL1 Blue :

Dans un tube eppendorf de 1,5 ml préalablement refroidi dans la glace :

- Addition de 300 ng de plasmide à 50  $\mu$ l de bactéries compétentes

- Incubation 30 minutes dans la glace
- Choc thermique de 30 secondes à 42°C
- Incubation de 2 minutes dans la glace
- Addition de 500 µl de SOC medium (Sigma-Aldrich) préchauffé à 42°C
- Incubation de 1 heure à 37°C sous agitation à 220 rpm
- Etalement de l'ensemble de la solution sur 2 boîtes LB-Agar supplémentées d'ampicilline (0,1 mg/ml final) (Sigma-Aldrich) : 50 µl dans la boîte 1 et 450 µl restant dans la boîte 2.
- Incubation des bactéries 1 nuit à 37°C

Remarque : L'étalement sur boîte de l'ensemble de la solution permet de maximiser les chances de réussite de la transformation. Pour l'étape suivante, les colonies utilisées seront issues de la boîte présentant des colonies bien individualisées. En effet, dans le cas d'une transformation à fort rendement, la boîte 2 sera composée d'un tapis de colonies difficilement individualisables. Nous nous reporterons alors sur la boîte 1 ayant été inoculée avec moins de produit de la transformation.

Mini-préparation :

- Utilisation d'un cône de pipette P200/P20 pour :
  - Piquer une colonie de bactéries compétentes transformées
- ou
  - Tremper dans une solution de bactéries conservées à -80°C dans du glycérol
- Lancement d'une mini-culture bactérienne par transfert du cône dans 5 ml de milieu LB supplémenté d'ampicilline ou de carbenicilline (Euromedex) (0,1 mg/ml final)
- Incubation de 1 nuit à 37°C sous agitation à 220 rpm
- Utilisation de 3 ml de la miniculture bactérienne pour l'extraction du plasmide à l'aide du Kit « Nucleospin Plasmid » de Macherey Nagel

Remarque : L'élution final de l'ADN plasmidique se fait dans 20 µl de tampon d'élution AE (Tris-HCl 5 mM, pH 8,5)

- Dosage de l'ADN plasmidique au nanodrop
- Conservation du plasmide ainsi préparé à -20°C

Midi-préparation :

- Lancement d'une midi-culture après inoculation de 2 ml d'une mini-culture dans 250 ml de milieu LB supplémenté en ampicilline ou carbenicilline (0,1 mg/ml final)
- Incubation de 1 nuit à 37°C sous agitation à 220 rpm
- Mesure de la  $DO_{600nm}$  de la midi-culture
- Utilisation d'un volume de 400 ml/  $DO_{600nm}$  de la midi-culture pour l'extraction du plasmide à l'aide du kit « Nucleobond Xtra Midi/Maxi » de Macherey Nagel
- Resuspension de l'ADN plasmidique dans 500 µl d'H<sub>2</sub>O millipore autoclavée

Pour obtenir un plasmide utilisable pour la transfection de cellules eucaryotes, une précipitation supplémentaire au CH<sub>3</sub>COONa (Acétate de sodium) est effectuée. Pour ce faire, dans les 500 µl de suspension d'ADN plasmidique :

- Addition de 50 µl de CH<sub>3</sub>COONa 3M, pH 4,5 (1/ 10<sup>ème</sup> du volume du plasmide)
- Addition de 1,25 ml d'éthanol 100 % froid (2,5 volumes du plasmide)
- Vortex jusqu'à observation de la formation d'une méduse d'ADN
- Centrifugation de 15 minutes à 21000 g à 4°C
- Elimination du surnageant et resuspension de culot d'ADN plasmidique dans 100 µl d'H<sub>2</sub>O millipore autoclavée
- Dosage au nanodrop pour déterminer la concentration
- Conservation du plasmide ainsi préparé à -20°C

c. Mutagenèse dirigée

Toutes les mutations ont été introduites dans la construction Nα1-pcDNA et proα1(V)-pcDNA à l'aide du kit « QuickChange® Lightning site-directed mutagenesis kit » de Agilent Technologies.

Cette méthode utilise un plasmide contenant la séquence à muter comme matrice pour la mutagenèse. Le plasmide matrice va être répliqué par la *PfuUltra* high-fidelity (HF) ADN polymérase à l'aide d'amorces synthétiques dont la séquence possède la mutation d'intérêt. L'extension des amorces va générer un plasmide possédant la séquence porteuse de la mutation. Par la suite, une digestion à l'endonucléase *DpnI* va digérer le plasmide matrice et ainsi isoler le plasmide porteur de la séquence mutée.

Synthèse du brin mutant :

- Mélange réactionnel :
  - 5 µl de 10X réaction buffer
  - 10 ng de plasmide (Nα1-pcDNA ou proα1(V)-pcDNA)
  - 125 ng de l'amorce 5' (cf Tableau des oligonucléotides utilisés)
  - 125 ng de l'amorce 3' (cf Tableau des oligonucléotides utilisés)
  - 1 µl de dNTP mix
  - 3 µl de Quiksolution
  - Qsp 50 µl avec H<sub>2</sub>O millipore autoclavée
- Addition de 1 µl de *PfuUltra* HF DNA polymérase (2,5U/ µl)

Le mélange réactionnel est placé dans le thermocycler et l'ADN est amplifié selon le programme suivant :

Segment	Cycles	Température	Durée
1	1	95°C	1 minute
2	18	95°C	50 secondes
		60°C	50 secondes
		68°C	1 minute/ kb
3	1	68°C	7 minutes

Oligonucléotides utilisés :

Mutation	Amorce 5'	Amorce 3'
COL5A1-G475D	cgcctggcccagaagaccggcggttctcc	ggaagaccgcggggtcttctgggccaggcg
COL5A1-S254L	acctgacaccccacagttgcaggacc	gggtcctgcaactgtggggtgtcaggt
COL5A1-S254A	cctgacaccccacaggcgcaggaccccaatcc	ggattggggtcctgcgcctgtggggtgtcagg

Digestion du produit d'amplification par *DpnI* :

- Addition de 1 µl d'endonucléase *DpnI*
- Incubation de 1h à 37°C

Transformation des bactéries compétentes XL10-Gold :

Dans un tube polypropylène de 14 ml refroidi dans la glace

- Addition de 2 µl de β-ME mix dans 45 µl de bactéries compétentes
- Incubation de 10 minutes dans la glace en tapotant le mélange toutes les 2 minutes
- Addition de 2 µl d'ADN digéré par *DpnI* et agitation légère pour bien mélanger
- Incubation du mélange 30 minutes dans la glace
- Choc thermique de 30 secondes à 42°C
- Incubation de 2 minutes dans la glace
- Addition de 500 µl de SOC medium
- Incubation de 1 heure à 37°C sous agitation à 220 rpm
- Étalement de l'ensemble du volume dans 2 boîtes de LB-Agar supplémenté d'ampicilline (0,1 mg/ml final) (50 µl dans une boîte et 450 µl dans la deuxième)

Remarque : L'étalement sur boîte de l'ensemble du volume permet de maximiser les chances de réussite de la transformation. Pour l'étape suivante, les colonies utilisées seront issues de la boîte présentant les colonies les mieux individualisées. En effet, dans le cas d'une mutagenèse à fort rendement, la boîte 2 sera composée d'un tapis de colonies difficilement individualisable. Nous nous reporterons alors à la boîte 1 ayant été inoculé avec moins de produit de la transformation.

- Incubation des bactéries 1 nuit à 37°C

Les clones présents sur les boîtes LB-Agar ont théoriquement été transformés par le plasmide porteur de la mutation d'intérêt. Pour le confirmer, 4 colonies sont inoculées dans 5 ml de LB supplémenté avec de l'ampicilline (0,1 mg/ml final) pour amplification et purification du plasmide par minipréparation.

Séquençage des produits de la mutagenèse dirigée :

- Envoi de 20 µl du plasmide à séquencer (30-100 ng/µl) dans un tube eppendorf 1,5 ml
- Envoi de 20 µl d'oligonucléotides de séquençage à 10 mM dans un tube eppendorf 1,5 ml (cf. Tableau des oligonucléotides de séquençage)
- Le séquençage des plasmides issus de la mutagenèse est réalisé par la société GATC Biotech®

Oligonucléotides utilisés pour le séquençage :

Oligonucléotides	Localisation	Séquence
CMV-F	pCMV (pCEP4)	cgcaaatgggcggtaggcgtg
T7	T7 (pcDNA)	taatacgactcactataggg
GATC-mutalpha1V-251003	COL5A1 – domaine NC3	accaccaaattcctcgac
GATC-hCOL5A1Ex8-818665	COL5A1 – domaine NC3	gggagttcactgaggaaac
hNα1-REV	COL5A1 – domaine COL2	tcgaggacctgaggccccacgtctc
EBV-RP	OriP (pCEP4)	gtggttgtccaaactcatc
SP6	SP6 (pcDNA)	atttaggtgacactatagaa



d. Clonage des séquence pro $\alpha$ 1(V) et N $\alpha$ 1 mutant dans le plasmide pCEP4

Le plasmide pCEP4 (10kb) étant trop long pour faire la mutagenèse dirigée à l'aide du kit « QuickChange® II Lightning site-directed mutagenesis kit », la mutagenèse a été effectuée exclusivement dans les constructions N $\alpha$ 1-pcDNA et  $\alpha$ 1(V)-pcDNA. Les séquences pro $\alpha$ 1(V) et N $\alpha$ 1 mutés sont ensuite sous-clonées dans pCEP4 en vue de la production des protéines recombinantes.

Les enzymes de restriction et leurs tampons respectifs proviennent de Promega.

- Digestion par *XhoI*.

Elle va permettre dans le cas du plasmide pro $\alpha$ 1(V)-pcDNA la libération de la séquence pro $\alpha$ 1(V) ou l'ouverture du plasmide dans le cas de la construction N $\alpha$ 1-pcDNA

Dans un tube eppendorf de 1,5 ml

- 10  $\mu$ g de plasmide (N $\alpha$ 1-pcDNA ou  $\alpha$ 1(V)-pcDNA)
- 2  $\mu$ l de l'enzyme de restriction *XhoI*
- 5  $\mu$ l du tampon 10X associé à l'enzyme utilisée
- Qsp 50  $\mu$ l avec H<sub>2</sub>O millipore autoclavée
- Incubation de 1 heure à 37°C
- Purification du produit de la digestion à l'aide du kit « Nucleospin gel and PCR clean up » de Macherey Nagel

Remarque : L'éluat final du plasmide digéré se fait dans 20  $\mu$ l de tampon d'éluat NE (Tris-HCl 5mM, pH 8,5)

- Digestion par *KpnI* de N $\alpha$ 1-pcDNA préalablement digéré par *XhoI*

Dans un tube eppendorf de 1,5 ml

- 18  $\mu$ l de l'éluat issue de la purification du produit de la première digestion
- 2  $\mu$ l de l'enzyme de restriction *KpnI*
- 5  $\mu$ l du tampon 10X associé à l'enzyme utilisé
- Qsp 50  $\mu$ l avec H<sub>2</sub>O millipore autoclavée
- Incubation de 1 heure à 37°C

- Purification des séquences N $\alpha$ 1 et pro $\alpha$ 1(V)

- Ajout de 10  $\mu$ l de tampon de dépôt 6X (Thermo Scientific) au produit de la seconde digestion *KpnI*

Ou

- Ajout de 4  $\mu$ l de tampon de dépôt 6X (Thermo Scientific) au produit de la digestion de la construction pro $\alpha$ 1(V)-pcDNA par *XhoI*
- Migration du produit de digestion sur gel d'agarose 1% (supplémenté avec 20  $\mu$ l de bromure d'éthidium (Euromedex - 0,5mg/ml) pour 50 ml de gel)

Après une migration de 30 minutes à 100V

- Découpe de la bande correspondant à la séquence codante de N $\alpha$ 1
- Purification à l'aide du kit « Nucleospin gel and PCR clean up » de Macherey Nagel

Remarque : L'éluion final de la séquence codante de N $\alpha$ 1 se fait dans 20  $\mu$ l de tampon d'éluion NE (Tris-HCl 5mM, pH 8,5) – 2. Le plasmide pCEP4 a également été digéré suivant le même protocole.

- Ligation des séquences N $\alpha$ 1 ou pro $\alpha$ 1(V) mutés dans pCEP4 linéarisé (par digestion *XhoI* ou double-digestion *XhoI/KpnI*)

Dans un tube eppendorf de 1,5 ml

- 1  $\mu$ l de la séquence à cloner (N $\alpha$ 1 ou pro $\alpha$ 1( $\square$ ))
  - 5  $\mu$ l de pCEP4 linéarisé
  - 5  $\mu$ l du tampon 2X de la Quick ligase (Biolabs)
  - 1  $\mu$ l de Quick ligase (Biolabs)
  - incubation de 10 minutes à température ambiante
- Transformation du produit de ligation dans des bactéries compétentes XL-1 blue
  - Amplification et purification du produit de la ligation par mini-préparation
  - Séquençage du produit issu de la ligation (cf Fiche technique n°1-b.) afin de vérifier l'insertion en phase de la séquence codante de N $\alpha$ 1 dans pCEP4.

## **Fiche Technique n°2 : Techniques de biologie cellulaire**

### a. Entretien des cellules

Les Fph (fibroblastes de peau humaine) issus de donneurs sains ont été fournis par l'équipe du Dr Odile Damour, (Hôpital Edouard Herriot, Lyon) et proviennent de prélèvements de prépuces.

Les Fph issus du patient S254L porteur de la mutation dominante S254L sur le gène *COL5A1* ont été fournis par le laboratoire du Pr. Anne de Paepe (Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Ghent, Belgique).

Les Fph sont cultivés dans un milieu de culture composé de :

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) F-12 HAM (Sigma-Aldrich)
- SVF (Sérum de veau fœtal) (Dutscher) à 10% final
- Zell Shield™ (Minerva Biolabs) à 1x final

La lignée humaine de cellules embryonnaires de rein HEK-293EBNA a été utilisée pour la production recombinante de  $\alpha 1(V)$  et du peptide N $\alpha 1$  (sauvage et mutant) ainsi que pour l'étude de leur clivage par l'enzyme de maturation BMP-1. Les cellules HEK-293EBNA sont cultivées dans un milieu de culture composé de :

- DMEM (Sigma-Aldrich)
- SVF à 10% final
- Gentamycine (PAA) à 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  final

**Remarque :** Les cellules HEK-293EBNA transfectées de manière semi-stable sont cultivées dans un milieu de culture supplémenté en Hygromycine B (Calbiochem) à 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  final pour permettre la sélection des cellules porteuses du vecteur d'intérêt N $\alpha 1$ -pCEP4 (cf. Fiche technique n°1).

Au cours de l'entretien des cellules, les milieux de culture respectifs sont changés tous les 2 jours. Lorsque les cellules atteignent la confluence, elles sont décollées de la boîte par action de la trypsine (PAA) (à 0,25% final dans du PBS stérile (Sigma-Aldrich)) puis ensemencées dans de nouvelles boîtes de culture à une dilution au 1/5<sup>ème</sup> pour les cellules HEK-293 EBNA, et au 1/3<sup>ème</sup> pour les Fph.

### b. Transfection transitoire

Les constructions pCEP4,  $\alpha 1(V)$ -pCEP4 (sauvage et mutées), N $\alpha 1$ -pCEP4 (sauvage et mutées), GFP-pcDNA et BMP-1-PCEP4 ont été transfectées de manière transitoire dans des cellules HEK-293EBNA. Ces transfections nous ont permis d'étudier, *in cellulo*, l'impact des mutations du domaine N-propeptide de *COL5A1* sur le clivage du N-propeptide par l'enzyme de maturation BMP-1 (cf. Fiche technique n°5).

La transfection transitoire a été réalisée à l'aide du kit « Calcium Phosphate Transfection Kit » de Invitrogen. Cette méthode est basée sur la formation de précipités de phosphate de calcium-ADN qui permettent l'entrée de l'ADN dans la cellule par endocytose.

La transfection a été réalisée selon le protocole suivant :

- Ensemencement de  $1,5 \cdot 10^6$  de cellules HEK-293EBNA dans une boîte de culture 100 mm
- Incubation de 1 nuit à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Renouvellement du milieu de culture 2 heures avant la transfection
- Dans un tube eppendorf 1,5 ml, préparation du mix A avec :
  - 10 µg du plasmide 1 (Nα1-pCEP4, GFP-pcDNA ou pCEP4)
  - 10 µg du plasmide 2 (pCEP4 ou BMP-1-pCEP4)
  - 36 µl de CaCl<sub>2</sub> 2M
  - Qsp 300 µl avec de l'H<sub>2</sub>O stérile pour culture cellulaire
- Dans un tube eppendorf 1,5 ml, préparation du mix de transfection :
  - Addition de 300 µl de tampon HBS
  - Transfert goutte par goutte à l'aide d'une pipette P1000 des 300 µl du mix A
  - Mélange par formation de bulles d'air à l'aide d'une pipette P1000
  - Incubation de 30 minutes à température ambiante
- Addition du mix de transfection dans le milieu de culture des cellules à transfecter
- Incubation de 1 nuit à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>
- Retrait du milieu de culture
- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages rapides au dPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) stérile (Sigma-Aldrich)
- Addition de 5 ml de milieu sans sérum (DMEM, Gentamycine à 50 µg/ml final) supplémenté de vitamine C (Sigma-Aldrich) à 50 µg/ml final
- Incubation de 1 nuit à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>

Remarque : L'efficacité de la transfection est mesurée en observant au microscope à épifluorescence le taux de cellules HEK-293EBNA exprimant la GFP, dans des cellules transfectées avec la construction GFP-pcDNA.

### c. Transfection semi-stable

Les constructions α1(V)-pCEP4 et Nα1-PCEP4 (sauvages et mutées) ont été transfectées de manière semi-stable dans la lignée cellulaire HEK-293EBNA. Ces cellules expriment de manière constitutive la protéine EBNA-1 du virus d'Epstein-Barr qui permet la réplication épisomale du vecteur d'intérêt.

Les cellules ont été transfectées à l'aide d'un électroporateur (Biorad) selon le protocole suivant :

- Trypsination de cellules HEK-293EBNA issues de 2 boîtes de culture 100 mm confluentes
- Calcul de la concentration de la suspension cellulaire
- Centrifugation à température ambiante, 5 minutes à 400 g
- Elimination du surnageant et resuspension du culot de cellules dans 1 ml de dPBS stérile (Sigma-Aldrich)
- Centrifugation à température ambiante, 5 minutes à 400 g

- Elimination du surnageant et resuspension du culot de cellules dans un volume de dPBS stérile tel que [HEK-293EBNA] =  $8 \cdot 10^6$  cellules/ml
- Dans une cuvette d'électroporation pour cellules eucaryotes 0,4 mm (Molecular BioProducts) :
  - Addition de 750  $\mu$ l de la suspension de cellules (soit  $6 \cdot 10^6$  cellules)
  - Addition de 20  $\mu$ g d'ADN à transférer
  - Electroporation à 950  $\mu$ Faraday / 250 Volts / 13 millisecondes
  - Ensemencement du produit de l'électroporation dans une boîte de culture 100 mm avec 7 ml de milieu de culture

Remarque : Comme contrôle négatif de transfection, des cellules HEK-293EBNA ont été électroporées suivant le même protocole mais en absence d'ADN.

- Incubation de 1 nuit à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Sélection des cellules ayant incorporées l'ADN plasmidique :
  - Elimination du milieu de culture
  - Addition du milieu de sélection (milieu de culture supplémenté d'Hygromycine B (Calbiochem) à 250  $\mu$ g/ml final)
  - Renouvellement du milieu de sélection tous les 2 jours jusqu'à confluence
  - Ensemencement des cellules issues d'une boîte confluite dans une nouvelle boîte après dilution au 1/5<sup>ème</sup> dans du milieu de sélection
  - Renouvellement du milieu de sélection tous les 2 jours jusqu'à confluence
  - Répétition des 2 étapes précédentes jusqu'à la fin de la sélection

Remarque : L'étape de sélection s'achève lorsque toutes les cellules contrôles sont mortes.

L'expression de  $\alpha 1(V)$  ou du peptide N $\alpha 1$  (sauvages ou mutants) peut alors être testée (cf. Fiche technique n°8).

#### d. Conservation des cellules

Les cultures primaires Fph et les lignées cellulaires utilisées sont conservées dans un milieu de congélation puis placées dans l'azote liquide. La congélation s'effectue selon le protocole suivant :

À partir d'une boîte 100 mm de culture de cellules confluentes :

- 3 rinçages rapides avec 5 ml de dPBS stérile (Sigma-Aldrich)
- 2 ml de trypsine (PAA) à 0,25% final dans du dPBS stérile
- Incubation de 5 minutes à température ambiante
- Resuspension des cellules dans 8 ml de milieu de culture et transfert dans un Falcon 50 ml
- Centrifugation à température ambiante, 5 minutes à 400 g
- Elimination du surnageant et resuspension du culot dans 10 ml de dPBS stérile
- Centrifugation à température ambiante, 5 minutes à 400 g
- Elimination du surnageant
- Resuspension du culot de cellules dans 1 ml de milieu de congélation (DMEM F-12 HAM, SVF à 20% final, DMSO (Diméthyl Sulfoxyde) (Sigma-Aldrich) à 10% final)

- Transfert de la suspension dans une ampoule de congélation de 2 ml
- Incubation de 3 jours à -80°C
- Conservation dans l'Azote liquide jusqu'à utilisation

Pour la décongélation :

- Prélèvement de l'ampoule de cellules à décongeler
- Incubation de 30 secondes à 37°C
- Addition de 1 ml de milieu de culture
- Transfert de la suspension de cellules dans un Falcon 50 ml contenant 8 ml de milieu de culture
- Centrifugation à température ambiante, 5 minutes à 400 g
- Elimination du surnageant
- Resuspension du culot de cellules avec 10 ml de milieu de culture
- Transfert de la suspension dans une boîte de culture 100 mm
- Incubation de 1 nuit à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>

## **Fiche technique n°3 : Microscopie électronique à transmission sur cellules en culture**

Une étude de l'ultrastructure des fibroblastes issus de donneurs sains, du patient S254L et de patients EDS<sub>c</sub> (G475D et G530S) a été réalisée par microscopie électronique à transmission.

### a. Culture Cellulaire

Les Fph sont cultivés dans un milieu de culture composé de :

- DMEM F-12 HAM (Sigma-Aldrich)
- SVF (Dutscher) à 10% final
- Zell Shield™ (Minerva Biolabs) à 1x final

et selon le protocole suivant :

Dans une boîte de culture de 60 mm de diamètre :

- Ensemencement de  $1 \cdot 10^5$  cellules
- Incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence

Remarque : Le milieu de culture est changé tous les 2 jours jusqu'à confluence.

Une fois les cellules à confluence

- Elimination du milieu de culture
- Addition de milieu de culture enrichi en vitamine C (Sigma-Aldrich) à 50 µg/ml final
- Renouvellement du milieu de culture enrichi en vitamine C tous les 2 jours pendant 5 jours

Remarque : La vitamine C est un co-facteur permettant l'hydroxylation des résidus proline et lysine. Elle va ainsi favoriser la stabilité de la triple hélice collagénique.

### b. Inclusion et coupes ultrafines

Sauf précision, toutes les dilutions et solutions ont été faites dans de l'eau distillée.

Sur une boîte de culture de cellules confluentes et traitée à la vitamine C :

- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages rapides dans 1 ml de Cacodylate de sodium (Sigma-Aldrich) à 0,1M final
- Fixation, 1 heure à température ambiante, dans une solution de Cacodylate de sodium à 0,1M final, glutéraldéhyde (EMS (Electron Microscopy Sciences)) à 2% final, paraformaldéhyde (EMS) à 2% final
- 3 rinçages de 5 minutes dans 1 ml de Cacodylate de sodium à 0,1M final
- Post-fixation, 45 minutes à température ambiante, dans 1 ml de solution de Cacodylate de sodium à 0,1M final, OsO<sub>4</sub> (Tétroxyde d'Osmium) (EMS) à 2% final

- Déshydratation par incubations successives de :
  - 5 minutes dans de l'éthanol 30 %
  - 5 minutes dans de l'éthanol 50 %
  - 5 minutes dans de l'éthanol 70 %
  - 5 minutes dans de l'éthanol 80 %
  - 5 minutes dans de l'éthanol 95 %
  - 5 minutes dans de l'éthanol 100 %
- Substitution, 1 heure à température ambiante, dans un mélange 1:1 d'éthanol 100 et de Résine époxy
- Imprégnation, 1 heure à température ambiante, dans une solution de résine époxy supplémentée de BDMA (benzyle diméthylamine) (Sigma-Aldrich) à 1,7% final

Remarque : La résine époxy utilisée est composée d'un mélange 1:1 d'Epon™ A et d'Epon™ B (fourni par le CTμ (Centre Technologique des Microstructures)). Le BDMA, ajouté à la résine époxy, va permettre d'accélérer sa polymérisation.

- Elimination de la résine époxy
- Nouvelle incubation de 1 heure dans la résine époxy supplémentée de BDMA à 1,7% final
- Inclusion à l'aide de gélules remplies de résine époxy et retournées à la surface des cellules
- Incubation de 1 nuit à 56°C
- Décollement des gélules
- Incubation de 72 heures à 56°C

Remarque : L'incubation à 56°C permet la polymérisation de la résine époxy. À l'issue de l'inclusion, les gélules sont conservées à l'abri de la poussière et à température ambiante.

Des coupes ultra-fines, de moins de 100 nm, des échantillons sont réalisées à partir de la couche cellulaire incluse dans la résine. Les coupes ultra-fines sont récoltées sur des grilles de cuivre adsorbées de Formvar-carbone (fourni par le CTμ).

Remarque : Les coupes ultra-fines de nos échantillons sont conservées sur des papiers filtres dans des boîtes de Pétri à température ambiante jusqu'à l'étape de contraste.

#### c. Contraste à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb

Un contraste de nos échantillons est effectué par coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Cette méthode de contraste repose sur l'addition de métaux lourds dont les ions positifs vont former des liens ioniques avec les charges négatives des macromolécules. La densité élevée des métaux lourds empêche le passage des électrons offrant ainsi un contraste plus fort en microscopie électronique. Nous avons choisi de combiner une coloration à l'acétate d'uranyle, qui va marquer les nucléoprotéines, avec une coloration au citrate de plomb, qui marque les membranes plasmiques et les membranes des divers organites cellulaires.



- Contraste à l'acétate d'uranyle selon le protocole suivant :
  - Répartition de 2 ml d'acétate d'uranyle saturé (soit 7% final dans de l'alcool méthylique absolu), préalablement filtré, dans une salière
  - Dépôt des grilles à contraster dans la salière, côté coupes vers le haut
  - Incubation de 10 minutes dans l'obscurité et à l'abri de la chaleur
  - Rinçage de chaque grille dans trois piluliers contenant de l'alcool méthylique absolu

Remarque : Au cours des rinçages, les grilles, saisies à la pince fine, doivent "couper" la surface du liquide une trentaine de fois dans chaque pilulier. Entre chaque bain, l'excès de liquide est absorbé entre les mors de la pince à l'aide d'un papier filtre.

- Séchage des grilles, coupes vers le haut, sur un papier filtre dans une boîte de Pétri

Le contraste au citrate de plomb a lieu après le séchage. Il se fait dans une boîte de Pétri dans laquelle sont disposés, un godet d'aluminium rempli de pastilles de soude (pour absorber le gaz carbonique de l'air) sur une moitié et un carré de parafilm sur l'autre moitié de la boîte.

- Contraste au citrate de plomb, sur le carré de parafilm :
  - Dépôt d'une goutte de citrate de plomb ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Nitrate de plomb) à 0,08M final,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  (Citrate de Sodium) à 0,13M final, NaOH (Hydroxyde de sodium) à 0,36N)
  - Dépôt des grilles sur les gouttes de citrate de plomb, côté coupes contre les gouttes
  - Incubation de 10 minutes

Remarque : Durant le contraste, la boîte de Pétri est refermée pour limiter le contact avec le gaz carbonique expiré qui entraîne la formation de précipités de carbonate de sodium.

- Rinçages de chaque grille dans une solution de NaOH 0,02N puis dans 3 bains successifs d'eau distillée

Remarque : Au cours des rinçages, les grilles, saisies à la pince fine, doivent "couper" la surface du liquide une trentaine de fois dans chaque pilulier. Entre chaque bain, l'excès de liquide est absorbé entre les mors de la pince à l'aide d'un papier filtre.

- Séchage des grilles, coupes vers le haut, sur un papier filtre dans une boîte de Pétri

Les grilles sont conservées sur un papier filtre dans une boîte de Pétri jusqu'à observation.

L'observation est effectuée au Microscope électronique à transmission Philips CM120.

## **Fiche technique n°4 : Étude *in cellulo* du clivage de $\alpha 1(V)$ et de $N\alpha 1(V)$ par l'enzyme BMP-1**

L'effet de la mutation S254L, et d'une mutation EDS<sub>C</sub> (G475D), sur le clivage du N-propeptide de la pro-chaîne  $\alpha 1$  du collagène V par l'enzyme BMP-1 a été étudié *in cellulo* (Bonod *et al.*, 2007) dans les cellules HEK-293EBNA à l'aide des constructions  $N\alpha 1$ -pCEP4 (sauvage et mutées), pro $\alpha 1(V)$ -pCEP4 (sauvage et mutées) (cf. Fiche technique n°1) et BMP-1-pCEP4 permettant l'expression de BMP-1 (Bone Morphogenetic Protein 1).

Les cellules, ainsi transfectées, vont secrétées dans le milieu de culture, le peptide  $N\alpha 1$  ou l'homotrimère [ $\alpha 1(V)$ ]<sub>3</sub> issu de l'assemblage de 3 chaînes pro $\alpha 1(V)$ .

Le clivage du N-propeptide est évalué par Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre le domaine TSPN libéré après le clivage par la BMP-1 (Figure 13).

### a. Clivage *in cellulo*

L'étude du clivage *in cellulo* est réalisé dans des cellules HEK-293EBNA ensemencées dans des boîtes de culture 100 mm selon le protocole suivant :

- Co-transfection de la construction  $N\alpha 1$ -pCEP4 ou pro $\alpha 1(V)$ -pCEP4 (sauvages ou mutées) avec la construction BMP-1-pCEP4 ou pCEP4 vide (cf. Fiche technique n°2.b)

Remarque : Le clivage *in cellulo* a également été étudié par transfection des constructions  $N\alpha 1$ -pCEP4 et pro $\alpha 1(V)$ -pCEP4, sauvage et mutantes, dans des cellules HEK-293EBNA préalablement transfectées de manière semi-stable avec la construction BMP-1-pCEP4.

Sur une boîte de culture 100 mm de cellules transfectées :

- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages au dPBS (Sigma-Aldrich) stérile
- Addition de 5 ml de milieu sans sérum (DMEM (Sigma-Aldrich), Gentamycine (PAA) à 50  $\mu$ g/ml final) supplémenté en vitamine C (Sigma-Aldrich) à 50  $\mu$ g/ml

Remarque : La vitamine C est un co-facteur permettant l'hydroxylation des résidus proline et lysine. Elle va ainsi favoriser la stabilité de la triple hélice collagénique.

- Incubation de 1 nuit à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>
- Récolte du surnageant de culture
- Centrifugation de 5 minutes à 400 g pour éliminer les débris cellulaires
- Répartition du surnageant en aliquot de 1 ml dans des tubes eppendorf 1,5 ml
- Conservation du surnageant ainsi conditionné à -20°C jusqu'à l'étape de précipitation

b. Préparation des échantillons protéiques - précipitation au TCA

- Décongélation de 1 ml de surnageant de culture obtenu comme décrit précédemment
- Addition de 100 µl de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 1%
- Addition de 140 µl de TCA (Acide TriChloracétique) (Sigma-Aldrich) 6,1N
- Mélange en inversant 8 fois le tube eppendorf
- Incubation de 20 minutes dans la glace
- Centrifugation de 20 minutes à 19000 g à 4°C
- Elimination du surnageant
- Addition de 1 ml d'éthanol absolu froid (Millipore)
- Centrifugation de 10 minutes à 19000 g à 4°C
- Elimination du surnageant
- Addition de 1 ml d'éthanol absolu froid
- Centrifugation de 10 minutes à 19000 g à 4°C
- Addition de 1 ml d'acétone froid (Merck)
- Centrifugation de 10 minutes à 19000 g à 4°C
- Elimination du surnageant
- Séchage du culot, 15 minutes à température ambiante
- Resuspension du culot dans 20 µl de solution de dépôt Laemmli 1X (62,5 mM final de Tris-HCl pH 6,8 ; Glycérol à 5% final ; SDS à 1% final ; Bleu de bromophénol à 0,1% final) supplémentée en DTT (Dithiothréitol) à 10 mM final

Remarque : Les échantillons sont conservés dans le Laemmli 1X supplémenté en DTT à -20°C jusqu'au dépôt sur gel.

c. Western blot

Sauf précision, l'ensemble des solutions et tampons utilisés a été réalisé dans de l'eau distillée.

- Incubation des échantillons, 5 minutes à 95°C
- Dépôt des échantillons sur gel SDS-PAGE 6 ou 12%
- Migration en tampon TG-SDS (Tris Glycine – Sodium dodecyl sulfate) (Euromedex) 1X
- Transfert sur une membrane de PVDF (Millipore) sur la nuit à 4°C à voltage constant de 60 Volts en tampon CAPS (Acide 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonique) (Sigma-Aldrich) 1X pH 11 supplémenté en éthanol à 10% final
- Récupération de la membrane de PVDF
- 3 rinçages rapides à l'eau distillée
- Coloration des protéines, 5 minutes sous agitation et à température ambiante, dans une solution de rouge ponceau (rouge ponceau (Sigma-Aldrich) à 0,2% final, acide acétique (VWR) à 1% final) pour marquer la position des marqueurs de taille et évaluer l'efficacité du transfert
- 3 rinçages rapides à l'eau distillée
- Saturation des sites non spécifiques, 2 heures sous agitation et à température ambiante, en PBS-T (PBS (Euromedex) 1X final, Tween 20 (Sigma-Aldrich) à 0,05% final) supplémenté en lait écrémé à 10% final

- Incubation de 2 heures, sous agitation et à température ambiante, dans la solution d'anticorps primaires (cf. Tableau des anticorps primaires utilisés)
- 3 lavages de 10 minutes en PBS-T, sous agitation et à température ambiante
- Incubation de 1 heure, sous agitation et à température ambiante, dans la solution d'anticorps secondaires de l'espèce adéquate couplé à la HRP (Biorad) diluée au 1/10000<sup>ème</sup> dans du PBS-T (cf. tableau des anticorps primaires utilisés)
- 3 lavages de 10 minutes en PBS-T, sous agitation et à température ambiante
- Révélation à l'aide du kit « Clarity Western ECL Substrate » (Biorad)

Tableau des anticorps utilisés

Anticorps utilisé	Protéine ciblée	Espèce	Dilution
Anti-PARP	Domaine TSPN de la chaîne pro $\alpha$ 1 collagène V humain	Polyclonal - lapin	1/200 en PBS-T
Anti-TSPN (Novotec)	Domaine TSPN de la chaîne pro $\alpha$ 1 du collagène V humain	Polyclonal - lapin	1/4000 en PBS-T-lait 5%
Anti-TSPN (Covalab)	Domaine TSPN de la chaîne pro $\alpha$ 1 du collagène V humain	Polyclonal - cochon d'inde	1/1000 en PBS-T-lait 5%
Anti-BMP-1 (R&D systems)	Enzyme BMP-1 humaine	Monoclonal - rat	1/250 en PBS-T

Remarque : La membrane de PVDF est tout d'abord hybridée avec les anticorps reconnaissant le domaine TSPN de la pro-chaîne  $\alpha$ 1(V). Elle est ensuite déshybridée pour être hybridée à nouveau avec un anticorps anti-BMP-1 afin de contrôler l'expression dans les cellules HEK-293EBNA de l'enzyme BMP-1. Pour ce faire :

- Déshybridation de la membrane de PVDF
  - Incubation de 15 minutes, sous agitation à température ambiante, de la membrane dans la solution de déshybridation « antibody stripping buffer » (Gene Bio Application)
  - 5 lavages de 5 minutes dans de l'eau distillée sous agitation et à température ambiante
  - Révélation à l'aide du kit « Clarity Western ECL Substrate » afin de vérifier l'efficacité de la déshybridation
  - 3 lavages de 10 minutes en PBS-T sous agitation et à température ambiante
- Reprise du protocole de western blot à partir de l'étape de saturation

## **Fiche technique n°5 : Production et purification des peptides Nα1**

### a. Surproduction de Nα1 dans des cellules HEK293-EBNA

Les peptides Nα1, sauvage et mutés, ont été surproduits dans des cellules HEK-293EBNA selon le protocole suivant :

- Transfection semi-stable de la construction Nα1-pCEP4 (sauvage ou mutée) dans des cellules HEK-293EBNA (cf. Fiche technique n°2)

À partir d'une boîte 100 mm de cellules HEK-293EBNA transfectées confluentes :

- Ensemencement des cellules dans 5 nouvelles boîtes après dilution au 1/5<sup>ème</sup> dans du milieu de culture (DMEM (Sigma-Aldrich), SVF (Dutscher) à 10% final, Gentamycine (PAA) à 50 µg/ml final, Hygromycine B (Calbiochem) à 250 µg/ml final)
- Incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence

Après 24 heures, une boîte de culture est utilisée afin de tester l'expression du peptide Nα1 par les cellules HEK-293EBNA transfectées. Pour ce faire :

- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages rapides au PBS stérile (Sigma-Aldrich)
- Addition de 5 ml de milieu sans sérum (DMEM, Gentamycine à 50 µg/ml final) supplémenté de vitamine C (Sigma-Aldrich) à 50 µg/ml final

Remarque : La vitamine C est un co-facteur permettant l'hydroxylation des résidus proline et lysine. Elle va ainsi favoriser la stabilité de la triple hélice collagénique.

- Incubation de 1 nuit à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Récolte du surnageant de culture
- Centrifugation de 5 minutes à 400 g pour éliminer les débris cellulaires
- Précipitation au TCA (acide trichloracétique) de 1 ml de surnageant de culture (cf. fiche technique n°4)
- Dépôt de l'échantillon sur gel SDS-PAGE 12%
- Migration en tampon TG-SDS (Tris Glycine – Sodium dodecyl sulfate) (Euromedex) 1X
- Coloration du gel SDS-PAGE au bleu de Coomassie :
  - 5 lavages de 5 minutes dans de l'eau distillée
  - Incubation de 1 heure dans une solution de bleu de Coomassie (Euromedex)
  - 3 lavages de 5 minutes dans de l'eau distillée

À partir des 4 boîtes de cellules transfectées restantes :

- Ensemencement des cellules dans 10 boîtes de culture 100 mm après dilution au 1/5<sup>ème</sup> dans du milieu de culture
- Incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence

- Ensemencement des cellules issues des 10 boîtes de culture dans 50 boîtes de culture après dilution au 1/5<sup>ème</sup> dans du milieu de culture
- Incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence

Remarque : 10 boîtes de culture sont utilisées pour la conservation de la lignée cellulaire par congélation et stockage dans l'azote liquide (cf. Fiche technique n°2)

Sur les 40 boîtes restantes, surproduction de la protéine Nα1 selon le protocole suivant :

- 3 rinçages rapides au PBS stérile
- Addition de 5 ml de milieu sans sérum
- Incubation de 48 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Récolte du surnageant de culture enrichi du peptide Nα1
- Centrifugation de 5 minutes à 400 g pour éliminer les débris cellulaires
- Conservation du milieu de culture enrichi dans des pots de 200 ml et d'un aliquot de 1 ml dans un tube eppendorf 1,5 ml à -20°C jusqu'à la purification

Remarque : La procédure est répétée jusqu'à l'obtention de 7 récoltes qui seront utilisées pour la purification de Nα1.

- Précipitation au TCA de 1 ml de chacune des 7 récoltes (cf. Fiche technique n°4)
- Dépôt sur gel SDS-PAGE 12%
- Coloration au bleu de Coomassie (Selon le protocole décrit précédemment)

Les 3 récoltes présentant le plus fort enrichissement en Nα1 sont utilisées pour la purification.

b. Purification par chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie échangeuse d'ions permet la purification d'une protéine d'intérêt sur une colonne par interaction ionique.

Pour augmenter le niveau de pureté des protéines à purifier, 2 chromatographies successives sont réalisées :

- La première sur une résine DE52 (Whatman) qui est une résine échangeuse d'anions (la phase stationnaire chargée positivement se lie à des protéines chargées négativement).
- la seconde sur une colonne HiTrap 1 ml Q HP (GE Healthcare), elle-même échangeuse d'anions. Les protéines sont ainsi liées à une phase stationnaire chargée à faible force ionique. Les protéines fixées sont ensuite éluées en augmentant la force ionique du tampon.

Remarque : L'ensemble des tampons sont réalisés dans de l'eau distillée.

- Décongélation des 3 récoltes sélectionnées
- Dialyse des récoltes de 1 nuit dans 4 L de tampon A (Tris-HCl 50 mM final pH 7,6 ; NaCl 100 mM final)
- Dialyse de 1 journée dans 4 L de tampon A
- Récupération du milieu dialysé

- Addition d'Urée (Sigma-Aldrich) à 2 M final
- Ajustement du pH à 7,6
- Préparation de la résine DE52 :
  - 7g de résine DE52 (Whatman)
  - 200 ml de Tampon A' pH 7,6 (Tris-HCl 50 mM final pH 7,6 ; NaCl 100 mM final ; Urée 2M final) ] x3
  - Ajustement du pH à 7,6
  - Elimination du tampon A'

Dans un récipient en verre :

- Mélange du milieu de culture dialysé et contenant de l'urée avec la résine DE52 préparée précédemment
- Incubation de 1 nuit à 4°C sous agitation

Le reste du protocole est réalisé sur le chromatographe « Biologic Duo Flow » de Biorad

- Chargement de la résine DE52 sur une colonne SP
- Nettoyage de la colonne à 1,5 ml/min avec du tampon A'
- Lancement du programme d'élution suivant :
  - Mélange de tampon A' et de tampon B' (Tris-HCl 50 mM final pH 7,6 ; NaCl 1 M final ; Urée 2 M final)
  - 1,5 ml/min pendant 20 min
  - Gradient linéaire de 0% à 60% de tampon B'
  - Collecte automatique de l'éluat par fraction de 5 ml

Remarque : Le profil protéique des fractions est suivi en analysant leur absorbance à 214 et 280 nm. Les fractions collectées durant le pic d'absorbance seront utilisées pour les étapes suivantes.

- Dépôt sur gel SDS-PAGE 12% de 100 µl de chaque fraction collectée :
  - Précipitation au TCA de 100 µl de chaque fraction collectée
  - Migration sur gel SDS-PAGE 12%
  - Coloration au bleu de Coomassie
- Regroupement en 1 seul volume des fractions contenant la protéine d'intérêt
- Dialyse du volume de fraction dans 2 L de tampon A, 1 nuit à 4°C sous agitation
- Equilibrage d'une colonne HiTrap 1 ml Q HP (GE Healthcare) avec successivement 1 volume de Tampon A, 1 volume de tampon B puis 10 volumes de tampon A
- Chargement sur la colonne des échantillons issus de la dialyse à un débit de 0,5 ml/min
- Lavage de la colonne avec du tampon A' jusqu'à ce que la conductivité retrouve une valeur nulle
- Lancement du programme d'élution suivant :
  - Mélange de tampon A et de tampon B
  - 1,5 ml/min
  - Gradient linéaire de 0% à 60% de tampon B pendant 20 min

## *Matériel et méthodes*

- 100 % de tampon B jusqu'au retour de l'absorbance (214 et 280 nm) à 0
- Collecte automatique de l'éluat en fractions de 1 ml
- Dépôt sur gel SDS-PAGE 12% de 10 µl des fractions collectées
- Regroupement en 1 volume des fractions présentant une protéine Nα1 pure
- Dialyse du volume de fractions collectées dans 2 L de tampon A, 1 nuit à 4°C sous agitation
- Dosage de la concentration protéique à l'aide du kit « Pierce BCA Protein Assay Kit » (Thermo Scientific)
- Conservation de la protéine Nα1 purifiée à -80°C par aliquot de 100 µl dans des tubes eppendorf 1,5 ml



## Fiche technique n°6 : Test de migration et de cicatrisation sur couche cellulaire

L'ensemble de ces tests est réalisé sur les Fph (fibroblastes de peau humaine) issus de donneurs sains et du patient S254L.

### a. Blessure sur couche cellulaire et time-lapse

Sur une plaque de culture 12 puits :

- Ensemencement de  $1.10^5$  cellules par puits dans 2 ml de milieu de culture DMEM F-12 HAM (Sigma-Aldrich), SVF (Dutscher) à 10% final, Zell Shield™ (Minerva Biolabs) à 1X final
- Incubation 24 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Elimination du milieu de culture
- 1 rinçage au dPBS (Sigma-Aldrich) stérile
- Addition de 1 ml de milieu associé à la condition étudiée (cf. Tableau des conditions étudiées)

### Tableau des conditions étudiées

Conditions	Milieu associé
Sans traitement	Milieu appauvri en SVF (DMEM F-12 HAM, SVF à 1% final, Zell Shield™ à 1x final)
En présence de collagène V	Milieu appauvri en SVF supplémenté avec 11 nM final de collagène V (homotrimère [ $\alpha_1(V)$ ] <sub>3</sub> )
En présence de N $\alpha$ 1	Milieu appauvri en SVF supplémenté avec 11 nM final du peptide N $\alpha$ 1
En présence de collagène I	Milieu appauvri en SVF supplémenté avec 11 nM final de collagène I

Remarque : 2 puits sontensemencés par condition étudiée.

- Incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence
- Réalisation d'une blessure au centre de chaque puits à l'aide d'un cône de pipette p10
- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages rapides au dPBS stérile afin d'éliminer les débris cellulaires
- Addition de 1 ml de milieu associé à la condition étudiée (cf. Tableau des conditions étudiées)
- Incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> durant toute la durée du time-lapse

Le time-lapse est réalisé sur le microscope Axiovert 100M (Zeiss) et l'acquisition des images via le logiciel Metamorph® avec les paramètres suivants :

- 3 positions par puits (ou 6 positions par condition)
- Acquisition sur 30 heures
- 1 acquisition toute les 5 minutes

b. Migration à faible confluence et time-lapse

Sur une plaque de culture 12 puits :

- Ensemencement de  $1.10^4$  cellules par puits dans 2 ml de milieu de culture DMEM F-12 HAM (Sigma-Aldrich), SVF (Dutscher) à 10% final, Zell Shield™ (Minerva Biolabs) à 1X final
- Incubation 24 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages au dPBS stérile (Sigma-Aldrich)
- Addition de 1 ml de milieu associé à la condition étudiée (cf. Tableau des conditions étudiées)
- Incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> durant toute la durée du time-lapse

Le time-lapse est réalisé sur le microscope Axiovert 100M (Zeiss) et l'acquisition des images via le logiciel Metamorph® avec les paramètres suivants :

- 3 positions par puits
- Acquisition sur 30 heures
- 1 acquisition toute les 5 minutes

c. Analyses des images issues du time-lapse

2 paramètres sont mesurés à partir des photos prises durant le time-lapse de suivi du recouvrement de blessure sur couche cellulaire : (1) le taux de recouvrement et (2) la migration cellulaire. Pour l'étude de la migration cellulaire à faible confluence, seul la 2<sup>ème</sup> mesure est effectuée.

- Mesure du pourcentage de recouvrement  $\tau$  à l'aide du logiciel imageJ :
  - Mesure de l'aire  $t_0$ , l'aire de la blessure à  $t = 0$  heure
  - Mesure de l'aire  $t_{30}$ , l'aire non recouverte par les cellules à  $t = 30$  heures
  - Calcul de  $\tau = ((\text{Aire } t_0 - \text{Aire } t_{30}) / \text{Aire } t_0) * 100$
- Mesure de la migration cellulaire à l'aide du logiciel imageJ et du plugin Manual Cell-tracking :
  - Montage d'une vidéo à partir de l'ensemble des clichés d'une position
  - Mesure manuelle de la distance parcourue par une cellule jusqu'à sa première division

Remarque : Les migrations de 10 cellules ou 5 cellules par extrémité de la blessure, sont ainsi mesurées par position.

## **Fiche technique n°7 : Marquage métabolique des collagènes à la [Proline]<sup>14</sup>C**

Les collagènes sont des protéines dont la séquence en acides aminés est riche en résidus prolines et hydroxyproline (30% des acides aminés totaux). Le marquage métabolique à la [Proline]<sup>14</sup>C a été utilisé pour examiner spécifiquement la production de collagènes par une culture de Fph (fibroblastes de peau humaine) issus de donneurs sains ou du patient S254L.

### a. Culture cellulaire

Les Fph sont cultivés dans un milieu de culture composé de :

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) F-12 HAM (Sigma-Aldrich)
- SVF (Sérum de veau fœtal) (Dutscher) à 10% final
- Zell Shield™ (Minerva Biolabs) à 1x final

Selon le protocole suivant :

Dans une boîte de culture de 60 mm de diamètre :

- Ensemencement de  $1.10^5$  cellules
- Incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à ce que la densité cellulaire soit proche de la confluence

Remarque : Le milieu de culture est changé tous les 2 jours jusqu'à la confluence des cellules.

### b. Marquage métabolique

Une fois la densité cellulaire proche de la confluence :

Sur la boîte de cellules en culture

- Elimination du milieu de culture
- Addition de milieu de culture enrichi en vitamine C (Sigma-Aldrich) à 50 µg/ml final
- Incubation de 24 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages au dPBS (Dulbecco's Phosphate buffered Saline) (Sigma-Aldrich) stérile
- Addition de milieu sans sérum DMEM F-12 HAM, Zell Shield™ à 1x final enrichi en vitamine C à 50 µg/ml final
- Incubation de 2 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>

Une analyse de la quantité de collagène produite par les Fph en culture est réalisée grâce à un marquage métabolique à la [Proline]<sup>14</sup>C. Pour ce faire, à partir de la boîte de culture préparée précédemment :

- Elimination du milieu sans sérum
- Addition de 1,5 ml de milieu sans sérum supplémenté en [Proline]<sup>14</sup>C à 2 µCi/ml final

- Incubation de 1 nuit à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Digestion à la pepsine et extraction des collagènes de la matrice extracellulaire, de la couche cellulaire et du surnageant de culture, à l'acide acétique (Fiche technique n°7.c)

Une analyse par Pulse-Chase est également réalisée. Cette méthode se déroule en deux temps.

1. Le pulse : Incubation des cellules en présence d'un précurseur marqué, ici la [Proline]<sup>14</sup>C.
2. Le chase : Incubation des cellules dans un milieu de culture dit froid sans [Proline]<sup>14</sup>C.

La collecte de la couche cellulaire et du surnageant, à différents temps, nous permet d'évaluer les cinétiques de production et de sécrétion du collagène dans les Fph.

Le Pulse-Chase est réalisé sur 5 temps : 0 minute, 15 minutes, 30 minutes, 1 heure et 4 heures selon le protocole suivant :

- Préparation de 1 boîte de culture par temps  suivant le protocole précédent

Pour chacune des boîtes de culture :

- Elimination du milieu sans sérum
- Pulse :
  - Addition de 1,5 ml de milieu sans sérum supplémenté en [Proline]<sup>14</sup>C à 2 µCi/ml final
  - Incubation de 20 minutes à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Chase :
  - Elimination du milieu enrichi en [Proline]<sup>14</sup>C
  - 3 rinçages au dPBS stérile
  - Addition de 1,5 ml de milieu sans sérum dépourvu de proline
  - Incubation, le temps  correspondant, à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Digestion à la pepsine et extraction des collagènes de la matrice extracellulaire, de la couche cellulaire et du surnageant de culture, à l'acide acétique (Fiche technique n°7.c)

c. Digestion à la pepsine et extraction des collagènes

Les collagènes présents dans le surnageant de culture et sur la couche cellulaire sont digérés à la pepsine. La pepsine va digérer les domaines non collagéniques et ainsi nous permettre d'identifier les différentes chaînes de collagène dont la taille des domaines collagéniques et les modifications post-traductionnelles varient.

Pour l'extraction du collagène présent dans la couche cellulaire :

Sur la boîte de culture marquée

- 3 rinçages au PBS 1x (PBS 10x (Euromedex) dilué au dixième dans de l'H<sub>2</sub>O distillé)
- Addition de 1 ml de solution A (acide acétique à 0,5 M final, NaCl à 0,2 M final)
- Grattage de la couche cellulaire à l'aide d'un grattoir
- Transfert de la couche cellulaire en solution dans un tube eppendorf 1,5 ml

Dans le tube eppendorf 1,5 ml contenant la couche cellulaire en solution A :

- Addition de 75 µl de pepsine (1 mg/ml)
- Incubation de 3 heures à température ambiante, sous agitation
- Addition de 5 µl de NaOH 1 M
- Centrifugation de 10 minutes à 4°C à 10000 g
- Précipitation au TCA du surnageant (cf. Fiche technique n°4)

Pour l'extraction du collagène présent dans le surnageant de culture :

À partir du surnageant de culture récolté

- Centrifugation de 5 minutes à température ambiante à 400 g
- Collecte du surnageant
- Répartition en aliquots de 1 ml dans des tubes eppendorf 1,5 ml

Sur 1 ml de surnageant de culture contenu dans un eppendorf 1,5 ml :

- Addition de 40 µl d'acide acétique pure
- Addition de 75 µl de pepsine (1mg/ml)
- Incubation de 2/3h à température ambiante, sous agitation
- Addition de 5µl de NaOH 1M
- Centrifugation de 10 minutes à 4°C à 10000 g
- Précipitation au TCA du surnageant (cf. Fiche technique n°4)

d. Migration sur gel SDS-PAGE et autoradiographie

- Dépôt des échantillons sur gel SDS-PAGE 6% ou 10%
- Migration en tampon TG-SDS (Tris Glycine – Sodium dodecyl sulfate) (Euromedex) 1X
- Incubation du gel pendant 30 minutes dans une solution eau/acide acétique/méthanol à 9/2/9 afin de fixer les protéines ayant migrées dans le gel
- Incubation de 30 minutes dans du milieu d'amplification, Amplify Solution (Amersham Life Science)
- Séchage du gel, 30 minutes sous vide à 80°C
- Exposition de 2 jours du gel contre un film autoradiographique, FUJI Medical X-Ray film Super RX 100 NIF (FUJIFILM).

## **Fiche technique n°8 : Immunomarquages des protéines intra-cellulaires sur cellules en culture**

Ce protocole a été utilisé pour les immunomarquages des protéines LC3-B et Vinculine sur les Fph en culture issus de donneurs sains et du patient S254L.

Le marquage des protéines de la matrice extracellulaire a été effectué suivant un autre protocole détaillé dans la fiche technique n°11.

### a. Mise en culture

Les immunomarquages sont effectués sur des cellules ensemencées sur une lamelle en verre carrée 22mm x 22mm, selon le protocole suivant :

Sur une plaque 6 puits pour culture cellulaire :

- Dépôt, dans chaque puits à ensemencer, d'une lamelle de verre préalablement désinfectée à l'éthanol 70 %
- Ensemencement de  $1.10^5$  cellules par puits dans 2 ml de milieu de culture DMEM F-12 HAM (Sigma-Aldrich), SVF (Dutscher) à 10% final, Zell Shield™ (Minerva Biolabs) à 1x final
- Incubation de 24 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages au dPBS (Sigma-Aldrich) stérile
- Maintien en culture ou traités en fonction du processus biologique étudié.
  - Adhésion cellulaire : Les cellules sont maintenu 24h après ensemencement
  - Autophagie et stress du REG : Cf. Fiche technique n° 12

### b. Immunomarquage fluorescent

À l'issue de la culture et/ou du traitement des Fph, l'immunomarquage fluorescent est réalisé selon le protocole suivant :

- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages au PBS 1x (PBS 10x (Euromedex) dilué au dixième dans de l'H<sub>2</sub>O distillé)
- Fixation, 10 minutes à température ambiante, dans une solution de PFA (Paraformaldéhyde) (Electron Microscopy Sciences (EMS)) à 2,5% final dans du PBS 1x
- 3 lavages de 3 minutes dans du PBS 1x
- Perméabilisation, 5 minutes à température ambiante, dans une solution de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) à 0,1% final dans du PBS 1x
- 3 lavages de 3 minutes dans du PBS-T (PBS 1x, Tween-20 (Sigma-Aldrich) à 0,02% final)
- Saturation des sites non spécifiques, 1 heure à température ambiante, dans une solution de saturation (PBS-T supplémenté en BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich) à 1% final)
- Incubation de 1 heure, à température ambiante, dans la solution d'anticorps primaires dilués dans la solution de saturation (cf. Tableau des anticorps utilisés)
  - Dépôt de 25 µl de solution d'anticorps sur un parafilm
  - Dépôt de la lamelle côté cellules contre la goutte

Anticorps utilisés	Protéine ciblée	Espèce	Dilution
L7543 (Sigma-Aldrich)	Light Chain protein B (humaine)	Polyclonal Lapin	1/400
V9131 (Sigma-Aldrich)	Vinculine (humaine)	Monoclonal Souris	1/100
V4505 (Sigma-Aldrich)	Vinculine (humaine)	Monoclonal Souris	1/50

- 3 lavages de 3 minutes dans du PBS-T
- Incubation de 1 heure, à température ambiante et à l'abri de la lumière, dans la solution d'anticorps secondaires, d'espèce adéquate, couplés au fluorochrome alexa 488 ou alexa 546 (Invitrogen) dilué au 1/500 dans la solution de saturation (cf. Tableau des anticorps utilisés)
  - Dépôt de 25 µl de solution d'anticorps sur un parafilm
  - Dépôt de la lamelle sur la goutte, côté cellules contre la goutte

Remarque : Au cours de l'immunomarquage vinculine, la solution d'anticorps secondaires utilisée est supplémentée de phalloïdine couplé à la rhodamine diluée au 1/50 afin de marquer les microfilaments d'actine.

- 1 lavage de 3 minutes dans du PBS-T
- 2 lavages de 3 minutes dans du PBS 1x
- Marquage des noyaux, 5 minutes à température ambiante, dans une solution de Hoechst dilué au 1/5000 dans du PBS 1x
- 3 lavages de 3 minutes dans du PBS 1x
- Montage sur une lame de verre, en retournant les lamelles sur une goutte de fluorescent mounting medium (Dako)

## **Fiche technique n°9 : Analyse des contacts focaux des fibroblastes de peau humaine**

Une analyse morphométrique des points d'adhésions focaux des fibroblastes de peau humaine, issus de donneurs sains et du patient S254L, a été réalisée.

### a. Immunomarquage fluorescent de l'actine et des points de contacts focaux

- Immunomarquage fluorescent, sur Fph en culture, des contacts focaux à la vinculine et marquage des fibres de stress à la phalloïdine-rhodamine (cf. fiche technique n°8)

Remarque : L'immunomarquage est réalisé sur des Fph à faible confluence, maintenu en culture 24h, après ensemencement, à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

### b. Acquisition et traitement des images

L'acquisition des images se fait au microscope confocale LSM780 de Zeiss. 50 images par conditions sont nécessaires à la réalisation de l'analyse morphométrique.

Le traitement des images est réalisé à l'aide du logiciel Fiji.

Pour chacune des images acquises :

- Isolement d'une cellule à l'aide de l'outil « crop »
- Enregistrement de l'image contenant la cellule isolée immunomarkuée à la vinculine, en format TIFF, 8-bit

À partir de l'image de la cellule individualisée préalablement enregistrée

- Création d'un mask représentant le contour de la cellule
- Sauvegarde l'image en format TIFF, blanc sur fond noir.

Pour chaque cellule à analyser, création d'un dossier contenant l'image de la cellule individualisée immunomarkuée à la vinculine ainsi que son mask.

Remarque : Le co-marquage des fibres de stress et des contacts focaux permet d'identifier le contour de la cellule et ainsi la dessiner.



## **Fiche technique n°10 : Mesure de la prolifération des fibroblastes de peau humaine**

Le taux de prolifération des Fph issus de donneurs sains et de patients EDSc a été mesuré à l'aide d'un test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium).

Le test MTT est une méthode colorimétrique permettant de mesurer la viabilité cellulaire. Le MTT est métabolisé par les cellules vivantes en Formazan qui va s'accumuler dans les mitochondries sous forme de cristaux violets. Les cristaux violets sont ensuite dissout dans du DMSO et une mesure de l'absorbance à 550 nm permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes.

La prolifération des Fph est suivie tous les 2 jours pendant 10 jours, soit 5 temps de mesure différents.

- Préparation d'une plaque 96 puits par nombre de mesure
  - Ensemencement de  $5 \cdot 10^3$  cellules par puits dans 300  $\mu$ l de milieu de culture DMEM F-12 HAM (Sigma-Aldrich), SVF (Dutscher) à 10% final, Zell Shield<sup>TM</sup> (Minerva Biolabs) à 1X final
  - Incubation, le temps correspondant, à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>

Remarque : les Fph issus de donneurs sains et de patients EDSc sont ensemencés sur une même plaque. 3 puits par génotype sont ensemencés.

À chaque temps de mesure, sur la plaque 96 puits correspondant :

- Traitement au MTT
  - Addition de 20  $\mu$ l de MTT (Sigma-Aldrich) à 2 mg/ml dans du PBS stérile (Sigma-Aldrich)
  - Incubation de 4 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
  - Retrait du milieu de culture
  - Addition de 150  $\mu$ l de DMSO afin de dissoudre les cristaux violets de Formazan
  - Mesure de l'absorbance à 550 nm au spectrophotomètre

Remarque : La courbe de prolifération est obtenue en alignant les points de mesure sur un graphique à 2 entrées avec le jour de mesure sur l'axe des abscisses et la valeur de l'absorbance observée sur l'axe des ordonnées.

## **Fiche technique n°11 : Immunomarquages fluorescents des collagènes sur cellules en culture**

Les collagènes et la fibronectine intracellulaires, d'une part, et incorporés dans la matrice extracellulaire d'autre part, de Fph en culture sont visualisés par immunomarquages fluorescents dirigés contre la fibronectine et les collagènes I, V et VI.

Cette expérience a été réalisée sur les Fph issus de donneurs sains et du patient S254L.

Le protocole suivant est adapté du protocole décrit par Hicks et *al.*, 2008.

### a. Mise en culture

Les immunomarquages sont effectués sur des cellulesensemencées sur une lamelle en verre carrée 22mm x 22mm.

Sur une plaque 6 puits pour culture cellulaire :

- Dépôt, dans chaque puits à ensemercer, d'une lamelle de verre préalablement désinfectée à l'éthanol 70 %
- Ensemencement de  $1.10^5$  cellules par puits dans 2 ml de milieu de culture DMEM F-12 HAM (Sigma-Aldrich), SVF (Dutscher) à 10% final, Zell Shield™ (Minerva Biolabs) à 1x final
- Incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence

Remarque : Dans le cas d'un immunomarquage fluorescent des collagènes intracellulaires uniquement, les Fph sont incubés 24 heures. A l'opposé, l'incubation de la culture cellulaire jusqu'à confluence est nécessaire pour observer la production et l'incorporation des collagènes dans la matrice extracellulaire. C'est à partir du stade de confluence que les fibroblastes en culture vont produire et déposer les collagènes en abondance dans leur matrice extracellulaire.

- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages au dPBS<sup>MgCl/CaCl</sup> (Dulbecco's PBS contenant des ions chlorure de calcium et chlorure de magnésium) (Sigma-Aldrich) stérile
- Addition de milieu de culture enrichi en vitamine C (Sigma-Aldrich) à 50 µg/ml final
- Incubation de 5 jours à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>

Remarque : Le milieu de culture est changé tous les 2 jours jusqu'à confluence. De même, le milieu enrichi en vitamine C est renouvelé tous les 2 jours. Dans le cas d'un immunomarquage fluorescent des collagènes intracellulaires uniquement, les Fph ne sont maintenu que 24 heures en milieu enrichi en vitamine C.

b. Immunomarquage fluorescent des collagènes sur cellules en culture

À l'issue de la culture des Fph, l'immunomarquage fluorescent est réalisé selon le protocole suivant :

- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages au dPBS<sup>MgCl/CaCl</sup> (Sigma-Aldrich)
- Fixation, 10 minutes à température ambiante, dans une solution de PFA (Paraformaldéhyde) (Electron Microscopy Sciences (EMS)) à 4% final dans du PBS 1x (PBS 10x (Euromedex) dilué au dixième dans de l'H<sub>2</sub>O distillé)
- 3 lavages de 3 minutes dans du dPBS<sup>MgCl/CaCl</sup>
- Saturation des sites non spécifiques, 1 heure à température ambiante, dans une solution de saturation (PBS à 1,25x final ; SVF à 1% final)

Remarque : Dans le cadre de l'immunomarquage intracellulaire des collagènes, la solution de saturation est supplémentée de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) à 0,125% final.

- Incubation de 1 heure, à température ambiante, dans la solution d'anticorps primaires dilués dans la solution de saturation (cf. Tableau des anticorps utilisés)
  - Dépôt de 25 µl de solution d'anticorps sur un parafilm
  - Dépôt de la lamelle côté cellules contre la goutte

Anticorps utilisés	Protéine ciblée	Espèce	Dilution
18G5	Collagène V humain (domaine collagénique)	Monoclonal souris	1/800
20111 (Novotec)	Collagène I humain (domaine collagénique)	Polyclonal lapin	1/200
COLI-3470 (Abcam)	Collagène I humain (domaine collagénique)	Polyclonal lapin	1/200
20611 (Novotec)	Collagène VI humain (domaine collagénique)	Polyclonal lapin	1/200
COLVI-6588 (Abcam)	Collagène VI humain (domaine collagénique)	Polyclonal lapin	1/200
FN	Fibronectine humaine	Monoclonal souris	1/200

- 3 lavages de 20 minutes dans du dPBS<sup>MgCl/CaCl</sup>
- Incubation de 1 heure, à température ambiante et à l'abri de la lumière, dans la solution d'anticorps secondaires, d'espèce adéquate, couplés au fluorochrome alexa 488 ou alexa 546 (Invitrogen) dilué au 1/1000 dans la solution de saturation (cf. Tableau des anticorps utilisés)
  - Dépôt de 25 µl de solution d'anticorps sur un parafilm
  - Dépôt de la lamelle sur la goutte, côté cellules contre la goutte
- 3 lavages de 20 minutes dans du dPBS<sup>MgCl/CaCl</sup>

Remarque : Au cours de l'immunomarquage des protéines de la matrice extracellulaire, une étape supplémentaire de marquage des membranes lipidiques peut-être réalisée.

Pour ce faire, à l'issue des 3 précédents lavages au dPBS<sup>MgCl/CaCl</sup>, les cellules sont incubées

5 minutes à 37°C puis 20 minutes à température ambiante, dans une solution de Vybrant® DiI Cell-Labeling (Thermo-Fischer) dilué au 1/200 dans du dPBS<sup>MgCl/CaCl</sup>.

- Marquage des noyaux, 5 minutes à température ambiante, dans une solution de Hoechst dilué au 1/5000 dans du dPBS<sup>MgCl/CaCl</sup>
- 3 lavages de 3 minutes dans du dPBS<sup>MgCl/CaCl</sup>
- Montage sur une lame de verre, en retournant les lamelles sur une goutte de fluorescent mounting medium (Dako) puis en lutant la lamelle sur la lame au vernis à ongles

L'observation est effectuée au Microscope confocal inversé Zeiss LSM780 et les images post-traitées sur ImageJ.

## Fiche technique n°12 : Analyse du flux autophagique

L'autophagie est un mécanisme cellulaire qui va permettre à la cellule de dégrader une partie de son cytoplasme et son contenu protéique et/ou organites. La macroautophagie commence par la formation d'une vésicule, l'autophagosome, qui va séquestrer la partie du cytoplasme à dégrader. L'autophagosome va ensuite fusionner avec les lysosomes dont les protéases vont digérer le contenu. L'autophagie est un mécanisme dynamique régulé par des stimuli extracellulaires (carence en nutriments, infection par des agents pathogènes) ou intracellulaire (stress du réticulum endoplasmique, protéines mal conformées, organites endommagés).

Une quantification du flux autophagique est réalisée chez les Fph issus de donneurs sains, d'un patient EDSc porteur de la mutation G475D sur COL5A1 et du patient S254L.

L'analyse du flux autophagique dans les Fph en culture est étudiée dans différentes conditions : à l'état basal, après activation du flux autophagique par privation de sérum et en favorisant ou non l'accumulation des autophagosomes par inhibition de leur dégradation par les lysosomes.

Afin d'identifier quel processus biologique est associé avec le flux autophagique observé, le stress de réticulum endoplasmique granuleux et la mitophagie ont été analysés chez les fph.

### a. Quantification du flux autophagique par Western blot

Une plaque 6 puits de culture est utilisée par culture primaire.

Dans 4 puits d'une plaque 6 puits :

- Ensemencement de  $1.10^5$  cellules par puits dans 2 ml de milieu de culture DMEM F-12 HAM (Sigma-Aldrich), SVF (Dutscher) à 10 % final, Zell Shield™ (Minerva Biolabs) à 1x final
- Incubation 20 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages au dPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Sigma-Aldrich) stérile
- Addition de 2 ml de milieu associé à la condition étudiée (cf. Tableau des conditions étudiées)

### Tableau des conditions étudiées

Conditions	Milieu associé
Niveau basal	DMEM F-12 HAM, SVF à 10 % final, Zell Shield™ à 1x final
Milieu sans sérum	DMEM F-12 HAM, Zell Shield™ à 1x final
Niveau basal en présence d'inhibiteurs de fusion autophagosome/ lysosome	DMEM F-12 HAM, SVF à 10 % final, Zell Shield™ à 1x final supplémenté de Pepstatin-A (Sigma-Aldrich) à 10 µg/ ml et de E-64d (Sigma-Aldrich) à 10 µg/ ml

Milieu sans sérum en présence d'inhibiteurs de fusion autophagosome/ lysosome	DMEM F-12 HAM, Zell Shield™ à 1x final supplémenté de Pepstatin-A (Sigma-Aldrich) à 10 µg/ml et de E-64d (Sigma-Aldrich) à 10 µg/ml
---	---

- Incubation 2 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
  
- Lyse cellulaire
  - Elimination du milieu de culture
  - 3 rinçages au PBS 1x (PBS 10x (Euromedex) dilué au dixième dans de l'H<sub>2</sub>O distillé)
  - Addition de 100 µl de tampon de lyse (NaCl 150 mM final ; Hepes 50 mM final pH 7,5 ; EDTA 5 mM final, Glycérol 10% final, NP-40 1% final, cOmplete™ EDTA-free inhibitor (Roche) 1x final)

Remarque : L'inhibiteur de protéase (cOmplete™ EDTA-free inhibitor) est ajouté extemporanément au tampon de lyse)

- Grattage des cellules
- Collecte des cellules contenues dans le tampon de lyse et transfert dans un eppendorf de 1,5 ml
- Agitation 5 secondes à l'aide d'un Vortex
- Incubation 5 minutes dans la glace

Les deux précédentes opérations sont répétées 2 fois

- Centrifugation de 10 minutes à 15000g à 4°C
- Collecte du surnageant et transfert dans de nouveaux eppendorfs de 1,5 ml
  
- Dosage protéique des produits de la lyse cellulaire à l'aide du kit « Pierce BCA Protein Assay kit » de Thermo scientific. 5 µg de chaque condition seront utilisés pour le Western blot.
  
- Western blot (Cf. Fiche technique n°4-c) à l'aide des anticorps listés dans le tableau ci-dessous

Tableau des anticorps utilisés

Anticorps utilisé	Protéine ciblée	Espèce	Dilution
Anti-LC3B (Sigma-Aldrich)	Light Chain protein B (humaine)	Polyclonal lapin	1/ 1000 en PBS-T
Anti-Beclin (Cell signaling)	Beclin-1 (humaine)	Monoclonal souris	1/ 1000 en TBS-T-BSA 5%
Anti-GAPDH (Cell signaling)	Glyceraldéhyde-3-Phosphate déshydrogénase (humaine)	Polyclonal lapin	1/ 80000 en PBS-T
Anti-p62 (Sigma-Aldrich)	p62/ SQSTM1 (humaine)	Polyclonal lapin	1/ 500 en PBS-T

Anti-□ actin (Sigma-Aldrich)	isoforme beta de l'actine (humaine)	Monoclonal souris	1/4000 en PBS- T
---------------------------------	--	----------------------	---------------------

- Quantification du flux autophagique sur ImageJ par analyse densitométrique de l'intensité des bandes LC3B et Beclin révélées par Western blot. Leur valeur est normalisée par la valeur densitométrique de la bande GAPDH révélée dans le même Western blot.

Remarque : En plus de la quantification du flux autophagique, la présence de vésicules autophagiques dans les Fph est étudiée par microscopie électronique à transmission (cf. Fiche technique n°3)

b. Quantification du stress du réticulum endoplasmique par Western blot

Sur une plaque 6 puits, 2 puits sont ensemencé par culture primaire.

Pour chaque puits :

- Ensemencement de  $1,5 \cdot 10^5$  cellules par puits dans 2 ml de milieu de culture DMEM F-12 HAM (Sigma-Aldrich), SVF (Dutscher) à 10 % final, Zell Shield™ (Minerva Biolabs) à 1x final
- Incubation 20 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Elimination du milieu de culture
- 3 rinçages au dPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Sigma-Aldrich) stérile
- Addition de 1 ml de milieu associé à la condition étudiée (cf. Tableau des conditions étudiées)

Tableau des conditions étudiées

Conditions	Milieu associé
Niveau basal	DMEM F-12 HAM, SVF à 10 % final, Zell Shield™ à 1x final
Niveau basal en présence d'activateur du stress du REG	DMEM F-12 HAM, SVF à 10 % final, Zell Shield™ à 1x final supplémenté de Thapsigargin (Sigma-Aldrich) à 50 ng/ml

- Incubation 6 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- Lyse cellulaire (Cf. Fiche technique n°12-a)
- Western blot (Cf. Fiche technique n°4-c) à l'aide des anticorps listés dans le tableau ci-dessous

Tableau des anticorps utilisés

Anticorps utilisé	Protéine ciblée	Espèce	Dilution
Anti-Pink1 (Sigma-Aldrich)	Pink1 (humaine)	Polyclonal lapin	1/ 1000 en PBS-T
Anti-Parkin (Cell signaling)	Parkin (humaine)	Monoclonal souris	1/ 1000 en TBS-T-BSA 5%

Anti-GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate déshydrogénase (humaine)	Polyclonal lapin	1/80000 en PBS-T
Anti- $\beta$ actin (Sigma-Aldrich)	isoforme beta de l'actine (humaine)	Monoclonal souris	1/4000 en PBS-T

Quantification du flux autophagique sur ImageJ par analyse densitométrique de l'intensité des bandes LC3B et Beclin révélées par Western blot. Leur valeur est normalisée par la valeur densitométrique de la bande GAPDH révélée dans le même Western blot.





## **RESULTATS**

**A *COL5A1* mutation located in the N-propeptide cleavage site is responsible for a new form of connective tissue disease with skin and muscle defects**

Steven Nindorera-Badara<sup>1</sup>, Shireen Lamandé<sup>2</sup>, Sofie Symoens<sup>3</sup>, Sandrine Vadon-Le Goff<sup>4</sup>, Elisabeth Vaganay<sup>1</sup>, Martial Balland<sup>5</sup>, Maryline Malbouyres<sup>1</sup>, Anthony Di Roio<sup>1</sup>, Fransiska Malfait<sup>3</sup>, Florence Ruggiero<sup>1\*,#</sup> and Christelle Bonod-Bidaud<sup>1\*</sup>

1 Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, ENS de Lyon, CNRS UMR5242, SFR BioSciences Gerland, 46 Allée d'Italie, Lyon F-69364, France

2 Murdoch Children's Research Inst., Royal Children's Hospital, Parkville 3052, Australia

3Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, 9000 Ghent, Belgium

4 Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, UMR CNRS 5305, University of Lyon, F-69367, France

5 Laboratoire interdisciplinaire de Physique, UMR CNRS 5588, University of Grenoble, St. Martin d'Hères F-38402, France

\* co-senior authors

#*Corresponding author*

## Abstract

Collagen V is a quantitatively minor fibrillar collagen that primary plays a regulatory role in fibrillogenesis. It is found in various tissues such as skin, tendons, bones, blood vessels, muscles, fat and cornea. The human collagen V is encoded by three genes, *COL5A1*, *COL5A2* and *COL5A3*. These genes are translated into polypeptidic pro $\alpha$  chains that assemble into different combination to form the trimeric collagen V molecules. The predominant molecular form in tissues is the heterotrimer [ $\alpha$ 1(V)]<sub>2</sub> $\alpha$ 2(V). Mutations in *COL5A1*, and in a less extend *COL5A2*, are primary responsible for the classic form of the Ehlers-Danlos syndrome, a heritable connective tissue disorder characterized by skin defects, joint hypermobility and hypertrophic scars. Here we described for the first time a mutation, localized in the BMP-1 cleavage site on the  $\alpha$ 1(V) chain in a patient displaying muscular contractures, weakness and abnormal skin. To characterize the effect of the mutation on collagen V biosynthesis, fibroblasts were derived from skin biopsies of the patient. We showed that this new mutation totally abolished the N-terminal processing of the pro $\alpha$ 1(V) chain by BMP-1. The absence of cleavage did not affect the secretion and deposition of collagen V heterotrimer in the extracellular matrix. Analysis of dermal fibroblasts from this patient with biochemistry, immunofluorescence and transmission electron microscopy showed that the collagen V is normally secreted but that the collagen fibrils are not correctly organized and showed an increased diameter. Solid binding assays showed that the mutation does not affect interactions of the mutant collagen V with collagen I and VI, its binding partners in the formation of fibers. Our analysis also revealed that the migration of fibroblasts is affected compared to healthy cells and that number, area and lengths of vinculin-containing focal adhesions are reduced. Interestingly, there was an increase of the autophagic flux in those cells, associated with mitophagy but without ER stress. These data revealed that this specific mutation in the *COL5A1* gene lead to cell and extracellular matrix defects that could explain the specific defects in skin and neuromuscular system.

Key words: Extracellular matrix, Type V collagen, Classic Ehlers-Danlos, Skin, Dermal fibroblasts, Connective tissue disease, Collagen processing.

## **Introduction**

Collagen V is a quantitatively minor fibrillar collagen whose primary function is to regulate collagen I fibril formation (Chanut-Delalande et al. 2004; Wenstrup et al. 2004). It is expressed in various tissues as diverse as the skin, bones, tendons, blood vessel walls and cornea. Collagen V is a negative regulator of the collagen I fiber growth: it represents 1-3% of the total collagen in skin where fibrils are relatively large (50-70 nm in diameter) and up to 25% in the cornea in which the diameter of collagen I fibrils does not exceed 25-30 nm (Ricard-Blum & Ruggiero 2005). The pro-collagen V is secreted as a trimeric molecule which consists of a long helical central part, flanked by two pro-peptides at the N- and C- terminal extremities. The processing of pro $\alpha$ (V) chains showed specificities. Contrary to the major fibrillar procollagens, the pro $\alpha$ (V) is only partially cleaved at the N-terminal end while the mature  $\alpha$ (V) chain retains its complete N-terminal domain (Unsöld et al. 2002). Moreover, processing of the pro $\alpha$ 1(V) is dependent on BMP-1 (Kessler et al. 2001) or ADAMTS-2 enzymes (Colige et al. 2005) that results respectively, in the release of the TSPN (Thrombospondin N-terminal domain-like) domain or the complete NC3 domain (TSPN + variable region), essentially expressed in tissues as a heterotrimer [ $\alpha$ 1(V)]<sub>2</sub> $\alpha$ 2(V). However, collagen V chains can also assemble into minor molecular forms: the heterotrimer  $\alpha$ 1(V) $\alpha$ 2(V) $\alpha$ 3(V) and the homotrimer [ $\alpha$ 1(V)]<sub>3</sub>, which show more restricted distribution and distinct role in tissue (Fichard et al. 1995). In developing mouse skin, Bonod-Bidaud and co-workers (Bonod-Bidaud et al. 2012) have shown that the homotrimeric form of collagen V serves as a bridging molecule that contributes to the stabilization of the epidermal-dermal interface. In the rat, collagen V promoted Schwann cell migration and inhibits axonal outgrowth (Chernousov et al. 2001). In mice, the  $\alpha$ 3(V) is critical for glucose homeostasis (Huang et al. 2011). Different binding partners of collagen V have been previously identified such as thrombospondin, insulin, tenascin-X, integrins (for review see (Ricard-Blum & Ruggiero 2005; Paladin et al. 2015)) and we have shown recently by a yeast two-hybrid that it is also able to interact with tenascin-C, fibronectin, PCPE-1, TIMP-1, MMP-2, TGF $\beta$  and collagen VI (Symoens et al. 2011). The fact that collagen V can interact with a multiplicity of ligands strongly suggest that it can fulfill yet unknown functions.

The classic Ehlers-Danlos Syndrome (cEDS) (OMIM 130000) is a heritable connective tissue disorder characterized by hyperextensible skin, joints laxity and defects in

wound-healing (Malfait & de Paepe 2005). Even though a few cEDS cases were reported to be caused by mutations in *COL1A1* (collagen I) and *TN-X* (tenascin-X) (Nuytinck et al. 2000; Lindor & Bristow 2005), over 90% of patients exhibit mutations in collagen V genes, specifically *COL5A1* gene (chromosome 9) and to a less extent in the *COL5A2* gene (chromosome 2) (Symoens et al. 2012; Ritelli et al. 2013). No mutations were so far found in the third gene, *COL5A3*. Most of the time, cEDS mutations introduced a premature stop codon that leads to *COL5A1* haploinsufficiency (Malfait et al. 2005; Mitchell et al. 2009). Some others that specifically affect the type V collagen structure, corresponded to glycine substitutions, exon-skipping occurring in the C-propeptide region, or mutations in the triple helix domain. In the latter cases, the incorporation of the mutant chains into the type V collagen heterotrimer is affected (Malfait et al. 2005). Finally, a mutation in the pro $\alpha$ 1(V) signal peptide was shown to interfere with type V collagen secretion into the extracellular matrix (Symoens et al. 2009).

However, there is a growing body of evidence indicating a clinical overlap between EDS and muscle disorders. Some patients diagnosed with cEDS showed muscle phenotype characterized by muscle weakness and significant and progressive joint contractures, which are not typically seen in the EDS. A patient who carried a mutation in *TN-X*, presented morphological changes of the skin typically seen in cEDS but also spasms and muscular weakness, suggesting that there is an overlapping of the clinical features between cEDS and the Ulrich Congenital Muscular Dystrophy (UCMD) caused by mutations in collagen VI genes (Voermans et al. 2007). In other hand, patients with UCMD show clinical characteristics typical of classical disorders of connective tissue such as Ehlers–Danlos syndromes (EDS) (Kirschner et al. 2005). Mutations in collagen XII gene cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans exhibited overlap phenotype combining a joint hypermobility syndrome with a myopathy (Zou et al. 2014). Adding to the complexity of these new disorders, B3GALT6 mutations encoding the galactosyltransferase II caused a pleiotropic Ehlers-Danlos-syndrome-like connective tissue disorder (Malfait et al. 2013).

Here, we described for the first time a new mutation in the *COL5A1* gene located in the BMP-1 cleavage site of the collagen V N-propeptide responsible for a new disease associated with skin and neuromuscular system defects. Our results emphasize the crucial role of collagen V in various tissues and a number of developmental and pathological processes.

## **Results**

### **A patient with a new mutation in *COL5A1* gene**

UCMD45 is XXX year's old and his parents are first cousins. He had a difficult birth, was limp, required resuscitation and had a pulmonary haemorrhage. He had signs of global developmental delay, walked at 3 years and delayed language. When he was 12-13 he developed contractures and weakness. He has contractures in his elbows, wrists, ankles and hands. His muscle biopsy was normal but nerve conduction study showed a mixed axonal/demyelinating picture. The last clinical note reported a progressive distal motor neuropathy with an unusual skin. He was tested negative for lamin A/C, emerin and collagen VI mutations but he presents a heterozygous single point mutation in the *COL5A1* gene (*COL5A1* c.761C>T, p.Ser254Leu) (Figure 1A), which is specifically located in the BMP-1 N-terminal cleavage site S-QD (Imamura et al. 1998; Bonod-Bidaud et al. 2007) (Figure 1B).

### **S254L mutation abolishes BMP-1 cleavage of the procollagen V**

During the synthesis of collagen V, the pro $\alpha$  chains undergo a maturation step during which the C- and N-propeptides are removed by enzymatic cleavage. Specifically, the N-terminal domain of the pro $\alpha$ 1(V) is partially cleaved by BMP-1.

The BMP-1 cleavage site in the N-propeptide of the pro $\alpha$ 1(V) chain corresponds to the Ser<sup>254</sup>/Gln<sup>255</sup> peptide bond between the TSPN-1 domain and the variable region (Figure 1B). As the mutation S254L is precisely located in the BMP-1 cleavage site, we investigated if this mutation affects the cleavage of collagen V by BMP-1. For this purpose, the S254L mutant construct was generated from the wild-type (WT) N $\alpha$ 1 construct previously described (Bonod-Bidaud et al. 2007). The S254A mutant construct (Bonod-Bidaud et al. 2007) was used as a control of the specificity of the patient mutation (Figure 2A).

The BMP-1 cleavage efficiency test was performed by transfecting BMP-1 expressing HEK-293 EBNA cells with WT and mutants N $\alpha$ 1 constructs (Figure 2B), or by co-transfecting N $\alpha$ 1V and BMP-1 constructs in HEK-293 EBNA cells (Figure 2C). Conditioned media from transfected cells were analysed by Western-blotting using anti-TSPN antibodies to assess the cleavage of the N $\alpha$ 1 fragment. Overall, the results showed that TSPN is not released from the N $\alpha$ 1 if the molecule harboured the S254L mutation. This indicated that the cleavage of the collagen V is abolished when the

serine of the cleavage site is mutated into a leucine but not an alanine (S254A). This result was confirmed by *in vitro* assays (Figure 2D) performed with purified proteins. As a control, experiment was performed with a construct containing the G530S mutation, which was reported to provoke a typical cEDS (Giunta et al. 2002).

Figure 1E shows that this mutation did not affect the N-propeptide cleavage by BMP-1 activity. This result suggested that the serine specific residue at the BMP-1 cleavage site is crucial and that its substitution by a leucine, a hydrophobic residue can specifically result in defects in ECM organization, because of the retention of the TSPN domain in the mature protein.

### **Collagen V is incorporated into ECM but shows abnormal fibrils organization in S254L fibroblasts**

To investigate if the absence of N-terminal cleavage in the collagen V S254L mutation affects collagen V synthesis, secretion or its deposition in the ECM, immunostaining of cultured WT and mutant fibroblasts (Fbs) with antibodies against collagen V, collagen I or VI were performed. No particular intracellular retention of collagen I, V and VI was observed in 254L fbs compared to WT fbs. Collagen was well secreted in the ECM of mutant fibroblasts and formed collagen fibers in association with collagen I as in WT ECM (Figure 3A and B). However, fibers appeared less organized in S254L Fbs than in WT Fbs. To confirm this observation, TEM experiments were undertaken. TEM of ECM produced by S254L fbs revealed the presence of unorganized fibers in the ECM compared to fbs from control individual. WT collagen fibers were correctly organized and straight, whereas collagen fibers in S254L ECM were less numerous, scattered and disorganized (Figure 3C). Furthermore, the measurement of fibers diameter in skin biopsies revealed that collagen fibers produced by S254L fbs were thinner than the one produced by WT fbs (Figure S1A). Finally, at the molecular level, SDS-PAGE analysis of collagen V (data not shown) and collagen VI (Figure S1B) revealed that these two molecules are normally secreted in the ECM.

### **Impact of S254L mutation on dermal fibroblast integrity and function**

The impact of the mutation on the cell behaviour was then investigated. Fibroblasts are the major cell component of the dermis and are responsible for collagen synthesis. Defective cell migration has been previously reported in fibroblasts from cEDS patient harbouring *COL5A1* haploinsufficient mutation using wound healing scratch assays



(Viglio et al. 2008). We thus investigated the migration performance of S254L Fbs using *in vitro* wound assays. With this aim, cells were cultivated until they reached confluence and were scrapped to mimic a wound. The wound healing and cell migration were observed under an inverted microscope. WT cells rapidly migrated towards the center of the wound and have completely closed the wound after 30 hours whereas the S254L Fbs remained sparsed and showed a delay in scratch repair (Figure 4A). Nonetheless, this defect in cell migration was not restored by addition of WT recombinant homotrimeric collagen V (Fichard et al. 1997)(Figure 4A). The quantification of the recovered areas showed that the wound repair is significantly impaired in S354L Fbs compared to WT Fbs and that addition of exogenous WT collagen V did not improve the extent of recovered area (Figure 4B). Cell migration during wound healing was measured by cell tracking. The results showed that migration is impaired in S254L fibroblasts compared to WT Fbs. As for the recovered area, addition of exogenous WT collagen V did not restore the WT phenotype (Figure 4C). We then checked if the defect in cell migration was not due to a problem in cell proliferation. A MTT test was performed and showed that the proliferation of S254L Fbs is less important than the WT Fbs (Figure 4D) and that the addition of collagen V did not restore the proliferation (Data not shown).

Next, migration of cells was then tested at low cell confluence (Figure 5A) to assess any influence of the S254L mutation. For that, cells were spread at 10000 cells/well in a 12-wells plate, with or without addition of collagen V, and cell displacement was measured by video-microscopy, cell-by-cell. Figure 5B showed that migration of S254L is really impaired compared to WT cells. It is also important to note that relative percentage of S254L fibroblasts migration related to WT cells was improved when soluble collagen V was added to the medium (Figure 5C).

To investigate if 1D migration was also affected in the case of S254L Fb, we used cytoochips (Cytoo) to test the velocity of the cells. In this system cells were forced to migrate in 1-axis but they can migrate in the two directions. With this new technology, we confirmed that the migration of S254L Fbs is impaired and that this defect is not restored by WT collagen V addition (Figure 6A, B). Defect in cell migration could result in a defect in cell adhesion (Kim & Wirtz 2013). Number, area and length of focal adhesions were measured using image analysis software (Carnesecchi et al. 2015). We investigated the properties of focal adhesion formed in WT and mutant fbs by analyzing the organization of membrane-cytoskeletal protein vinculin and the actin

cytoskeleton using fluorescence staining. Cells were spread at low confluence, fixed, permeabilized and stained with antibodies against vinculin or with phalloidin-rhodamin. S254L fbs, as WT cells were elongated and showed abundant F-actin stress fibers (Figure 7A). To quantify the number, area and length of vinculin-containing focal adhesions, a morphometric analysis was conducted using image analysis software (n\_cells=50). The three parameters decreased significantly in S254L Fbs compared to WT Fbs (Figure 7B). We thus concluded that impaired focal adhesion formation in mutant Fbs can result in defects in directional cell migration.

### **S254L fibroblasts exhibit a high level of autophagy**

TEM analysis was next performed to analyze cell morphology and ultrastructure. WT Fbs showed normal cellular organelles, notably the oval-shaped mitochondria (Figure 8a, arrow) and the flattened saccules of the rough endoplasmic reticulum (ER) (Figure 8a, arrowhead). On the opposite, S254L Fbs displayed misshapen mitochondria (Figure 8c, black arrowhead) and a strong accumulation of autophagic vesicles (Figure 8c, black arrow and Figure 8d). Nonetheless, no modification or dilation of the ER organization was observed (Figure 8c, grey arrowhead), unlike the control G530S Fbs (Giunta & Steinmann 2000) that showed strong dilation of the ER (Figure 8b, arrowhead).

The presence of autophagic vesicles in S254L Fbs can be associated to an increase of the autophagic flux or to an alteration of the flux. To assess this question, endogenous levels of autophagic vesicles-associated-form LC3-II was monitored by Western-blot, in presence or absence of fetal calf serum. We observed a higher level of LC3B in S254L Fbs compared to WT (Figure 9A, B). This result is in agreement with the observation of an accumulation of autophagosomes in S254S Fbs by TEM. Treatment with E64d/pepstatinA was then performed to block the degradation of autophagosomes in the lysosomes and to determine if the accumulation of autophagosomes was associated with an increase of autophagic flux rather than an alteration of the flux. Both healthy and mutant fibroblasts showed an increase of LC3B signal indicative of an accumulation of autophagosomes (Figure 9A, B). We concluded that the accumulation of autophagic vesicles observed in S254L Fbs is associated with a higher level of autophagic flux.

Autophagy can be related to the accumulation of unfolded proteins in the ER. As shown in Figure 8c, S254L Fbs showed no dilation of ER. To confirm this observation, we used specific markers for ER stress such as BIP, a chaperone protein present in the

ER lumen, and the spliced and non-spliced form of XBP1, a transcription factor spliced in ER stress context. No increase in Bip level was observed with Western-blot analysis in the patient Fbs compared to the control (Figure 9C, D). In the same way, no accumulation of the spliced variant of XBP1 was observed in S254L Fbs and WT Fbs (Figure 9E). On contrary, the XBP-1 spliced variant was accumulated after treatment with thapsigargin, an inducer of ER stress (Figure 9E). These results suggested the absence of an ER stress in both WT and mutated Fbs meaning that the autophagy observed in S254L fibroblasts is not associated with misfolded protein degradation.

### **Mitophagy is activated in S254L mutant fibroblasts**

Observations of TEM micrographs revealed the presence of altered mitochondria in S254L Fbs (Figure 8c). We thus hypothesized that the autophagic flux observed in these cells can correspond to mitophagy, a specific autophagic mechanism that leads the mitochondria degradation. To assess this question, we performed Western-blot with antibodies against Pink-1, a protein that is accumulated at the mitochondria membrane and triggers its inclusion in autophagic vesicles. A higher level of Pink-1 was observed in S254L Fbs, indicating selective degradation of mitochondria by autophagy.

## **Discussion**

Here we described for the first time a cEDS overlap syndrome characterized by defects in skin and in the neuromuscular system in a patient with a mutation in the *COL5A1* gene (S254L) that specifically inhibits the N-propeptide cleavage by BMP-1 activity. In addition to skin defects typically seen in cEDS, the patient developed muscle contractures and weakness. A splice-acceptor mutation in the N-propeptide-encoding region of *COL5A1* resulting in the deletion of exon 5 containing the BMP-1 cleavage site was previously described (Takahara et al. 2002). However, the patients have a clinical picture compatible with the diagnosis of cEDS. No muscle weakness or neuromuscular defects were reported.

The particularity of this mutation is that it is situated at the BMP-1 cleavage site of the pro $\alpha$ 1(V) chain which occurs at the peptide bond Ser<sup>254</sup>/Gln<sup>255</sup>. It was previously shown that the mutation of the serine at position 254 in alanine did not affect the cleavage (Bonod-Bidaud et al. 2007) Here we showed that the S254L mutation totally abolishes the cleavage by BMP-1 activity and, in that, interfered with normal

processing (Imamura et al. 1998). *In vivo* evidence have showed that the pro $\alpha$ 1(V) globular N-terminal domain plays a crucial role in the regulation of collagen fibril nucleation and architecture (Chanut-Delalande et al. 2004; Wenstrup et al. 2004). In accordance with these findings, the analysis of the ECM produced by fibroblasts derived from the patient skin biopsy revealed the deposition of disorganized collagen fibrils and a reduction of the collagen fibril density. Defects in collagen fibrils formation are a hallmark of cEDS. However, whereas the diameter of collagen fibrils of cEDS skin are generally larger than in healthy skin (Symoens et al. 2012), the collagen fibrils in the patient skin showed a smaller diameter than in the control individual. Cultured fibroblasts from the patient produced a sparse network of sinuous and disorganized fibers of irregular diameter, though it was not measurable because of the rarity of the fibrils present in the ECM. Dominant negative experiments in cultured corneal fibroblasts revealed that collagen V controls collagen I fibril growth and that the partial retention of N-propeptide is responsible for this function by inhibiting lateral fibril growth by charge repulsion or steric hindrance (Linsenmayer et al. 1993). Numerous studies have confirmed that collagen V is a regulatory fibril-forming collagen (reviewed in Ricard-Blum & Ruggiero 2005). However, there is so far no *in vivo* evidence that the retention of the TSPN domain in the N-propeptide directly affects the formation and organization of collagen fibers. Here we showed that lack of N-propeptide cleavage resulted in fibril formation and organization in the ECM suggesting a regulated process more specific than previously thought, i.e. a mechanism involving charge repulsion or steric hindrance. We previously demonstrated that the N-propeptide of collagen V specifically interacts with collagen I C-propeptide and with several domains of collagen VI (Symoens et al. 2011). In our model, collagen VI interacts with collagen V N-propeptide at the surface of the collagen fibers (Symoens et al. 2011). Solid phase assays revealed that the interaction of the S254L mutated N $\alpha$ 1(V) domain with collagen VI molecules was not impaired as observed (data not shown), excluding the hypothesis that the defect in fibril organization was due to defective interactions between collagen V and VI. Collagen V is crucial for the nucleation of collagen I fibers (Chanut-Delalande et al. 2004; Wenstrup et al. 2004). *In vitro* fibrillogenesis experiments with the mutant molecules could be further performed to examine the impact of the mutation on heterotypic fibril nucleation.

Classic EDS is characterized by defects in wound healing resulting in atrophic scars. The patient exhibited an unusual structure of the skin. Cultured cEDS Fbs showed a

marked delay in wound repair and this defect could be restored by the addition of wild-type collagen V (Viglio et al. 2008). A delay in wound closure was also reported with Fbs derived from *col5a1<sup>+/-</sup>* mouse skin, compared to wild-type (DeNigris et al. 2016). Here we showed that the S254L Fbs showed impaired migration compared to WT Fbs but, contrary to typical cEDS Fbs, addition of WT collagen V did not rescue the migration phenotype. The defect in migration could be partially explained by a decrease in the cell proliferation rate. The defect in migration was confirmed with a 1D migration test.

There is a relationship between cell migration and focal adhesion morphology and structure (Kim & Wirtz 2013). We thus decided to test whether S254L mutation can affect the organization of markers of focal adhesion. We showed that stress fibers are abundant and well-organized in both WT and mutated cells but vinculin seems to be less present at the focal adhesion sites in S254L cells. The significant decrease in the number, length and area of focal adhesions observed in S254L cells compared to WT cells can explain the decrease in cell migration.

TEM analysis revealed a strong accumulation of autophagic vesicles and defects in mitochondria shape but no modification of the ER structure, specifically in S254L Fbs. We established that autophagy and mitophagy are increased in S254L fibroblasts but no stress of ER. These data confirmed our immunofluorescence staining indicating that the mutant protein is normally secreted in the ECM and not accumulated in the ER. This is not surprising since we showed that the S254L mutation affects the N-propeptide cleavage that occurs extracellularly and has likely no effect on protein folding.

ECM quality influences growth, morphology, and motility of cells. The capability of cells to migrate and keep their shape depends strongly on correct functioning of the cytoskeleton. Cytoskeleton and ECM are connected through receptors, as integrins, that are clustered with ECM at the focal adhesions. ATP producing mitochondria is needed to support energy requirement of the cytoskeleton. As a consequence, mitochondria can sense ECM composition changes (de Cavanagh et al. 2009). In genetically modified mice, mitochondria alterations were observed in skeletal muscle with collagen VI deficiency (Irwin et al. 2003). We can thus speculate that the S254L collagen V is secreted but not correctly incorporated in the ECM and that this defect could be sensed by mitochondria via receptors/focal adhesions/cytoskeleton complex inducing eventually an alteration of mitochondrial functions. As a consequence, altered mitochondria are then degraded by autophagy.

Collagen V interacts with collagen VI (Symoens et al. 2011). Mutations in collagen V lead to defects in skin and mutations of collagen VI had muscular consequences. Deficiency in one of the two proteins can result in defects in skin and muscle in patients depending on the mutation locations. Defect in nerve conduction has been also described. A collagen V  $\alpha 4(V)$  chain, which is expressed by Schwann cells during peripheral nerve differentiation, was reported in rat (Chernousov et al. 2000). This chain played a role in Schwann cell adhesion, spreading and migration and its knock-down resulted in the inhibition of myelination in co-culture system (Chernousov et al. 2006). This  $\alpha 4(V)$  chain has not been described in humans but it might correspond to the  $\alpha 3(V)$  chain. Nerve conduction defects observed in the patient could be explained by the formation of an abnormal heterotrimer [ $\alpha 1(V)$ ] $2\alpha 3(V)$  in Schwann cells, and subsequent defects in peripheral nerve myelination and function (Chen et al. 2014). In conclusion, we described for the first time a patient with a specific mutation in the COL5A1 gene which correspond to a specific replacement of serine at position 254 by a leucine, who present different symptoms on skin, muscle and nerve conduction. It will be necessary in the future to better understand why peripheral nervous system is affected. To answer to this question, it will be interesting to create knock-in mice that harboured the S254L mutation in the col5a1 gene and to check if this mutation could leads to specific peripheral nervous system dysfunctions.

## **Experimental procedures**

### *Plasmids and mutagenesis*

Plasmids BMP-1-pCEP4 and N $\alpha 1(V)$ -pcDNA3 and were already described (Moali et al. 2005, Bonod-Bidaud et al., 2007). N $\alpha 1(V)$  is a small domain of 64 kDa containing the NC3, COL2 and NC2 domains and eleven triplets from COL1 (Bonod-Bidaud et al. 2007)(Figure 1A). S254L and S254A Mutations were done using the Quick-change II XL site-directed mutagenesis kit (Stratagen) according to the manufacturers' instructions, using the following oligonucleotides:

S254A forward 5'CCTGACACCCACAGGCGCAGGACCCCAATCC3' and reverse 5'GGATTGGGGTCCTGCGCCTGTGGGGTGTTCAGG3', S254L forward 5'GACACCCACAGTCGGCGGACCCCAATCC3' and reverse 5'GGATTGGGGTCCGCCGACTGTGGGGTGTTC3'. The cDNA sequences of the mutants were thoroughly checked.

### *Cell Culture*

Human embryonic kidney (HEK) 293 EBNA cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum and penicillin-streptomycin cocktail (all from Sigma Aldrich, USA) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Stable cell lines containing BMP-1 or N $\alpha$ 1V (wild-type or mutant) were selected and grown in the same medium supplemented with 200  $\mu$ g/ml hygromycin B (Calbiochem, USA).

Primary dermal fibroblasts were established from patient and non-affected people. Cells were grown in DMEM-F12 Ham medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum and ZellShield<sup>TM</sup> (Minerva Biolabs), in presence, or not, of 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.

### *Production and purification of recombinants proteins*

WT and mutated (S254L and S254A) N $\alpha$ 1(V), were overexpressed and purified as described (Bonod-Bidaud et al., 2007).

### *BMP-1 cleavage*

#### *In cellulo*

We took the advantages of a cell approach based on the transient transfection of cells with plasmids that each encodes one of the partners (enzyme and substrate) followed by direct analysis of digestion products, as already described (Bonod-Bidaud et al. 2007).

#### *In vitro*

Activity assays were performed at 37°C in 40  $\mu$ l final volume of Hepes 50mM, NaCl 0.15M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Brij 35 0.02% pH 7.4. 815 nM of N $\alpha$ 1V (WT or mutant) were incubated for 2h with 46 nM recombinant BMP-1 (produced and purified as in (Blanc et al. 2007)). Reaction was stopped by addition of 8  $\mu$ L Laemli buffer containing DTT and immediate boiling for 8 min. Samples were separated by SDS/PAGE on 12% gels and stained by Coomassie blue.

### *Cell migration*

#### *After wound-healing*

The cell migration assays were performed in 12 well sterile Plate. Cells (30 000/cm<sup>2</sup>) were seeded in each well. After 24 hours, 5  $\mu$ g of FL- $\alpha$ 1(V) was added, or not, in each

well. After 72 hours scraping the cells with a pipette tip created a wound and cells were rinsed three times with PBS. PBS was replaced by DMEM-F12 Ham medium, containing 1% FCS and 5 µg of FL-α1(V) was added, or not, in each well. Pictures were taken every 5 minutes during 30 hours under an inverted microscope. Migration was quantified by measuring the surface recovered by the cells after the end of migration by ImageJ.

### *At low confluence*

The cell migration assays at low confluence were performed in 12 well sterile Plate.  $1.10^4$  cells were seeded in each well. After 24 hours, cells were rinsed three times with PBS and PBS was replaced by DMEM-F12 Ham medium, containing 1% FCS and 5 µg of homotrimeric collagen V was added, or not according to the condition studied. Pictures were taken every 5 minutes during 30 hours under an inverted microscope. Cell migration is quantified using “cell tracking” ImageJ Plugin.

### *ID migration*

ID migration of cells was analysed via the CytooChip system (Cytoo). Cells were seeded in each well (3500 cells/well) in medium complemented with 1% FCS, with or without 5 µg of collagen V. Cells were incubated 10 min at 25°C, then 20 min at 37°C, medium was changed and cells were incubated 1 hour at 37°C. Pictures were taken every 5 minutes during 6 hours under an inverted microscope. Migration was quantified with ImageJ software.

### *MTT test*

3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was used to measure cell proliferation, Fibroblasts were seeded in five 96-well plates at a density of 5000 cells/well. Every 48 hours, 1 plate was taken and 20 µl of MTT (at 2 mg/ml) was added to each well. After 4 hours of incubation, cell medium was removed and replaced by 150 µl of DMSO (Sigma-Aldrich). The optical density was measured at 570 nm on a plate reader (Enspire – Perkin Elmer).

### *Immunofluorescence for Labelling of collagen I, V and VI and focal adhesions*

Fibroblasts were grown on cover slips during 24 hours or until confluence for ECM staining, fixed with 2.5% PFA, and permeabilized, or not, with 0.1% triton-X100. After blocking in 1% BSA or 1% FCS, cells were incubated 1 hour with the primary



antibodies, vinculin (Sigma Aldrich, 1/100), COL1 (Novotec or abcam, 1/200), COLV (18G5, 1/800, Bonod-Bidaud et al., 2007) and COLVI (Abcam, 1/200), washed three times with PBS 1X and incubated 1 hour with the fluorescently conjugated secondary antibodies. Staining of F-actin was performed by incubating the cells with phalloidin-TRITC for 1 hour at room temperature. Nuclei were stained for 5 min in the Hoescht solution. Images were captured using the Zeiss LSM780 confocal microscope. Vinculin quantification was performed using computational analysis.

### *Transmission Electron Microscopy*

Fibroblasts from skin biopsies were fixed overnight at room temperature in 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in sodium cacodylate buffer 0.1 M pH 7.4. After few washes in 0.1M sodium cacodylate pH 7.4, specimens were post-fixed in 2% osmium tetroxyde - 0.1M cacodylate pH 7.4 for 45 min and then embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were treated with uranyl acetate and lead citrate and then examined with a Philips CM120 electron microscope (Centre Technique des Microstructures, Université Claude Bernard Lyon I, Villeurbanne, France).

### *Autophagy*

100.000 fibroblasts were seeded in 6-well plates and grown for 20h, then treated for 2h at 37°C in cell culture medium in the presence, or not, of 10% FCS, with or without 10 µg/ml pepstatin A and 10 µg/ml E64d to block autophagosome/lysosome fusion.

### *ER stress*

150.000 fibroblasts were seeded in 6-well plates and grown for 20h, then treated for 6h at 37°C in cell culture medium containing or not 50 µM of Thapsigargin to induce ER stress as a control.

### *Mitophagy*

150.000 fibroblasts were seeded in 6-well plates and grown for 20h then, treated for 6h at 37°C in cell culture medium containing or not 100 µM of CCCP (Carbonyl Cyanid 3-ChloroPhenylhydrazone)(Sigma Aldrich) to induce mitophagy as a control.

### *Protein extraction and Western-blot*

Protein extracts were prepared using Lysis buffer (NaCl 150 mM; Hepes 50 mM pH 7,5; EDTA 5 mM, Glycérol 10%, NP-40 1%) containing proteases inhibitors (cOmplete™ EDTA-free inhibitor (Roche) 1x final) and analysed by SDS-PAGE, under reducing conditions. Proteins were electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Millipore, France) overnight in 10 mM CAPS pH 11, 10% ethanol. Then, membranes were saturated for 2 hours in PBS supplemented with 0,05% of Tween-20 and 10% non-fat milk. Membranes were first probed with primary antibodies. The antibodies against following protein were used: LC3B (L7543) and  $\beta$ -actin (A5441) from Sigma Aldrich; Pink1 (ab75487) and Parkin (ab15954) from Abcam; and BiP (generous gift from T. Van Agtmaël) followed by incubation with the corresponding peroxidase coupled goat secondary antibodies and detection using a peroxidase colorimetric kit (Sigma Aldrich).

### *RNA extraction and RT-PCR*

Total RNAs from cell culture were extracted from the cells according to the manufacturer's instructions (Macherey Nagel). RT reactions were performed using 1  $\mu$ g of RNA, with random primers and 200 U of Moloney murine leukemia virus enzyme. Human XBP1 was amplified using the following primers: hXBP1 forward 5'CCTTGTAGTTGAGAACCAGG3' and hXBP1 reverse 5'GGGGCTTGGTATATATGTGG.

Acknowledgments: CTu, PBES, novotec, GIS, AFSED.

The abbreviations used are:

cEDS, classic Ehlers-Danlos Syndrome; WT, wild-type; Fbs, fibroblasts.

## **References**

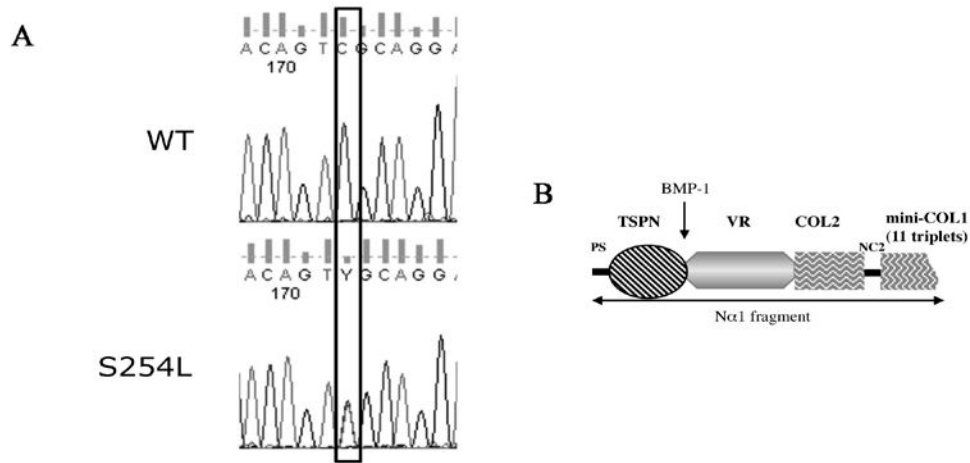
- Blanc, G. et al., 2007. Insights into How CUB Domains Can Exert Specific Functions while Sharing a Common Fold Conserved And Specific Features Of The Cub1 Domain Contribute To The Molecular Basis Of Procollagen C-Proteinase Enhancer-1 Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(23), pp.16924–16933.
- Bonod-Bidaud, C. et al., 2007. Enzymatic cleavage specificity of the pro $\alpha$ 1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*, 405(2), p.299.

- Bonod-Bidaud, C. et al., 2012. In Vivo Evidence for a Bridging Role of a Collagen V Subtype at the Epidermis–Dermis Interface. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(7), pp.1841–1849.
- Carneseccchi, J. et al., 2015. Estrogens Induce Rapid Cytoskeleton Re-Organization in Human Dermal Fibroblasts via the Non-Classical Receptor GPR30. *PLOS ONE*, 10(3), p.e0120672.
- Cavanagh, E.M. de et al., 2009. Angiotensin II, mitochondria, cytoskeletal, and extracellular matrix connections: an integrating viewpoint. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 296(3), pp.H550–H558.
- Chanut-Delalande, H. et al., 2004. Development of a Functional Skin Matrix Requires Deposition of Collagen V Heterotrimers. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), pp.6049–6057.
- Chen, P., Cescon, M. & Bonaldo, P., 2014. The Role of Collagens in Peripheral Nerve Myelination and Function. *Molecular Neurobiology*, 52(1), pp.216–225.
- Chernousov, M.A. et al., 2006. Glypican-1 and  $\alpha 4(V)$  Collagen Are Required for Schwann Cell Myelination. *The Journal of Neuroscience*, 26(2), pp.508–517.
- Chernousov, M.A. et al., 2000. Schwann Cells Synthesize Type V Collagen That Contains a Novel Alpha 4 Chain: Molecular Cloning, Biochemical Characterization and High Affinity Heparin Binding of Alpha4(V) Collagen. *Journal of Biological Chemistry*. Available at: <http://www.jbc.org.gate1.inist.fr/content/early/2000/06/13/jbc.M003922200> [Accessed September 26, 2016].
- Chernousov, M.A., Stahl, R.C. & Carey, D.J., 2001. Schwann Cell Type V Collagen Inhibits Axonal Outgrowth and Promotes Schwann Cell Migration via Distinct Adhesive Activities of the Collagen and Noncollagen Domains. *The Journal of Neuroscience*, 21(16), pp.6125–6135.
- Colige, A. et al., 2005. Domains and Maturation Processes That Regulate the Activity of ADAMTS-2, a Metalloproteinase Cleaving the Aminopropeptide of Fibrillar Procollagens Types I–III and V. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), pp.34397–34408.
- DeNigris, J. et al., 2016. Altered dermal fibroblast behavior in a collagen V haploinsufficient murine model of classic Ehlers–Danlos syndrome. *Connective Tissue Research*, 57(1), pp.1–9.
- Fichard, A. et al., 1997. Human Recombinant  $\alpha 1(V)$  Collagen Chain HOMOTRIMERIC ASSEMBLY AND SUBSEQUENT PROCESSING. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48), pp.30083–30087.
- Fichard, A., Kleman, J.-P. & Ruggiero, F., 1995. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biology*, 14(7), pp.515–531.
- Giunta, C. et al., 2002. Homozygous Gly530Ser substitution in COL5A1 causes mild classical Ehlers-Danlos syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 109(4), pp.284–290.

- Giunta, C. & Steinmann, B., 2000. Compound heterozygosity for a disease-causing G1489D and disease-modifying G530S substitution in COL5A1 of a patient with the classical type of Ehlers-Danlos syndrome: An explanation of intrafamilial variability? *American Journal of Medical Genetics*, 90(1), pp.72–79.
- Huang, G. et al., 2011.  $\alpha 3(V)$  Collagen is critical for glucose homeostasis in mice due to effects in pancreatic islets and peripheral tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), pp.769–783.
- Imamura, Y., Steiglit, B.M. & Greenspan, D.S., 1998. Bone Morphogenetic Protein-1 Processes the NH<sub>2</sub>-terminal Propeptide, and a Furin-like Proprotein Convertase Processes the COOH-terminal Propeptide of pro- $\alpha 1(V)$  Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), pp.27511–27517.
- Irwin, W.A. et al., 2003. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nature Genetics*, 35(4), pp.367–371.
- Kessler, E. et al., 2001. Bone Morphogenetic Protein-1 (BMP-1) Mediates C-terminal Processing of Procollagen V Homotrimer. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), pp.27051–27057.
- Kim, D.-H. & Wirtz, D., 2013. Predicting how cells spread and migrate: focal adhesion size does matter. *Cell Adhesion & Migration*, 7(3), pp.293–296.
- Kirschner, J. et al., 2005. Ullrich congenital muscular dystrophy: Connective tissue abnormalities in the skin support overlap with Ehlers–Danlos syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 132A(3), pp.296–301.
- Lindor, N.M. & Bristow, J., 2005. Tenascin-X deficiency in autosomal recessive Ehlers–Danlos syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 135A(1), pp.75–80.
- Linsenmayer, T.F. et al., 1993. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken  $\alpha 1(V)$  NH<sub>2</sub>-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 121(5), pp.1181–1189.
- Malfait, F. et al., 2013. Defective Initiation of Glycosaminoglycan Synthesis due to B3GALT6 Mutations Causes a Pleiotropic Ehlers-Danlos-Syndrome-like Connective Tissue Disorder. *American Journal of Human Genetics*, 92(6), pp.935–945.
- Malfait, F. et al., 2005. The molecular basis of classic Ehlers-Danlos syndrome: A comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients. *Human Mutation*, 25(1), pp.28–37.
- Malfait, F. & de Paepe, A., 2005. Molecular genetics in classic Ehlers–Danlos syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 139C(1), pp.17–23.
- Mitchell, A.L. et al., 2009. Molecular mechanisms of classical Ehlers-Danlos syndrome (EDS). *Human Mutation*, 30(6), pp.995–1002.
- Moali, C. et al., 2005. Substrate-specific Modulation of a Multisubstrate Proteinase C-terminal processing of fibrillar procollagens is the only bmp-1-dependent activity to

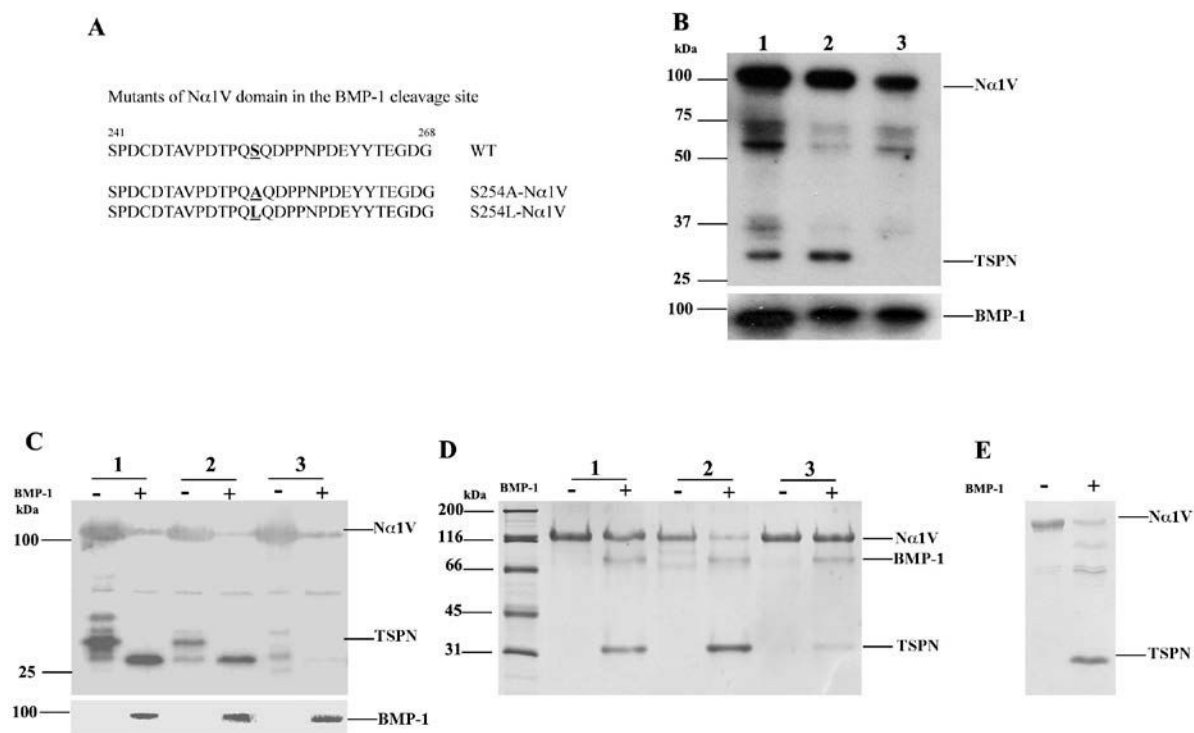
- be enhanced by PCPE-1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), pp.24188–24194.
- Nuytinck, L. et al., 2000. Classical Ehlers-Danlos Syndrome Caused by a Mutation in Type I Collagen. *The American Journal of Human Genetics*, 66(4), pp.1398–1402.
- Paladin, L., Tosatto, S.C.E. & Minervini, G., 2015. Structural in silico dissection of the collagen V interactome to identify genotype–phenotype correlations in classic Ehlers–Danlos Syndrome (EDS). *FEBS Letters*, 589(24, Part B), pp.3871–3878.
- Ricard-Blum, S. & Ruggiero, F., 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie Biologie*, 53(7), pp.430–442.
- Ritelli, M. et al., 2013. Clinical and molecular characterization of 40 patients with classic Ehlers–Danlos syndrome: identification of 18 COL5A1 and 2 COL5A2 novel mutations. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), p.58.
- Symoens, S. et al., 2009. COL5A1 signal peptide mutations interfere with protein secretion and cause classic Ehlers-Danlos syndrome. *Human Mutation*, 30(2), pp.E395–E403.
- Symoens, S. et al., 2012. Comprehensive molecular analysis demonstrates type V collagen mutations in over 90% of patients with classic EDS and allows to refine diagnostic criteria. *Human Mutation*, 33(10), pp.1485–1493.
- Symoens, S. et al., 2011. Identification of binding partners interacting with the  $\alpha$ 1-N-propeptide of type V collagen. *Biochemical Journal*, 433(2), pp.371–381.
- Takahara, K. et al., 2002. Order of Intron Removal Influences Multiple Splice Outcomes, Including a Two-Exon Skip, in a COL5A1 Acceptor-Site Mutation That Results in Abnormal Pro- $\alpha$ 1(V) N-Propeptides and Ehlers-Danlos Syndrome Type I. *The American Journal of Human Genetics*, 71(3), pp.451–465.
- Unsöld, C. et al., 2002. Biosynthetic Processing of the Pro- $\alpha$ 1(V) $\alpha$ 2(V) Collagen Heterotrimer by Bone Morphogenetic Protein-1 and Furin-like Proprotein Convertases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp.5596–5602.
- Viglio, S. et al., 2008. Rescue of Migratory Defects of Ehlers–Danlos Syndrome Fibroblasts In Vitro by Type V Collagen but not Insulin-Like Binding Protein-1. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(8), pp.1915–1919.
- Voermans, N. c. et al., 2007. Ehlers–Danlos syndrome due to tenascin-X deficiency: Muscle weakness and contractures support overlap with collagen VI myopathies. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A(18), pp.2215–2219.
- Wenstrup, R.J. et al., 2004. Type V Collagen Controls the Initiation of Collagen Fibril Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), pp.53331–53337.
- Zou, Y. et al., 2014. Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23(9), pp.2339–2352.

Figure 1

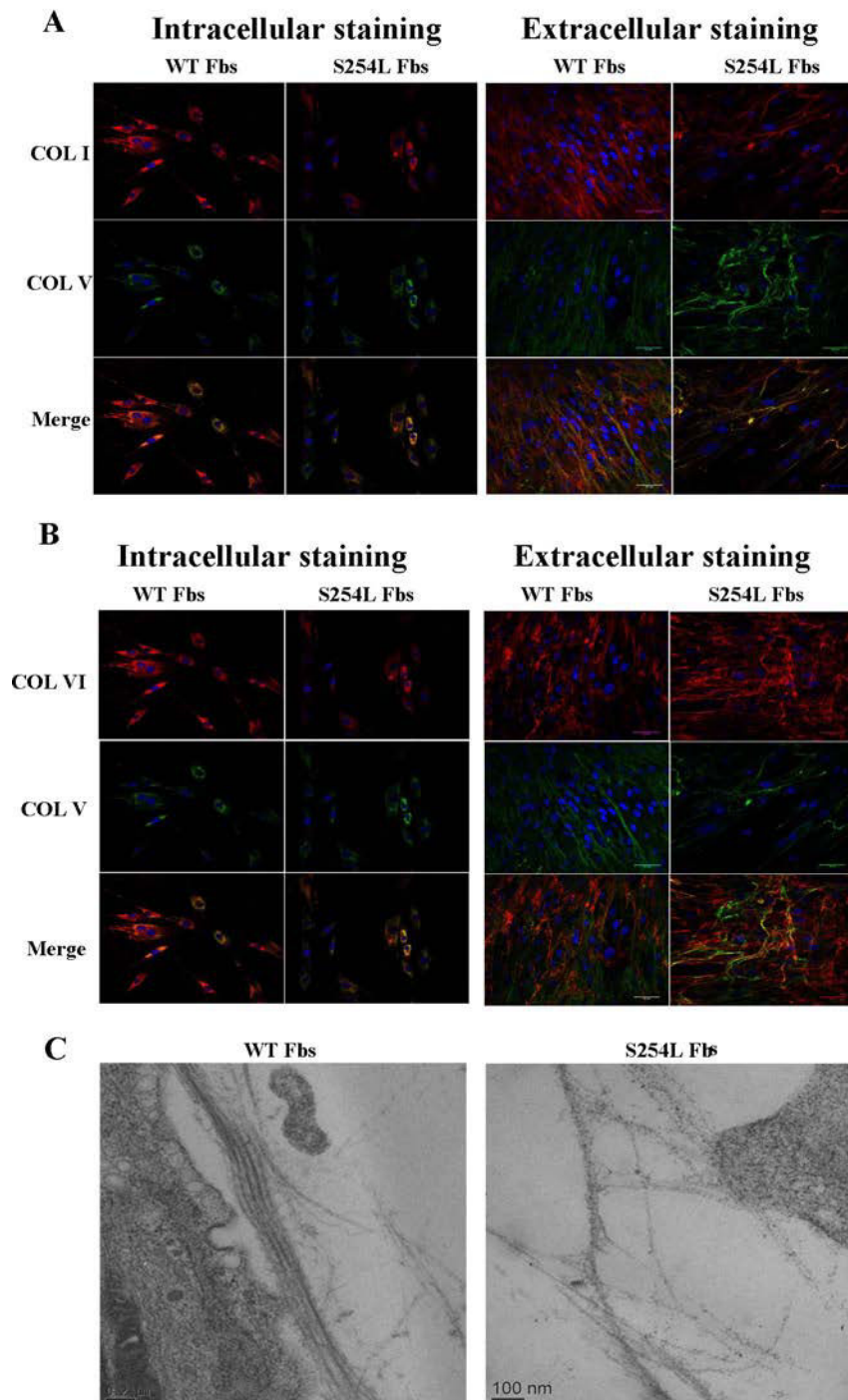


**Figure 1:** A, Electropherogram of the COL5A1<sup>S254L</sup> mutation in the cDNA of the patient(S254L) compare to Wild-type Fbs (WT). B, Schematic representation of the Nα1 structure with the localization of the BMP-1 cleavage site. Nα1 fragment corresponds to the N-terminal extension of the N-propeptide of the proα1(V) chain. PS, peptide signal; TSPN, Thrombospondin N-terminal domain-like VR, variable region; COL, collagenous domain, NC, non collagenous domain.

Figure 2

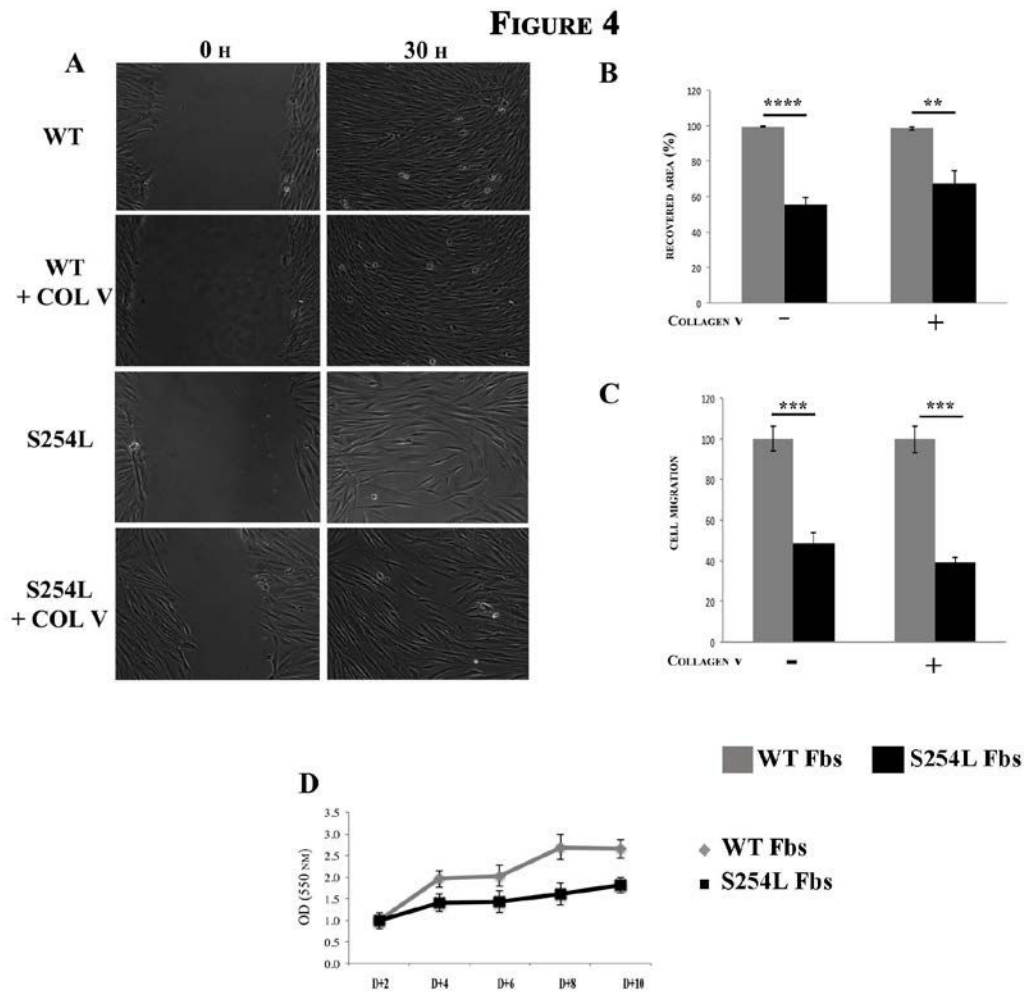


**Figure 2: *In cellulo* and *in vitro* cleavage of N $\alpha$ 1 (WT and mutants) by BMP-1.** A, Partial sequence of the N $\alpha$ 1V domain and localization of the two different mutants S254A and S254L. B, Western-blot analysis of BMP-1 *in cellulo* processing of WT-N $\alpha$ 1V (lane 1), S254A-N $\alpha$ 1V (lane 2) and S254L-N $\alpha$ 1V (lane 3), in HEK-293 cells expressing BMP-1. C, Electrophoretic pattern of HEK-293 cell media transfected with WT-N $\alpha$ 1V (lane 1) or S254A-N $\alpha$ 1V (lane 2) or with S254L-N $\alpha$ 1V (lane 3) co-transfected (+) or not (-) with BMP-1. D, *in vitro* cleavage of N $\alpha$ 1V (lane 1), S254A-N $\alpha$ 1V (lane 2) and S254L-N $\alpha$ 1V (lane 3) by BMP-1 (+). E, *in cellulo* cleavage of G530S-N $\alpha$ 1V by BMP-1 (+).



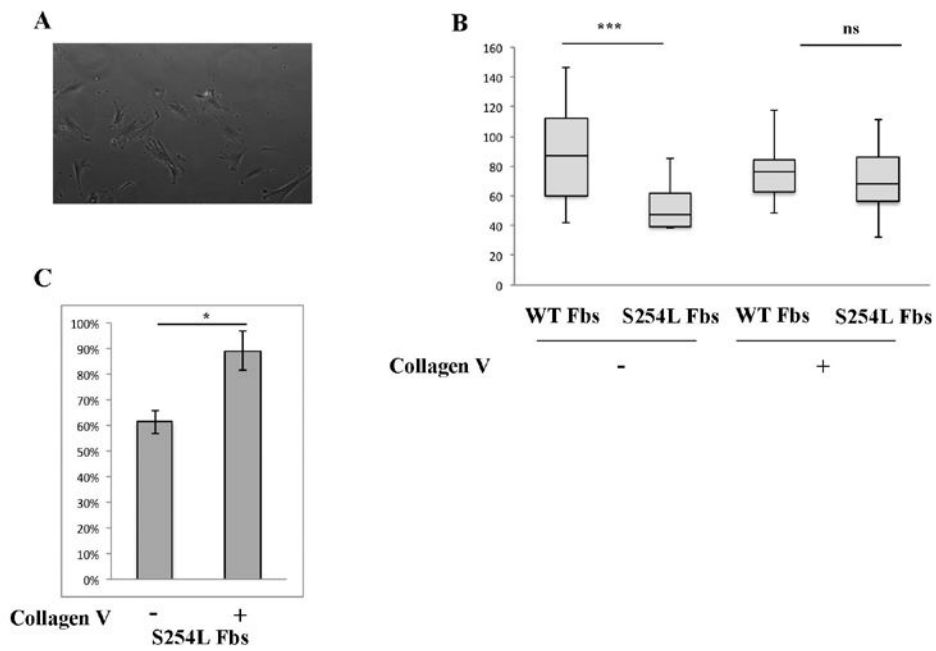
**Figure 3: Extracellular matrix organization and composition produced by WT and S254L fibroblasts.** A, WT and S254L fibroblasts (Fb) were double-labelled for Collagen I (COLI, red) and Collagen V (COLV, green), intracellularly and extracellularly. B, WT and S254L fibroblasts were double-labelled for Collagen VI (COLVI, red) and Collagen V (COLV, green), intracellularly and extracellularly. C, Ultrastructural analysis of the ECM organization in WT and S254L Fbs.





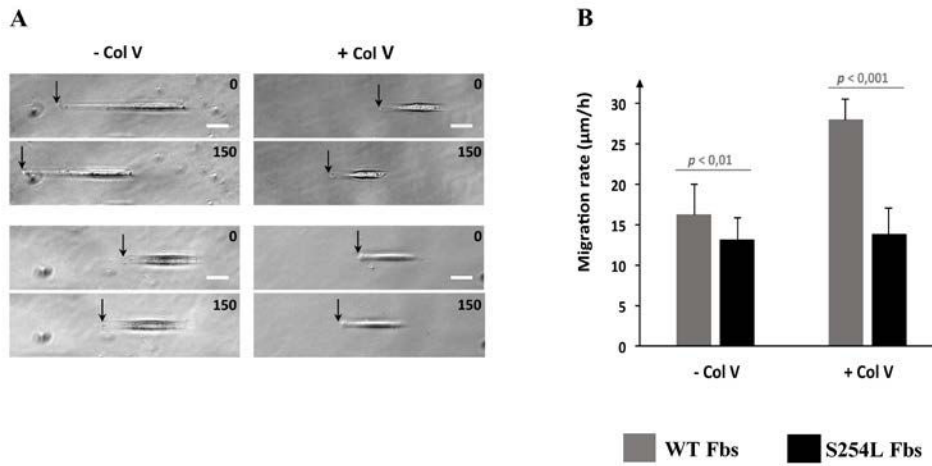
**Figure 4: Wound healing assays and cell migration profiles of WT and S254L fibroblasts.** A, Time-lapse imaging of a scrape wound assay performed with WT and mutated cells, treated or not with homotrimeric collagen V (+ COLV), showing the cell migration kinetic at the indicated time points. B, Quantification of the recovered area for WT and S254L fibroblasts, with (+) or without (-) collagen V. C, Quantification of the cell migration for WT and S254L fibroblasts, in presence (+) or absence (-) of collagen V. D, MTT proliferation assay in WT and S254L fibroblasts cultivated for 10 days.

FIGURE 5



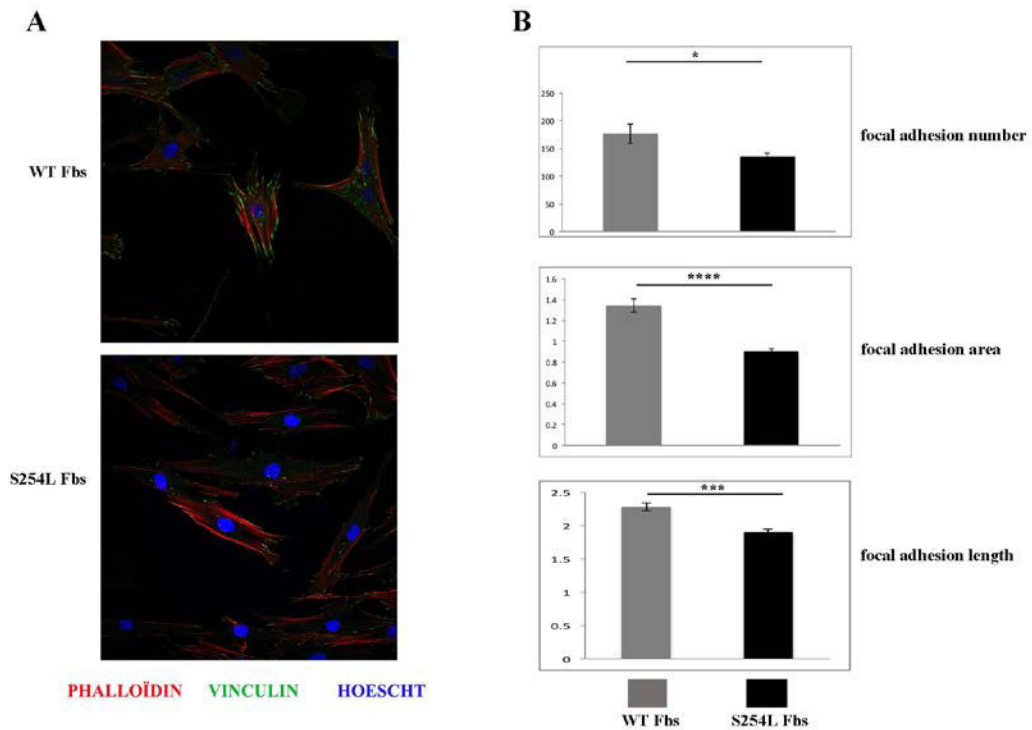
**Figure 5: Random migration at low cellular density of WT and S254L fibroblasts.** A, Cells were plated at low confluence and observed under a phase-contrast microscope. B, Quantification of the cell covered distance during 30 hours after incubation of WT and S254L fibroblasts with (+) or without (-) collagen V. C, Relative percentage of S254L fibroblasts migration related to WT cells, with (+) or without (-) collagen V.

FIGURE 6



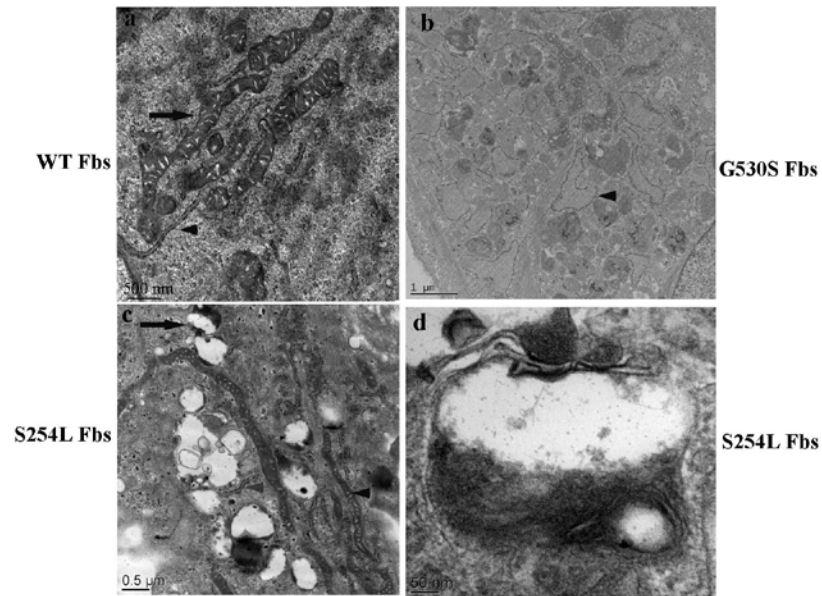
**Figure 6: 1D migration.** A, Cells (WT and S254L Fb) were seeded and allowed to migrate in one direction, in the presence (+) or absence (-) of collagen V. Arrows indicated the starting point. B, Quantification of the migration rate in  $\mu\text{m}/\text{h}$ .

FIGURE 7



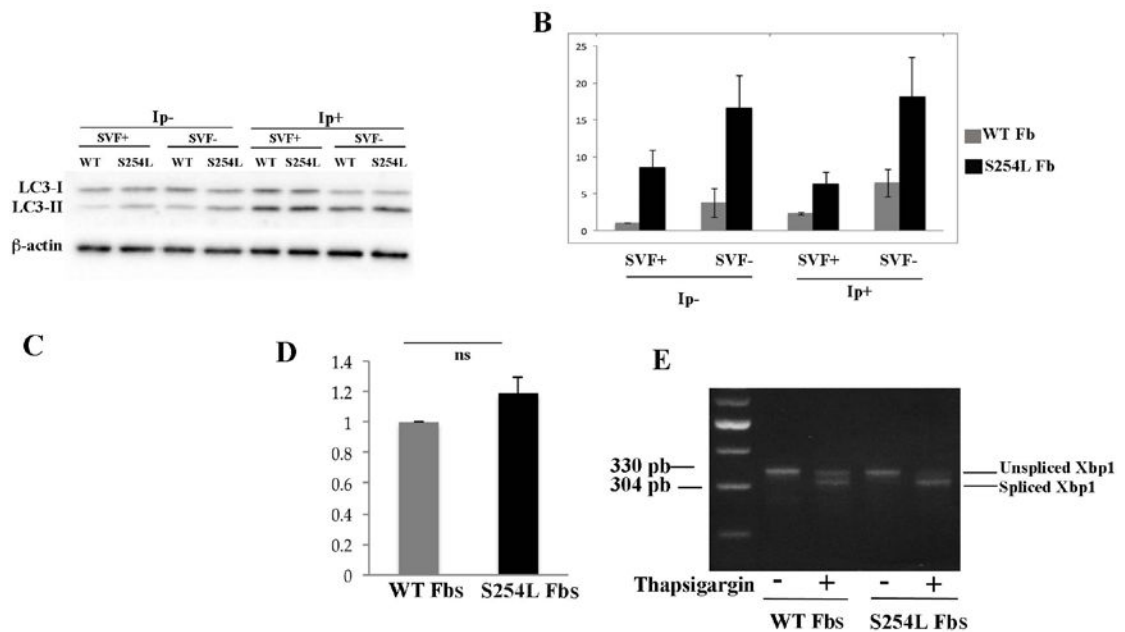
**Figure 7: Analysis of focal adhesions and stress fibers in WT and S254L fibroblasts.** A, Cells were plated and allowed to spread for 24 hours before fixation and staining with phalloidin for F-actin (red) or with antibodies against vinculin (green). Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). B, Quantification of focal adhesion number, area and length on WT and S254L cells.

**Figure 8**



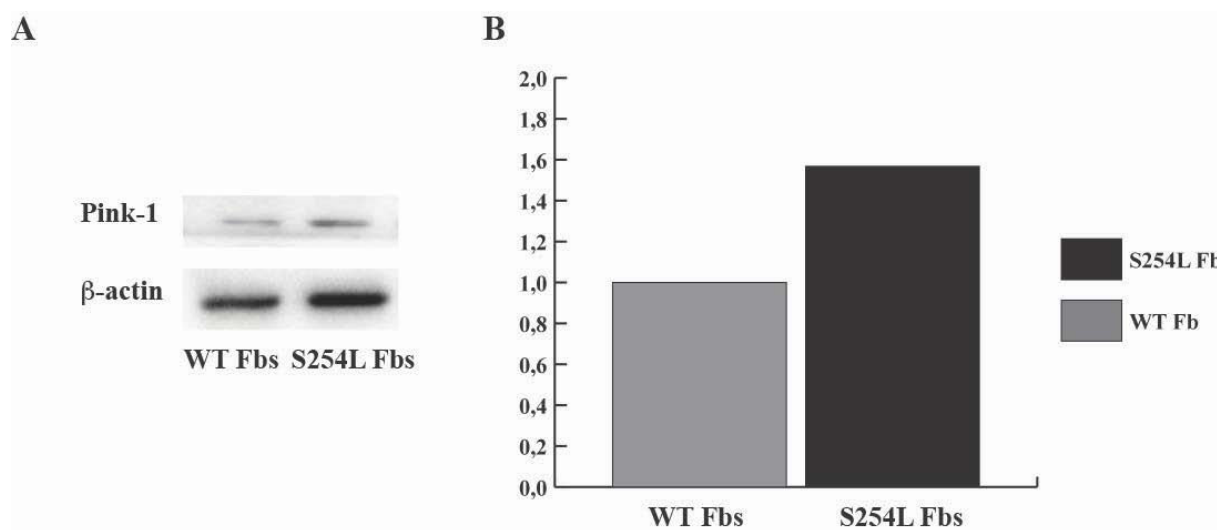
**Figure 8: Analysis of WT and S254L fibroblasts ultrastructure.** Ultrastructure of WT cells (a), G530S Fbs (b) used as a control of ER dilatation and of S254L Fbs (c and d). For WT Fbs arrow in (a) indicates mitochondria, arrowhead indicates ER. For G530S Fbs, arrowhead shows ER. For S254L Fbs, in c, arrow indicates autophagic vesicles, black arrowhead indicates mitochondria and grey arrowhead indicates ER.

Figure 9



**Figure 9: Quantification of autophagy and ER-stress on WT and S254L fibroblasts.** A, Analysis of autophagic level by Western-blot with LC3B1 antibodies, with (+) or without (-) SVF, in the absence (Ip-) or in the presence (Ip+) of pepstatin/E64d. B, Densitometric analysis was performed using Image J software and data were normalized using GAPDH. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of 3 separate experiments. C, Western-blot using anti-Bip antibodies and anti-GAPDH as a control. D, Analysis of BIP expression level using Image J software (n= 3). E, Analysis of the UPR marker, XBP-1 (spliced (304 pb) and unspliced (330 pb), before (-) and after (+) treatment with thapsigargin, by RT-PCR.

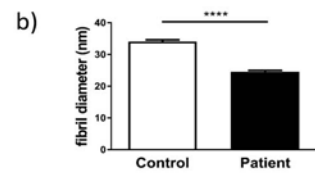
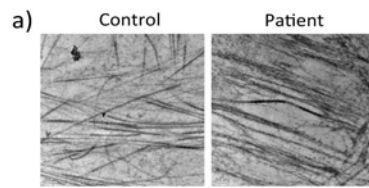
Figure 10



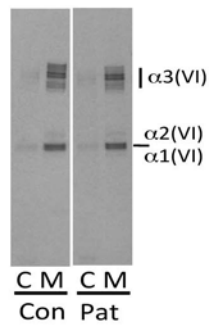
**Figure 10: Quantification of mitophagy on WT and S254L fibroblasts.** A, expression level of PINK1 and  $\beta$ -actin quantified by Western-blot (B) Quantitative band measurement for PINK1 normalized using  $\beta$ -actin.

**Figure S1**

**A**



**B**







# **DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS**

## **DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS**

La forme classique du syndrome d'Ehlers-Danlos (EDSc) est une pathologie très hétérogène, de par la sévérité des atteintes principales et la présence de symptômes dit secondaires. Dans l'optique d'établir une corrélation entre le génotype et le phénotype de ce syndrome, plusieurs équipes ont choisi de réaliser une comparaison entre le tableau clinique des patients et les diverses mutations qui les touchent. Ainsi Symoens et al. ont observé que 90% des patients ayant développés un EDSc étaient porteurs de mutations sur les gènes *COL5A1* et *COL5A2*, émettant l'hypothèse que l'EDSc était strictement associé à des mutations sur les gènes du collagène V (Symoens et al. 2012). La majorité de ces mutations vont affecter *COL5A1* et sont soit des mutations entraînant une haploinsuffisance de la chaîne  $\alpha 1(V)$  (mutations faux-sens et délétions modifiant le cadre de lecture) soit des mutations structurales. Toutefois, aucune corrélation entre le degré de sévérité et le type de mutation (structurale ou nulle), ni leur localisation (N-propeptide, domaine en triple hélice et C-propeptide) n'a pu être établie ; seules les mutations de *COL5A2* semblant être associées aux phénotypes les plus sévères (Malfait et al. 2005; Symoens et al. 2012; Ritelli et al. 2013).

Ayant pour but d'établir un lien entre les mutations et le phénotype observé chez les patients, mon projet de thèse visait, initialement, à évaluer l'effet de certaines mutations de *COL5A1* sur le phénotype en étudiant leur impact d'un point de vue moléculaire et cellulaire. Cela, dans l'optique d'identifier les processus biologiques altérés par les mutations EDSc et ainsi éclaircir nos connaissances sur la pathogénèse de l'EDSc, ce qui représenterait un premier pas dans l'élaboration de solutions thérapeutiques.

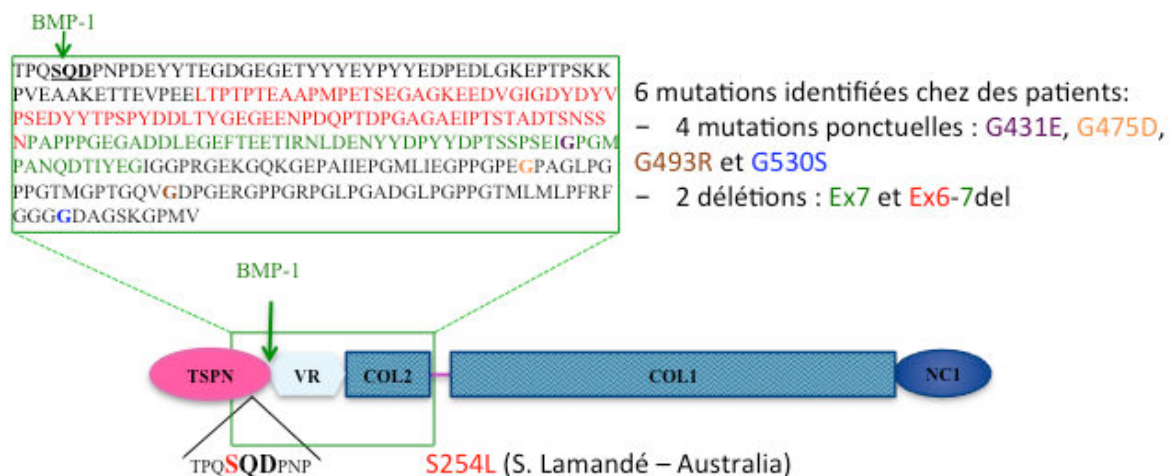
Notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années au collagène V et notamment à étudier l'effet des mutations structurales du N-propeptide, non seulement sur la synthèse du collagène V mais aussi sur la formation de la matrice extracellulaire ainsi que sur le comportement des fibroblastes du derme qui sont les cellules de la peau responsables de la synthèse de la majorité des composants de la matrice extracellulaire (MEC).

Il est parfois possible de prédire l'effet des mutations structurales en fonction de leur localisation. Les mutations du C-propeptide peuvent affecter la formation de la triple

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

hélice en modifiant le domaine de trimérisation du collagène V. De même, les mutations situées dans la région codant pour le large domaine collagénique COL1 peuvent avoir un impact sur la stabilité de la triple hélice et donc de la molécule de collagène. Toutefois, il est difficile de comprendre comment les mutations affectant le domaine N-terminal peuvent conduire à la pathologie en dehors des mutations présentes au niveau du peptide signal qui est important pour l'adressage du collagène V dans la MEC (Symoens et al. 2009). Ce domaine n'intervient pas dans la trimérisation de la protéine mais va réguler la nucléation et le diamètre des fibres de collagène. Il est également le siège d'interactions avec des partenaires du collagène V parmi lesquels le collagène I, le collagène VI ou encore le TGF- $\beta$  (Birk 2001; Symoens et al. 2011).

Le groupe d'Anne de Paepe (Gand, Belgique), constitué majoritairement de médecins-généralistes, a identifié un grand nombre de mutations situées au niveau du N-propeptide qui entraînent un EDSc. Notre équipe travaille depuis plusieurs années avec ce groupe, qui nous fournit des fibroblastes du derme issus de biopsies de peau des patients. Nous avons au départ choisi de nous focaliser sur 6 mutations : 4 mutations ponctuelles : G431E, G475D, G493R et G530S et 2 délétions : délétion de l'exon 7 et délétion des exons 6 et 7, situées sur les différents domaines du N-propeptide de la chaîne  $\alpha_1(V)$  à savoir le domaine TSPN, la région variable et le domaine COL2 (Figure 30).

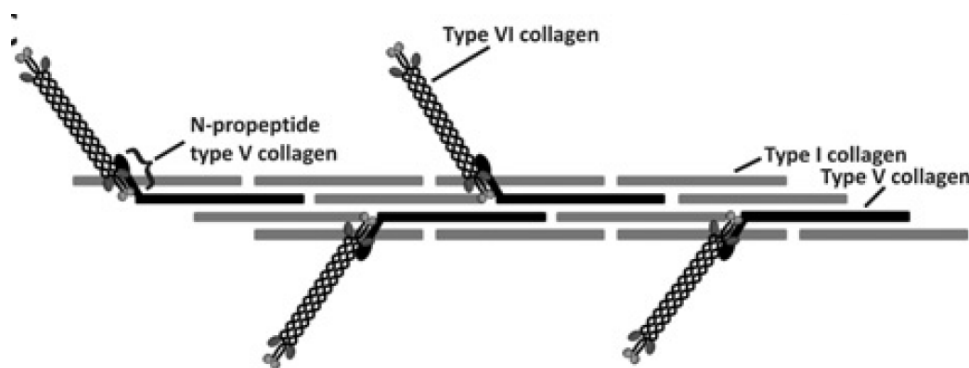


**Figure 30 :** Localisation des mutations EDSc étudiées du N-propeptide de la chaîne  $\alpha_1(V)$ .

## Discussion générale, perspectives et conclusions

Puis, assez rapidement, une mutation a tout particulièrement attiré notre attention et a été au centre des travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse. Cette mutation ponctuelle, située à la frontière du domaine TSPN et de la région variable change la sérine en position 254 en leucine (S254L) et va induire chez le patient des symptômes musculaires, qui ne sont habituellement pas retrouvés chez les patients EDSc. Le patient S254L a présenté un retard dans l'acquisition de la marche et il a, au cours de sa deuxième décennie, développé des contractures aux poignets et aux coudes, symptômes que l'on retrouve normalement associés aux myopathies liées au collagène VI à savoir la Dystrophie Musculaire Congénitale d'Ullrich (UCMD) et la Myopathie de Bethlem (BM) (Bönnemann 2011). Aucune mutation n'a été identifiée au niveau des gènes codant pour le collagène VI chez ce patient qui est porteur de la mutation S254L à l'état hétérozygote. Elle représente la première mutation sur un gène codant pour le collagène V, qui va induire un phénotype musculaire.

Comme évoqué plus haut, les mutations sur *COL5A1* provoquent habituellement des symptômes cutanés et articulaires associés à un EDSc. Un chevauchement entre les myopathies et l'EDSc avait déjà été observé chez un groupe de patients atteints d'un UCMD. Porteurs de mutations sur le collagène VI, ils développent également une hyperlaxité articulaire et des défauts de cicatrisation (Kirschner et al. 2005). De plus, des mutations sur 2 autres gènes, *COL12A1* et *TN-X*, ont également induit un syndrome chevauchant EDSc/UCMD (Voermans et al. 2007; Zou et al. 2014). Il est intéressant de constater que les protéines impliquées dans ce type de syndromes chevauchants, sont toutes des protéines de la MEC connues pour interagir entre elles. Par exemple, des travaux réalisés au sein de notre équipe ont montré que le collagène V et le collagène VI interagissent ensemble et que cette interaction se fait via le domaine N-terminal de la chaîne  $\alpha 1(V)$  (Figure 31) (Symoens et al. 2011).



**Figure 31 :** Modèle proposé pour l'interaction entre le collagène V et le collagène VI (Symoens et al. 2011).

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

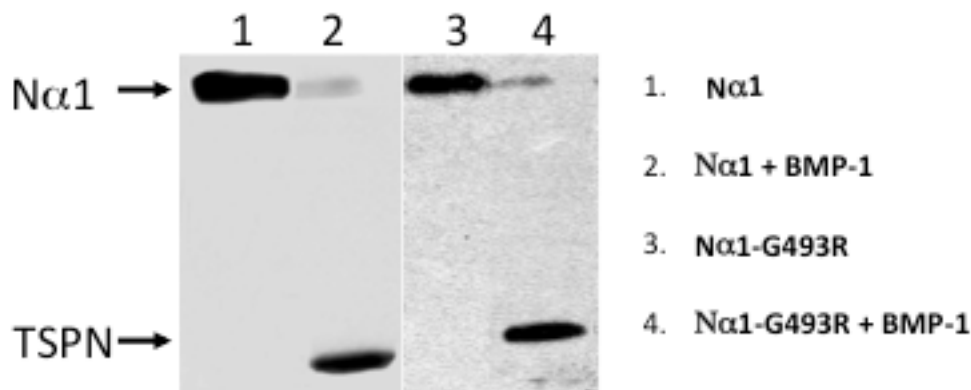
De même, le collagène VI et la ténascine-X interagissent ensemble, notamment pour réguler la fibrillogénèse (Minamitani et al. 2004) et le collagène XII interagit avec la ténascine-X et les fibres de collagène I (Font et al. 1996; Veit et al. 2006). L'ensemble de ces résultats démontrent l'existence d'un chevauchement entre différentes pathologies du tissu conjonctif. Ils soulignent également l'importance du réseau protéique qui forme la MEC, et pas seulement le collagène VI, dans l'homéostasie du tissu musculaire. L'approche pour étudier la pathogénèse de l'UCMD et de l'EDSc ne doit dès lors pas se focaliser sur une protéine particulière, mais l'intégrer au sein d'un réseau d'interaction impliquant différentes protéines de la MEC.

Durant sa synthèse, le collagène V va subir une étape de maturation au cours de laquelle ses extrémités N/C-terminales vont être clivées. La chaîne  $\text{pro}\alpha 1(\text{V})$  va ainsi avoir son C-propeptide clivé par l'action de la Furine et/ou la BMP-1, et son N-propeptide partiellement clivé par la BMP-1 (Imamura et al. 1998; Kessler et al. 2001). Ce dernier clivage, qui se produit entre la sérine 254 et la glutamine 255, libère le domaine TSPN, la région variable et le domaine COL2 restant eux liés au large domaine en triple hélice COL1 (Figure 30) (Kessler et al. 2001). Parmi les mutations identifiées sur le N-propeptide, la mutation S254L a donc la particularité de modifier la séquence reconnue par la BMP-1 et son site de clivage. Notre laboratoire avait auparavant étudié le clivage enzymatique du N-propeptide à l'aide d'une construction permettant l'expression d'un peptide  $\text{N}\alpha 1$  correspondant au N-propeptide de la chaîne  $\alpha 1(\text{V})$  plus les 11 premiers triplets du domaine COL1. Cette construction avait permis d'effectuer des tests de clivage enzymatique *in cellulo* dans les cellules HEK-293 EBNA (Bonod-Bidaud et al. 2007). Au cours de ma thèse j'ai donc introduit, par mutagenèse dirigée, la mutation S254L dans la construction  $\text{N}\alpha 1$  et observé son impact sur le clivage par BMP-1. Pour ce faire, la construction  $\text{N}\alpha 1$  a été co-transfectée dans les cellules HEK-293 EBNA avec un plasmide permettant l'expression de BMP-1. Le clivage de  $\text{N}\alpha 1$  a ensuite été analysé par Western-blot à l'aide d'anticorps reconnaissant le domaine TSPN libéré à la suite de l'action de l'enzyme. J'ai ainsi démontré que le fragment TSPN n'était pas libéré lorsque la sérine 254 était mutée en Leucine. Ce résultat, qui a été confirmé par un test de clivage *in cellulo* sur la molécule entière  $\alpha 1(\text{V})$  et par clivage *in vitro*, démontre que la mutation S254L abolit le clivage du N-propeptide de la chaîne  $\alpha 1(\text{V})$  par la BMP-1, altérant ainsi une étape clé de la maturation de la chaîne de collagène V. Ce résultat n'est pas surprenant dans la

## Discussion générale, perspectives et conclusions

mesure où la mutation modifie le site de clivage de la BMP-1 (Figure 30) (Imamura et al. 1998). Néanmoins, la caractérisation du clivage du N-propeptide, réalisé dans notre laboratoire, avait montré que la mutation du résidu en position P1 n'affectait par le clivage du N-propeptide par la BMP-1. En effet, le clivage était toujours effectif lorsque la sérine 254 était modifiée en alanine. Seul le résidu aspartate en position P2' semblait être essentiel à ce clivage (Bonod-Bidaud et al. 2007). Le résultat que j'ai obtenu lors de la caractérisation du clivage du mutant S254L par la BMP-1 ne remet pas en cause les conclusions de notre précédente étude mais elle souligne l'importance de la nature de l'acide aminé en position P1. Le remplacement de la sérine par une leucine bien qu'étant un acide aminé apolaire, non chargé et aliphatique comme l'alanine, va avoir un effet drastique sur le clivage.

Cette expérience sur la maturation de la chaîne  $\alpha 1(V)$  au niveau de l'extrémité N-terminale, a également été réalisée pour les 4 autres mutations ponctuelles du N-propeptide, à notre disposition au laboratoire, qui induisent, chez les patients porteurs, un EDSc. À l'aide du clivage enzymatique *in cellulo*, j'ai observé que de l'ensemble des mutations du N-propeptide étudiées, seule la mutation S254L abolit le clivage par la BMP-1. En effet, le peptide  $N\alpha 1$  porteur des autres mutations G431E, G475D, G493R et G530S, est clivé par la BMP-1 (Figure 32 et données non communiquées).



**Figure 32** : Suivi du clivage *in cellulo* du peptide  $N\alpha 1$  sauvage et porteur de la mutation G493R. Western-blots à l'aide d'anticorps reconnaissant le domaine TSPN de la chaîne  $\alpha 1(V)$ . Milieu conditionné issu d'une culture de cellules 293-EBNA transfectées avec la construction  $N\alpha 1$  sauvage (1),  $N\alpha 1$  sauvage et BMP-1 (2),  $N\alpha 1-G493R$  (3) et  $N\alpha 1-G493R$  et la BMP-1(4).

Ce résultat représente une première différence de l'impact moléculaire que peuvent avoir les mutations induisant un EDSc et celle présentant un phénotype musculaire.

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

Néanmoins, l'absence de clivage BMP-1 ne peut-être corrélé avec un effet musculaire car une délétion de l'exon 5, codant pour la séquence reconnue par BMP-1, a été identifiée chez un patient EDSc n'ayant pas développé de symptômes musculaires (Takahara et al. 2002).

Nous avons, par la suite, cherché à savoir si la présence de la chaîne  $\alpha 1(V)$  mutée pouvait modifier la quantité de collagène secrétée dans la MEC. Pour ce faire, j'ai analysé, par SDS-PAGE, la production de collagène par les fibroblastes du derme issus du patient S254L et de donneurs sains. J'ai ainsi analysé la quantité de collagène sécrété et présent dans le milieu de culture, et celle incorporée dans la couche cellulaire d'une culture de fibroblastes. À l'aide d'un marquage du collagène au carbone 14 ou des protéines au bleu de Coomassie, j'ai observé que les chaînes  $\alpha 1(V)$  et  $\alpha 2(V)$  étaient bien présentes dans le milieu de culture des fibroblastes mutants S254L. Je n'ai observé aucune différence significative dans la quantité de collagène V sécrété, ni dans la migration de la chaîne  $\alpha 1(V)$ . Ainsi la mutation S254L ne semble pas altérer la sécrétion de la chaîne  $\alpha 1(V)$ . Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus sur cellules HEK-293 EBNA où le peptide  $N\alpha 1$  et la chaîne  $\alpha 1(V)$  sont sécrétés par les cellules malgré la présence de la mutation et l'absence de clivage. L'absence de différence quant à la quantité de collagène sécrété et/ou les défauts de migration sur gel restent toutefois à relativiser au regard de la technique utilisée. En effet, l'analyse biochimique par SDS-PAGE du collagène V produit par les fibroblastes issus de patients EDSc a révélé des défauts de migration dans seulement 10% des cas d'EDSc lors de 2 études portant sur respectivement 48 et 128 patients porteurs d'un EDSc et porteurs de mutations sur les gènes du collagène V, soulignant les limites de cette technique pour la détection d'anomalies structurales du collagène V (Malfait et al. 2005; Symoens et al. 2012).

J'ai également évalué l'impact de la mutation sur la formation et l'organisation de la MEC. Pour ce faire, les fibroblastes ont été mis en culture jusqu'à confluence et cultivés en présence de vitamine C afin de stimuler la production et la sécrétion de collagène dans la MEC puis la qualité des fibres de collagène produites par les fibroblastes sauvages et S254L en culture a été observée en microscopie électronique à transmission (MET). L'observation des fibres de collagène a révélé que le diamètre des fibres de collagène est inférieur à celui observé chez le donneur sain. En cela, les fibres du patient S254L montrent les mêmes anomalies que celles observées chez les patients



## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

EDSc et UCMD où il a été montré qu'elles présentaient, dans la plupart des cas, une grande variabilité dans le diamètre et une organisation dite en chou-fleur (Kirschner et al. 2005; Symoens et al. 2012). Le collagène V régule la nucléation et le diamètre des fibres et ce, de manière dose dépendante, et via son domaine N-terminal (Chanut-Delalande et al. 2001; Birk 2001). L'absence de collagène V et/ou du domaine N-terminal est associée à un épaissement des fibres de collagène (Figure 17). À l'inverse, la mutation S254L semble induire une diminution du diamètre des fibres. Il a été proposé que le domaine N-terminal du collagène V régulerait le diamètre des fibres de collagène en contrôlant l'accrétion du collagène I et l'épaisseur des fibres de collagène par encombrement stérique (Figure 17) (Birk 2001). La mutation S254L, en altérant le clivage du N-propeptide par la BMP-1, entraînerait la formation d'une molécule de collagène V présentant un plus large domaine N-terminal, dû à la présence du domaine TSPN, ce qui aurait à son tour un effet sur l'accrétion des molécules de collagène avec pour conséquence une diminution de l'épaisseur des fibres.

Par immunofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre le collagène I et le collagène V, j'ai observé, dans la MEC produite par les fibroblastes S254L en culture, une désorganisation des fibres de collagène qui ont un aspect plus tortueux comparé aux fibres produites par les fibroblastes sains. De plus, l'immunomarquage a également révélé que le réseau de collagène VI déposé dans la MEC était désorganisé par rapport à celui observé chez les fibroblastes issus de donneurs sains. A l'inverse, aucune différence quant au réseau de fibronectine n'a été observée. Ces résultats confirment d'une part, l'importance du collagène V sur la formation et l'organisation des fibres de collagène. D'autre part, ils semblent indiquer que le collagène V participerait également à l'organisation supramoléculaire du collagène VI dans la MEC.

Notre équipe avait précédemment montré que le collagène V interagissait avec le collagène VI et que cette interaction se faisait via le domaine N-terminal de la chaîne  $\alpha 1(V)$  (Figure 31). L'impact du collagène V sur l'organisation du collagène VI pourrait donc se faire via ce domaine N-terminal. Pour tester cette hypothèse, Il serait donc important d'évaluer l'effet de cette mutation sur l'interaction avec le collagène VI. Nous avons initié cette démarche, en évaluant par un test ELISA, l'impact de la mutation S254L sur l'interaction du domaine N-terminal avec le collagène VI. Les résultats préliminaires obtenus ne semblent pas montrer un effet de la mutation sur

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

l'interaction COL V/COL VI. Néanmoins, le test ELISA effectué selon le protocole utilisé pour identifier les partenaires du domaine N-terminal du collagène V (Symoens et al. 2011), a été réalisé sur le peptide N $\alpha$ 1 non clivé par la BMP-1, ce qui, bien que correspondant à l'effet de la mutation S254L sur le clivage, n'est à priori pas la forme dans laquelle se retrouve le domaine N-terminal du collagène V non muté dans la MEC. Afin de tester l'impact réel de la mutation sur l'interaction COL V/COL VI, il faudrait être capable de comparer l'interaction du collagène VI avec, d'une part, la région N-terminale non clivée car porteuse de la mutation S254L et, d'autre part, la région N-terminale clivée par BMP-1. Cela pourrait-être réalisé *in vitro*, par test ELISA sur le domaine N-terminal préalablement clivé par la BMP-1, ou non, ou sur la MEC produite par les fibroblastes issus du derme par co-immunoprécipitation. Par ailleurs, il serait important de déterminer si la désorganisation du collagène VI observée dans la MEC des fibroblastes du derme est également retrouvée dans le tissu musculaire du patient S254L. Nous saurions ainsi si les défauts musculaires associés à la mutation S254L sont lié à une désorganisation du collagène VI comme c'est le cas dans le UCMD et la BM (Bönnemann 2011).

Il a été montré que le collagène VI régule la fibrillogénèse et l'organisation des fibres de collagène dans la MEC produite par les fibroblastes (Minamitani et al. 2004; Theocharidis et al. 2016). C'est également le cas des deux autres protéines impliquées dans des syndromes chevauchants EDS/UCMD, la ténascine-X et le collagène XII. Ces deux molécules interagissent avec les collagènes fibrillaires, soit directement pour la ténascine-X soit via les protéoglycanes pour le collagène XII, afin de réguler l'organisation des fibres de collagène (Font et al. 1996; Veit et al. 2006; Minamitani et al. 2004). Il serait donc également intéressant de voir l'effet de la mutation S254L sur le dépôt et la localisation de la ténascine-X et du collagène XII dans la matrice. Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse que la mutation S254L altérerait l'organisation des fibres de collagène et du collagène VI dans la matrice extracellulaire et aurait ainsi pour conséquence d'induire la symptomatologie musculaire observée chez les patients atteints d'un UCMD. En effet, chez ces patients, l'altération du réseau de collagène VI a notamment pour conséquence une apoptose accrue des fibres musculaires qui peut être réduite par l'ensemencement des fibres musculaires de patients UCMD sur du collagène VI (Bernardi & Bonaldo 2008).

Au cours de la prise en charge clinique du patient S254L, une biopsie musculaire a été réalisée. Celle-ci n'a révélé aucune dystrophie musculaire. Néanmoins, cela n'implique

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

pas forcément que le phénotype observé chez le patient ne soit pas associé avec un défaut de tissu musculaire. En effet, les biopsies musculaires réalisées chez les patients UCMD à un stade précoce ne présentent pas toujours de dystrophie musculaire, qui va apparaître à un stade plus avancé de la maladie (Schessl et al. 2008). À l'inverse, la réalisation d'un co-marquage du collagène VI et d'un marqueur de la membrane basale, sur ces même biopsies, révèlent chez les patients UCMD un défaut de localisation du collagène VI qui peut-être fortement diminué, voir absent de la MEC dans le cas des mutations récessives, ou désorganisé pour les mutations dominantes (Bönnemann 2011). Dans le but d'éclaircir le diagnostic musculaire du patients S254L, un immunomarquage du collagène VI et de la membrane basale du tissus musculaire est donc nécessaire et actuellement en cours de réalisation dans l'équipe de S. Lamandé.

Les contractures et la faiblesse musculaire observées chez le patients S254L peuvent également avoir une origine neurologique. Aussi, une mesure de conduction nerveuse a été effectuée sur le patient S254L qui a révélé la présence d'une neuropathie. Les neuropathies peuvent être liées à un défaut neurologique ou à la myélinisation, cette dernière étant assurée, au niveau du système nerveux périphérique (SNP), par les cellules de Schwann (Mirsky & Jessen 1999) dont l'intégrité et les fonctions sont dépendantes de la MEC environnante.

L'absence d'interaction entre les cellules de Schwann et la matrice environnante va notamment altérer la production et l'organisation de la gaine de myéline (Chen, Cescon & Bonaldo 2014). Il a été montré que le collagène VI joue un rôle dans la myélinisation et la coordination motrice chez la souris. En effet, chez les souris *Col6a1*<sup>-/-</sup>, l'absence de collagène VI dans la MEC des cellules de Schwann (CSc) entraîne une épaissement de la gaine de myéline déposée au niveau du nerf sciatique et une désorganisation des fibres nerveuses de type C (Chen, Cescon, Megighian, et al. 2014). Le collagène V est également présent au niveau du SNP où il est déposé par les CSc (Chernousov et al. 2000). Des études effectuées chez le rat ont révélé que les CSc produisent un collagène V formé par les chaîne  $\alpha1(V)$  et  $\alpha4(V)$  (Chernousov et al. 1996). La chaîne  $\alpha4(V)$  régulerait l'adhésion, l'étalement et la migration des CSc via l'interaction de son domaine N-terminal, qui possède un site de liaison à l'héparine, avec l'héparane sulfate des protéoglycanes transmembranaires présent à la surface des CSc (Chernousov et al. 2001).  $\alpha3(V)$  qui est exprimée uniquement durant le stade embryonnaire du rat, va jouer un rôle dans le développement du SNP, notamment en

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

interagissant avec le Glypican-1 pour réguler la myélinisation des axones (Chernousov et al. 2006).

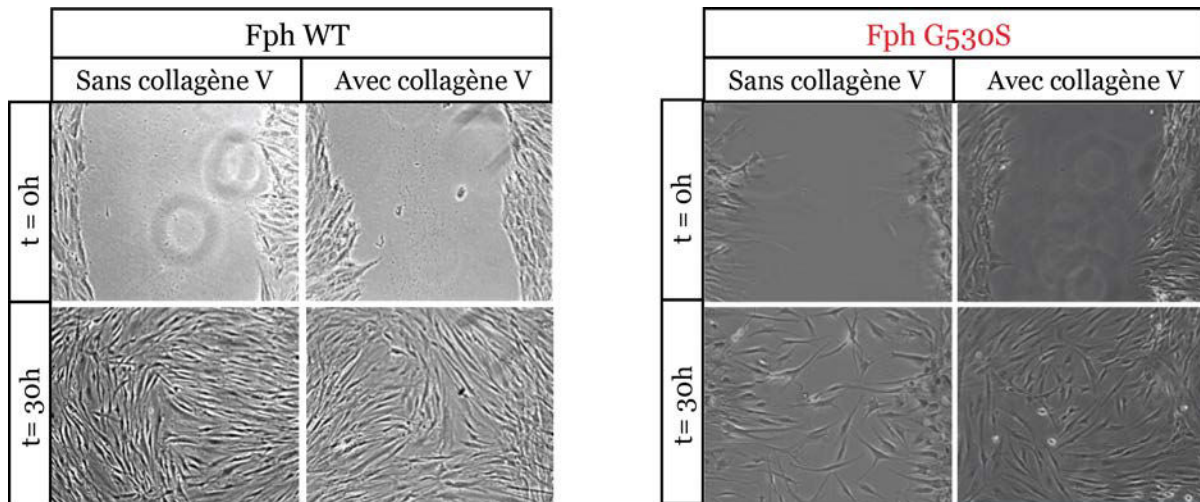
La chaîne  $\alpha 4(V)$ , qui correspondrait en réalité à la chaîne  $\alpha 3(V)$  chez le rat, forme un hétérotrimère de collagène V en association avec la chaîne  $\alpha 1(V)$ . Les deux chaînes ont leur région N-terminale composée des mêmes domaines TSPN, région variable, COL2 et NC2. Néanmoins, la région N-terminale de la chaîne  $\alpha 1(V)$  ne possède pas de site de liaison à l'héparine importante pour l'interaction avec les HSPG membranaires (Chernousov et al. 2000). Aucun rôle de la chaîne  $\alpha 1(V)$  dans le développement du SNP n'a encore été décrit. Au regard de la neuropathie développée par le patient S254L, il serait important d'étudier l'impact de la mutation sur l'intégrité et les fonctions des CSc notamment en évaluant le rôle de la chaîne  $\alpha 1(V)$  sauvage et mutante sur l'adhésion cellulaire et la migration des CSc *in vitro*.

Aucune caractérisation poussée du phénotype cutané n'a été effectuée par les cliniciens, qui ont toutefois observé une peau dite « anormale » chez le patient S254L. J'ai donc cherché à évaluer si le patient présentait au niveau cellulaire, les défauts caractéristiques d'un EDSc. Il a été montré que les fibroblastes issus de patients porteurs de mutations induisant une haploinsuffisance en collagène V présentaient des défauts de cicatrisation lors de test de migration après blessure (Viglio et al. 2008).

J'ai donc réalisé des tests de blessure sur couche cellulaire, sur les fibroblastes S254L et les fibroblastes sains. Pour ce faire, les fibroblastes ont été ensemencés, une blessure a été réalisée à confluence et le recouvrement de la blessure a été suivi par vidéo-microscopie, un cliché de la blessure ayant été pris toute les 5 minutes pendant 30h. Alors que les fibroblastes sauvages ont entièrement recouvert la blessure après 30h de migration, celle-ci n'est que partiellement recouverte par les fibroblastes S254L. En plus du taux de recouvrement, j'ai également mesuré la vitesse de migration des cellules au cours de la cicatrisation et constaté que la vitesse de déplacement des fibroblastes mutants était inférieure à celle mesurée pour les cellules issues de donneurs sains. Chez les fibroblastes EDSc haploinsuffisants, il a été montré que l'addition de collagène V exogène dans le milieu de culture permettait de restaurer le phénotype sauvage (Viglio et al. 2008). j'ai donc étudié l'effet de l'addition de collagène V exogène (que nous produisons de manière recombinante au laboratoire dans les cellules 293-EBNA) lors du test de cicatrisation et j'ai ainsi pu montrer pour les fibroblastes S254L, que, même si la vitesse de migration était partiellement restaurée

## Discussion générale, perspectives et conclusions

chez les mutants, le recouvrement n'était lui pas amélioré par l'addition de collagène V. Ainsi à la différence des mutations induisant une haploinsuffisance, l'addition de collagène V n'a pas d'effet sur la cicatrisation *in cellulo* des fibroblastes S254L et un léger effet sur leur migration. En parallèle des fibroblastes S254L j'ai, au cours de ma thèse, étudié également la cicatrisation chez les fibroblastes porteurs des mutations EDSc précédemment citées (G475D et G530S) et j'ai pu montrer que, de la même manière que les fibroblastes S254L, le recouvrement des blessures est incomplet pour ces deux mutations (Figure 33 et résultats non montrés).



**Figure 33** : Test de cicatrisation *in cellulo* sur les fibroblastes. Clichés de suivi de recouvrement de blessures réalisés sur des cultures confluentes de fibroblastes du derme issus d'un donneur sain et du patient porteur de la mutation G530S sur la chaîne  $\alpha_1(V)$ . Le recouvrement a été suivi sur 30h, pour des fibroblastes cultivés en absence (A) ou en présence de collagène V exogène\* (B). \* Homotrimère  $\alpha_1(V)\beta_3$  à 5  $\mu\text{g/ml}$ .

De manière intéressante, contrairement aux fibroblastes S254L et à l'instar des fibroblastes EDSc haploinsuffisants décrit par Viglio et al. , l'addition de collagène V semble relativement bien restaurer le recouvrement de la blessure chez les fibroblastes G475D et G530S.

Il a été montré que les fibroblastes EDSc haploinsuffisants en collagène V, présentaient une distribution anormale des intégrines. En effet, le taux d'intégrines  $\alpha_2\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_1$ , récepteurs respectivement des collagènes et de la fibronectine, est réduit au profit des intégrines  $\alpha_v\beta_3$ . L'addition de collagène V exogène dans le milieu de culture permet de restaurer la distribution des intégrines observée chez les fibroblastes sains (Zoppi et al. 2004). Zoppi et al. émettent dès lors l'hypothèse que la restauration de la cicatrisation par la présence de collagène V exogène serait liée à son effet sur les intégrines présents à la surface des cellules. Il serait donc intéressant d'évaluer quels types d'intégrines se

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

retrouvent distribuées à la surface des cellules, qu'elles soient porteuses de la mutation S254L ou des mutations EDS<sub>c</sub> du N-propeptide. Cela pourrait être réalisé par cytométrie en flux selon le protocole utilisé par (Zoppi et al. 2004) en présence ou non de collagène V exogène.

L'organisation du cytosquelette, l'adhésion cellulaire ainsi que la prolifération étant des processus biologiques important pour la migration et donc la cicatrisation, j'ai ensuite choisi d'évaluer l'impact de la mutation S254L sur ces différents processus.

L'organisation du cytosquelette a été étudiée par immunofluorescence et marquage du réseau d'actine à l'aide de la phalloïdine-rhodamine. Les fibroblastes S254L ne semblent pas présenter de défaut dans l'organisation du réseau d'actine, les fibres de stress sont correctement formées par les fibroblastes mutants et ils ne semblent pas avoir une organisation différente de celle observée chez les fibroblastes issus de donneurs sains. J'ai également réalisé des expériences d'immunofluorescence en présence d'anticorps permettant de marquer la vinculine et donc de mettre en évidence les points de contact focaux, qui représentent les complexes d'interaction entre les cellules et la MEC (Schmidt & Friedl 2010). Tout comme les fibroblastes sains, les cellules issues du patient S254L présentent des contacts focaux correctement organisés à la surface cellulaire. À partir des clichés réalisés sur les marquages de la vinculine, nous avons réalisé, en collaboration avec Martial Balland à Grenoble, une analyse morphométrique des contacts focaux et mesuré le nombre et la géométrie de ces contacts. Cette analyse a révélé que les fibroblastes S254L formaient moins de contacts focaux et que ceux-ci étaient également plus petits en longueur et en aire. Par conséquent, la surface adhésive des fibroblastes mutants est inférieure à celle des fibroblastes sains suggérant un défaut d'adhésion des fibroblastes mutants à la matrice environnante. Ce défaut d'adhésion peut-être la conséquence, d'un défaut cellulaire et/ou d'un défaut de la matrice.

Enfin, pour terminer l'analyse des processus biologiques impliqués dans la cicatrisation, je me suis intéressé à la prolifération cellulaire. À l'aide d'un test MTT, j'ai suivi par mesure de l'absorbance à 550 nm, la prolifération des fibroblastes sains et mutants. J'ai ainsi observé que les fibroblastes S254L avaient un taux de prolifération inférieur à celui observé chez les fibroblastes sains, ce défaut de prolifération pouvant être dû à un défaut de division cellulaire et/ou à un taux de mort cellulaire supérieur chez les fibroblastes mutants. Il serait important de continuer cette analyse d'une part

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

en quantifiant l'apoptose mais également en analysant le cycle cellulaire des fibroblastes mutants afin d'évaluer l'impact de la mutation sur la division cellulaire.

Au cours de ma thèse, j'ai également effectué une analyse ultrastructurale du contenu intracellulaire des fibroblastes par microscopie électronique à transmission (MET). L'analyse des micrographies m'a permis d'observer, au niveau du cytoplasme, une accumulation de vésicules autophagiques et des mitochondries altérées dans les fibroblastes S254L, comparé aux fibroblastes sains.

L'accumulation des vésicules autophagiques peut traduire une augmentation du flux autophagique ou à l'inverse une inhibition de celui-ci. Afin de confirmer l'accumulation des vésicules autophagiques observée par MET, j'ai quantifié ces vésicules par Western-blot à l'aide d'anticorps anti-LC3, protéine localisée à la surface des autophagosomes. J'ai mis en évidence que les fibroblastes S254L présentaient une accumulation de LC3-II par rapport aux fibroblastes sains, confirmant ainsi l'accumulation observée par MET. Afin de vérifier s'il s'agissait d'une activation du flux, qui se traduirait par une augmentation du nombre de vésicules autophagiques ou plutôt d'une altération du flux autophagique, les vésicules s'accumulant alors du fait de leur non dégradation, j'ai quantifié par Western-blot, les effets de l'inhibition de la dégradation des vésicules d'autophagie. J'ai montré que l'inhibition de la dégradation des autophagosomes chez les fibroblastes mutants induisait une augmentation de l'accumulation des autophagosomes, et que donc les fibroblastes mutés présentaient une augmentation du flux autophagique. Ainsi la mutation S254L de la chaîne  $\alpha 1(V)$  n'altère pas l'autophagie contrairement aux mutations du collagène VI. En effet, l'autophagie est défectueuse dans les fibres musculaires issues de patients UCMD et BM, ainsi que pour les souris *col6a1<sup>-/-</sup>*. Ce défaut d'autophagie peut-être restauré à l'aide de drogues activant l'autophagie ou en ensemencant les cellules sur du collagène VI sauvage (Grumati et al. 2010) ce qui suggère que le collagène VI présent dans la MEC régulerait la voie de l'autophagie par une voie de signalisation outside-in.

L'autophagie permet également de dégrader les macromolécules mal conformées et les organites endommagés et de réguler la synthèse protéique. Elle va permettre de réguler la quantité de collagène déposée dans la matrice des tissus fibrotiques (Kim et al. 2012) mais également de dégrader le procollagène mal conformé qui va s'accumuler dans la lumière du réticulum endoplasmique granuleux (REG) (Ishida & Nagata 2009). Pour savoir si l'autophagie observée chez les fibroblastes S254L était associée

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

avec la présence de protéines mal conformées, j'ai mesuré le stress du réticulum endoplasmique par Western-blot à l'aide d'anticorps anti-BiP, une protéine chaperonne qui va s'accumuler dans la lumière du REG mais également par RT-PCR du gène *XBP-1* qui va subir un épissage alternatif en cas de stress du REG. Je n'ai pas observé de stress particulier du REG chez les fibroblastes mutants comparés aux fibroblastes sains. Ainsi la présence de la chaîne  $\alpha 1(V)$  mutée n'induit pas de stress du REG qui traduirait une accumulation de protéines mal conformées (Lenna & Trojanowska 2012). Cela confirme les observations des micrographies de MET, où aucune dilatation du REG n'a été observée.

À l'inverse, les clichés de MET ont révélé une accumulation de mitochondries altérées que l'on retrouve souvent associés à des pathologies dégénératives. Elles vont notamment avoir un rôle important dans la pathogénèse des myopathies du collagène VI où les fibres musculaires vont présenter un défaut de perméabilité de la membrane des mitochondries couplé à une dilatation du réticulum sarcoplasmique qui vont entraîner une apoptose des fibres musculaires et une dégénérescence progressive du tissu musculaire (Bernardi & Bonaldo 2008).

L'observation faite sur les biopsies musculaires du patients S254L n'a pas révélé d'accumulation de mitochondries altérées. C'est également le cas des études effectuées sur les myocytes de patients UCMD et BM, chez qui les dysfonctionnements mitochondriaux sont latents et ne sont observables qu'en condition de stress notamment en induisant leur dépolarisation (Irwin et al. 2003; Bernardi & Bonaldo 2008). Afin de confirmer les observations faites en MET, une étude de l'intégrité des mitochondries, notamment en évaluant leur potentiel de membrane devra être effectuée en condition basale et après dépolarisation membranaire des mitochondries, qui peut être induit par traitement à la cyclosporine (Irwin et al. 2003).

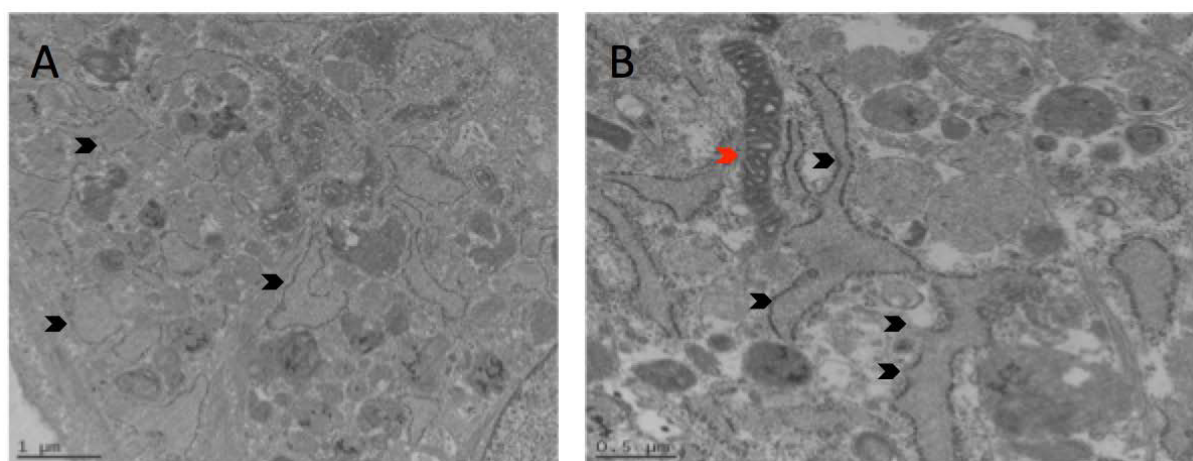
À la différence des cellules déficientes en collagène VI, la mutation S254L du collagène V ne semble pas altérer l'autophagie, les fibroblastes mutants présentant au contraire une augmentation du flux autophagique. J'ai donc cherché à savoir si l'autophagie n'était pas associée à une dégradation des mitochondries, cette autophagie pouvant être induite dans le but de dégrader les mitochondries altérées. Afin de tester cette hypothèse, j'ai évalué le niveau de mitophagie dans les fibroblastes à l'aide d'un Western-blot dirigé contre la protéine Pink-1, qui va être localisée à la membrane externe des mitochondries et permettre leur inclusion dans les vésicules autophagiques et finalement leur dégradation. J'ai montré que les fibroblastes S254L



## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

présentaient une accumulation de Pink-1 par comparaison aux fibroblastes sains. Ainsi, l'autophagie observée pour les cellules mutantes est au moins en partie, associée à de la mitophagie et donc à la dégradation des mitochondries.

L'analyse ultrastructurale par MET a également été réalisée pour les fibroblastes porteurs de la mutations G530S de la chaîne  $\alpha 1(V)$  qui va induire un EDSc. Elle a révélé la présence de vésicules autophagiques et de mitochondries altérées mais également une dilatation du REG chez ces fibroblastes mutant (Figure 34).



**Figure 34** : Cytoplasme de fibroblastes issus du derme du patient G530S, observé en microscopie électronique à transmission. Mitochondrie anormale (tête de flèche rouge) et réticulum endoplasmique granuleux dilaté (têtes de flèche noir) présent dans le cytoplasme des fibroblastes G530S.

Par Western-blot, à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine LC3B, j'ai démontré que, tout comme pour les cellules mutantes S254L, l'accumulation des vésicules autophagiques était associée à une augmentation du flux autophagique pour le mutant G530S. De même, j'ai confirmé par Western-blot, à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine BiP, et par RT-PCR du gène *XBP-1*, que la dilatation du REG observée dans le cytoplasme des fibroblastes G530S était associée à un stress du REG. Cela peut notamment s'expliquer par le fait que la mutation G530S est située au niveau du domaine COL2, petit domaine en triple hélice (Figure 30). Il a été démontré que les protéines chaperonnes, dont BiP, interagissaient avec la triple hélice en cours de formation (Lamande & Bateman 1999). La mutation G530S pourrait avoir des effets sur la stabilité de la triple hélice et conduire à une rétention de la protéine dans le REG. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait important d'effectuer un marquage du collagène V avec des marqueurs du REG afin d'observer l'éventuelle accumulation du collagène V dans le REG. La dilatation du REG a déjà été observée,

## Discussion générale, perspectives et conclusions

notamment dans des cas de mutations structurales du collagène IV (Murray et al. 2014).

J'ai ainsi, au cours de ma thèse, identifié des défauts cellulaires et moléculaires associés à la mutation S254L de la chaîne  $\alpha_1(V)$ . Dans le modèle que je propose à partir de mes résultats (Figure 35), la chaîne  $\alpha_1(V)$  porteuse de la mutation S254L est synthétisée par les fibroblastes et s'associe avec la chaîne  $\alpha_2(V)$  afin de former un hétérotrimère  $[\alpha_1(V)]_2\alpha_2(V)$ . Malgré la présence de la mutation, le collagène V ne semble pas mal conformé et ne va pas induire un stress du REG. La présence de la mutation S254L va cependant entraîner une absence du clivage du N-propeptide de la chaîne  $\alpha_1(V)$  présent dans l'hétérotrimère qui va être incorporé dans les fibres de collagène. Ces fibres vont être désorganisées, tout comme le réseau de collagène VI, qui interagit directement avec les fibres notamment par l'intermédiaire du collagène V. La désorganisation de la MEC va altérer l'adhésion cellulaire, la prolifération cellulaire et la viabilité des mitochondries. La présence des mitochondries altérées va activer dans les cellules en contact avec la matrice, la voie de l'autophagie afin de dégrader les organites endommagés (Figure 35).

### Fibroblastes S254L

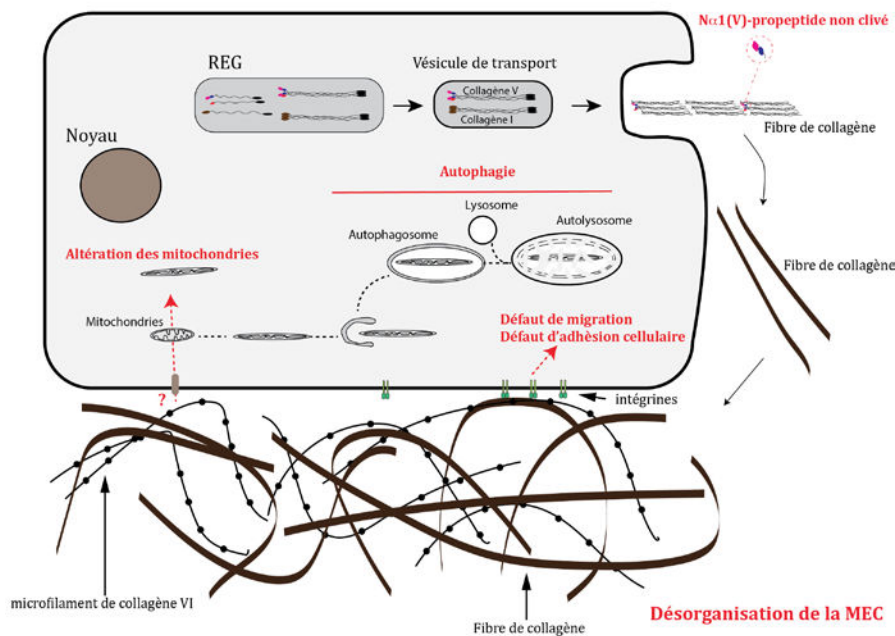


Figure 35 : Impact de la mutation S254L sur l'organisation de la MEC et l'intégrité des fibroblastes.

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

Les défauts cellulaires que j'ai pu mettre en évidence au cours de ma thèse, même s'ils sont associés à la présence d'une mutation sur un gène codant pour un composant de la MEC, pourraient être également dus à un défaut intracellulaire. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de tester l'effet de la MEC produit par les fibroblastes sains sur les cellules mutées. On évaluerait par exemple l'adhésion cellulaire, la migration, l'intégrité des mitochondries et le flux autophagique des fibroblastes S254L ensemencés sur une MEC produite par des fibroblastes issus de donneurs sains. Un protocole a déjà été mis au point et a notamment permis d'observer que les défauts de migration liés à une mutation du collagène VI dans des fibroblastes pouvaient être restaurés si ceux-ci étaient ensemencés sur une matrice produite par des fibroblastes sains (Theocharidis et al. 2016). Ces expériences permettraient de confirmer ou d'infirmer que les défauts observés pour les fibroblastes sont associés à un défaut de la matrice plutôt qu'à des effets intracellulaires liés à la mutation. Elle permettrait également d'évaluer l'impact de la matrice sur d'autres types cellulaires comme notamment les myocytes et les cellules de Schwann.

La présence de collagène VI et son organisation dans la MEC sont importantes pour l'activité autophagique (Grumati et al. 2010). Néanmoins le récepteur cellulaire et la voie de signalisation par laquelle le collagène VI régule l'autophagie n'ont pas été identifiés. Les fibroblastes porteurs de la mutation S254L ne présentent pas de défauts des mécanismes impliqués dans l'autophagie, ce qui signifierait que le collagène V n'est pas impliqué dans la régulation de l'autophagie. Toutefois, tout comme les cellules présentes sur une matrice défectueuse en collagène VI, les fibroblastes S254L voient leurs mitochondries altérées. Sous réserve d'une confirmation que le défaut au niveau des mitochondries serait associé avec la présence dans la MEC du collagène V muté, ces résultats indiqueraient que tout comme le collagène VI, le collagène V est important pour l'intégrité des mitochondries. On pourrait imaginer que le collagène V et VI participe à une même voie de signalisation régulant les fonctions mitochondriales.

Les mécanismes biologiques altérés par la mutation S254L vont entraîner des défauts de prolifération cellulaire, d'adhésion cellulaire et de migration. Tous ces mécanismes identifiés représentent autant d'informations sur la pathogénèse du syndrome associé à la mutation S254L mais également de l'EDSc lié aux mutations du collagène V. Il sera toutefois nécessaire, de détailler l'implication précise du collagène V dans ces différents processus, dans l'optique de trouver des pistes dans l'élaboration d'un

## *Discussion générale, perspectives et conclusions*

traitement pour les syndromes d'Ehlers-Danlos classique et/ou des myopathies associées à des défauts de la MEC. Cela représenterait un pas non négligeable vers la compréhension de la pathogénèse du syndrome.

Enfin les expériences que nous avons initié au cours de ma thèse ont également apporté des informations sur les effets des mutations EDSc sur le N-propeptide dans l'organisation de la MEC et les fonctions et l'intégrité des fibroblastes. En plus de la mutation S254L, plusieurs autres mutations ont été identifiées dans la région qui code pour la région N-terminale de la chaîne  $\alpha_1(V)$ . Ces mutations localisées dans les différents domaines qui composent le N-propeptide (TSPN, région variable et COL2) vont induire un EDSc avec des degrés de sévérité variés. Comme vu précédemment, nous avons commencé à étudier l'impact de 6 mutations EDSc localisées dans ce domaine et notamment étudié leur effet sur la maturation du collagène V, la cicatrisation cellulaire (*in cellulo*) et l'autophagie. Dans l'optique d'identifier la pathogénèse associée aux mutations du N-propeptide mais également identifier les fonctions portées par ce domaine, il serait intéressant de continuer la caractérisation des mutants EDSc, notamment en reproduisant l'ensemble des expériences effectuées lors de la caractérisation de la mutation 254L sur les autres mutations identifiées sur le N-propeptide à notre disposition.

Il sera, par ailleurs, essentiel d'analyser l'effet des mutations EDSc sur les interactions identifiées du collagène V. Aucune corrélation particulière n'a été observée entre la localisation des mutations sur le collagène V et le phénotype des patients. Effectuer une corrélation entre les interactions et les phénotypes des patients représenterait une nouvelle démarche afin d'établir une relation génotype-phénotype dans l'EDSc. Cette démarche a été effectuée une première fois *in silico* en se focalisant sur les mutations localisées au niveau de la triple hélice de collagène V. Lors de cette étude, les interactants identifiés ou prédits de la triple hélice ont été réunis au sein de 2 groupes distincts : l'un associé à une hypermobilité articulaire et accessoirement à des défauts cutanés, l'autre associé essentiellement à une hyperextensibilité cutanée. L'impact des mutations identifiées sur l'interactome du collagène V a suggéré que l'hétérogénéité phénotypique observée dans l'EDSc serait liée à l'effet variable des mutations sur 2 clusters de processus biologiques distincts : L'adhésion cellulaire et la réparation tissulaire d'un côté, et la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose, de l'autre (Paladin et al. 2015).



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**RÉFÉRENCES**

- Allamand, V. et al., 2011. ColVI myopathies: where do we stand, where do we go? *Skeletal Muscle*, 1(1), p.30.
- Andrikopoulos, K. et al., 1995. Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. *Nature Genetics*, 9(1), pp.31–36.
- Baghy, K. et al., 2016. Proteoglycans in liver cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(1), pp.379–393.
- Baker, N.L. et al., 2005. Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 14(2), pp.279–293.
- Bancelin, S. et al., 2015. Ex vivo multiscale quantitation of skin biomechanics in wild-type and genetically-modified mice using multiphoton microscopy. *Scientific Reports*, 5, p.17635.
- Banos, C.C., Thomas, A.H. & Kuo, C.K., 2008. Collagen fibrillogenesis in tendon development: Current models and regulation of fibril assembly. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 84(3), pp.228–244.
- Barker, D.D. et al., 1991. Retrovirus-induced insertional mutagenesis: mechanism of collagen mutation in Mov13 mice. *Molecular and Cellular Biology*, 11(10), pp.5154–5163.
- Barsky, S.H. et al., 1982. Increased content of Type V Collagen in desmoplasia of human breast carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 108(3), pp.276–283.
- Bateman, J.F., Boot-Handford, R.P. & Lamandé, S.R., 2009. Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations. *Nature Reviews Genetics*, 10(3), pp.173–183.
- Beighton, P. et al., 1998. Ehlers-Danlos syndromes: Revised nosology, Villefranche, 1997. *American Journal of Medical Genetics*, 77(1), pp.31–37.
- Beighton, P. et al., 1988. International nosology of heritable disorders of connective tissue, Berlin, 1986. *American Journal of Medical Genetics*, 29(3), pp.581–594.
- Bellot, G. et al., 2009. Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), pp.2570–2581.
- Bernardi, P. & Bonaldo, P., 2008. Dysfunction of Mitochondria and Sarcoplasmic Reticulum in the Pathogenesis of Collagen VI Muscular Dystrophies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), pp.303–311.
- BERTINI, E. & PEPE, G., 2002. Collagen type VI and related disorders: Bethlem myopathy and Ullrich scleroatonic muscular dystrophy. *European Journal of Paediatric Neurology*, 6(4), pp.193–198.
- Bethlem, J. & Wijngaarden, G.K.V., 1976. Benign Myopathy, with Autosomal Dominant Inheritance. *Brain*, 99(1), pp.91–100.
- Bezerra, M.C. et al., 2006. Scleroderma-like remodeling induced by type V collagen. *Archives of Dermatological Research*, 298(2), pp.51–57.
- Bidanset, D.J. et al., 1992. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *Journal of Biological Chemistry*, 267(8), pp.5250–5256.
- Birk, D.E. et al., 1990. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V

- collagen regulates fibril diameter. *Journal of Cell Science*, 95(4), pp.649–657.
- Birk, D.E., 2001a. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron*, 32(3), pp.223–237.
  - Birk, D.E., 2001b. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron*, 32(3), pp.223–237.
  - Birk, D.E. & Zycband, E., 1994. Assembly of the tendon extracellular matrix during development. *Journal of Anatomy*, 184(Pt 3), pp.457–463.
  - Bonfanti, L. et al., 1998. Procollagen Traverses the Golgi Stack without Leaving the Lumen of Cisternae: Evidence for Cisternal Maturation. *Cell*, 95(7), pp.993–1003.
  - Bonnans, C., Chou, J. & Werb, Z., 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), pp.786–801.
  - Bönnemann, C.G., 2011. The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. *Nature Reviews. Neurology*, 7(7), pp.379–390.
  - Bonod-Bidaud, C. et al., 2007. Enzymatic cleavage specificity of the pro $\alpha$ 1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*, 405(2), p.299.
  - Bonod-Bidaud, C. et al., 2012. In Vivo Evidence for a Bridging Role of a Collagen V Subtype at the Epidermis–Dermis Interface. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(7), pp.1841–1849.
  - Boot-Handford, R.P. & Briggs, M.D., 2009. The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases. *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp.197–211.
  - Borck, G. et al., 2010. Arterial rupture in classic Ehlers–Danlos syndrome with COL5A1 mutation. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(8), pp.2090–2093.
  - Bornstein, P., 2002. The NH<sub>2</sub>-terminal propeptides of fibrillar collagens: highly conserved domains with poorly understood functions. *Matrix Biology*, 21(3), pp.217–226.
  - Bourdon, M.A. et al., 1983. Human Glioma-Mesenchymal Extracellular Matrix Antigen Defined by Monoclonal Antibody. *Cancer Research*, 43(6), pp.2796–2805.
  - Braghetta, P. et al., 2008. An enhancer required for transcription of the Col6a1 gene in muscle connective tissue is induced by signals released from muscle cells. *Experimental Cell Research*, 314(19), pp.3508–3518.
  - Bredrup, C. et al., 2005. Congenital Stromal Dystrophy of the Cornea Caused by a Mutation in the Decorin Gene. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(2), p.420.
  - Briñas, L. et al., 2010. Early onset collagen VI myopathies: Genetic and clinical correlations. *Annals of Neurology*, 68(4), pp.511–520.
  - Brown, J.C. et al., 1994. Structure and stability of the triple-helical domains of human collagen XIV. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 14(4), pp.287–295.
  - Bruckner, P., 2009. Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp.7–18.
  - Bulleid, N.J., Wilson, R. & Lees, J.F., 1996. Type-III procollagen assembly in semi-intact cells: chain association, nucleation and triple-helix folding do not require formation of inter-chain disulphide bonds but triple-helix nucleation does require hydroxylation. *Biochemical Journal*, 317(1), pp.195–202.



- Cabral, W.A. et al., 2005. Mutations Near Amino End of  $\alpha 1(I)$  Collagen Cause Combined Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos Syndrome by Interference with N-propeptide Processing. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), pp.19259–19269.
- Callado, M.R.M. et al., 2007. Autoantibody profile in the experimental model of scleroderma induced by type V human collagen. *Immunology*, 122(1), pp.38–46.
- Canty, E.G. et al., 2004. Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *The Journal of Cell Biology*, 165(4), pp.553–563.
- Canty, E.G. & Kadler, K.E., 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science*, 118(7), pp.1341–1353.
- Cescon, M. et al., 2015. Collagen VI at a glance. *J Cell Sci*, 128(19), pp.3525–3531.
- Chanut-Delalande, H. et al., 2001. Control of Heterotypic Fibril Formation by Collagen V Is Determined by Chain Stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), pp.24352–24359.
- Chanut-Delalande, H. et al., 2004. Development of a Functional Skin Matrix Requires Deposition of Collagen V Heterotrimers. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), pp.6049–6057.
- Charvet, B. et al., 2013. Knockdown of col22a1 gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction. *Development*, 140(22), pp.4602–4613.
- Cheng, B. et al., 2016. Syndecans as Cell Surface Receptors in Cancer Biology. A Focus on their Interaction with PDZ Domain Proteins. *Pharmacology of Anti-Cancer Drugs*, p.10.
- Cheng, J.S. et al., 2009. Collagen VI protects neurons against A $\beta$  toxicity. *Nature Neuroscience*, 12(2), pp.119–121.
- Chen, P., Cescon, M., Megighian, A., et al., 2014. Collagen VI regulates peripheral nerve myelination and function. *The FASEB Journal*, 28(3), pp.1145–1156.
- Chen, P., Cescon, M., Zuccolotto, G., et al., 2014. Collagen VI regulates peripheral nerve regeneration by modulating macrophage recruitment and polarization. *Acta Neuropathologica*, 129(1), pp.97–113.
- Chen, P., Cescon, M. & Bonaldo, P., 2014. The Role of Collagens in Peripheral Nerve Myelination and Function. *Molecular Neurobiology*, 52(1), pp.216–225.
- Chernousov, M.A. et al., 2006. Glypican-1 and  $\alpha 4(V)$  Collagen Are Required for Schwann Cell Myelination. *The Journal of Neuroscience*, 26(2), pp.508–517.
- Chernousov, M.A. et al., 2000. Schwann Cells Synthesize Type V Collagen That Contains a Novel Alpha 4 Chain: Molecular Cloning, Biochemical Characterization and High Affinity Heparin Binding of Alpha4(V) Collagen. *Journal of Biological Chemistry*. Available at: <http://www.jbc.org.gate1.inist.fr/content/early/2000/06/13/jbc.M003922200> [Accessed June 10, 2016].
- Chernousov, M.A., Stahl, R.C. & Carey, D.J., 1996. Schwann Cells Secrete a Novel Collagen-like Adhesive Protein That Binds N-Syndecan. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), pp.13844–13853.
- Chernousov, M.A., Stahl, R.C. & Carey, D.J., 2001. Schwann Cell Type V Collagen Inhibits Axonal Outgrowth and Promotes Schwann Cell Migration via Distinct Adhesive Activities of the Collagen and Noncollagen Domains. *The Journal of Neuroscience*, 21(16), pp.6125–6135.
- Chessler, S.D. & Byers, P.H., 1993. BiP binds type I procollagen pro alpha chains

- with mutations in the carboxyl-terminal propeptide synthesized by cells from patients with osteogenesis imperfecta. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24), pp.18226–18233.
- Chiquet-Ehrismann, R. & Tucker, R.P., 2011. Tenascins and the Importance of Adhesion Modulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5), p.a004960.
  - Chiquet, M. et al., 2014. Collagen XII: Protecting bone and muscle integrity by organizing collagen fibrils. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 53, pp.51–54.
  - Chiquet, M. & Fambrough, D.M., 1984. Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits. *The Journal of Cell Biology*, 98(6), pp.1937–1946.
  - Chung, H.J. & Uitto, J., 2010. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatologic clinics*, 28(1), pp.93–105.
  - Colige, A. et al., 2002. Cloning and Characterization of ADAMTS-14, a Novel ADAMTS Displaying High Homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), pp.5756–5766.
  - Colige, A. et al., 2005. Domains and Maturation Processes That Regulate the Activity of ADAMTS-2, a Metalloproteinase Cleaving the Aminopropeptide of Fibrillar Procollagens Types I–III and V. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), pp.34397–34408.
  - Colombatti, A., Mucignat, M.T. & Bonaldo, P., 1995. Secretion and Matrix Assembly of Recombinant Type VI Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 270(22), pp.13105–13111.
  - Dart, M.L. et al., 2010. Interleukin-17–Dependent Autoimmunity to Collagen Type V in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 107(9), pp.1106–1116.
  - DeNigris, J. et al., 2016. Altered dermal fibroblast behavior in a collagen V haploinsufficient murine model of classic Ehlers–Danlos syndrome. *Connective Tissue Research*, 57(1), pp.1–9.
  - Ding, W.-X. & Yin, X.-M., 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological chemistry*, 393(7), pp.547–564.
  - Ding, Y. et al., 2010. TGF- $\beta$ 1 Protects against Mesangial Cell Apoptosis via Induction of Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), pp.37909–37919.
  - Doane, K.J., Howell, S.J. & Birk, D.E., 1998. Identification and functional characterization of two type VI collagen receptors, alpha 3 beta 1 integrin and NG2, during avian corneal stromal development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(2), pp.263–275.
  - Dong, S., Cole, G.J. & Halfter, W., 2003. Expression of Collagen XVIII and Localization of Its Glycosaminoglycan Attachment Sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), pp.1700–1707.
  - Dooley, H.C. et al., 2014. WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5–16L1. *Molecular Cell*, 55(2), pp.238–252.
  - Ecker, N. et al., 2010. Induction of autophagic flux by amino acid deprivation is distinct from nitrogen starvation-induced macroautophagy. *Autophagy*, 6(7), pp.879–890.
  - Egging, D. et al., 2007. Wound Healing in Tenascin-X Deficient Mice Suggests that Tenascin-X is Involved in Matrix Maturation Rather than Matrix Deposition. *Connective Tissue Research*, 48(2), pp.93–98.

- Exposito, J.-Y. et al., 2010. The Fibrillar Collagen Family. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), pp.407–426.
- Eyre, D.R. et al., 2002. Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), pp.894–900.
- Fallas, J.A., Gauba, V. & Hartgerink, J.D., 2009. Solution Structure of an ABC Collagen Heterotrimer Reveals a Single-register Helix Stabilized by Electrostatic Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 284(39), pp.26851–26859.
- Fichard, A., Kleman, J.-P. & Ruggiero, F., 1995. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biology*, 14(7), pp.515–531.
- Fischer, H. et al., 2001. Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. *Carcinogenesis*, 22(6), pp.875–878.
- Fitzgerald, J. et al., 2008. Three Novel Collagen VI Chains,  $\alpha 4(\text{VI})$ ,  $\alpha 5(\text{VI})$ , and  $\alpha 6(\text{VI})$ . *Journal of Biological Chemistry*, 283(29), pp.20170–20180.
- Fitzgerald, J., Lamandé, S.R. & Bateman, J.F., 1999. Proteasomal Degradation of Unassembled Mutant Type I Collagen Pro- $\alpha 1(\text{I})$  Chains. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), pp.27392–27398.
- Foley, A.R. et al., 2009. Autosomal Recessive Inheritance of Classic Bethlem Myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD*, 19(12), pp.813–817.
- Font, B. et al., 1996. Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biology*, 15(5), pp.341–348.
- Frank, M. et al., 2015. The type of variants at the COL3A1 gene associates with the phenotype and severity of vascular Ehlers–Danlos syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 23(12), pp.1657–1664.
- Frantz, C., Stewart, K.M. & Weaver, V.M., 2010. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 24), pp.4195–4200.
- Franzke, C.-W. et al., 2003. Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype. *Matrix Biology*, 22(4), pp.299–309.
- Furthmayr, H. et al., 1983. Electron-microscopical approach to a structural model of intima collagen. *Biochemical Journal*, 211(2), pp.303–311.
- Gara, S.K. et al., 2008. Three Novel Collagen VI Chains with High Homology to the  $\alpha 3$  Chain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), pp.10658–10670.
- Gebauer, J.M. et al., 2016. Structure, evolution and expression of collagen XXVIII: Lessons from the zebrafish. *Matrix Biology*, 49, pp.106–119.
- Geffrotin, C. et al., 1995. Distinct Tissue Distribution in Pigs of Tenascin-X and Tenascin-C Transcripts. *European Journal of Biochemistry*, 231(1), pp.83–92.
- Ge, G. & Greenspan, D.S., 2006. Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 78(1), pp.47–68.
- Gleghorn, L. et al., 2005. A Mutation in the Variable Repeat Region of the Aggrecan Gene (AGC1) Causes a Form of Spondyloepiphyseal Dysplasia Associated with Severe, Premature Osteoarthritis. *American Journal of Human Genetics*, 77(3), pp.484–490.
- Gordon, M.K. & Hahn, R.A., 2010. Collagens. *Cell and tissue research*, 339(1), pp.247–257.
- Greenspan, D.S. et al., 1995. COL5a1: fine genetic mapping and exclusion as candidate gene in families with nail-patella syndrome, tuberous sclerosis 1, hereditary hemorrhagic telangiectasia, and Ehlers–Danlos syndrome type II.

- Genomics*, 25(3), pp.737–739.
- Grumati, P. et al., 2010. Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nature Medicine*, 16(11), pp.1313–1320.
  - Grumet, M. et al., 1985. Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(23), pp.8075–8079.
  - Halper, J. & Kjaer, M., 2014. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Elastin, Fibrillin, Fibulins, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Tenascins and Thrombospondins. In J. Halper, ed. *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Netherlands, pp. 31–47. Available at: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-7893-1\\_3](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-7893-1_3) [Accessed April 28, 2016].
  - Hansen, U. et al., 2012. WARP Interacts with Collagen VI-Containing Microfibrils in the Pericellular Matrix of Human Chondrocytes. *PLOS ONE*, 7(12), p.e52793.
  - Harburger, D.S. & Calderwood, D.A., 2009. Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(2), pp.159–163.
  - Has, C. & Kern, J.S., 2010. Collagen XVII. *Dermatologic Clinics*, 28(1), pp.61–66.
  - Hashimoto, Y. et al., 1986. Isolation and Characterization of Type V Collagen from Human Post-Burn Granulation Tissues. *Journal of Investigative Dermatology*, 87(4), pp.540–543.
  - Hausser, I. & Anton-Lamprecht, I., 1994. Differential ultrastructural aberrations of collagen fibrils in Ehlers-Danlos syndrome types I–IV as a means of diagnostics and classification. *Human Genetics*, 93(4), pp.394–407.
  - Hicks, D. et al., 2014. Mutations in the collagen XII gene define a new form of extracellular matrix-related myopathy. *Human Molecular Genetics*, 23(9), pp.2353–2363.
  - Hohenester, E. & Yurchenco, P.D., 2013. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), pp.56–63.
  - Hojima, Y., Rest, M. van der & Prockop, D.J., 1985. Type I procollagen carboxyl-terminal proteinase from chick embryo tendons. Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 260(29), pp.15996–16003.
  - Huang, G. et al., 2011.  $\alpha 3(V)$  Collagen is critical for glucose homeostasis in mice due to effects in pancreatic islets and peripheral tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), pp.769–783.
  - Humphries, J.D., Byron, A. & Humphries, M.J., 2006. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, 119(19), pp.3901–3903.
  - Humphries, S.M. et al., 2008. Active Negative Control of Collagen Fibrillogenesis in Vivo Intracellular Cleavage Of The Type I Procollagen Propeptides In Tendon Fibroblasts Without Intracellular Fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 283(18), pp.12129–12135.
  - Hynes, R.O., 2009. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science*, 326(5957), pp.1216–1219.
  - Hynes, R.O. & Naba, A., 2012. Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), p.a004903.
  - Hyttinen, J.M.T. et al., 2014. Clearance of misfolded and aggregated proteins by autophagy and implications for aggregation diseases. *Ageing Research Reviews*,

- 18, pp.16–28.
- Imamura, Y., Scott, I.C. & Greenspan, D.S., 2000. The Pro- $\alpha$ 3(V) Collagen Chain COMPLETE PRIMARY STRUCTURE, EXPRESSION DOMAINS IN ADULT AND DEVELOPING TISSUES, AND COMPARISON TO THE STRUCTURES AND EXPRESSION DOMAINS OF THE OTHER TYPES V AND XI PROCOLLAGEN CHAINS. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), pp.8749–8759.
  - Imamura, Y., Steiglitz, B.M. & Greenspan, D.S., 1998. Bone Morphogenetic Protein-1 Processes the NH<sub>2</sub>-terminal Propeptide, and a Furin-like Proprotein Convertase Processes the COOH-terminal Propeptide of pro- $\alpha$ 1(V) Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), pp.27511–27517.
  - Iozzo, R.V. & Schaefer, L., 2015. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, 42, pp.11–55.
  - Irwin, W.A. et al., 2003. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nature Genetics*, 35(4), pp.367–371.
  - Ishida, Y. et al., 2009. Autophagic Elimination of Misfolded Procollagen Aggregates in the Endoplasmic Reticulum as a Means of Cell Protection. *Molecular Biology of the Cell*, 20(11), pp.2744–2754.
  - Ishida, Y. & Nagata, K., 2009. Autophagy eliminates a specific species of misfolded procollagen and plays a protective role in cell survival against ER stress. *Autophagy*, 5(8), pp.1217–1219.
  - Itano, N., 2008. Simple Primary Structure, Complex Turnover Regulation and Multiple Roles of Hyaluronan. *Journal of Biochemistry*, 144(2), pp.131–137.
  - Järveläinen, H. et al., 2009. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 61(2), pp.198–223.
  - Jöbsis, G.J. et al., 1996. Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. *Nature Genetics*, 14(1), pp.113–115.
  - Jones, F.S. & Jones, P.L., 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Developmental Dynamics*, 218(2), pp.235–259.
  - Kadler, K.E. et al., 1996. Collagen fibril formation. *Biochemical Journal*, 316(1), pp.1–11.
  - Kadler, K.E. et al., 2007. Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, 120(12), pp.1955–1958.
  - Kawasaki, K. et al., 2015. Deletion of the Collagen-specific Molecular Chaperone Hsp47 Causes Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis of Hepatic Stellate Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(6), pp.3639–3646.
  - Kessler, E. et al., 2001. Bone Morphogenetic Protein-1 (BMP-1) Mediates C-terminal Processing of Procollagen V Homotrimer. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), pp.27051–27057.
  - Khoshnoodi, J. et al., 2006. Molecular Recognition in the Assembly of Collagens: Terminal Noncollagenous Domains Are Key Recognition Modules in the Formation of Triple Helical Protomers. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), pp.38117–38121.
  - Khoshnoodi, J., Pedchenko, V. & Hudson, B., 2008. Mammalian Collagen IV. *Microscopy research and technique*, 71(5), pp.357–370.
  - Kim, J. et al., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), pp.132–141.
  - Kim, S.I. et al., 2012. Autophagy Promotes Intracellular Degradation of Type I

- Collagen Induced by Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), pp.11677–11688.
- Kirschner, J. et al., 2005a. Ullrich congenital muscular dystrophy: Connective tissue abnormalities in the skin support overlap with Ehlers–Danlos syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 132A(3), pp.296–301.
  - Kirschner, J. et al., 2005b. Ullrich congenital muscular dystrophy: Connective tissue abnormalities in the skin support overlap with Ehlers–Danlos syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 132A(3), pp.296–301.
  - Klionsky, D.J. & Schulman, B.A., 2014. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(4), pp.336–345.
  - Knupp, C. et al., 2006. Structural correlation between collagen VI microfibrils and collagen VI banded aggregates. *Journal of Structural Biology*, 154(3), pp.312–326.
  - Kuo, H.-J. et al., 1997. Type VI Collagen Anchors Endothelial Basement Membranes by Interacting with Type IV Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), pp.26522–26529.
  - Kwan, A.P. et al., 1991. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 114(3), pp.597–604.
  - Lamande, S.R. & Bateman, J.F., 1999. Procollagen folding and assembly: The role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(5), pp.455–464.
  - Lampe, A. k. et al., 2008. Exon skipping mutations in collagen VI are common and are predictive for severity and inheritance. *Human Mutation*, 29(6), pp.809–822.
  - Lampe, A.K. & Bushby, K.M.D., 2005. Collagen VI related muscle disorders. *Journal of Medical Genetics*, 42(9), pp.673–685.
  - Lawrence, R., Hartmann, D.J. & Sonenshein, G.E., 1994. Transforming growth factor beta 1 stimulates type V collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), pp.9603–9609.
  - Leask, A. & Abraham, D.J., 2004. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, 18(7), pp.816–827.
  - Leblond, C.P., 1989. Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin. *The Anatomical Record*, 224(2), pp.123–138.
  - Lees, J.F., 1997. Identification of the molecular recognition sequence which determines the type-specific assembly of procollagen. *The EMBO Journal*, 16(5), pp.908–916.
  - Leitinger, B., 2014. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *International review of cell and molecular biology*, 310, pp.39–87.
  - Lenna, S. & Trojanowska, M., 2012. The role of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in fibrosis. *Current opinion in rheumatology*, 24(6). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3828639/> [Accessed August 15, 2016].
  - Lethias, C. et al., 2006. A model of tenascin-X integration within the collagenous network. *FEBS Letters*, 580(26), pp.6281–6285.
  - Lindor, N.M. & Bristow, J., 2005. Tenascin-X deficiency in autosomal recessive Ehlers–Danlos syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 135A(1), pp.75–80.
  - Linsenmayer, T.F. et al., 1983. Monoclonal antibodies against chicken type V collagen: production, specificity, and use for immunocytochemical localization in

- embryonic cornea and other organs. *The Journal of Cell Biology*, 96(1), pp.124–132.
- Linsenmayer, T.F., Fitch, J.M. & Mayne, R., 1984. Extracellular matrices in the developing avian eye: type V collagen in corneal and noncorneal tissues. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 25(1), pp.41–47.
  - Liu, K. & Czaja, M.J., 2013. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death & Differentiation*, 20(1), pp.3–11.
  - Loughlin, J. et al., 1995. Linkage of the gene that encodes the  $\alpha 1$  chain of type V collagen (COL5A1) to type II Ehlers-Danlos syndrome (EDS II). *Human Molecular Genetics*, 4(9), pp.1649–1651.
  - Luciola, S. et al., 2005. Detection of common and private mutations in the COL6A1 gene of patients with Bethlem myopathy. *Neurology*, 64(11), pp.1931–1937.
  - Luczak, J.A., Redick, S.D. & Schwarzbauer, J.E., 1998. A Single Cysteine, Cys-64, Is Essential for Assembly of Tenascin-C Hexabrachions. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), pp.2073–2077.
  - Mackie, E.J., Halfter, W. & Liverani, D., 1988. Induction of tenascin in healing wounds. *The Journal of Cell Biology*, 107(6), pp.2757–2767.
  - Mak, K.M., Png, C.Y.M. & Lee, D.J., 2016. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *The Anatomical Record*, 299(5), pp.613–629.
  - Malfait, F. et al., 2013. Defective Initiation of Glycosaminoglycan Synthesis due to B3GALT6 Mutations Causes a Pleiotropic Ehlers-Danlos-Syndrome-like Connective Tissue Disorder. *American Journal of Human Genetics*, 92(6), pp.935–945.
  - Malfait, F. et al., 2005. The molecular basis of classic Ehlers-Danlos syndrome: A comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients. *Human Mutation*, 25(1), pp.28–37.
  - Malfait, F. et al., 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. *Human Mutation*, 28(4), pp.387–395.
  - Malfait, F., Wenstrup, R.J. & De Paepe, A., 2010. Clinical and genetic aspects of Ehlers-Danlos syndrome, classic type. *Genetics in Medicine*, 12(10), pp.597–605.
  - Mancias, J.D. & Kimmelman, A.C., 2016. Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *Journal of Molecular Biology*, 428(9, Part A), pp.1659–1680.
  - Mao, J.R. et al., 2002. Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nature Genetics*, 30(4), pp.421–425.
  - Marcelino, J. & McDevitt, C.A., 1995. Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1249(2), pp.180–188.
  - Marchant, J.K. et al., 1996. Reduction of type V collagen using a dominant-negative strategy alters the regulation of fibrillogenesis and results in the loss of corneal-specific fibril morphology. *The Journal of Cell Biology*, 135(5), pp.1415–1426.
  - Marian, B. & Danner, M.W., 1987. Skin tumor promotion is associated with increased Type V collagen content in the dermis. *Carcinogenesis*, 8(1), pp.151–154.
  - Matsumoto, K. et al., 1994. The distribution of tenascin-X is distinct and often reciprocal to that of tenascin-C. *The Journal of Cell Biology*, 125(2), pp.483–493.
  - Matsuo, N. et al., 2006. CREB-AP1 Protein Complexes Regulate Transcription of the Collagen XXIV Gene (Col24a1) in Osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*,

- 281(9), pp.5445–5452.
- Medeck, R.J. et al., 2003. BMP-1-mediated proteolytic processing of alternatively spliced isoforms of collagen type XI. *Biochemical Journal*, 376(Pt 2), pp.361–368.
  - Meijer, A.J. & Codogno, P., 2011. Autophagy: Regulation by Energy Sensing. *Current Biology*, 21(6), pp.R227–R229.
  - Mercuri, E. et al., 2005. Muscle MRI in Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Neuromuscular Disorders*, 15(4), pp.303–310.
  - Merlini, L. et al., 2008. Autosomal recessive myosclerosis myopathy is a collagen VI disorder. *Neurology*, 71(16), pp.1245–1253.
  - Minamitani, T., Ikuta, T., et al., 2004. Modulation of collagen fibrillogenesis by tenascin-X and type VI collagen. *Experimental Cell Research*, 298(1), pp.305–315.
  - Minamitani, T., Ariga, H. & Matsumoto, K., 2004. Deficiency of tenascin-X causes a decrease in the level of expression of type VI collagen. *Experimental Cell Research*, 297(1), pp.49–60.
  - Minchin, J.E.N. et al., 2015. Plexin D1 determines body fat distribution by regulating the type V collagen microenvironment in visceral adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(14), pp.4363–4368.
  - Mirsky, R. & Jessen, K.R., 1999. The Neurobiology of Schwann Cells. *Brain Pathology*, 9(2), pp.293–311.
  - Mizushima, N., 2009. Physiological Functions of Autophagy. In B. Levine, T. Yoshimori, & V. Deretic, eds. *Autophagy in Infection and Immunity*. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 71–84. Available at: [http://link.springer.com.gate1.inist.fr/chapter/10.1007/978-3-642-00302-8\\_3](http://link.springer.com.gate1.inist.fr/chapter/10.1007/978-3-642-00302-8_3) [Accessed October 7, 2016].
  - Mohan, R.R., Mohan, R.R. & Wilson, S.E., 2001. Discoidin Domain Receptor (DDR) 1 and 2: Collagen-activated Tyrosine Kinase Receptors in the Cornea. *Experimental Eye Research*, 72(1), pp.87–92.
  - Monroe, G.R. et al., 2015. Familial Ehlers-Danlos syndrome with lethal arterial events caused by a mutation in COL5A1. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(6), pp.1196–1203.
  - Moradi-Ameli, M. et al., 1994. Diversity in the processing events at the N-terminus of type-V collagen. *European Journal of Biochemistry*, 221(3), pp.987–995.
  - Murray, L.S. et al., 2014. Chemical chaperone treatment reduces intracellular accumulation of mutant collagen IV and ameliorates the cellular phenotype of a COL4A2 mutation that causes haemorrhagic stroke. *Human Molecular Genetics*, 23(2), pp.283–292.
  - Myers, J.C. et al., 2007. The molecular structure of human tissue type XV presents a unique conformation among the collagens. *Biochemical Journal*, 404(3), pp.535–544.
  - Myllyharju, J., 2005. Intracellular Post-Translational Modifications of Collagens. In J. Brinckmann, H. Notbohm, & P. K. Müller, eds. *Collagen*. Topics in Current Chemistry. Springer Berlin Heidelberg, pp. 115–147. Available at: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/b103821> [Accessed May 30, 2016].
  - Myllyharju, J. & Kivirikko, K.I., 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics*, 20(1), pp.33–43.
  - Neill, T., Schaefer, L. & Iozzo, R.V., 2014. Instructive Roles of Extracellular Matrix on Autophagy. *The American Journal of Pathology*, 184(8), pp.2146–2153.
  - Nijholt, D. a. T. et al., 2011. Endoplasmic reticulum stress activates autophagy but not the proteasome in neuronal cells: implications for Alzheimer’s disease. *Cell*



- Death & Differentiation*, 18(6), pp.1071–1081.
- Niyibizi, C., Fietzek, P.P. & Rest, M. van der, 1984. Human placenta type V collagens. Evidence for the existence of an alpha 1(V) alpha 2(V) alpha 3(V) collagen molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 259(22), pp.14170–14174.
  - Norwood, F.L.M. et al., 2009. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain*, 132(11), pp.3175–3186.
  - Nuytinck, L. et al., 2000. Classical Ehlers-Danlos Syndrome Caused by a Mutation in Type I Collagen. *The American Journal of Human Genetics*, 66(4), pp.1398–1402.
  - Oberhauser, A.F. et al., 1998. The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature*, 393(6681), pp.181–185.
  - Ottani, V. et al., 2002. Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron*, 33(7–8), pp.587–596.
  - Pace, R.A. et al., 2008. Collagen VI glycine mutations: Perturbed assembly and a spectrum of clinical severity. *Annals of Neurology*, 64(3), pp.294–303.
  - De Paepe, A. et al., 1997. Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II. *American Journal of Human Genetics*, 60(3), pp.547–554.
  - De Paepe, A. & Malfait, F., 2012. The Ehlers–Danlos syndrome, a disorder with many faces. *Clinical Genetics*, 82(1), pp.1–11.
  - Paladin, L., Tosatto, S.C.E. & Minervini, G., 2015. Structural in silico dissection of the collagen V interactome to identify genotype–phenotype correlations in classic Ehlers–Danlos Syndrome (EDS). *FEBS Letters*, 589(24, Part B), pp.3871–3878.
  - Pan, T.-C. et al., 2003. New Molecular Mechanism for Ullrich Congenital Muscular Dystrophy: A Heterozygous In-Frame Deletion in the COL6A1 Gene Causes a Severe Phenotype. *The American Journal of Human Genetics*, 73(2), pp.355–369.
  - Park, A.C. et al., 2015. Homozygosity and Heterozygosity for Null Col5a2 Alleles Produce Embryonic Lethality and a Novel Classic Ehlers-Danlos Syndrome–Related Phenotype. *The American Journal of Pathology*, 185(7), pp.2000–2011.
  - Park, J. & Scherer, P.E., 2012. Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), pp.4243–4256.
  - Park, P.W., Reizes, O. & Bernfield, M., 2000. Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans: Selective Regulators of Ligand-Receptor Encounters. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), pp.29923–29926.
  - Pearing, J.N. et al., 2011. A Role for Nyctalopin, a Small Leucine-Rich Repeat Protein, in Localizing the TRP Melastatin 1 Channel to Retinal Depolarizing Bipolar Cell Dendrites. *The Journal of Neuroscience*, 31(27), pp.10060–10066.
  - Pepe, G. et al., 1999. A Heterozygous Splice Site Mutation in COL6A1 Leading to an In-Frame Deletion of the  $\alpha 1(VI)$  Collagen Chain in an Italian Family Affected by Bethlem Myopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(3), pp.802–807.
  - Pepe, G. et al., 2006. COL6A1 genomic deletions in Bethlem myopathy and Ullrich muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 59(1), pp.190–195.
  - Perret, S. et al., 2001. Unhydroxylated Triple Helical Collagen I Produced in Transgenic Plants Provides New Clues on the Role of Hydroxyproline in Collagen Folding and Fibril Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), pp.43693–43698.
  - Persikov, A.V. et al., 2005. Electrostatic Interactions Involving Lysine Make Major

- Contributions to Collagen Triple-Helix Stability. *Biochemistry*, 44(5), pp.1414–1422.
- Pfaff, M. et al., 1993. Integrin and Arg-Gly-Asp Dependence of Cell Adhesion to the Native and Unfolded Triple Helix of Collagen Type VI. *Experimental Cell Research*, 206(1), pp.167–176.
  - Plumb, D.A. et al., 2007. Collagen XXVII Is Developmentally Regulated and Forms Thin Fibrillar Structures Distinct from Those of Classical Vertebrate Fibrillar Collagens. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), pp.12791–12795.
  - Prydz, K. & Dalen, K.T., 2000. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci*, 113(2), pp.193–205.
  - Rao, Y. et al., 2016. The Atg1–kinase complex tethers Atg9-vesicles to initiate autophagy. *Nature Communications*, 7, p.10338.
  - Ricard-Blum, S., 2011. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), p.a004978.
  - Ricard-Blum, S. & Ballut, L., 2011. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 16, pp.674–697.
  - Ricard-Blum, S. & Ruggiero, F., 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie Biologie*, 53(7), pp.430–442.
  - Ritelli, M. et al., 2013. Clinical and molecular characterization of 40 patients with classic Ehlers–Danlos syndrome: identification of 18 COL5A1 and 2 COL5A2 novel mutations. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), p.58.
  - Rui, Y.-N. et al., 2015. Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nature Cell Biology*, 17(3), pp.262–275.
  - Sabatelli, P. et al., 2001. Collagen VI deficiency affects the organization of fibronectin in the extracellular matrix of cultured fibroblasts. *Matrix Biology*, 20(7), pp.475–486.
  - Sato, K. et al., 2002. Type XXVI Collagen, a New Member of the Collagen Family, Is Specifically Expressed in the Testis and Ovary. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), pp.37678–37684.
  - Schaefer, L. et al., 2005. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), pp.2223–2233.
  - Schaefer, L. & Iozzo, R.V., 2008. Biological Functions of the Small Leucine-rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), pp.21305–21309.
  - Schaefer, L. & Schaefer, R.M., 2009. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp.237–246.
  - Scherberich, A. et al., 2004. Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *Journal of Cell Science*, 117(4), pp.571–581.
  - Schessl, J. et al., 2008. Predominant fiber atrophy and fiber type disproportion in early ullrich disease. *Muscle & Nerve*, 38(3), pp.1184–1191.
  - Schmidt, S. & Friedl, P., 2010. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp.83–92.
  - Segev, F. et al., 2006. Structural Abnormalities of the Cornea and Lid Resulting from Collagen V Mutations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(2), p.565.
  - Seidler, D.G. et al., 2006. Decorin Protein Core Inhibits in Vivo Cancer Growth and Metabolism by Hindering Epidermal Growth Factor Receptor Function and

- Triggering Apoptosis via Caspase-3 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), pp.26408–26418.
- Sertić, A.L. et al., 2000. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Human Molecular Genetics*, 9(13), pp.2051–2058.
  - Shuttleworth, C.A., 1997. Type VIII collagen. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(10), pp.1145–1148.
  - Sievers, J. et al., 1994. Meningeal cells organize the superficial glia limitans of the cerebellum and produce components of both the interstitial matrix and the basement membrane. *Journal of Neurocytology*, 23(2), pp.135–149.
  - Smith, S.M. & Birk, D.E., 2012. Focus on Molecules: Collagens V and XI. *Experimental Eye Research*, 98, pp.105–106.
  - Snellman, A. et al., 2000. A short sequence in the N-terminal region is required for the trimerization of type XIII collagen and is conserved in other collagenous transmembrane proteins. *The EMBO Journal*, 19(19), pp.5051–5059.
  - Söderberg, L. et al., 2005. Characterization of the Alzheimer's Disease-associated CLAC Protein and Identification of an Amyloid  $\beta$ -Peptide-binding Site. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), pp.1007–1015.
  - Söderhäll, C. et al., 2007. Variants in a Novel Epidermal Collagen Gene (COL29A1) Are Associated with Atopic Dermatitis. *PLOS Biol*, 5(9), p.e242.
  - Stephens, D.J. & Pepperkok, R., 2002. Imaging of procollagen transport reveals COPI-dependent cargo sorting during ER-to-Golgi transport in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 115(6), pp.1149–1160.
  - Sun, M. et al., 2011. Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model. *J Cell Sci*, 124(23), pp.4096–4105.
  - Symoens, S., Malfait, F., et al., 2011. A Novel Splice Variant in the N-propeptide of COL5A1 Causes an EDS Phenotype with Severe Kyphoscoliosis and Eye Involvement. *PLoS ONE*, 6(5), p.e20121.
  - Symoens, S. et al., 2009. COL5A1 signal peptide mutations interfere with protein secretion and cause classic Ehlers-Danlos syndrome. *Human Mutation*, 30(2), pp.E395–E403.
  - Symoens, S. et al., 2012. Comprehensive molecular analysis demonstrates type V collagen mutations in over 90% of patients with classic EDS and allows to refine diagnostic criteria. *Human Mutation*, 33(10), pp.1485–1493.
  - Symoens, S., Renard, M., et al., 2011. Identification of binding partners interacting with the  $\alpha$ 1-N-propeptide of type V collagen. *Biochemical Journal*, 433(2), pp.371–381.
  - Takahara, K. et al., 2002. Order of Intron Removal Influences Multiple Splice Outcomes, Including a Two-Exon Skip, in a COL5A1 Acceptor-Site Mutation That Results in Abnormal Pro- $\alpha$ 1(V) N-Propeptides and Ehlers-Danlos Syndrome Type I. *The American Journal of Human Genetics*, 71(3), pp.451–465.
  - Theocharidis, G. et al., 2016. Type VI Collagen Regulates Dermal Matrix Assembly and Fibroblast Motility. *The Journal of Investigative Dermatology*, 136(1), pp.74–83.
  - Tulla, M. et al., 2001. Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha II, alpha 2I, and alpha 10I domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(51), pp.48206–48212.
  - Ullrich, O., 1930. Kongenitale, atonisch-sklerotische Muskeldystrophie, ein

- weiterer Typus der hereditären degenerativen Erkrankungen des neuromuskulären Systems. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 126(1), pp.171–201.
- Unsöld, C. et al., 2002. Biosynthetic Processing of the Pro- $\alpha$ 1(V) $\alpha$ 2(V) Collagen Heterotrimer by Bone Morphogenetic Protein-1 and Furin-like Proprotein Convertases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp.5596–5602.
  - Urciuolo, A. et al., 2013. Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nature Communications*, 4, p.1964.
  - Valcourt, U. et al., 2015. Tenascin-X: beyond the architectural function. *Cell Adhesion & Migration*, 9(1-2), pp.154–165.
  - Vanegas, O.C. et al., 2001. Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), pp.7516–7521.
  - Veit, G., Hansen, U., et al., 2006. Collagen XII Interacts with Avian Tenascin-X through Its NC3 Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), pp.27461–27470.
  - Veit, G., Kobbe, B., et al., 2006. Collagen XXVIII, a Novel von Willebrand Factor A Domain-containing Protein with Many Imperfections in the Collagenous Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), pp.3494–3504.
  - Verrecchia, F. & Mauviel, A., 2007. Transforming growth factor- $\beta$  and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(22), pp.3056–3062.
  - Viglio, S. et al., 2008. Rescue of Migratory Defects of Ehlers–Danlos Syndrome Fibroblasts In Vitro by Type V Collagen but not Insulin-Like Binding Protein-1. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(8), pp.1915–1919.
  - Voermans, N. c. et al., 2007. Ehlers–Danlos syndrome due to tenascin-X deficiency: Muscle weakness and contractures support overlap with collagen VI myopathies. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A(18), pp.2215–2219.
  - Walmsley, A.R. et al., 1999. Intracellular Retention of Procollagen within the Endoplasmic Reticulum Is Mediated by Prolyl 4-Hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), pp.14884–14892.
  - Wang, X. et al., 2008. Type IV collagens regulate BMP signalling in Drosophila. *Nature*, 455(7209), pp.72–77.
  - Weber, P. et al., 1998. Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *Journal of Neurobiology*, 35(1), pp.1–16.
  - Wenstrup, R.J. et al., 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). *Human Molecular Genetics*, 5(11), pp.1733–1736.
  - Wenstrup, R.J. et al., 2006. Murine Model of the Ehlers-Danlos Syndrome col5a1 HAPLOINSUFFICIENCY DISRUPTS COLLAGEN FIBRIL ASSEMBLY AT MULTIPLE STAGES. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), pp.12888–12895.
  - Wenstrup, R.J. et al., 2004. Type V Collagen Controls the Initiation of Collagen Fibril Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), pp.53331–53337.
  - Wilson, D.G. et al., 2011. Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse. *The Journal of Cell Biology*, 193(5), pp.935–951.
  - Wise, S.G. et al., 2014. Tropoelastin: A versatile, bioactive assembly module. *Acta Biomaterialia*, 10(4), pp.1532–1541.
  - Wu, J.-J. et al., 2009. Differences in Chain Usage and Cross-linking Specificities of

## *Références bibliographiques*

- Cartilage Type V/XI Collagen Isoforms with Age and Tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 284(9), pp.5539–5545.
- Wu, J.J., Eyre, D.R. & Slayter, H.S., 1987. Type VI collagen of the intervertebral disc. Biochemical and electron-microscopic characterization of the native protein. *Biochemical Journal*, 248(2), pp.373–381.
  - Yamamoto, M. et al., 1984. Distribution of collagen types I, III, and V in fibrotic and neoplastic human liver. *Acta Pathologica Japonica*, 34(1), pp.77–86.
  - Yurchenco, P.D., 2011. Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), p.a004911.
  - Zhu, J.-X. et al., 2005. Decorin Evokes Protracted Internalization and Degradation of the Epidermal Growth Factor Receptor via Caveolar Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), pp.32468–32479.
  - Zoppi, N. et al., 2004. Human Fibroblasts with Mutations in COL5A1 and COL3A1 Genes Do Not Organize Collagens and Fibronectin in the Extracellular Matrix, Down-regulate  $\alpha 2\beta 1$  Integrin, and Recruit  $\alpha v\beta 3$  Instead of  $\alpha 5\beta 1$  Integrin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), pp.18157–18168.
  - Zou, Y. et al., 2008. Muscle Interstitial Fibroblasts Are the Main Source of Collagen VI Synthesis in Skeletal Muscle: Implications for Congenital Muscular Dystrophy Types Ullrich and Bethlem. *Journal of Neuropathology*, 67(2), pp.144–154.
  - Zou, Y. et al., 2014. Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23(9), pp.2339–2352.
  - Zweers, M.C. et al., 2003. Haploinsufficiency of TNXB Is Associated with Hypermobility Type of Ehlers-Danlos Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 73(1), pp.214–217.

# **PUBLICATION ANNEXE**

Les compétences acquises au cours de ma thèse m'ont permis de prendre part, dans une moindre mesure, à un second projet qui a abouti à un article actuellement en révision. Ce projet, porté par la société SILAB et notre équipe, vise à caractériser le matrisome des 2 populations de fibroblastes présent dans le derme à savoir, les fibroblastes papillaire et réticulaire présents respectivement dans le derme papillaire (plus proche de l'épiderme) et réticulaire (plus profond). Pour se faire, une analyse du transcriptome des fibroblastes issus de jeunes donneurs a été effectuée. Elle a notamment permis de révéler une signature génétique différente entre ces deux populations cellulaires. En effet, les fibroblastes papillaires expriment plus fortement des gènes impliqués dans les défenses immunitaires, la migration cellulaire, la prolifération et des gènes associés au matrisome. À l'inverse, les fibroblastes réticulaires vont eux, plus fortement exprimer des gènes codant pour des composant cœur du matrisome et des régulateurs de la MEC.

J'ai pris part à ce projet en analysant, par microscopie électronique à transmission (MET), la MEC produit par les 2 populations de cellules en culture. Cette expérience a notamment permis d'observer la présence d'élastine dans la MEC des fibroblastes réticulaire, confirmant ainsi au niveau protéique, les informations issues de l'analyse du transcriptome.



**HUMAN DERMAL FIBROBLAST SUB-POPULATIONS DISPLAY DISTINCT GENE SIGNATURES RELATED TO CELL BEHAVIORS AND MATRISOME**

Journal:	<i>Journal of Investigative Dermatology</i>
Manuscript ID	JID-2016-0829.R1
Article Type:	Letter to Editor
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Nauroy, Pauline; Ecole normale superieure de Lyon, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon                      Barruche, Vincent; SILAB, R&amp;D                      Marchand, Laëtitia; SILAB, R&amp;D                      Nindorera-Badara, Steven; Ecole normale superieure de Lyon, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon                      Bordes, Sylvie; SILAB, R&amp;D                      Closs, Brigitte; SILAB, R&amp;D                      Ruggiero, Florence; Ecole normale superieure de Lyon, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon</p>
Key Words:	dermis, extracellular matrix, transcriptome, matrisome, papillary and reticular fibroblast



1  
2  
3 **HUMAN DERMAL FIBROBLAST SUB-POPULATIONS DISPLAY DISTINCT GENE**  
4  
5 **SIGNATURES RELATED TO CELL BEHAVIORS AND MATRISOME.**  
6  
7

8  
9 Pauline Nauroy<sup>1</sup>, Vincent Barruche<sup>2</sup>, Laetitia Marchand<sup>2</sup>, Steven Nindorera-Badara<sup>1</sup>, Sylvie  
10 Bordes<sup>2</sup>, Brigitte Closs<sup>2</sup>, Florence Ruggiero<sup>1#</sup>  
11

12  
13 <sup>1</sup> Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, ENS de Lyon, CNRS, Univ Lyon 1, 46 Allée  
14 d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France  
15

16  
17 <sup>2</sup> R&D department, SILAB, BP 213, 19108 Brive CEDEX, France  
18  
19

20  
21  
22 # Author for correspondence  
23

24 Dr Florence Ruggiero

25  
26 Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon,  
27

28  
29 ENS de Lyon,  
30

31 46 Allée d'Italie,  
32

33 F69364 Lyon cedex 07  
34

35 Phone number: +33472722657  
36

37 Fax number: +33472722602  
38

39 e-mail: [florence.ruggiero@ens-lyon.fr](mailto:florence.ruggiero@ens-lyon.fr)  
40  
41  
42  
43

44 **Short title:** Transcriptome analysis of dermal fibroblasts

45  
46 **Abbreviations:** ECM, extracellular matrix; Fp, papillary fibroblast; Fr, reticular fibroblast; Pn,  
47 number of cell passage. COL, collagen; MMP, matrix metalloproteinase  
48  
49  
50

51  
52  
53 Word count: 1000 words  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 The dermis is divided into two distinct compartments, the (upper) papillary dermis and the (lower)  
4 reticular dermis, that differ structurally and functionally. The isolation of the resident fibroblasts  
5 from papillary and reticular dermis has revealed that the papillary (Fp) and reticular (Fr) fibroblasts  
6 are morphologically distinct and behave differently (Harper and Grove, 1979). This lent support to  
7 the concept that sub-populations of fibroblasts are present within the dermis and prompt the search  
8 for selective cell markers (Driskell and Watt, 2015). However, the identified markers cannot explain  
9 *per se* the structural and morphological signatures of the two distinct compartments. Notably, while  
10 dermis is primarily composed extracellular matrix (ECM), only a few ECM genes were identified in  
11 the previous transcriptome comparing Fp and Fr sub-populations (Janson et al., 2012).

12  
13  
14 We thus decided to perform a transcriptomic analysis of dermal fibroblast subpopulations using  
15 Affymetrix GeneChip human genome arrays (see Supplementary Material), but imposing additional  
16 and more stringent criteria: (i) to select donors in the age group of about 20 at a time fibroblasts are  
17 active and produced high level of ECM, (ii) to take skin samples from an unique anatomic site (i.e.  
18 breast), (iii) to perform the analysis soon after fibroblast isolation.

19  
20  
21 Samples were obtained from donors after plastic surgery procedures, following written informed  
22 consent and institutional approval. Site-matched Fp and Fr fibroblasts were isolated from  
23 dermatomed dermis and explant-derived cells were cultured at passage 1 (P1). The purity of the  
24 isolated fibroblast sub-populations was checked based on cell morphology, cell proliferation and q-  
25 PCR of the Fp marker *PDPN* (Fig S1).

26  
27  
28 A total number of 25,223 probes (45% of the total probes) was expressed by the dermal fibroblasts  
29 of 3 independent donors aged 20-22. Principal component analysis of the data showed that Fp and  
30 Fr grouped separately (Fig S1). Bioinformatics analyses delivered 230 upregulated and 139  
31 downregulated genes in Fp vs Fr. Markers identified in previous studies were found in our list of  
32 genes: the Fp markers, *PDPN* and *MMP1*, and the Fr markers, *TGM2* and *MGP* (Mine et al. 2008;  
33 Janson et al., 2012) (Table S1).

1  
2  
3 Gene ontology (GO) (Fig S3a) and KEGG pathway (Fig S3b) analyses identified enriched sets of  
4 genes involved in the defense function and the response to cytokines, the regulation of cell motility  
5 and proliferation and the MAPK and TNR pathways in Fp indicating that Fp are more prone to  
6 produce and to respond to chemical signals than Fr as previously reported (Sorrell et al, 2004). The  
7 GO terms related to “vasculature development” and “angiogenesis” were also highly represented in  
8 Fp suggestive of a paracrine role of Fp in the vascularization of the dermis. This result is consistent  
9 with the capillary density of the papillary dermis that is about 10 times that of the reticular dermis  
10 (Papp, 2012). Fr showed higher expression of genes related to “development of connective tissues”  
11 (Fig S3a,b).

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
Next, we took advantage of the MatrisomeBD (Naba et al., 2016) to build the first matrisome of the  
dermal fibroblast sub-populations (Fig 1a, Fig S2a). The core matrisome was highly enriched in Fr  
(13 genes among 18 genes differentially regulated) while the matrix-associated genes (38 genes  
regulated in our transcriptome) were both enriched in Fp and Fr. The upregulation of ECM  
regulators such as MMPs and cathepsin genes involved in matrix remodeling and *LOXL3* that  
showed amine oxidase activity toward elastin and collagens, indicates intensive matrix remodeling  
of the papillary dermis.

The collagen (COL) category was also represented. Of particular interest is the upregulation of  
*COL7A1* and *ELN* in Fp and Fr respectively that was further confirmed at the transcript and protein  
levels (Fig 2). Fibroblasts and keratinocytes both contribute to the development of the dermo-  
epidermal junction that is predominantly composed of COLVII anchoring fibrils. Dermal fibroblasts  
are used for cell therapy for patients with skin blistering diseases (Nyström et al, 2013). The use of  
Fp that have specifically the double advantage of displaying elevated levels of COLVII and a high  
proliferation rate could improve cell therapy. As to Fr, they highly expressed *ELN* (elastin) and  
*MAFP5* that are both major components of the elastic fibrils. Punctate appearance of elastin

1  
2  
3 electron-dense deposits was observed in the ECM of Fr (Fig 2b). This result is coherent with the  
4  
5 presence of larger amounts of thick elastic fibers in Fr compared to Fp.  
6

7  
8 Most unexpectedly was the presence of *COL11A1* gene as one the first upregulated genes in Fr  
9  
10 (Table S1). *COL11A1* encodes the COLXI $\alpha$ 1 chain whose expression is chiefly restricted to  
11  
12 cartilage (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). As such, the GO term “Skeletal system development”  
13  
14 was highly enriched in Fr (Fig S3a). Five of the representative genes (*COL11A1*, *MGP*, *FGF18*,  
15  
16 *COMP* and *ACAN*) were in the top 10 genes upregulated in Fr (Table S1). *COL11A1* upregulation  
17  
18 was confirmed in cultured Fr independently of the anatomic site (breast or abdominal), and in breast  
19  
20 reticular dermis (Fig S2b; Fig 2c). COLXI-containing ECM produced by cultivated cells is highly  
21  
22 insoluble (Kleman et al., 1992). The presence of COLXI $\alpha$ 1 in reticular dermis was thus essayed in  
23  
24 crude extracts of freshly dermatomed dermis. COLXI $\alpha$ 1 (pro)-chains were found significantly  
25  
26 enriched in reticular dermis extracts (Fig 2c). *COL11A1* was expressed in murine dermal fibroblasts  
27  
28 in response to Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and deposited at the dermis-hair follicle interface (Collins et  
29  
30 al, 2011). *ACAN*, *COMP* and/or *COL11A1* expression were enhanced in tissues that are exposed to  
31  
32 mechanical tension as fibrotic skin (Giannoni et al, 2003; Agarwal et al, 2013; Naitoh et al, 2005).  
33  
34  
35  
36  
37 The Fr might respond to the ECM density-induced mechanical tension of the reticular dermis by  
38  
39 expressing cartilaginous ECM genes. *COL11A1* expression was not accompanied by expression of  
40  
41 the cartilage marker *COL2A1*, indicating that COLXI $\alpha$ 1 may fulfill a specific function in skin.  
42

43  
44 Altogether, we provided here the first documentation of a cell behavior and ECM signature of the  
45  
46 fibroblast sub-population that is coherent with the organization and function of the papillary and  
47  
48 reticular dermis. Our data may help refining therapeutic strategies for skin aging and diseases, and  
49  
50 bioengineering new skin substitutes that recapitulate more closely skin physiology.  
51

#### 52 53 54 55 **CONFLICT OF INTEREST**

56  
57 VB, LM, SB and BC are employees of SILAB. FR declares the receipt of a grant from SILAB. PN,  
58  
59  
60

1  
2  
3 SNB state no conflict of interest.  
4  
5  
6

## 7 8 **ACKNOWLEDGEMENTS**

9  
10 We thank M Malbouyres (IGFL, Lyon) for assistance with TEM that was performed at the “Centre  
11  
12 Technique des Microstructures” (Université de Lyon).  
13

## 14 15 16 **REFERENCES**

17  
18 Agarwal P, Schulz J-N, Blumbach K, Andreasson K, Heinegård D, Paulsson M, et al. Enhanced  
19  
20 deposition of cartilage oligomeric matrix protein is a common feature in fibrotic skin  
21  
22 pathologies. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2013 Aug 8;32(6):325–31.  
23

24  
25  
26 Collins CA, Kretzschmar K, Watt FM. Reprogramming adult dermis to a neonatal state through  
27  
28 epidermal activation of  $\beta$ -catenin. *Development.* 2011 Dec;138(23):5189–99.  
29

30  
31 Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol.* 2015  
32  
33 Feb;25(2):92-99  
34

35  
36  
37 Giannoni P, Siegrist M, Hunziker EB, Wong M. The mechanosensitivity of cartilage oligomeric  
38  
39 matrix protein (COMP). *Biorheology.* 2003;40(1–3):101–9.  
40

41  
42 Harper RA, Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis:  
43  
44 differences in growth potential in vitro. *Science.* 1979 May 4;204(4392):526–7.  
45

46  
47  
48 Janson D, Saintigny G, Mahé C, El Ghalbzouri A. Papillary fibroblasts differentiate into reticular  
49  
50 fibroblasts after prolonged in vitro culture. *Exp Dermatol.* 2013 Jan;22(1):48–53.  
51

52  
53  
54 Janson DG, Saintigny G, van Adrichem A, Mahé C, El Ghalbzouri A. Different gene expression  
55  
56 patterns in human papillary and reticular fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2012  
57  
58 Nov;132(11):2565–72.  
59  
60

1  
2  
3 Kleman JP, Hartmann DJ, Ramirez F, van der Rest M. The human rhabdomyosarcoma cell line  
4  
5 A204 lays down a highly insoluble matrix composed mainly of alpha 1 type-XI and alpha 2  
6  
7 type-V collagen chains. *Eur J Biochem FEBS*. 1992 Nov 15;210(1):329–35.  
8  
9

10 Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary  
11  
12 fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PloS*  
13  
14 *One*. 2008;3(12):e4066.  
15  
16

17  
18 Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools  
19  
20 and insights for the “omics” era. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2016 Jan;49:10–24.  
21  
22

23  
24 Naitoh M, Kubota H, Ikeda M, Tanaka T, Shirane H, Suzuki S, et al. Gene expression in human  
25  
26 keloids is altered from dermal to chondrocytic and osteogenic lineage. *Genes Cells Devoted*  
27  
28 *Mol Cell Mech*. 2005 Nov;10(11):1081–91.  
29  
30

31 Nyström A, Bruckner-Tuderman L, Kern JS. Cell- and protein-based therapy approaches for  
32  
33 epidermolysis bullosa. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;961:425–40.  
34  
35

36 Papp A. Dermal Wound Healing and Burn Wounds. In: Larjava H, editor. *Oral Wound Healing*  
37  
38 [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd.; 2012 [cited 2016 Aug 3]. p. 333–45. Available from:  
39  
40 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118704509.ch14/summary>  
41  
42  
43

44 Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell  
45  
46 membrane. *Pathol Biol (Paris)*. 2005 Sep;53(7):430–42.  
47  
48

49 Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts  
50  
51 differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with  
52  
53 keratinocytes. *J Cell Physiol*. 2004 Jul;200(1):134–45.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**FIGURE LEGENDS**

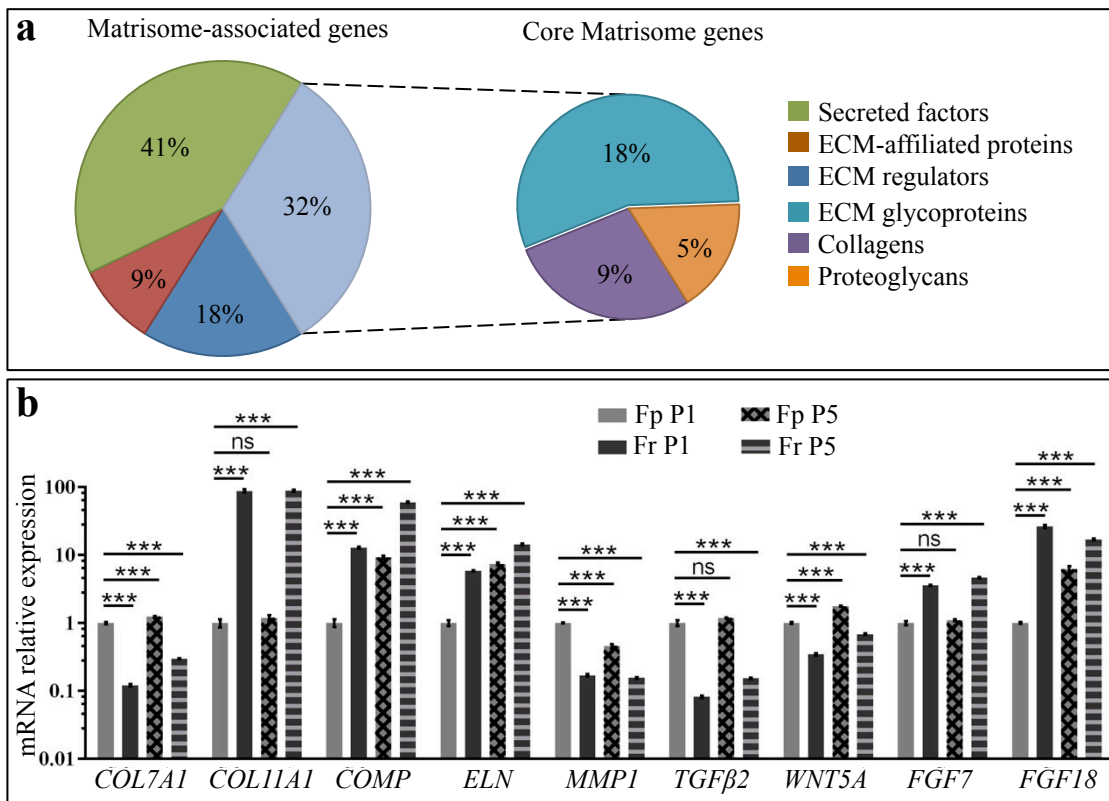
**Figure 1: Matrisome of the fibroblast sub-populations.** **a.** Pie-charts represent the distribution in percentage of matrisome genes expressed in dermal fibroblast sub-populations encoding core matrisome genes and matrisome-associated. The matrisome was built using the database MatrisomeDB (<http://matrisomeproject.mi.edu>). **b.** qRT-PCR validation of selected differentially expressed ECM and matrisome-associated genes attesting for the robustness of our transcriptome analysis. Fp, papillary fibroblasts; Fr, reticular fibroblasts at passage 1 (P1) and passage 5 (P5). Q-PCR was conducted with LightCycler 480 DNA SYBRGreen Master reaction mix (Roche diagnostics, Meylan, France) and analyzed with a LightCycler 480 (Roche diagnostics). Data are from three independent experiments (n<sub>donors</sub>=6) and compared by Student's t-tests, using GraphPad Prism software. Asterisks in histograms indicate P-values: \*\*\*<0.001; ns, non significant. Errors bars represent ±SEM.

**Figure 2: Expression of identified ECM markers of papillary and reticular dermis. a,b.** Immunostaining (upper panels) and Western-blot (lower panels) of papillary (Fp) and reticular (Fr) fibroblasts with anti-collagen VII (**a**, COLVII) and anti-elastin (**b**, ELN). Transmission electron microscopy (TEM) showing that Fp and Fr both produced an abundant ECM (**b**). Insert, arrows indicate the presence of electron dense granular aggregates of elastin in the ECM of Fr. Fb, fibroblast. **c,** Upregulation of *COL11A1* expression in reticular dermis. q-PCR validation of differential expression of *COL11A1* and other selected matrisome genes in total mRNA extracts. (left) and Western-blot with anti-COLXI of protein extracts (right) obtained from dermatomed papillary (Pap) or reticular (Ret) dermis of breast skin. Right: **a,b,c** Quantification: densitometry was performed with the Multigauge software (Fujifilm). Errors bars represent ±SEM. Asterisks indicate P-values: \*<0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.001 (n<sub>donors</sub>=3).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Nauroy et al

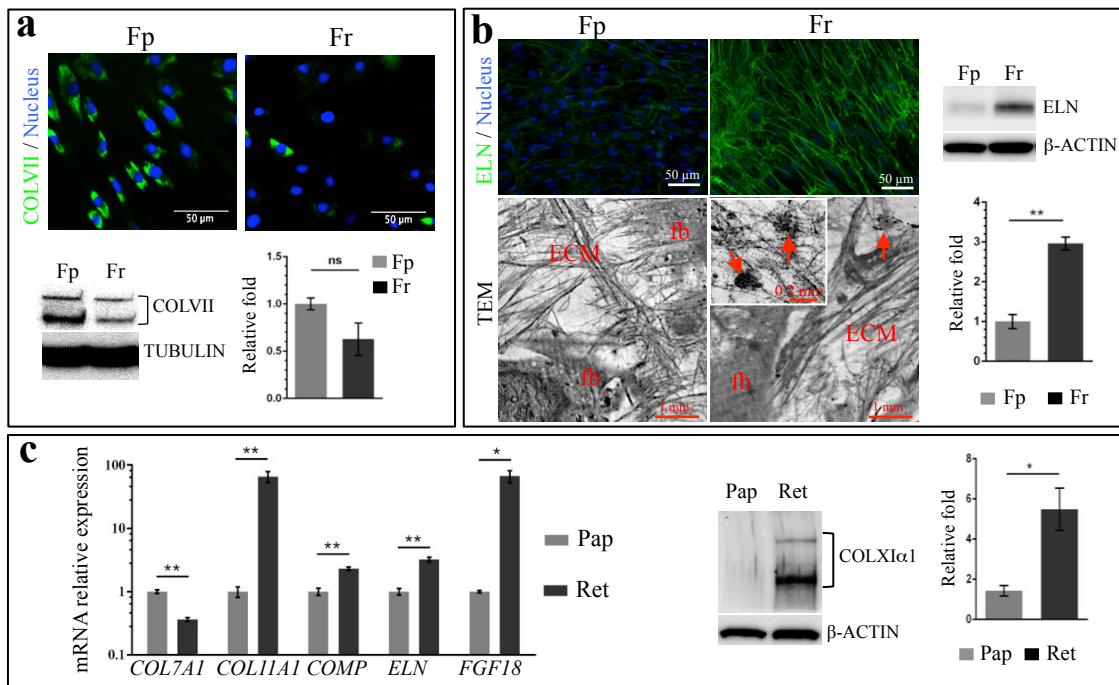
Figure 1





Nauroy et al

Figure 2



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## **SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS**

### **Isolation of fibroblast sub-populations for cell culture and flow cytometry analysis**

The tissue was harvested with dermatome set at 300 $\mu$ m or to 700 $\mu$ m to obtain respectively papillary or reticular dermis. Dermatomed samples were cut into small pieces and cultivated for two weeks in appropriate medium to allow fibroblasts to exit explants. The primary cultures were re-fed weekly until confluence and used at passage 1 (P1) or 5 (P5) as indicated. Cultures of Fp and Fr were analyzed for size and granularity using a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter). For cell proliferation analysis, EdU incorporation during DNA synthesis was evaluated with the Click-iT<sup>®</sup> EdU Flow Cytometry Assay kit (Molecular Probes, France). Proliferating cells were analyzed and quantified with CXP Analysis (Beckman Coulter).

### **Microarray and bioinformatic analysis**

100 ng of each RNA sample was 3'-labeled with GeneChip 3' IVT Express Kit (Affymetrix, California) and 15  $\mu$ g of cRNA was hybridized to the GeneChip Human 133 plus 2.0 Arrays (Affymetrix). Fluorescence signals were detected using an Affymetrix GeneChip<sup>®</sup>3000 7G scanner and image files were processed with Affymetrix<sup>®</sup> GeneChip<sup>®</sup> Command Console<sup>®</sup> Software (AGCC). Bioinformatic analyses were performed by Altrabio (France). Raw data have been deposited at NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE86273.

### **RNA or protein extraction and analysis**

Skin biopsies were homogenized in a Precellys-24 (Bertin, France) using ceramic beads. QPCR were conducted with a LightCycler 480 (Roche diagnostics) and statistics were done using Student's t-tests and the GraphPad software. For western blot analysis 10 $\mu$ g of protein were separated onto 4-15% precast TGX gel (Bio-Rad, California) and transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad) before incubation with antibodies. Protein presence was visualized and quantified by densitometry with LAS-400 (Fujifilm, Japan).

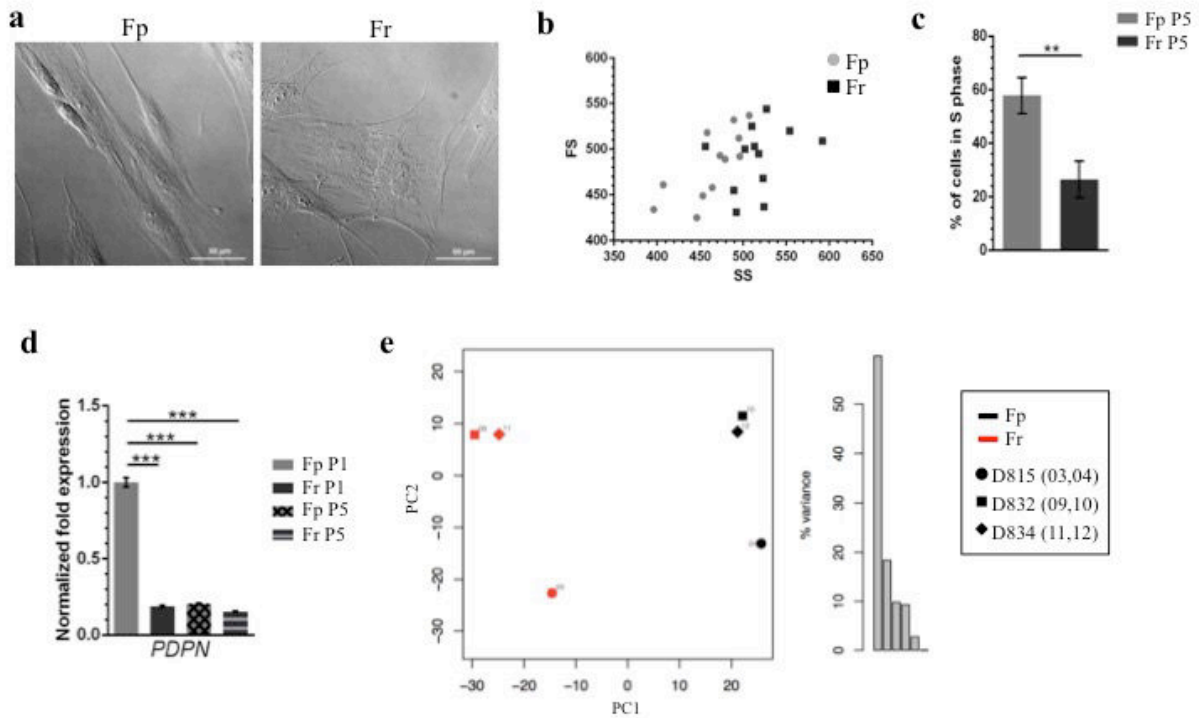
### **Cell imaging and electron microscopy**

For immunofluorescence experiments, cells were permeabilized with 0.5% Saponin after fixation and incubated with the following antibodies: elastin (25011, Novotec, France), collagen XI (kindly provided by Novotec), collagen VII (C6805, Sigma-Aldrich),  $\beta$ -Actin (sc-47778, Santa-Cruz, Germany). Immunofluorescence was analyzed a LSM700 Confocal microscope (Zeiss, Allemagne).

1  
2  
3 For transmission electron microscopy, Fr and Fp cells were cultivated for 5 days in presence  
4 of vitamin C, fixed in 2% glutaraldehyde, 2.5% paraformaldehyde in 0.2 M sodium  
5 cacodylate pH 7.4 for 30 min and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 30 min at room  
6 temperature. Cell layers were dehydrated in graded series of ethanol and embedded in Epoxy  
7 resin. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined  
8 with a Philips CM 120 electron microscope.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Review Only

## SUPPLEMENTARY FIGURES

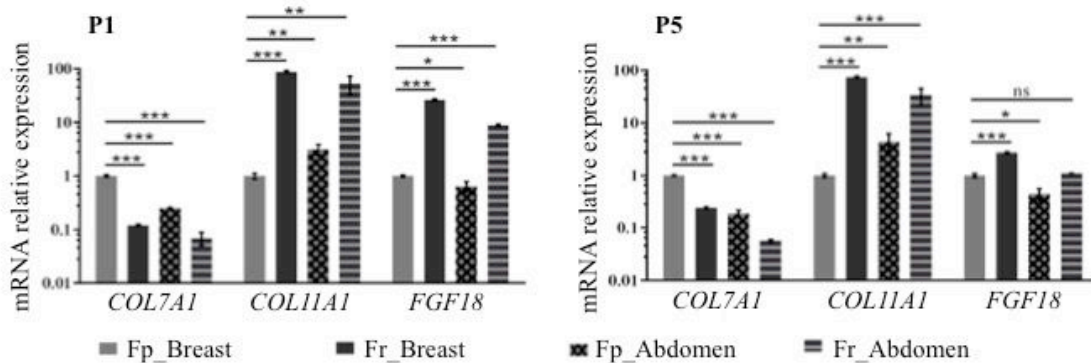


**Figure S1: Characterization of site-matched papillary (Fp) and reticular (Fr) dermal fibroblasts - a.** Cell morphology: Bright field images of Fp (elongated morphology) and Fr (stellate morphology). **b.** Cell size: FS/SS plot of Fp ( $19.7 \mu\text{m} \pm 1.09$ ) and Fr ( $17.3 \mu\text{m} \pm 1.06$ ) after FACS analysis. Side scatter (SC) in x-axis and forward scatter (FS) in y-axis. **c.** Cell proliferation: histogram showing the percentage of S-phase of Fp and Fr analyzed by flow cytometry. **d.** q-PCR of the Fp marker *PDPN* (Podoplanin) in total mRNA extracted from isolated Fp and Fr. **e.** Microarray analysis: Principal component analysis (PCA) of the gene data sets. Left, PCA biplot with samples plotted in two dimensions using their projections onto the first two principal components PC1 and PC2. Right, variance of the principal components (in percentage). P1 and P5 correspond to the number of cell passage.

a.

Fp vs Fr		UP (28 genes)	DOWN (28 genes)
Core matrisome	Collagens	COL7A1 ; COL10A1 ; COL18A1	COL14A1 ; COL11A1
	ECM glycoproteins	SRPX2	COMP ; EFEMP1 ; ELN ; FBLN2 ; MFAP5 ; MGP ; PCOLCE2 ; SLIT3 ; THBS2
	Proteoglycans	DCN	ACAN ; SPOCK1
Matrisome-associated proteins	ECM regulators	CD109 ; CTSC ; CTSK ; CTSS ; LOXL3 ; MMP1	A2M ; ADAMTSL1 ; PCSK5 ; TGM2
	ECM-affiliated proteins	COLEC12 ; CSPG4 ; PLXNC1	GPC4 ; PLXDC2
	Secreted factors	ANGPT1 ; BMP2 (1.8) CCL2 ; CCL8 ; CXCL1 ; FGF13 ; IL15 ; INHBB ; NTF3 ; PDGFC ; S100A8 ; TGFB2 ; TNFSF4 ; WNT5A	ANGPTL1 ; BMP6 ; CRLF1 ; FGF7 ; FGF18 ; IGF1 ; PDGFD ; SFRP4 ; WNT4

b.



**Figure S2: Matrisome of the dermal fibroblast subpopulation and gene validation - a.**

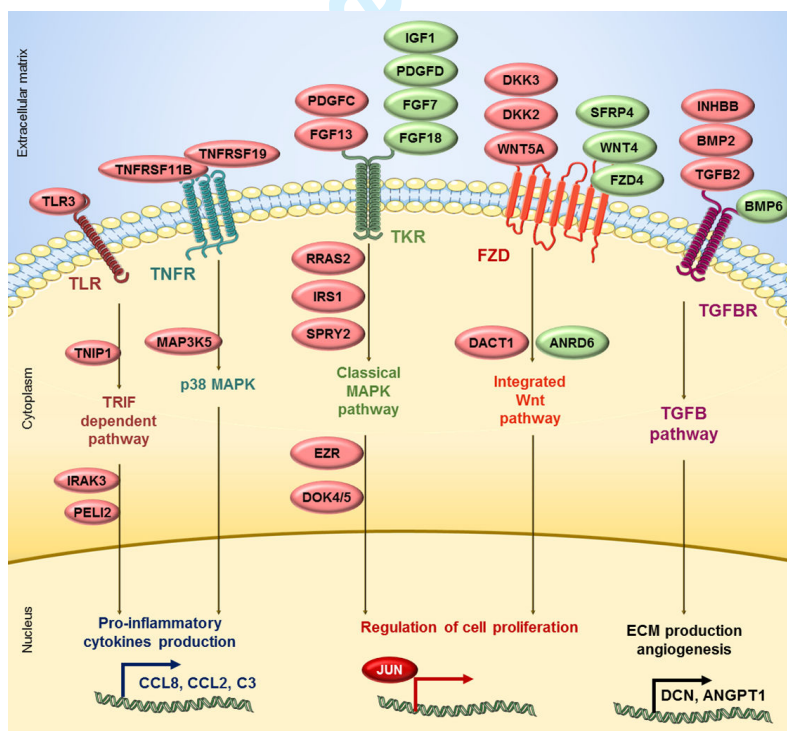
List of the genes differentially expressed in Fp versus Fr for each matrisome category. **b.** Q-PCR validation of differential expression of identified markers of Fr (*COL11A1* and *FGF18*) and Fp (*COL7A1*) in total mRNA extracted from skin fibroblasts (Fp and Fr) from breast or abdomen skin at passage 1 (P1) or 5 (P5). Errors bars represent  $\pm$ SEM. Asterisks indicate P-value: ns; non significant, \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  (n<sub>donors</sub>=3).

a.

GO terms	Fp vs Fr	
	enrichment score/p bonf* (gene count)	
	UP	DOWN
GO:0048584~positive regulation of response to stimulus	6.60 / 3.62E-9 (68)	
O:0034097~response to cytokine	6.60 / 2.50E-7 (38)	
GO:0019221~cytokine-mediated signaling pathway	6.60 / 3.80E-6 (30)	
GO:0006952~defense response	6.60 / 1.45E-5 (55)	
GO:0031347~regulation of defense response	6.60 / 3.24E-5 (33)	
GO:0042127~regulation of cell proliferation	6.51 / 1.16E-5 (49)	
GO:0008283~cell proliferation	6.51 / 8.06E-5 (53)	
GO:0000165~MAPK cascade	4.02 / 0.075 (27)	
GO:0001932~regulation of protein phosphorylation	4.02 / 0.301 (36)	
GO:0043410~positive regulation of MAPK cascade	4.02 / 0.348 (21)	
GO:0048870~cell motility	3.84 / 0.005 (39)	
GO:0016477~cell migration	3.84 / 0.006 (36)	
GO:0001944~vasculature development	3.84 / 0.182 (29)	4.7 / 0.01 (17)
GO:0001568~blood vessel development	3.84 / 0.553 (22)	4.7 / 0.02 (18)
GO:0001525~angiogenesis	3.84 / 0.976 (15)	
GO:0061448~connective tissue development		7.80 / 8.07E-5 (14)
GO:0001501~skeletal system development		7.80 / 9.40E-9 (24)
GO:0048729~tissue morphogenesis		3.10 / 0.19 (16)
GO:0045595~regulation of cell differentiation		4.71 / 0.102 (28)
GO:0045597~positive regulation of cell differentiation		4.71 / 0.989 (16)

p\_bonf correspond to P-values after Bonferroni correction for multiple tests.

b.



**Figure S3: Bioinformatic analysis of microarray data - a.** Gene Ontology (GO) analysis of papillary fibroblasts (Fp) versus reticular fibroblasts (Fr) using the DAVID Bioinformatics database. **b.** Association of down- and upregulated genes in Fp versus Fr with major KEGG pathways and their interactions. Upregulated (red) and downregulated (green) genes are indicated. TKR, tyrosine kinase receptors.

## SUPPLEMENTARY TABLES

**Table S1:** List of genes statistically differentially expressed. Fold change > 1.5; adjusted P-value > 0.03. Upregulated genes are in red and downregulated genes in green.

Gene Symbol	Gene Name	Log2(fold change)	Adjusted P-value
COL11A1	collagen type XI alpha 1 chain	-5.5154	0.0089
COL11A1	collagen type XI alpha 1 chain	-4.5497	0.0114
SCRG1	stimulator of chondrogenesis 1	-4.2586	0.0089
COMP	cartilage oligomeric matrix protein	-4.2570	0.0088
BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	3.9763	0.0100
DEPTOR	DEP domain containing MTOR-interacting protein	-3.9387	0.0114
A2M	alpha-2-macroglobulin	-3.8795	0.0176
MGP	matrix Gla protein	-3.7879	0.0089
MFAP5	microfibrillar associated protein 5	-3.5374	0.0161
APCDD1	APC down-regulated 1	3.4172	0.0130
CRLF1	cytokine receptor like factor 1	-3.0221	0.0236
IL8	interleukin-8	2.9944	0.0130
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	2.8128	0.0297
MMP1	matrix metalloproteinase 1	2.7662	0.0154
CTSC	cathepsin C	2.7227	0.0135
IL8	interleukin-8	2.6921	0.0249
CTSC	cathepsin C	2.6383	0.0165
RDH10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	-2.6167	0.0130
PTGDS	prostaglandin D2 synthase	2.5297	0.0149
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	2.4981	0.0173
TNFRSF19	TNF receptor superfamily member 19	2.4800	0.0116
IGDCC4	immunoglobulin superfamily DCC subclass member 4	2.4474	0.0113
DOK5	docking protein 5	-2.4076	0.0116
SFRP4	secreted frizzled related protein 4	-2.3771	0.0232
PPP1R14A	protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 14A	-2.3496	0.0154
GPC4	glypican 4	-2.3357	0.0209
GATA6	GATA binding protein 6	-2.2735	0.0130
EFNB2	ephrin B2	2.2661	0.0119
GPR37	G protein-coupled receptor 37	2.2647	0.0191
TFAP2C	transcription factor AP-2 gamma	2.2645	0.0119
INHBB	inhibin beta B subunit	2.2487	0.0154
ROR1	receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1	-2.2437	0.0116
TRHDE	thyrotropin releasing hormone degrading enzyme	2.2059	0.0114
PLXNC1	plexin C1	2.1851	0.0154
PLCB4	phospholipase C beta 4	2.1786	0.0130
CTSC	cathepsin C	2.1736	0.0154

1  
2  
3 *To be continued*

4	COL18A1	collagen type XVIII alpha 1 chain	2.1562	0.0174
5	LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1	-2.1473	0.0169
6	PRDM1	PR/SET domain 1	2.1408	0.0209
7	DACT1	dishevelled binding antagonist of beta catenin 1	-2.0917	0.0169
8	GFRA1	GDNF family receptor alpha 1	2.0745	0.0159
9	ELN	elastin	-2.0485	0.0216
10	CCL8	C-C motif chemokine ligand 8	2.0481	0.0200
11	SLC38A4	solute carrier family 38 member 4	-2.0476	0.0163
12	IL15	interleukin 15	2.0469	0.0088
13	TNFSF4	tumor necrosis factor superfamily member 4	2.0219	0.0142
14	GPC4	glypican 4	-2.0218	0.0135
15	MLPH	melanophilin	2.0116	0.0229
16	C11orf96	chromosome 11 open reading frame 96	-1.9918	0.0296
17	EFEMP1	EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1	-1.9904	0.0133
18	TPD52L1	tumor protein D52-like 1	-1.9748	0.0209
19	PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	-1.9660	0.0130
20	C3	complement component 3	1.9370	0.0116
21	IGF1	insulin like growth factor 1	-1.9255	0.0187
22	GRAMD3	GRAM domain containing 3	-1.9190	0.0089
23	MEDAG	mesenteric estrogen dependent adipogenesis	-1.8956	0.0232
24	CPXM2	carboxypeptidase X. M14 family member 2	1.8718	0.0135
25	FAM65C	family with sequence similarity 65 member C	1.8631	0.0226
26	KCND2	potassium voltage-gated channel subfamily D member 2	-1.8627	0.0116
27	ZFPM2	zinc finger protein. FOG family member 2	-1.8492	0.0089
28	CADM1	cell adhesion molecule 1	1.8225	0.0181
29	VWA8	von Willebrand factor A domain containing 8	-1.8222	0.0088
30	COLEC12	collectin subfamily member 12	1.8156	0.0291
31	IL7R	interleukin 7 receptor	1.8098	0.0130
32	CPED1	cadherin like and PC-esterase domain containing 1	1.7981	0.0200
33	DOK5	docking protein 5	-1.7886	0.0089
34	PSMB9	proteasome subunit beta 9	1.7752	0.0185
35	SOD2	superoxide dismutase 2. mitochondrial	1.7720	0.0096
36	CTSK	cathepsin K	1.7678	0.0163
37	OSBPL10	oxysterol binding protein like 10	-1.7592	0.0192
38	SIX1	SIX homeobox 1	-1.7482	0.0227
39	AK5	adenylate kinase 5	1.7335	0.0154
40	NTF3	neurotrophin 3	1.7143	0.0135
41	MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1.7037	0.0114
42	DKK2	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2	1.6972	0.0142
43	FOXL2	forkhead box L2	1.6969	0.0135
44	PDPN	podoplanin	1.6932	0.0114
45	TMEM200A	transmembrane protein 200A	-1.6807	0.0147
46	DNAJC6	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6	1.6762	0.0119



*To be continued*

1				
2				
3				
4				
5	DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	1.6732	0.0133
6	ST6GALNAC5	ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2.6-sialyltransferase 5	1.6511	0.0123
7	RNF182	ring finger protein 182	1.6378	0.0114
8	SLC1A3	solute carrier family 1 member 3	1.6347	0.0116
9				
10		amyloid beta precursor protein binding family B member 1 interacting		
11	APBB1IP	protein	-1.6304	0.0216
12	PTGER4	prostaglandin E receptor 4	1.6279	0.0089
13	SYBU	syntabulin	-1.6150	0.0289
14	PCSK5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	-1.6144	0.0268
15	STMN2	stathmin 2	-1.5936	0.0187
16	IL7R	interleukin 7 receptor	1.5822	0.0142
17	SESN3	sestrin 3	-1.5762	0.0136
18	ANKRD6	ankyrin repeat domain 6	-1.5749	0.0169
19	COL7A1	collagen type VII alpha 1 chain	1.5697	0.0292
20	TOM1L1	target of myb1 like 1 membrane trafficking protein	1.5694	0.0114
21	KCNJ8	potassium voltage-gated channel subfamily J member 8	-1.5565	0.0257
22	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	-1.5529	0.0216
23	CADPS2	calcium dependent secretion activator 2	1.5465	0.0157
24	PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type E	1.5310	0.0157
25	F2R	coagulation factor II thrombin receptor	-1.5257	0.0130
26	LRIG1	leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1	1.5181	0.0135
27	IFI27	interferon alpha inducible protein 27	1.5148	0.0135
28	TGM2	transglutaminase 2	-1.5104	0.0209
29	INSIG1	insulin induced gene 1	1.5088	0.0222
30	FGF7	fibroblast growth factor 7	-1.5054	0.0154
31	SLC39A8	solute carrier family 39 member 8	1.4662	0.0116
32	GRIA3	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3	1.4658	0.0121
33	SYTL2	synaptotagmin like 2	1.4653	0.0243
34	PPAPDC1A	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A	-1.4647	0.0229
35	SDPR	serum deprivation response	-1.4645	0.0291
36	ADAMTSL1	ADAMTS like 1	-1.4620	0.0252
37	SPATA13	spermatogenesis associated 13	1.4612	0.0292
38	PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	1.4596	0.0113
39	ARHGAP28	Rho GTPase activating protein 28	-1.4430	0.0201
40	GALNT12	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12	-1.4411	0.0259
41	TFAP2A	transcription factor AP-2 alpha	1.4297	0.0222
42	DKK3	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3	1.4289	0.0119
43	ACAN	aggrecan	-1.4262	0.0271
44	WNT5A	Wnt family member 5A	1.4076	0.0209
45	PCOLCE2	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	-1.3963	0.0201
46	MYH10	myosin heavy chain 10	-1.3922	0.0089
47	NREP	neuronal regeneration related protein	-1.3888	0.0175
48	STEAP3	STEAP3 metalloredutase	1.3767	0.0134
49				
50				
51				
52				
53				
54				
55				
56				
57				
58				
59				
60				

1  
2  
3 *To be continued*

4	MN1	MN1 proto-oncogene. transcriptional regulator	-1.3700	0.0213
5	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3	1.3610	0.0202
6	TUBA4A	tubulin alpha 4a	1.3427	0.0296
7	DRAM1	DNA damage regulated autophagy modulator 1	1.3312	0.0133
8	VEPH1	ventricular zone expressed PH domain containing 1	-1.3308	0.0130
9	AK5	adenylate kinase 5	1.3142	0.0223
10	PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	-1.3133	0.0202
11	LINC00327	long intergenic non-protein coding RNA 327	1.3029	0.0209
12	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	1.2944	0.0163
13	SERTAD4	SERTA domain containing 4	1.2903	0.0187
14	IFI6	interferon alpha inducible protein 6	1.2804	0.0206
15	GREM2	gremlin 2. DAN family BMP antagonist	-1.2752	0.0135
16	C1orf115	chromosome 1 open reading frame 115	1.2737	0.0280
17	COL14A1	collagen type XIV alpha 1 chain	-1.2635	0.0198
18	TLE4	transducin like enhancer of split 4	1.2464	0.0100
19	RUNX3	runt related transcription factor 3	1.2453	0.0223
20	SRPX2	sushi repeat containing protein. X-linked 2	1.2427	0.0123
21	SGIP1	SH3 domain GRB2 like endophilin interacting protein 1	1.2401	0.0136
22	PHLDA1	pleckstrin homology like domain family A member 1	1.2389	0.0142
23	ATL1	atlastin GTPase 1	-1.2319	0.0142
24	EZR	ezrin	1.2315	0.0123
25	RNF150	ring finger protein 150	1.2229	0.0169
26	BMP6	bone morphogenetic protein 6	-1.2217	0.0266
27	CDCA7	cell division cycle associated 7	1.2083	0.0258
28	SESN3	sestrin 3	-1.1996	0.0146
29	SALL1	spalt like transcription factor 1	1.1966	0.0195
30	IRAK3	interleukin 1 receptor associated kinase 3	1.1954	0.0154
31	HLA-B	major histocompatibility complex. class I. B	1.1914	0.0173
32	PKDCC	protein kinase domain containing. cytoplasmic	-1.1858	0.0119
33	MT1M	metallothionein 1M	1.1819	0.0140
34	PLK2	polo like kinase 2	1.1804	0.0209
35	NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	1.1777	0.0169
36	ARHGAP20	Rho GTPase activating protein 20	-1.1736	0.0239
37	COBLL1	cordons-bleu WH2 repeat protein like 1	-1.1703	0.0123
38	RAB38	RAB38. member RAS oncogene family	1.1693	0.0187
39	CHST15	carbohydrate sulfotransferase 15	1.1628	0.0216
40	NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase	1.1627	0.0113
41	PHLDA2	pleckstrin homology like domain family A member 2	1.1581	0.0154
42	KCTD4	potassium channel tetramerization domain containing 4	1.1580	0.0130
43	GIMAP2	GTPase. IMAP family member 2	1.1566	0.0158
44	SLIT3	slit guidance ligand 3	-1.1535	0.0209
45	DEPDC7	DEP domain containing 7	1.1531	0.0294
46	SERTAD4-AS1	SERTAD4 antisense RNA 1	1.1443	0.0202

*To be continued*

1				
2				
3				
4				
5	DPP4	dipeptidyl peptidase 4	1.1406	0.0186
6	BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	1.1371	0.0202
7	PDGFD	platelet derived growth factor D	-1.1335	0.0093
8	CD200	CD200 molecule	-1.1316	0.0242
9	CDH11	cadherin 11	-1.1302	0.0089
10	ACVR2A	activin A receptor type 2A	-1.1280	0.0088
11	HTR2A	5-hydroxytryptamine receptor 2A	-1.1251	0.0227
12	FADS1	fatty acid desaturase 1	1.1251	0.0203
13	MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1.1204	0.0158
14	MYLIP	myosin regulatory light chain interacting protein	1.1162	0.0209
15	FGF13	fibroblast growth factor 13	1.1101	0.0120
16	PLAC9	placenta specific 9	-1.1094	0.0133
17	TNS3	tensin 3	1.1092	0.0266
18	RBP1	retinol binding protein 1	1.1029	0.0223
19	DHRS3	dehydrogenase/reductase 3	-1.0948	0.0222
20	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	1.0932	0.0207
21	HAS2	hyaluronan synthase 2	1.0878	0.0116
22	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	1.0871	0.0227
23	CFB	complement factor B	1.0861	0.0123
24	MX2	MX dynamin like GTPase 2	1.0849	0.0297
25	CFH	complement factor H	1.0833	0.0116
26	IL13RA2	interleukin 13 receptor subunit alpha 2	-1.0820	0.0270
27	LY75	lymphocyte antigen 75	1.0789	0.0181
28	MAP3K7CL	MAP3K7 C-terminal like	1.0664	0.0174
29	PRRX1	paired related homeobox 1	-1.0661	0.0215
30	GRIA1	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1	1.0630	0.0230
31	NETO2	neuropilin and tolloid like 2	1.0589	0.0230
32	PAG1	phosphoprotein membrane anchor with glycosphingolipid microdomains 1	1.0552	0.0163
33	ACVR2A	activin A receptor type 2A	-1.0542	0.0119
34	FAM213A	family with sequence similarity 213 member A	1.0517	0.0187
35	TMEM155	transmembrane protein 155	-1.0468	0.0285
36	CAMTA2	calmodulin binding transcription activator 2	-1.0457	0.0135
37	TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	1.0410	0.0157
38	ZNF367	zinc finger protein 367	1.0405	0.0283
39	MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	-1.0356	0.0229
40	CCNE2	cyclin E2	1.0348	0.0283
41	PRPS1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	-1.0346	0.0294
42	TNFRSF11B	TNF receptor superfamily member 11b	1.0287	0.0130
43	DDX60	DEXD/H-box helicase 60	1.0206	0.0137
44	PIK3CD	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta	1.0190	0.0154
45	STAU2	staufen double-stranded RNA binding protein 2	-1.0169	0.0235
46	CTSS	cathepsin S	1.0159	0.0299
47	ZFH4-AS1	ZFH4 antisense RNA 1	-1.0143	0.0223

1  
2  
3 *To be continued*

4	ST8SIA2	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2.8-sialyltransferase 2	1.0092	0.0157
5	MYH2	myosin heavy chain 2	-1.0034	0.0299
6	LYPD6B	LY6/PLAUR domain containing 6B	1.0002	0.0154
7	RTP4	receptor transporter protein 4	0.9951	0.0142
8	COL10A1	collagen type X alpha 1 chain	0.9900	0.0202
9	EVI2A	ecotropic viral integration site 2A	0.9897	0.0239
10	ALDH7A1	aldehyde dehydrogenase 7 family member A1	-0.9810	0.0169
11	C8orf34	chromosome 8 open reading frame 34	0.9805	0.0216
12	RRAS2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	0.9803	0.0134
13	WTAP	Wilms tumor 1 associated protein	0.9784	0.0114
14	MT1F	metallothionein 1F	0.9693	0.0169
15	SIPA1L2	signal induced proliferation associated 1 like 2	0.9685	0.0169
16	TRPV2	transient receptor potential cation channel subfamily V member 2	0.9656	0.0202
17	ANGPT1	angiopoietin 1	0.9623	0.0130
18	GGH	gamma-glutamyl hydrolase	0.9596	0.0116
19	MYO1E	myosin IE	-0.9589	0.0169
20	GNPTAB	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase alpha and beta subunits	0.9568	0.0226
21	MAP2	microtubule associated protein 2	0.9559	0.0263
22	IGF1	insulin like growth factor 1	-0.9559	0.0239
23	RGS4	regulator of G-protein signaling 4	-0.9542	0.0209
24	TCF7L2	transcription factor 7 like 2	-0.9491	0.0100
25	TRIM47	tripartite motif containing 47	0.9458	0.0269
26	TENM2	teneurin transmembrane protein 2	0.9405	0.0133
27	NFE2L3	nuclear factor, erythroid 2 like 3	0.9387	0.0200
28	JUN	Jun proto-oncogene. AP-1 transcription factor subunit	0.9378	0.0169
29	ADD3	adducin 3	-0.9374	0.0089
30	AURKA	aurora kinase A	0.9229	0.0256
31	HOXB6	homeobox B6	0.9219	0.0216
32	ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	0.9197	0.0138
33	FOXP1	forkhead box P1	-0.9194	0.0154
34	CRYAB	crystallin alpha B	-0.9145	0.0236
35	TFPI	tissue factor pathway inhibitor	0.9142	0.0187
36	SQLE	squalene epoxidase	0.9078	0.0130
37	CLDN11	claudin 11	0.9050	0.0283
38	NFYB	nuclear transcription factor Y subunit beta	-0.9010	0.0278
39	STARD13	StAR related lipid transfer domain containing 13	0.8979	0.0263
40	CDH13	cadherin 13	0.8972	0.0130
41	ANGPT1	angiopoietin 1	0.8958	0.0116
42	HOXA5	homeobox A5	-0.8954	0.0143
43	PVRL3	nectin cell adhesion molecule 3	0.8936	0.0111
44	LOC100505501	uncharacterized LOC100505501	0.8930	0.0142
45	MAP7	microtubule associated protein 7	0.8856	0.0287
46	SQRDL	sulfide quinone reductase-like (yeast)	0.8850	0.0191

1  
2  
3 *To be continued*  
4

5	MAF	MAF bZIP transcription factor	0.8813	0.0187
6	CHI3L1	chitinase 3 like 1	-0.8810	0.0216
7	IRF1	interferon regulatory factor 1	0.8780	0.0236
8	FAM107B	family with sequence similarity 107 member B	0.8748	0.0300
9	PCDH18	protocadherin 18	-0.8695	0.0130
10	LIPA	lipase A, lysosomal acid type	-0.8693	0.0142
11	RABGAP1	RAB GTPase activating protein 1	0.8687	0.0211
12	ITM2C	integral membrane protein 2C	0.8639	0.0187
13	SLC7A11	solute carrier family 7 member 11	0.8574	0.0169
14	CDC25B	cell division cycle 25B	0.8556	0.0243
15	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4 group A member 3	-0.8554	0.0211
16	PLA2G4C	phospholipase A2 group IVC	0.8512	0.0201
17	C1GALT1C1	C1GALT1 specific chaperone 1	0.8492	0.0142
18	WNT4	Wnt family member 4	-0.8492	0.0269
19	BMP2	bone morphogenetic protein 2	0.8416	0.0154
20	LOXL3	lysyl oxidase like 3	0.8403	0.0226
21	FMN2	formin 2	-0.8391	0.0271
22	ANKH	ANKH inorganic pyrophosphate transport regulator	-0.8370	0.0130
23	NFIA	nuclear factor I A	-0.8344	0.0135
24	TJP2	tight junction protein 2	0.8269	0.0116
25	NFIB	nuclear factor I B	-0.8228	0.0223
26	EPB41L4A-AS1	EPB41L4A antisense RNA 1	-0.8178	0.0130
27	GATA6-AS1	GATA6 antisense RNA 1 (head to head)	-0.8146	0.0298
28	ROR1	receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1	-0.8101	0.0232
29	NCALD	neurocalcin delta	-0.8100	0.0181
30	PDZD2	PDZ domain containing 2	0.8061	0.0243
31	TIPARP	TCDD inducible poly(ADP-ribose) polymerase	0.8049	0.0130
32	LEPR	leptin receptor	0.8043	0.0234
33	LOC645638	uncharacterizedLOC645638	0.8042	0.0223
34	MCC	mutated in colorectal cancers	0.8005	0.0123
35	GNA14	G protein subunit alpha 14	0.7959	0.0297
36	PDGFC	platelet derived growth factor C	0.7938	0.0223
37	SERAC1	serine active site containing 1	-0.7916	0.0273
38	PLS3	plastin 3	-0.7908	0.0216
39	PBX1	PBX homeobox 1	-0.7905	0.0186
40	ZFHX4	zinc finger homeobox 4	-0.7865	0.0181
41	LSS	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	0.7847	0.0163
42	PARP8	poly(ADP-ribose) polymerase family member 8	0.7820	0.0154
43	AFAP1L1	actin filament associated protein 1 like 1	0.7814	0.0187
44	BID	BH3 interacting domain death agonist	0.7774	0.0187
45	FOXP1	forkhead box P1	-0.7728	0.0113
46	TPCN1	two pore segment channel 1	0.7726	0.0219
47	C7orf60	Base Methyltransferase Of 25S RRNA 2 Homolog	-0.7717	0.0114

1  
2  
3 *To be continued*

4	BHMT2	betaine--homocysteine S-methyltransferase 2	0.7716	0.0208
5	CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4	0.7707	0.0134
6	FAIM	Fas apoptotic inhibitory molecule	0.7679	0.0103
7	UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	0.7649	0.0169
8	SNCAIP	synuclein alpha interacting protein	0.7642	0.0187
9	NUP62	nucleoporin 62	0.7637	0.0187
10	GALNT15	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 15	0.7636	0.0135
11	GNG11	G protein subunit gamma 11	0.7597	0.0187
12	EMP2	epithelial membrane protein 2	0.7530	0.0239
13	FZD4	frizzled class receptor 4	-0.7522	0.0269
14	TLR3	toll like receptor 3	0.7515	0.0261
15	PARP12	poly(ADP-ribose) polymerase family member 12	0.7489	0.0149
16	EPS8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	-0.7475	0.0089
17	BDKRB2	bradykinin receptor B2	0.7461	0.0227
18	PLXDC2	plexin domain containing 2	-0.7455	0.0203
19	ZNF185	zinc finger protein 185 (LIM domain)	0.7450	0.0200
20	SPRY2	sprouty RTK signaling antagonist 2	0.7421	0.0134
21	TBX3	T-box 3	0.7372	0.0227
22	IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	-0.7370	0.0114
23	ANGPTL1	angiopoietin like 1	-0.7340	0.0225
24	TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	0.7282	0.0205
25	PGM1	phosphoglucomutase 1	-0.7271	0.0257
26	TAPSAR1	PSMB8 antisense RNA 1	0.7253	0.0149
27	MAP1B	microtubule associated protein 1B	-0.7238	0.0089
28	SPOCK1	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	-0.7192	0.0172
29	ARRDC3	arrestin domain containing 3	0.7143	0.0154
30	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	0.7126	0.0123
31	HSD17B6	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 6	-0.7117	0.0232
32	HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	0.7111	0.0209
33	WTAP	Wilms tumor 1 associated protein	0.7061	0.0236
34	AMPH	amphiphysin	0.7051	0.0154
35	CDH18	cadherin 18	-0.7029	0.0230
36	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	0.6993	0.0202
37	MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	0.6950	0.0172
38	GALNT1	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	-0.6929	0.0243
39	TMSB15A	thymosin beta 15a	0.6928	0.0209
40	DAPK1	death associated protein kinase 1	0.6924	0.0243
41	THBS2	thrombospondin 2	-0.6880	0.0274
42	IL15RA	interleukin 15 receptor subunit alpha	0.6859	0.0216
43	TGFB2	transforming growth factor beta 2	0.6854	0.0229
44	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	0.6847	0.0299
45	SFT2D2	SFT2 domain containing 2	-0.6842	0.0154
46	FOXO1	forkhead box O1	-0.6816	0.0154

*To be continued*

1				
2				
3				
4				
5	KBTD11	kelch repeat and BTB domain containing 11	0.6783	0.0192
6	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	-0.6755	0.0176
7	AHRR	aryl-hydrocarbon receptor repressor	0.6741	0.0232
8	FBLN2	fibulin 2	-0.6658	0.0216
9				
10	TNFRSF21	TNF receptor superfamily member 21	0.6644	0.0142
11	KANK1	KN motif and ankyrin repeat domains 1	-0.6594	0.0089
12	GRIA3	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3	0.6559	0.0142
13	RRAS2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	0.6553	0.0198
14	TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase	0.6533	0.0187
15	HLA-E	major histocompatibility complex, class I, E	0.6519	0.0142
16	TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	0.6517	0.0187
17				
18	GALNT10	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	-0.6513	0.0216
19	PPIF	peptidylprolyl isomerase F	0.6508	0.0135
20	FADS3	fatty acid desaturase 3	0.6505	0.0114
21	GINS2	GINS complex subunit 2	0.6450	0.0287
22	EZR	ezrin	0.6447	0.0142
23	TRAF3	TNF receptor associated factor 3	0.6442	0.0134
24	PARP14	poly(ADP-ribose) polymerase family member 14	0.6415	0.0135
25	CD109	CD109 molecule	0.6401	0.0185
26	ATP1B1	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit beta 1	0.6400	0.0142
27	IDI1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	0.6398	0.0184
28	TRPS1	transcriptional repressor GATA binding 1	0.6388	0.0277
29	GBP2	guanylate binding protein 2	0.6372	0.0216
30	RHOBTB1	Rho related BTB domain containing 1	-0.6335	0.0299
31	STEAP2	STEAP2 metalloredutase	0.6334	0.0201
32	TRIM2	tripartite motif containing 2	-0.6302	0.0230
33	MRPS6	mitochondrial ribosomal protein S6	0.6299	0.0142
34	ASPH	aspartate beta-hydroxylase	0.6286	0.0187
35	GCA	granalecin	0.6240	0.0299
36	FHL2	four and a half LIM domains 2	-0.6236	0.0209
37	IRX3	iroquois homeobox 3	-0.6235	0.0205
38	FGF18	fibroblast growth factor 18	-0.6230	0.0154
39	CSGALNACT1	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	-0.6195	0.0297
40	DCN	decorin	0.6166	0.0223
41	SHROOM3	shroom family member 3	-0.6135	0.0216
42	LARGE	Glycosyltransferase-like protein LARGE1	-0.6123	0.0160
43	NR2F1-AS1	NR2F1 antisense RNA 1	-0.6102	0.0130
44	PSMB8	proteasome subunit beta 8	0.6080	0.0300
45	IRS1	insulin receptor substrate 1	0.6002	0.0277
46	SLC35F2	solute carrier family 35 member F2	0.5995	0.0258
47	DTX3L	deltex E3 ubiquitin ligase 3L	0.5971	0.0239
48	PPIA	peptidylprolyl isomerase A	0.5947	0.0258
49				
50	SLC28A3	solute carrier family 28 member 3	0.5932	0.0236

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60*To be continued*

PPDPF	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor	-0.5916	0.0135
NUAK1	NUAK family kinase 1	-0.5912	0.0135
PPP1R3C	protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C	-0.5904	0.0210
PELI2	pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 2	0.5901	0.0255
DOK4	docking protein 4	-0.5895	0.0135
MXRA7	matrix remodeling associated 7	-0.5876	0.0164
LIMS2	LIM zinc finger domain containing 2	-0.5862	0.0259
SIDT2	SID1 transmembrane family member 2	-0.5854	0.0114
PLCE1	phospholipase C epsilon 1	-0.5851	0.0202

For Review Only