



**HAL**  
open science

# Rôle d'ADAMTSL2 et FBN1 dans l'ossification endochondrale : étude des modèles murins mimant la dysplasie géléophysique

Laure Delhon

► **To cite this version:**

Laure Delhon. Rôle d'ADAMTSL2 et FBN1 dans l'ossification endochondrale : étude des modèles murins mimant la dysplasie géléophysique. Génétique. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB081 . tel-02134124

**HAL Id: tel-02134124**

**<https://theses.hal.science/tel-02134124>**

Submitted on 20 May 2019

**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.



**imagine**  
INSTITUT DES MALADIES GÉNÉTIQUES



# Rôle d'ADAMTSL2 et FBN1 dans l'ossification endochondrale : étude des modèles murins mimant la Dysplasie Géléophysique



**Par Laure Delhon**

**Directrice de thèse : Dr Carine Le Goff**

**Co-directrice : Pr Valérie Cormier-Daire**

Thèse de l'université Paris Descartes

Ecole Doctorale BioSPC

Spécialité : Génétique

Soutenue le 28 Novembre 2017

## **Jury**

Dr Marie-Paule Jacob  
Pr Ulrich Valcourt  
Pr Alain Colige  
Pr Franck Carreiras

Présidente du Jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur

# Remerciements

Ces années de thèse m'auront fait mûrir, pour le meilleur j'espère, à la fois grâce au travail accompli mais surtout grâce aux nombreuses personnes que j'aurai rencontré et côtoyé. Il m'est difficile de retranscrire toute ma reconnaissance à celles et ceux qui m'ont soutenu durant ces trois années mais je vais essayer de faire au mieux.

Tout d'abord merci aux professeurs Ulrich Valcourt et Alain Colige pour être mes rapporteurs, à Marie-Paule Jacob pour être mon examinatrice et la présidente de mon jury et à Franck Carreiras pour être mon examinateur. Merci de vous être déplacés et de bien vouloir participer à cet évènement important de ma vie.

Je voudrais dire un immense merci à ma directrice de thèse, le Docteur Carine Le Goff, qui m'a soutenu et encouragé pendant ces trois (presque quatre) années. Je pense que tu as su me cerner et ainsi m'encadrer comme il le fallait. J'ignore comment ce serait passé une thèse sous un autre directeur mais je sais que je ne garderai que des bons souvenirs et que j'en sors grandie, en partie grâce à toi. Merci de m'avoir fait confiance. C'est peut-être un peu présomptueux de ma part mais je pense que nous avons fait un super bon duo de choc 😊

Merci au Professeur Valérie Cormier-Daire pour m'avoir accepté dans son équipe. Grâce à vous j'ai pu travailler sur un projet intéressant et stimulant, entourée de personnes en or.

Merci à l'équipe et toutes les personnes qui y seront passées. Merci à Céline pour sa bonne humeur et sa patience (et pour nous avoir beaucoup fourni en bonbons !), à Mathilde pour ses conseils, son aide et son rire si communicateur (je l'adore !), à Johanne pour sa belge attitude (je suis certaine que ça se dit !) et de m'avoir rapporté du ZiCoin (je ne suis pas sûre de pouvoir écrire le vrai nom), à Caroline pour sa gentillesse. Merci à tou(tes)(s) celles et ceux qui sont passé(e)s et m'ont aidé dans mon projet et/ou sont devenu(e)s des ami(e)s. Merci à Kevin (sans accent ;)), à Emilie (ton aide m'a été précieuse), à Clémence (d'une bonne humeur à toutes épreuves !), à Perrine (tu vas tellement me manquer !), à Séverine, à Clémence bis (encore pleine de bonne humeur, je pense que c'est une règle avec ce prénom), à Cynthia et Angélique (bref passage mais vous avez bien animé le labo), à Clémentine (même si ce ne fut pas très long).

Merci aux personnes de l'équipe de Laurence Legeai-Mallet (que je remercie pour ses nombreux conseils scientifiques). Merci à Maxence, mon colloc de bureau et copain de thèse, qui m'a supporté (même quand j'étais pénible 😊) et changé les idées quand je broyais du noir (oui un jour je regarderai tous les films de cette liste). Merci à Valentin, qui a toujours été à l'écoute et qui a un humour à toute épreuve, à ses bras qui nous ont permis de remporter l'épreuve de tir à la corde ;), et grâce à qui j'ai pu faire la connaissance de Mallo 😊 (Revenez sur Paris SVP !). Merci à

Ludo, mon grand frère de cœur, qui me manque aussi beaucoup. Merci à Emilie pour sa solidarité féminine (:P) et ces gros fous rire. Merci à Davide, copain de thèse aussi, qui j'espère sera là à ma soutenance (pas de pression tu as vu ;) ?). Merci à Nabil, avec toujours le petit compliment bien placé et pour avoir toujours trouvé ce que j'avais perdu 😊. Merci à Catherine, pour son aide et son expérience de labo. Merci à Léa, toujours là pour un coup de main, et qui partage mon amour pour les encas à n'importe quelle heure. Merci à Cindy, on ne sera pas côtoyé longtemps mais ce fut quand même génial de te rencontrer.

J'en profite pour remercier Sophie, qui m'a de très nombreuses fois dépanné et aidé. Merci à Camille également (Roomy), je suis super contente qu'on se soit rencontrée, à Flo et à Anaïs (à nos apéros et à votre soutien).

Merci à Nicolas pour ces séances de confocal et sa patience. Merci à Gabriela pour s'être très bien occupé de mes petites souris.

Merci à l'association des jeunes chercheurs YR21, qui m'a permis de m'investir dans des projets très intéressants et de pouvoir développer d'autres capacités. J'ai vraiment adoré en faire partie.

Merci à Christelle (ma sis de cœur), pour m'avoir toujours écouté, soutenu et remonté le moral. Voilà 6 ans qu'on se suit même jusque dans nos stages, le prochain ça sera vraiment le destin ;). Merci à toi, Lisa et Morgane (mon tétra, il fallait que je le mette) pour être là ! Merci à tous mes amis qui ont été là et qui le seront, j'espère, encore longtemps, à Ludo (Bro et duo de choc au rock), Tommaso (Bro bis, ... ;)), Anaïs, et tous ceux que je n'ai pas cités mais qui sont là depuis longtemps pour certains. Merci grâce à vous je me sens entourée et soutenue !

Merci à ma famille. A mes parents, sans qui je ne serais sûrement pas là où j'en suis, qui me soutiennent dans tout ce que j'entreprends, des parents en or ! Merci à mon frère et ma sœur, qui sont merveilleux (profitez de ces mots ;) ) et sur lesquels je sais, je pourrais toujours compter (et inversement). Merci à mes grands-parents (des deux côtés) qui malgré la difficulté de comprendre mes projets durant mes études, s'y sont toujours intéressés et ont toujours été là en soutien (c'est aussi grâce à vous là où j'en suis). Merci au reste de ma famille d'être là 😊 (J'essaierai d'être claire à ma soutenance).

Je suis désolée si j'ai oublié des personnes mais vraiment je vous suis entièrement reconnaissante à toutes et tous. Merci à pour ces années merveilleuses. Toute ceci me manquera énormément, j'espère retrouver une ambiance de travail au moins aussi bonne (même si la barre est haute) !

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>1</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>3</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>6</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>8</b>
1. Le groupe des dysplasies acroméliques .....	9
1.1. La Dysplasie Géléophysique (DG).....	9
1.2. Les bases moléculaires de la dysplasie géléophysique .....	10
2.3.1. La forme autosomique récessive : mutations dans le gène <i>ADAMTSL2</i> .....	10
2.3.2. La forme autosomique dominante : mutations dans le gène <i>FBN1</i> .....	10
2.3.3. Mutations dans le gène <i>LTBP3</i> .....	11
1.3. Les autres dysplasies acroméliques .....	12
1.3.1. La Dysplasie Acromicrique (DA, MIM 102370).....	12
1.3.2. Le Syndrome de Weill-Marchesani (SWM, MIM 277600).....	12
1.3.3. Le Syndrome Myhre (SM, MIM 139210).....	13
2. Processus d'ossification endochondrale .....	14
2.1. Mécanisme de l'ossification enchondrale.....	16
2.2. Organisation de la plaque de croissance .....	18
2.3. Régulation de la plaque de croissance.....	19
2.3.1. Sox9.....	20
2.3.2. Ihh/PTHrP.....	21
2.3.3. Runx2 .....	22
2.3.4. Les facteurs de croissance TGF- $\beta$ et BMP .....	23
2.3.5. Les facteurs FGF .....	24
3. La matrice extracellulaire .....	25
3.1. Les collagènes.....	25

3.2.	Les protéoglycanes .....	28
3.3.	Les enzymes protéolytiques de la matrice .....	29
3.3.1.	Les MMPs .....	30
3.3.2.	Les ADAMTSs .....	33
1)	Caractéristiques et structure des ADAMTSs .....	33
2)	Rôles des ADAMTSs .....	35
3)	Implication des ADAMTS dans des pathologies.....	38
3.3.3.	Les ADAMTS-Like .....	41
3.4.	La voie de signalisation du TGF- $\beta$ .....	44
3.4.1.	Les facteurs de croissance TGF- $\beta$ .....	44
3.4.2.	Le TGF- $\beta$ en complexe avec le LAP .....	44
3.4.3.	La voie de signalisation du TGF- $\beta$ .....	46
3.5.	Les protéines du réseau microfibrillaire impliquées dans la voie de signalisation du TGF- $\beta$	47
3.5.1.	Les Fibrillines .....	47
1)	Caractéristiques .....	47
2)	Expression dans les tissus au cours du développement .....	47
3)	Structure .....	48
4)	Formations des microfibrilles .....	50
5)	Rôles des fibrillines .....	51
i.	La régulation de la biodisponibilité des facteurs de croissance .....	51
ii.	L'interaction avec les cellules .....	52
iii.	L'assemblage des fibres élastiques.....	52
6)	Implication de FBN1 dans des pathologies .....	53
3.5.2.	Les LTBP1s .....	55
1)	Caractéristiques et structure des LTBP1s .....	55
2)	Rôles des LTBP1s dans la MEC et dans des pathologies .....	55
3.5.3.	La fibronectine .....	57

4. Les modèles invalidés pour les gènes <i>fbn1</i> et <i>adamtsl2</i> .....	59
4.1. Les modèles murins <i>fbn1</i> .....	59
4.1.1. Les modèles murins mimant le syndrome Marfan .....	59
4.1.2. Le modèle murin du SWM .....	61
4.1.3. Le modèle murin du syndrome « Stiff Skin » .....	62
4.1.4. Les autres modèles murins <i>Fbn1</i> .....	62
4.2. Les modèles invalidés pour <i>Adamtsl2</i> .....	62
<b>Objectifs</b> .....	<b>64</b>
<b>Matériels et Méthodes/Résultats</b> .....	<b>66</b>
Première partie : Invalidation du gène <i>Adamtsl2</i> chez la souris.....	67
Article 1 : “ <i>ADAMTSL2 regulates chondrogenesis by controlling the structure of microfibrillar network</i> ”	
Deuxième partie : Mutation dans le domaine TB5 du gène <i>FBN1</i> chez la souris .....	94
Article 2 : “ <i>Involvement of FBN1/TB5 domain in regulation of chondrogenesis</i> ”	
<b>Discussion et perspectives</b> .....	<b>119</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>128</b>
<b>Annexe</b> .....	<b>148</b>

# Liste des abréviations

ADAMTS	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs</i>
ADAMTSL	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs-Like</i>
ALK	<i>Activin receptor-Like Kinase</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
cb	<i>Calcium binding</i>
CCBE1	<i>Collagen-and Calcium Binding Epidermal growth factor domains 1</i>
CDMS	Chondrodysplasie Métaphysale de type Schmid
COMP	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>
Col	Collagène
DA	Dysplasie Acromicrique
DG	Dysplasie Géléophysique
ECTOL	Ectopie du Cristallin Isolée
EDS	Syndrome d'Ehlers-Danlos
EGF	<i>Epidermal Growth Factor-like</i>
FACIT	<i>Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices</i>
FBG	<i>Fibrinogen-like globe</i>
FBN1	Fibrilline-1
FBN2	Fibrilline-2
FGF	<i>Fibroblast Growth Factors</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factors Receptor</i>
FvW	facteur von Willebrand
GAG	Glycosamynoglycane
HS	Sulfate d'héparane (Heparan sulfate)
IHH	Indian Hedgehog
KO	<i>Knock-Out</i>
LAP	<i>Latency Associated Propeptide</i>
LLC	<i>Large Latent Complex</i>
Lox	<i>Lysyl oxidase</i>
LTBP	<i>Latent TGF-beta Binding Protein</i>
MAD	Anadysplasie Métaphysaire
MAGP	<i>Microfibril-Associated Glycoprotein-1</i>
MEC	Matrice Extracellulaire
MH2	<i>Mad Homology 2</i>

MMCAT	Syndrome de Microcornée associé à une dystrophie Choriorétinienne myopique et Telecanthus
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
PCP	Procollagène C-protéase
POC	Centre d'Ossification Primaire
Ptch-1	<i>Patched-1</i>
PTHrP	<i>Parathyroid Hormone-related Protein</i>
PTT	Purpura Thrombotique Thrombocytopénique
SLC	<i>Small Latent Complex</i>
SM	Syndrome de Myhre
SML	Syndrome de Musladin-Lueke
Smo	<i>Smoothened</i>
Soc	Centre d'Ossification Secondaire
Sox9	<i>Sex determining region Y-related high-mobility group box 9</i>
SWM	Syndrome de Weill Marchesani
TAAD	Dissection aortique de type A
TB	<i>TGF-<math>\beta</math> binding protein-like</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor (TGF)-<math>\beta</math></i>
T $\beta$ R1	Récepteur TGF- $\beta$ type 1
T $\beta$ R2	Récepteur TGF- $\beta$ type 2
Tsk	<i>Tight skin</i>
TSR	<i>Thrombospondin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

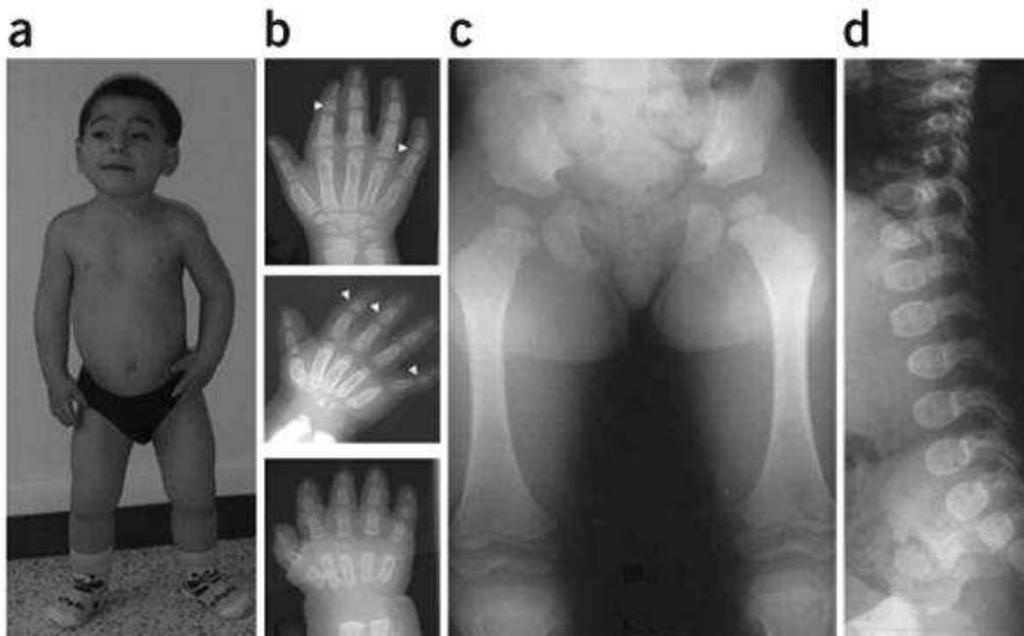
# Introduction

## 1. Le groupe des dysplasies acroméliques

Le groupe des dysplasies acroméliques comporte quatre pathologies squelettiques rares : le Syndrome Weill-Marchesani (SWM), la dysplasie géléophysique (DG), la dysplasie acromicrique (DA) et le syndrome Myhre. Ces quatre dysplasies squelettiques sont caractérisées par un retard statural, un raccourcissement des extrémités, une peau épaisse et une rigidité des articulations. Elles se distinguent également par des caractéristiques qui vont être décrites ci-dessous<sup>1</sup>.

### 1.1. La Dysplasie Géléophysique (DG)

Les patients DG présentent les manifestations cliniques suivantes : un retard de l'âge osseux, des épiphyses en cône, des os longs tubulaires courts et des corps vertébraux ovoïdes (**Figure 1**). Le faciès caractéristique (visage « joyeux » *geleos* pour « joyeux » et *physis* pour « nature ») inclut un nez court, des joues rondes, un hypertélorisme, un philtrum long et plat et une lèvre supérieure fine. Les caractéristiques cliniques additionnelles sont: un épaissement valvulaire progressif entraînant souvent une mort précoce, des contractions du muscle gastrocnémien et du talon d'Achille qui obligent à marcher sur la pointe des pieds, une sténose trachéale, une insuffisance broncho-pulmonaire et enfin une hépatomégalie<sup>2</sup>.



**Figure 1 : Manifestations cliniques et radiologiques de la dysplasie géléophysique. (a)** Caractéristiques faciales, incluant le visage rond, le philtrum long, la lèvre supérieure amincie et le raccourcissement des mains et des pieds (âge de l'individu : 9ans). **(b)** Radiographies des mains de l'individu à l'âge d'un an (en bas), 3ans (au milieu) et 10ans (en haut). **(c)(d)** Hanches à l'âge de 3ans et colonne à l'âge d'un an<sup>2</sup>.

## 1.2. Les bases moléculaires de la dysplasie géléophysique

Deux modes de transmission ont été décrits par l'équipe grâce à l'étude d'une cohorte de 33 patients atteints de la DG.

### 2.3.1. La forme autosomique récessive : mutations dans le gène *ADAMTSL2*

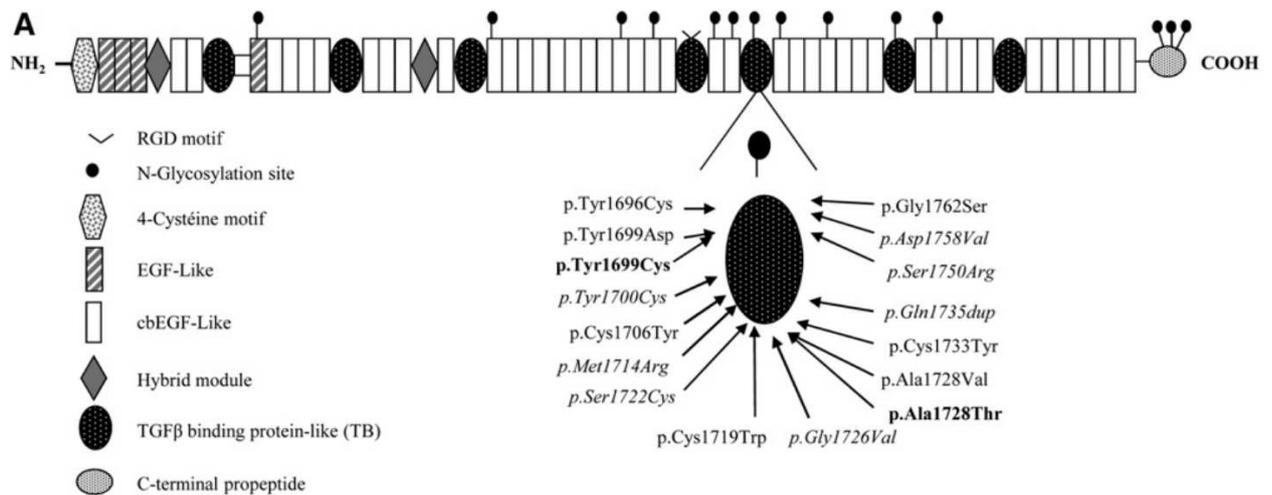
Un premier mode autosomique récessif (MIM 231050) a été décrit par Le Goff *et al.* en 2008<sup>2</sup>. Utilisant une stratégie de cartographie par homozygotie au sein d'un échantillon de 4 familles consanguines et de 2 familles non consanguines présentant une DG, le gène responsable de la DG a été localisé en 9q34.2 puis des mutations ont été identifiées dans un membre de la famille des ADAMTS, *ADAMTSL2*. Les mutations sont localisées dans les régions codant le domaine riche en cystéine (3 des mutations) et codant le TSR6 (2 des mutations). A ce moment-là, aucune fonction n'était connue pour *ADAMTSL2*.

### 2.3.2. La forme autosomique dominante : mutations dans le gène *FBN1*

33 cas supplémentaires de DG ont été collectés<sup>3</sup>. Des mutations dans *ADAMTSL2* chez 14/33 cas avec 13 nouvelles mutations ont été identifiées<sup>3</sup>. L'étude d'une plus grande cohorte de patients DG a montré l'absence de mutations dans *ADAMTSL2* pour 19/33 cas et nous a conduit à comparer les patients avec ou sans mutation dans *ADAMTSL2*. Nous avons observé des caractéristiques distinctes dans les deux groupes telles que la dysmorphie faciale et la marche sur la pointe des pieds constamment observées dans le groupe avec mutation. Pour le reste des manifestations cliniques, aucune différence n'a été constatée. Nous concluons que la DG est cliniquement homogène mais présente une hétérogénéité génétique<sup>3</sup>.

Le second mode d'hérédité de la DG est autosomique dominant (MIM 608328) et est dû à des mutations dans le gène de la Fibrilline-1 (*FBN1*). En effet, deux patients DG et trois DA ont été séquencés par exome. Considérant le chevauchement phénotypique entre la DG et la DA, nous avons recherché un gène muté en commun parmi ces 5 exomes. Nous avons identifié des changements nucléotidiques dans 3 gènes: *MUC17*, *HYDIN* et *FBN1*. La présence de l'avance staturale dans le syndrome de Marfan, due aux mutations dans *FBN1*, et l'implication du gène *FBN1* dans le SWM nous a conduits à considérer *FBN1* comme un gène candidat. Dans 19 cas DG et 10 DA, nous avons identifié 16 mutations hétérozygotes dans *FBN1* (15 faux sens et une insertion) toutes localisées dans les exons 41-42, codant le TGF- $\beta$  binding protein-like domaine 5 (TB5) de *FBN1*.

Sept mutations ont été retrouvées exclusivement chez des patients DG, 7 mutations chez des patients AD et 2 mutations ont été retrouvées à la fois chez des patients DG et DA (**Figure 2**).



**Figure 2 : Localisation des mutations dans FBN1 identifiées chez des patients AD et DG.** *La localisation du changement d'acide aminé pour chaque mutation est indiquée (les mutations pour les patients DG sont listées en police romain, les mutations DA en italique et les mutations partagées par les patients DG et DA en gras).*

Toutes ces mutations altéraient soit des acides aminés aromatiques, soit des cystéine. La moitié des mutations créaient ou retiraient un résidu cystéine à l'intérieur du TB5, qui est caractérisé comme les autres domaines TB par des motifs composés de 8 cystéine directement impliquées dans la conformation de FBN1 via des liaisons disulfure intramoléculaires <sup>4</sup>.

### 2.3.3. Mutations dans le gène *LTBP3*

Après l'identification des mutations dans le gène FBN1, des patients DG restaient sans base moléculaire. Une autre analyse, utilisant le séquençage par exome, nous a conduit à identifier des mutations hétérozygotes dans le gène « Latent TGF-beta Binding Protein-3» (*LTBP3*) comme responsables de la DG et de la DA. Cependant, il est important de noter que les cas DG et DA mutés dans le gène *LTBP3* ne présentent pas de rétrécissement aortique et meurent à cause d'une atteinte pulmonaire<sup>5</sup>.

## 1.3. Les autres dysplasies acroméliques

### 1.3.1. La Dysplasie Acromicrique (DA, MIM 102370)

La DA a été décrite pour la première fois par le Dr P. Maroteaux et ses collaborateurs<sup>6</sup>. La DG et la DA ont des caractéristiques très similaires. Les patients présentent une petite taille (<-3SD (Standard Deviation)), des extrémités courtes, une intelligence normale, une peau épaisse, une limitation articulaire progressive et des anomalies osseuses (retard d'âge osseux, anomalie des têtes fémorales et épiphyses en cône).

La DA se différencie par des caractéristiques faciales distinctes : visage rond, fentes palpébrales étroites, sourcils bien dessinés, longs cils, nez bulbeux avec narines antéversées, philtrum long et proéminent et petite bouche avec lèvres épaisses. De plus, les patients DA ne présentent pas d'anomalies cardiaques ou broncho-pulmonaires. Le mode de transmission de la DA est autosomique dominant. Les bases moléculaires de la DA connues à ce jour sont les gènes *FBN1* et *LTBP3*.

### 1.3.2. Le Syndrome de Weill-Marchesani (SWM, MIM 277600)

Le SWM est une maladie rare caractérisée par une insuffisance staturale, une brachydactylie, une limitation articulaire et des anomalies oculaires comprenant une microsphérophakie et une luxation du cristallin. Des anomalies cardiaques (sténose de la valve pulmonaire, insuffisance de la valve mitrale, sténose de la valve aortique) et osseuses (retard d'âge osseux, épiphyse en cône) sont également présentes. Deux modes d'hérédité, autosomique dominant et autosomique récessif, ont été rapportés<sup>7,8</sup>.

Alors que le SWM peut être considéré comme le contre-type du syndrome de Marfan en raison de l'insuffisance staturale et de la brachydactylie, la présence d'une luxation du cristallin dans ces deux maladies a conduit Faivre et ses collaborateurs à considérer *FBN1* comme le gène candidat du SWM<sup>7</sup>. L'équipe du Pr. V. Cormier-Daire a ensuite identifié dans une famille de SWM dominant, une délétion de 24 nucléotides dans l'exon 41 de *FBN1* conduisant à la perte de 8 acides aminés dans un domaine LTBP (exon 41, 5074\_5097)<sup>7</sup>. Par ailleurs, à partir d'une cartographie par homozygotie, l'équipe a identifié des mutations homozygotes dans le gène *ADAMTS10*<sup>8</sup>. Des mutations récessives dans le gène *ADAMTS17* sont également responsables du syndrome de Weill Marchesani-like (SWM-like) dont les patients présentent des caractéristiques similaires au SWM, incluant les défauts oculaires et le retard statural mais qui ne présentent pas de brachydactylie ou de raideurs articulaires<sup>9</sup>. Les mutations dans le gène *LTBP2* sont impliquées dans la forme autosomique récessive du SWM et du SWM-like<sup>10</sup>.

### 1.3.3. Le Syndrome Myhre (SM, MIM 139210)

Le SM est caractérisé par un retard statural pré- et postnatal, une brachydactylie, une dysmorphie faciale (une hypoplasie maxillaire, un prognathisme, un philtrum court), une peau épaisse, une hypertrophie musculaire et une raideur articulaire. Une surdité est observée chez les cas les plus âgés. D'autres caractéristiques sont le retard de développement avec un retard mental et une attitude anormale, des anomalies cardiaques, un cryptorchidisme et des anomalies osseuses. Les manifestations squelettiques comprennent une voûte crânienne épaisse, des épiphyses en cônes, des os longs courts, les ailes iliaques hypoplasiques, des côtes larges et des vertèbres avec un large pédicule.

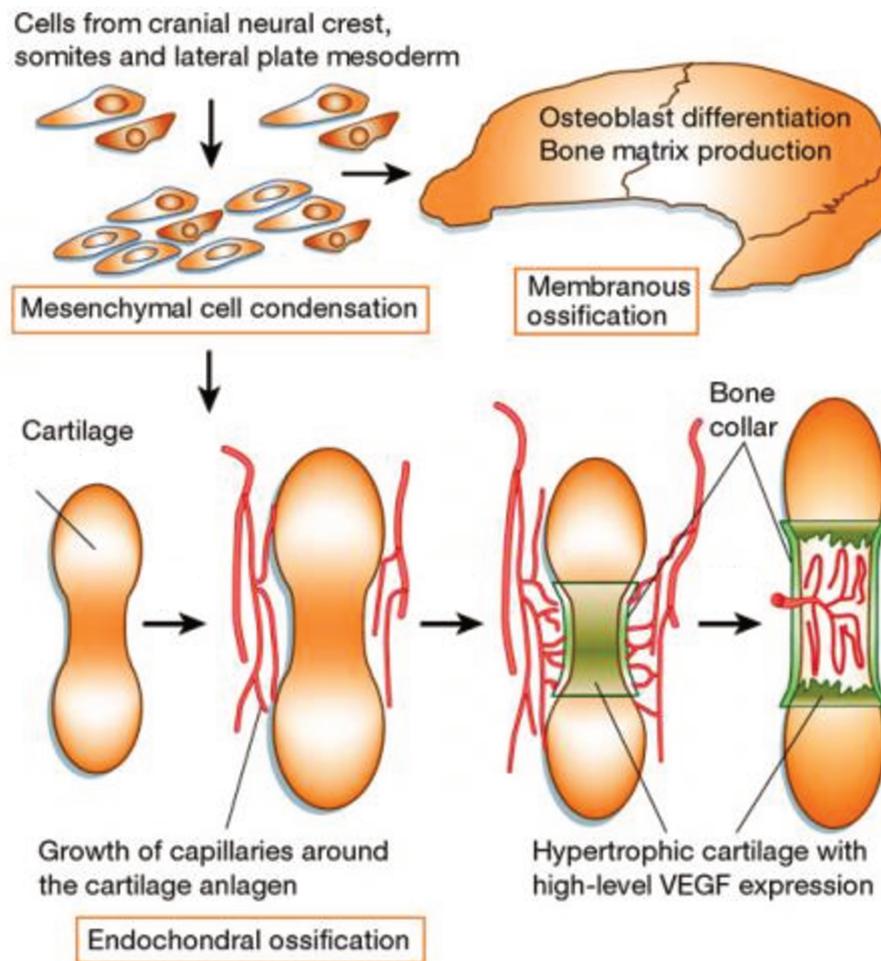
Utilisant une stratégie de séquençage par exome chez deux individus SM, le gène SMAD4 a été considéré comme le meilleur gène candidat, étant donné son rôle de médiateur dans les voies de signalisation TGF- $\beta$  et BMP, en nous rappelant le potentiel rôle de TGF- $\beta$  dans les dysplasies acroméliques. Nous avons identifié trois mutations hétérozygotes faux sens distinctes dans *SMAD4*, toutes affectant l'isoleucine 500 chez les 11 individus MS. Toutes ces mutations sont localisées dans le domaine MH2 (Mad Homology 2), impliqué dans l'activation transcriptionnelle et proche du site de monoubiquitination (Lys 519)<sup>11</sup>.

## 2.Processus d'ossification endochondrale

Les dysplasies acroméliques présentent de nombreuses anomalies squelettiques, suggérant une anomalie du développement du squelette dans ces pathologies et, plus particulièrement, des défauts d'ossification endochondrale.

Le développement du squelette est un processus complexe qui fait intervenir de nombreux types cellulaires, ainsi que de nombreuses molécules. L'ostéogenèse se produit durant l'embryogenèse, pendant la croissance, après une blessure et aussi pour le maintien de l'homéostasie normale. Deux mécanismes sont impliqués (**Figure 3**) dans le développement squelettique:

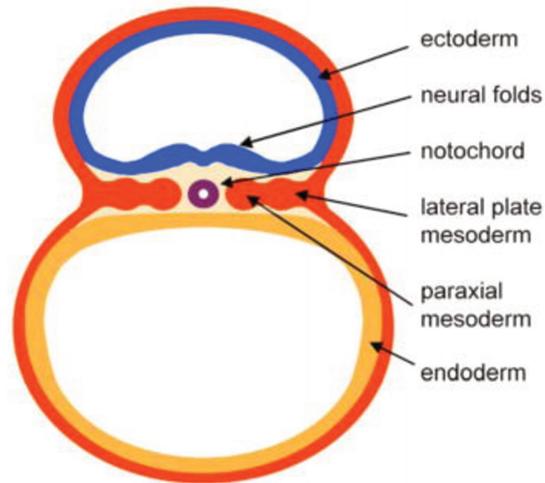
- **l'ossification endochondrale** qui requiert la différenciation et la prolifération de cellules spécifiques, les chondrocytes, au niveau de la plaque de croissance (ou cartilage de croissance) à partir des cellules mésenchymateuses qui vont former une matrice cartilagineuse pour le futur os. Cette ossification est impliquée dans la formation du squelette axial (colonne vertébrale et cage thoracique) et appendiculaire (membres) ainsi que dans les os de la base du crâne.
- **l'ossification intramembranaire** est impliquée dans la formation des os plats du crâne tels que ceux de la voûte crânienne. Cette ossification débute, tout comme l'ossification endochondrale, par la condensation des cellules mésenchymateuses. Cependant, ces cellules seront directement remplacées par du tissu osseux, en se différenciant en ostéoblastes, sans passer par l'étape de formation d'une matrice cartilagineuse.



**Figure 3 : Développement du squelette.** Les cellules mésenchymateuses se condensent dans les sites des futurs os. Dans l'ossification intramembranaire, les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes et la production de matrice osseuse se fait directement. A l'inverse, dans l'ossification endochondrale, les cellules mésenchymateuses se différencient en chondrocytes et forment un modèle cartilagineux qui sera ensuite remplacé par de l'os<sup>12</sup>.

Trois types cellulaires propres au squelette interviennent durant le développement de celui-ci : les chondrocytes formant le cartilage, les ostéoblastes et les ostéoclastes dans l'os. L'origine du squelette provient de trois régions de l'embryon (**Figure 4**).

- Les membres (ou appelé squelette appendiculaire), le sternum et une partie du squelette craniofacial dérivent du **mésoderme de la plaque latérale**
- Le squelette axial (colonne vertébrale et cage thoracique) dérive des somites provenant du **mésoderme paraxial**
- Le squelette craniofacial provient à la fois des **crêtes neurales et du mésoderme**.



**Figure 4 : Origine des cellules squelettiques dans un embryon de vertébré.** Schéma d'une coupe transversale d'un embryon de souris après la gastrulation au 8<sup>ème</sup> jour de développement (équivalent au 17<sup>ème</sup> jour chez l'homme)<sup>13</sup>.

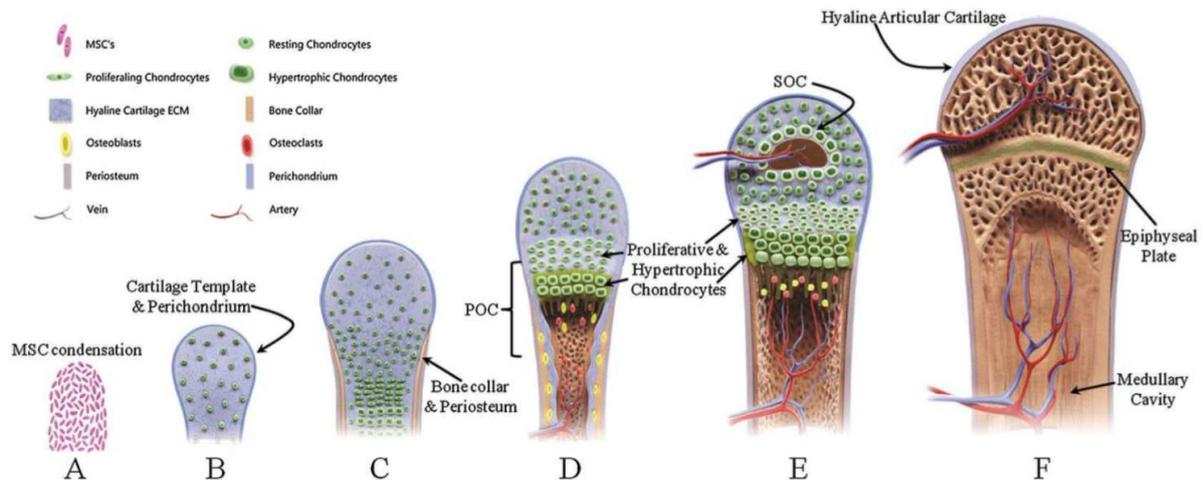
## 2.1. Mécanisme de l'ossification enchondrale

L'ossification endochondrale débute par la condensation des cellules mésenchymateuses dans les futurs sites des éléments du squelette (**Figure 5**)<sup>14</sup>. Ces cellules se différencient en chondrocytes, qui prolifèrent et produisent une MEC composée, entre autre, de collagène de type 2 (Col2). A la périphérie, au sein du périchondrium, se trouvent des ostéochondroprogéniteurs dont une partie sert de réserve chondrocytaire, tandis que les autres deviendront les ostéoblastes.

Les chondrocytes situés au centre de l'os, au niveau de la diaphyse, arrêtent de proliférer, et s'hypertrophient. Les chondrocytes hypertrophiques produisent une MEC, composée principalement de collagène de type 10 (Col10). Ils entrent ensuite en mort cellulaire, une des hypothèses émises est une mort par apoptose. Les chondrocytes hypertrophiques et prolifératifs forment la plaque de croissance (ou cartilage de croissance) aux extrémités épiphysaires du futur os. L'activité des chondrocytes dans cette plaque de croissance participe à l'allongement en longueur de l'os.

Le vide laissé après la mort cellulaire des chondrocytes permet l'invasion des vaisseaux sanguins qui est induite notamment par le facteur de croissance endothélial vasculaire (« Vascular endothelial growth factor » (VEGF)). Cette vascularisation permet aux ostéoclastes et aux ostéoblastes d'envahir les cavités. Les ostéoclastes dérivent des cellules hématopoïétiques et participent à la dégradation de la MEC et des débris cellulaires, tandis que les ostéoblastes interviennent dans la minéralisation du tissu. Ainsi l'action combinée des ostéoclastes et des ostéoblastes permet la formation du centre d'ossification primaire (POC). Des métalloprotéases

matricielles comme « Matrix Metalloproteinase 13 » (MMP-13 ou aussi collagénase 3), exprimée par les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes, et MMP-9, exprimée par les ostéoclastes, participent à la dégradation de la MEC.

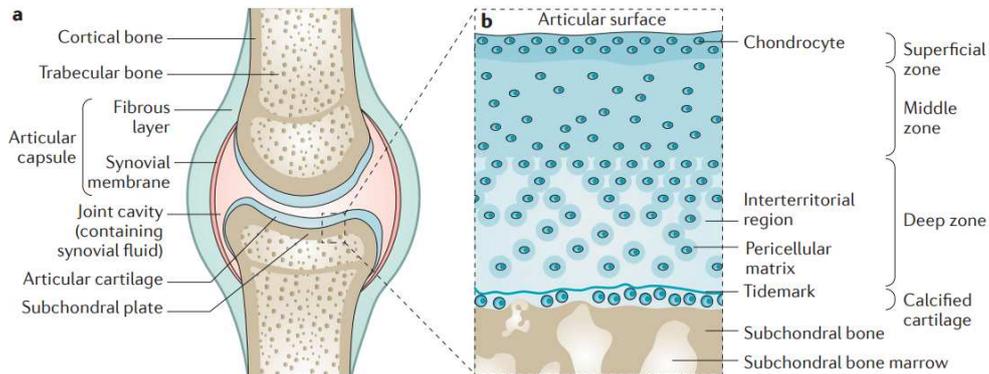


**Figure 5 : Ossification endochondrale.** (A) Au début de la formation de l'os, les cellules mésenchymateuses se condensent (B) avant de se différencier en chondrocytes et de former le modèle cartilagineux hyalin du futur os long. Les cellules mésenchymateuses situées à la périphérie forment le périchondrium. (C) Les cellules au centre des condensations deviennent hypertrophiques, alors que les cellules localisées à la périphérie subissent directement une différenciation ostéoblastique pour former le périoste. (D) Les cellules hypertrophiques initient la calcification du cartilage. La diaphyse est envahie par les vaisseaux sanguins et les cellules de l'os, aboutissant à la formation du centre primaire d'ossification (POC). Les ostéoclastes remodelent le modèle cartilagineux calcifié, pendant que les ostéoprogéniteurs se développent en ostéoblastes, qui synthétiseront de l'ostéoïde (tissu osseux encore jeune, non minéralisé). (E, F) Au début de la vie post-natale, les extrémités de l'os en développement, les épiphyses, sont envahies par les vaisseaux sanguins, conduisant à la formation du centre d'ossification secondaire (SOC), avec la partie périphérique maintenant un phénotype cartilagineux stable qui deviendra cette surface articulaire hyaline, vue à l'intérieur des articulations. La plaque de croissance épiphysaire persiste entre le POC et le SOC; c'est le site de la croissance longitudinale osseuse avant l'ossification à l'âge adulte<sup>15</sup>.

Une deuxième ossification se fait au centre des épiphyses, le centre d'ossification secondaire (SOC), qui débute comme pour le POC, par l'invasion des vaisseaux sanguins qui proviennent du périchondrium. Cette vascularisation entraîne l'arrivée des ostéoclastes et des ostéoblastes, permettant la dégradation de la matrice cartilagineuse, la formation de tissu osseux et sa minéralisation.

A la fin de l'adolescence, les cartilages de croissance cessent d'être actifs. Épiphyses et diaphyses fusionnent alors, rendant impossible l'allongement ultérieur des os. La croissance des os

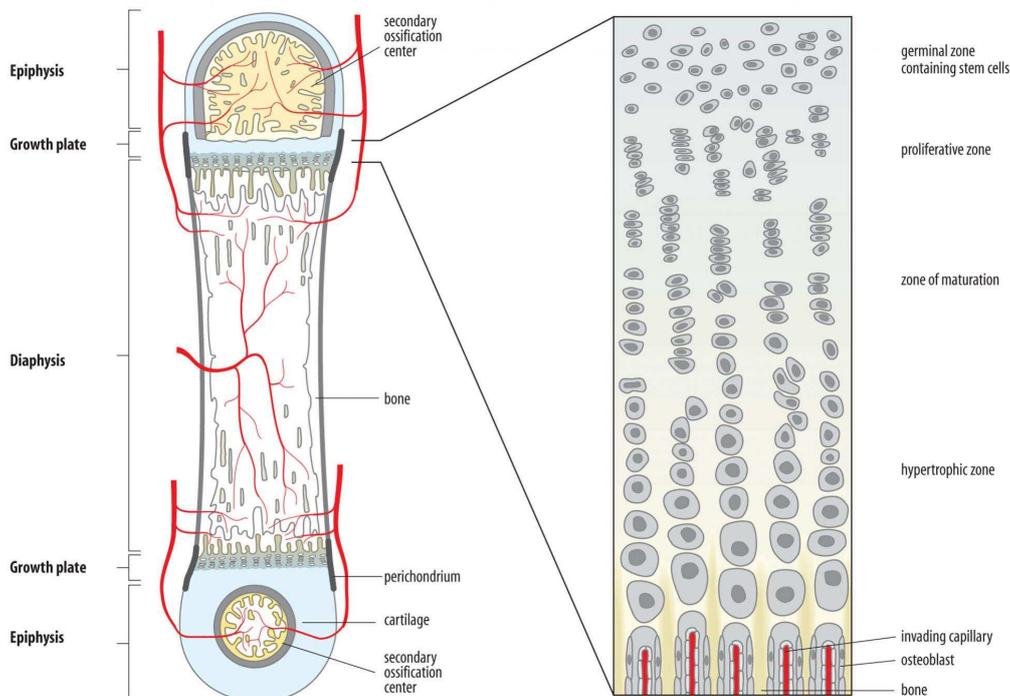
longs est alors achevée. Seul subsiste une zone de cartilage au niveau des articulations, appelé cartilage articulaire (**Figure 6**)<sup>16</sup>.



**Figure 6 : Articulation diarthroïdale (ou mobile).** (a) Schéma d'une articulation entre deux os adjacents qui sont recouverts par une couche de cartilage articulaire et qui sont enfermés dans une capsule de tissu conjonctif dont la couche interne, la membrane synoviale, consiste en une fine couche cellulaire composée de macrophages et de fibroblastes. (b) Coupe du cartilage articulaire montrant les différents couches<sup>16</sup>.

## 2.2. Organisation de la plaque de croissance

La plaque de croissance est une structure très bien organisée, située aux épiphyses des os longs. Elle est composée de 3 zones principales : la zone germinale (ou zone de repos), la zone proliférative et la zone hypertrophique (**Figure 7**).



**Figure 7 : Plaque de croissance d'un os long** (David E. Attarian and Andre C. Grant, 2013, by Duke Medicine, in Health)

**La zone de repos** (ou germinale) : Les chondrocytes de la zone de repos sont dispersés dans la matrice extracellulaire. Abad V. *et al* ont démontré que cette zone avait plusieurs rôles dans la plaque de croissance<sup>17</sup>. En premier, ce lieu sert de zone de stockage pour les cellules souches capables de générer des nouveaux clones de chondrocytes de la zone proliférative. De plus, leurs résultats suggèrent que cette zone pourrait également produire des facteurs qui réguleraient la différenciation hypertrophique. Ces facteurs inhiberaient l'hypertrophie des chondrocytes de la zone proliférative, les chondrocytes prolifératifs étant les plus proches de la zone germinale seraient exposés à un niveau plus élevé ce qui empêcherait l'hypertrophie alors que les chondrocytes plus éloignés et soumis à un niveau moins élevé de ces inhibiteurs pourraient s'hypertrophier.

**La zone proliférative** : Les chondrocytes de la zone proliférative s'organisent en colonne longitudinale. Il y a une très forte activité mitotique. Les chondrocytes prolifératifs vont exprimer les facteurs de transcription Sox5, Sox6 et Sox9, ainsi que les protéines structurales, Collagène de type 2 (Col2) et l'aggrécane<sup>18</sup>.

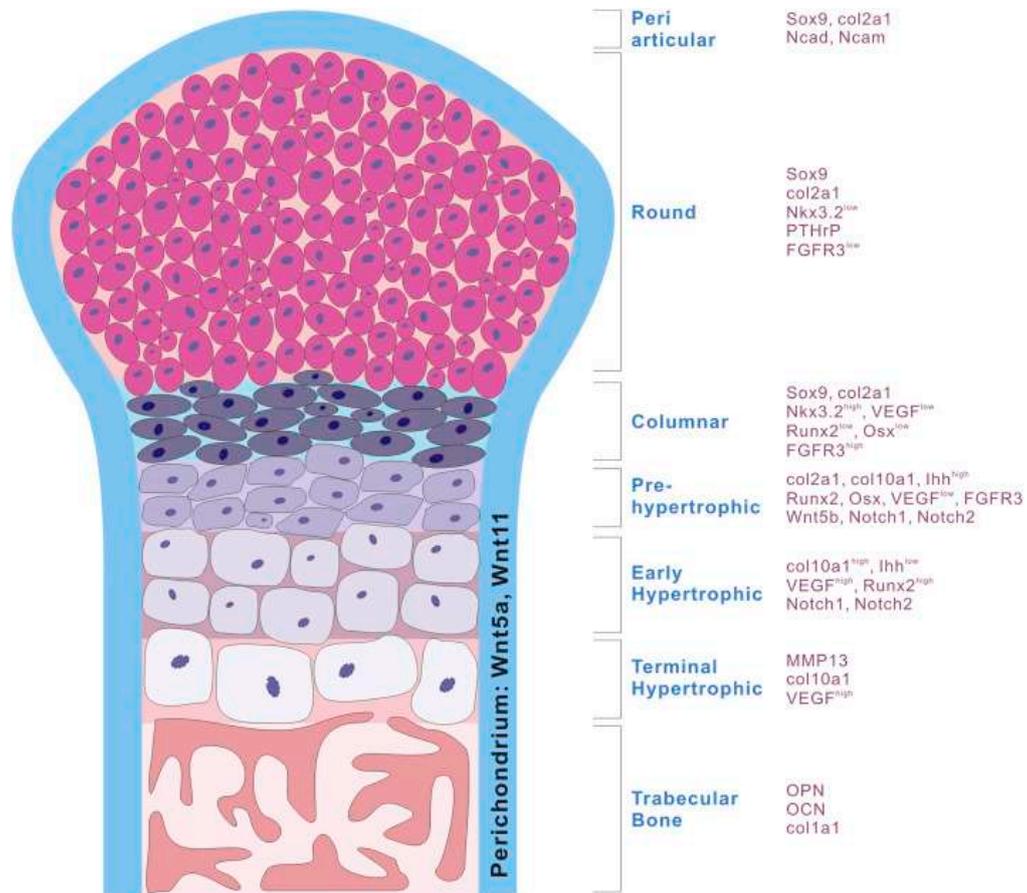
**La zone hypertrophique** : Dans cette zone, les chondrocytes perdent leur activité proliférative. Ces chondrocytes sont organisés en colonne, parallèlement à l'axe de l'os. Les chondrocytes vont s'hypertrophier. Cette zone est strictement avasculaire. Les chondrocytes libèrent des enzymes et du calcium qui préparent la MEC à sa minéralisation.

**La zone d'ossification** : Dans cette zone, les chondrocytes entrent en apoptose, créant un espace vide. Les vaisseaux métaphysaires vont venir envahir cette zone, ce qui permet l'afflux de cellules progénitrices osseuses (futurs ostéoblastes) qui vont venir déposer de la matrice osseuse, riche en collagène de type 1 (Col1). Cependant, l'origine des précurseurs d'ostéoblastes est contestée : ils proviennent soit du périchondrium, soit ce sont des chondrocytes hypertrophiques qui se transdifférencient en ostéoblastes<sup>19,20</sup>. Les ostéoblastes travaillent ensemble avec les ostéoclastes pour réorganiser la MEC de la plaque de croissance pour former l'os trabéculaire<sup>21</sup>. Malgré l'arrêt de la croissance à la fin de l'adolescence, le tissu osseux est en constant renouvellement au cours de la vie. Ce remodelage permanent, dans lequel s'intriquent la résorption et la formation de tissu osseux, s'effectue grâce à l'association de l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes.

### 2.3. Régulation de la plaque de croissance

Plusieurs molécules et voies de signalisation contrôlent la formation, la croissance et la maturation des structures squelettiques du début du développement jusqu'à l'âge adulte, comme

démonstré par la variabilité des maladies squelettiques qui apparaissent chez l'humain dues à leur dérégulation (**Figure 8**).



**Figure 8 : Expression des gènes impliqués dans la chondrogenèse.** Les principaux marqueurs de la chondrogenèse sont listés selon les différentes zones de la plaque de croissance<sup>22</sup>.

### 2.3.1. Sox9

**Sox9 (Sex determining region Y-related high-mobility group box 9)** est un facteur-clé à la fois pour le développement sexuel mais aussi pour le développement squelettique<sup>23</sup>. Les cellules mésenchymateuses condensées expriment le facteur de transcription Sox9, qui est un régulateur-clé pour la chondrogenèse, et donnent naissance à un début de cartilage, constitué par des chondrocytes immatures exprimant Sox9. Plus généralement, Sox9 est également exprimé dans les chondrocytes prolifératifs mais pas dans les chondrocytes hypertrophiques<sup>24</sup>.

De nombreuses molécules s'associent à Sox9 dans le but de réguler différents gènes. Sox5 et Sox6, des co-activateurs de la famille des protéines Sox, régulent les gènes cibles de Sox9, comme l'aggrécane, en formant un complexe avec Sox9 par lien direct ou indirect<sup>25</sup>. Sox9 est nécessaire pour

induire Sox5 et Sox6, comme le montre l'absence d'expression, spécifiquement dans les chondrocytes, de ces deux protéines dans les souris mutées pour Sox9<sup>26</sup>.

Dans les cultures de cellules, Sox9 induit la transcription d'un certain nombre de facteurs de la MEC comme le collagène de type 2, le collagène de type 11, FGFR3, Runx2 et l'aggrécane. Ainsi, Sox9 régule directement le gène COL2A1 en se fixant sur une région amplificatrice spécifique des chondrocytes<sup>27</sup>.

Sox9 réprime aussi la transcription du gène COL10A1, codant le collagène de type 10 (Col10) qui est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques, en se fixant sur une séquence spécifique appelée élément A. Des souris transgéniques exprimant de manière ectopique Sox9 dans les chondrocytes hypertrophiques ont une zone hypertrophique plus grande et une diminution de l'expression du Col10 sans pour autant qu'il y ait une augmentation du Col2<sup>28</sup>.

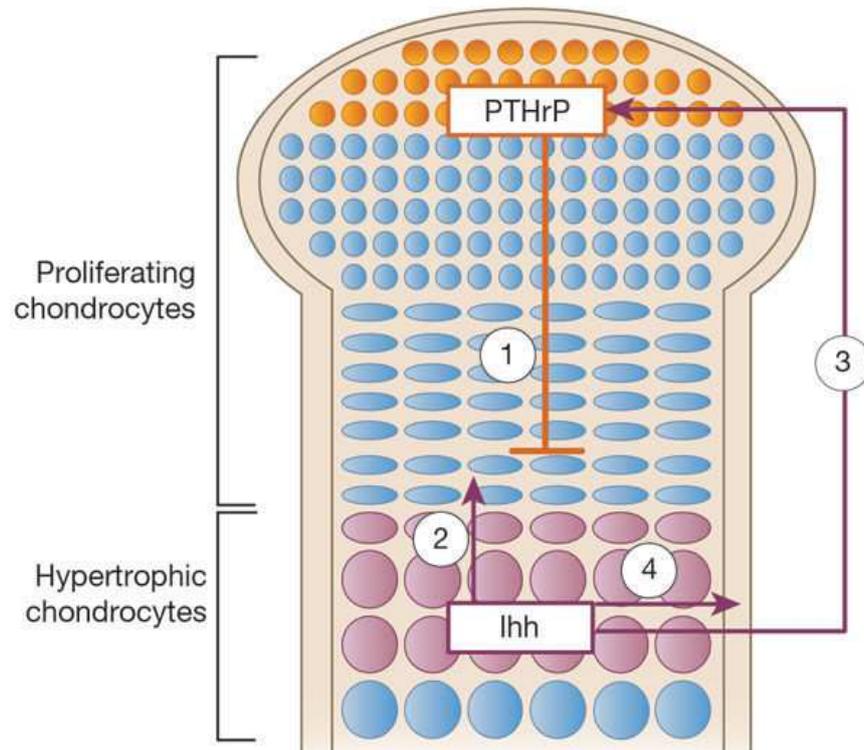
Les mutations dans le gène Sox9 sont responsables de la Dysplasie Campomélique, qui est caractérisée par plusieurs anomalies squelettiques comme des os longs raccourcis et courbés<sup>23</sup>.

### 2.3.2. Ihh/PTHrP

La protéine **Indian Hedgehog (Ihh)** est exprimée dans les chondrocytes durant l'ossification endochondrale. Ihh est synthétisée par les chondrocytes pré-hypertrophiques et également par les premiers chondrocytes hypertrophiques. Le récepteur d'Ihh est Patched-1 (Ptch-1) et leur interaction conduit à l'activation de smoothened (smo), ce qui aboutira à l'expression de différents gènes dont Ptch-1 lui-même<sup>29</sup>. Ihh régule la prolifération des chondrocytes. Les souris Ihh<sup>-/-</sup> ont des os normaux à l'étape de condensation mais développent par la suite un retard statural qui est dû à une sévère diminution de la prolifération<sup>30</sup>. De plus, l'augmentation dans les chondrocytes d'Ihh ou bien l'activation constitutionnelle de smo entraîne une augmentation de la prolifération des chondrocytes<sup>31</sup>. Ihh joue également un rôle dans la différenciation des chondrocytes et des ostéoblastes. Une augmentation du nombre de chondrocytes hypertrophiques a été aussi observée chez les souris Ihh<sup>-/-</sup>, qui est expliquée par l'incapacité du cartilage à synthétiser la parathyroid hormone-related protein (PTHrP).

La « **Parathyroid hormone-related protein** » (PTHrP) est sécrétée durant la vie fœtale par les cellules péri-chondriales aux extrémités de l'os et par les chondrocytes prolifératifs précoces. Les récepteurs PTH/PTHrP sont exprimés faiblement par les chondrocytes prolifératifs et à un plus fort taux dans les chondrocytes pré-hypertrophiques et les hypertrophiques précoces. Un des premiers rôles de PTHrP est de maintenir un stock de chondrocytes prolifératifs. PTHrP et Ihh, à travers une

boucle de rétrocontrôle négative, détermine la longueur des colonnes de chondrocytes prolifératifs<sup>32</sup> (Figure 9).



**Figure 9 : Boucle de régulation PTHrP/Ihh.** PTHrP est sécrétée par les chondrocytes du péri-chondrium et par les chondrocytes de la zone de réserve. PTHrP inhibe la différenciation des chondrocytes (1) et retarde la production d'Ihh (2). Ihh augmente la prolifération des chondrocytes et stimule la production de PTHrP dans la zone de réserve (3). Ihh agit également sur les chondrocytes du péri-chondrium en convertissant ces cellules en ostéoblastes (4).<sup>33</sup>

### 2.3.3. Runx2

Runx2 est un marqueur moléculaire de la lignée des ostéoblastes, exprimé aussi dans les chondrocytes hypertrophiques. Dans l'ossification intramembranaire, l'expression de Runx2 entraîne la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes, en opposition avec Sox9 qui est responsable de la différenciation de ces mêmes cellules en chondrocytes<sup>34</sup>. Runx2 régule la chondrogenèse via Ihh. Ses gènes cibles dans les chondrocytes sont Ihh, Col10a1 et MMP-13. De plus, MMP-13 étant impliquée dans l'ostéoarthrite comme une enzyme dégradant la matrice extracellulaire, Runx2 a été proposé comme cible moléculaire pour traiter la pathologie.

#### 2.3.4. Les facteurs de croissance TGF- $\beta$ et BMP

Les signaux qui dirigent la prolifération, la différenciation, la maturation et l'hypertrophie des chondrocytes sont aussi contrôlés par des facteurs de croissance, dont notamment les facteurs « Transforming Growth Factors (TGF)- $\beta$  » et « Bone Morphogenetic Proteins » (BMP).

**TGF- $\beta$**  : la famille de TGF- $\beta$  est impliquée dans de très nombreux mécanismes biologiques. Le TGF- $\beta$  est sécrété sous forme latente. Le TGF- $\beta$  est un facteur-clé impliqué dans tous les stades des condensations mésenchymateuses, de prolifération des chondrocytes, de déposition de la matrice extracellulaire et de différenciation des chondrocytes. Les chondrocytes produisent du TGF- $\beta$ , sous forme de molécule inactive associée au LTBP et qui est libéré en étant clivé par la plasmine et les MMPs. Le TGF- $\beta$  augmente l'expression de molécules de la matrice comme l'ostéopontine (molécule inhibitrice de la minéralisation dans le tissu osseux), de l'ostéonectine (intervenant également dans la minéralisation), la décorine (un protéoglycane) et les collagènes de types 1/3/6/10<sup>35</sup>. L'activité cellulaire du TGF- $\beta$  étant transduite via la voie des Smads, la régulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ /Smad joue un rôle essentiel dans l'hypertrophie et la maturation des chondrocytes et a aussi un rôle important dans le maintien de l'intégrité du cartilage articulaire<sup>36</sup>. La voie TGF- $\beta$  via Smad2/3 bloque la différenciation terminale alors qu'elle est stimulée par la voie Smad1/5/9<sup>37,38</sup>. Lors de la maturation des chondrocytes, les récepteurs du TGF- $\beta$  « activin-like kinase » (ALK ou encore appelé récepteurs du TGF- $\beta$  de type 1) -1 et -5 agissent en opposition. Le mécanisme d'activation d'ALK-5 par TGF- $\beta$ , initiant ainsi la voie Smad2/3 a été le plus étudié. La voie Smad2/3 est pro-anabolique et réprime la différenciation terminale des chondrocytes<sup>39</sup>. Cependant, il a été montré que TGF- $\beta$  pouvait également activer ALK-1 et, par conséquent activer la voie Smad1/5/9 dans l'ostéoarthrite<sup>40</sup>. Cette activation est corrélée avec l'augmentation de MMP-13. La régulation du TGF- $\beta$  de la différenciation terminale est contexte-dépendant et est modulée par des signaux comme l'inflammation ou l'âge, impactant ainsi le cartilage et le phénotype des chondrocytes.

**BMPs** : Les BMPs font partie d'un sous-groupe de la superfamille TGF- $\beta$  ayant des rôles critiques dans la formation de l'os et du cartilage. Ils agissent aussi bien sur les ostéoblastes que sur les chondrocytes.

- BMP-2 à -7 sont exprimés par les chondrocytes de la zone hypertrophique et de la zone calcifiée de la plaque de croissance et par les chondrocytes situés au milieu du cartilage articulaire.
- BMP-2, -4 et -7 sont trouvés dans le périchondrium.

Les BMPs activent les récepteurs BMP de type 1 et ainsi Smad1/5/9 qui favoriseront la différenciation des chondrocytes. La voie des BMPs étant impliquée dans de nombreux stades de

l'ossification endochondrale, son dérèglement entraîne des perturbations dans la formation du cartilage. La voie des BMP démarre la différenciation des chondrocytes, mais il a été démontré que dans des stades plus tardifs, cette même voie induit la prolifération et Smad1/5/9 est requis pour l'hypertrophie des chondrocytes<sup>41</sup>. Les BMPs interagissent avec de nombreux facteurs de transcription qui détermine le destin de la cellule. Ainsi il a été démontré que BMP-2 induit l'expression de Sox9, et par conséquent augmente l'expression du Col2 et donc favorise la formation du cartilage<sup>42</sup>. BMP2 est d'ailleurs largement utilisé en chirurgie orthopédique pour favoriser la reformation du cartilage. Les BMPs augmentent également l'expression d'Ihh, qui en retour régule négativement BMP, et ainsi retarde la différenciation terminale des chondrocytes<sup>41</sup>.

### 2.3.5. Les facteurs FGF

Les **Fibroblast growth factors (FGF)** et leurs voies de signalisation impliquant les protéines FGF sont importantes pour le développement de la plaque de croissance. La famille FGF comprend 18 protéines sécrétées qui fixent et activent 4 récepteurs tyrosine kinase, les récepteurs FGF (FGFRs). FGFR1, FGFR2 et FGFR3 produisent différents variants, grâce à un épissage alternatif, qui ont des spécificités de fixation aux ligands distinctes et qui sont exprimés différemment selon les tissus<sup>43</sup>. L'activité biologique des FGFs canoniques est augmentée par le sulfate d'héparane (HS) et par d'autres polysaccharides sulfatés<sup>44,45</sup>. La fixation des FGFs aux FGFRs induit la dimérisation et la juxtaposition des domaines tyrosine kinase, entraînant la trans-phosphorylation de résidus tyrosines. FGF18 et FGF9 sont les deux ligands de FGFR3, et FGF18 est exprimé par les cellules du péri-chondrium<sup>43</sup>.

Les FGFs peuvent activer plusieurs voies de signalisation MAPKs différentes comme ERK1/2, JNK et p38. Fgfs, Fgfrs et leur co-récepteurs, HS, sont exprimés à des temps et des localisations bien précis durant le développement du squelette chez la souris. FGFR3 est exprimé dans les chondrocytes non-hypertrophiques alors que FGFR1 est exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques<sup>46</sup>. L'activation constitutive de la voie FGF, due à des mutations dans le gène FGFR3, conduit à des défauts dans la prolifération des chondrocytes et à un retard statural, caractéristique de l'achondrodysplasie et la dysplasie thanatophore. A l'inverse l'inactivation de *FGFR3* favorise la prolifération des chondrocytes et conduit à un allongement des os longs<sup>47</sup>.

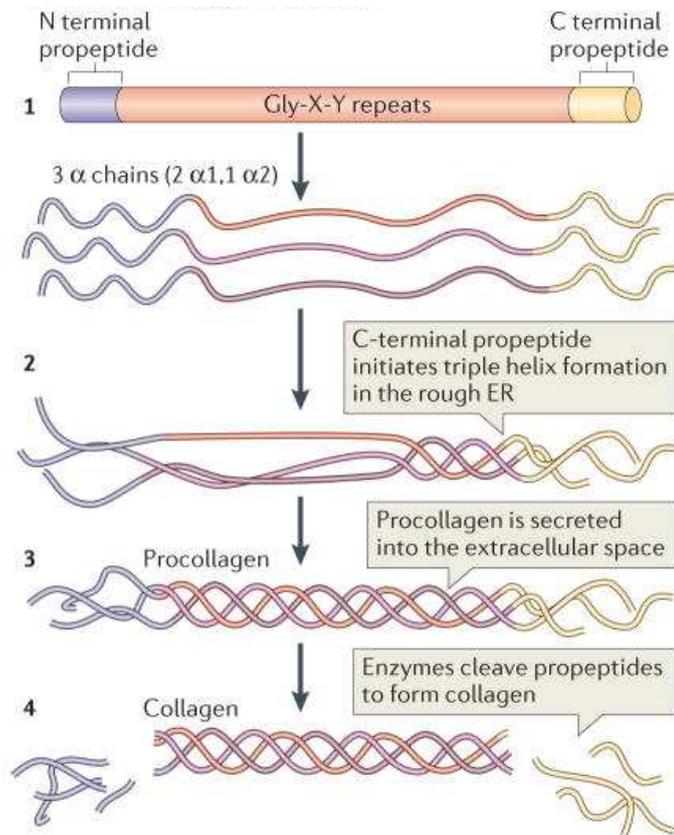
## 3. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) désigne l'ensemble des macromolécules extracellulaires. Elle a un rôle important dans la régulation du développement, de la fonction et de l'homéostasie de toutes les cellules eucaryotes. Ces diverses fonctions sont accomplies à travers une composition et une organisation complexe. La MEC est constituée d'une grande diversité de molécules qui lui confèrent une multitude de rôles au sein des tissus en assurant le maintien et la structure des tissus. Et, plus particulièrement au niveau du cartilage, cette matrice a un rôle-clé dans le mécanisme de l'ossification endochondrale permettant de passer du cartilage à l'os. La MEC a un rôle également dans la communication intercellulaire.

### 3.1. Les collagènes

Les collagènes sont les protéines majeures de la MEC. Aujourd'hui, 28 types différents de collagènes ont été découverts et chaque type est composé d'homo- ou d'hétéro-trimères qui sont formés de 3 chaînes polypeptides appelées chaîne  $\alpha$ . Plus de 40 chaînes  $\alpha$  ont été identifiées chez l'humain. L'assemblage des fibrilles de collagènes après la transcription et la traduction des chaînes  $\alpha$  de procollagènes sont définis par 4 stades distincts (**Figure 10**):

1. les modifications dans le réticulum endoplasmique qui permettent aux chaînes- $\alpha$  de former une triple hélice
2. les modifications dans l'appareil de Golgi du procollagène qui est ensuite transporté dans les vésicules sécrétrices
1. le clivage des propeptides pour permettre l'assemblage quasi spontané des trimères en fibrilles de collagène<sup>48</sup>.
2. enfin l'assemblage des molécules de collagène pour former une structure supramoléculaire de collagène<sup>49</sup>.



**Figure 10 : Assemblage des molécules de collagène. (1)** La molécule de collagène fibrillaire standard est caractérisée par des séquences propeptides amino- et carboxyl- terminal qui entourent une série de séquences répétées Gly-X-Y (X et Y représentent n'importe quel acide aminé mais sont fréquemment des prolines ou des hydroxyprolines). **(2)** Trois chaînes  $\alpha$  sont intracellulairement assemblées en triple hélice, après l'initiation du processus en C-terminal. **(3)** Le procollagène est sécrété par la cellule dans la MEC et **(4)** est converti en collagène après la suppression des N- et C-propeptides via des enzymes métalloprotéases<sup>49</sup>.

Les collagènes sont répartis en différentes familles :

- Les collagènes fibrillaires (Types 1, 2, 3 et 5)
- FACIT (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices)
- Les collagènes formant des réseaux (Type 4)
- Les collagènes formant des réseaux de type hexagonal (Type 10)
- Les collagènes formant des filaments perlés (Type 6)
- Les collagènes formant des fibrilles d'ancrage (Type 7)
- Les collagènes transmembranaires
- Les multiplexines

Dans la MEC de la plaque de croissance, plusieurs collagènes sont retrouvés selon les stades de développement mais aussi selon les différentes zones (les collagènes de types 1, 2 et 10).

Le **collagène de type 1** (Col1) est un hétéro-trimère, le plus retrouvé dans le corps et compose à 90% le tissu osseux. Dans l'os, il est synthétisé par les ostéoblastes et forme des fibrilles avec le collagène de type 5. Par contre, il n'est pas retrouvé dans le cartilage. Les mutations dans le gène COL1A1 entraîne l'ostéogenèse imparfaite, qui est caractérisée par une masse osseuse réduite entraînant une très grande fragilité des os<sup>50</sup>.

Le collagène majeur de la plaque de croissance est le **collagène de type 2** (Col2) qui forme des fibrilles de diamètre épais (40nm) et plus fin (16nm). Col2 est un homo-trimère composé de 3 chaînes  $\alpha 1(2)$  codées par le gène COL2A1. COL2A1 est une cible directe transcriptionnelle de Sox9 et la dysplasie campomélique est associée à une diminution de l'expression du COL2A1<sup>27</sup>. Les mutations dans le gène COL2A1 sont responsables d'environ 10 chondrodysplasies de forme autosomique dominante, de sévérité variable allant de la forme létale (comme l'achondroplasie de type 2) à des formes moins sévères (Syndrome de Stickler). Les souris mutées dans le gène COL2A1 présentent la plupart du temps des anomalies de la plaque de croissance et des chondrodysplasies ainsi que des anomalies de leurs disques intervertébraux qui ne sont pas développés<sup>51,52</sup>.

Le **collagène de type 10** (Col10) est spécifique des chondrocytes hypertrophiques<sup>53</sup>. Col10 est un homo-trimère, relativement petit comparé au Col2, composé de 3 chaînes  $\alpha 1(10)$ . Des sites fixant Runx2 ont été identifiés dans le promoteur du gène COL10A1 chez le poulet, la souris et l'humain<sup>54</sup>. Il a été démontré que Runx2 active le promoteur *Col10a1* dans des cellules transgéniques de souris. Et également, que l'expression de *Col10a1* diminue dans les souris hétérozygotes mutées pour Runx2, avec une altération de l'hypertrophie des chondrocytes. Ces résultats montrent que Runx2 active directement la transcription de COL10A1 pendant la chondrogenèse. Les mutations hétérozygotes dans le gène COL10A1 sont responsables de la chondrodysplasie métaphysale de type Schmid (CDMS) qui est caractérisée par une petite taille, des membres courts, des défauts au niveau des fémurs et des tibias et une démarche anormale<sup>55</sup>. Une équipe a généré un modèle de souris qui reproduit la mutation humaine responsable de la CDMS et qui présente des caractéristiques de la pathologie comme le raccourcissement des membres et la déformation des os. Chez ces souris, la différenciation des chondrocytes est altérée et la zone hypertrophique est plus large que chez les souris sauvages<sup>56</sup>.

### 3.2. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont composés d'une protéine sur laquelle s'attachent des chaînes polysaccharidiques appelées glycosaminoglycanes (GAGs), qui sont des molécules très hydrophiles et qui ont tendance à adopter une configuration déployée du fait de leur grande inflexibilité. Ainsi, les protéoglycanes fixent les molécules d'eau pour fournir l'hydratation de la matrice, occupant ainsi une grande partie du volume de la MEC et permettant une diffusion efficace des molécules hydrophiles. Les propriétés des GAGs vont aussi conférer une résistance compressive à la matrice. Les protéoglycanes sont trouvés en abondance dans la MEC neurale et du cartilage.

Les GAGs sont répartis en 4 grands groupes, se différenciant par la nature, la structure et la longueur des chaînes polysaccharidiques :

- L'acide hyaluronique : seul GAG existant sous forme libre, non liée à une protéine porteuse
- Les sulfates de chondroïtine et les sulfates de dermatane
- L'héparine et les sulfates d'héparane (HS) : l'héparine est très similaire au HS et est utilisée comme substitut au HS.
- Les sulfates de kératane

Généralement la protéine porteuse du protéoglycane est une glycoprotéine sur laquelle est fixé un nombre varié de chaînes de GAGs. Chez les protéoglycanes, les GAGs peuvent représenter jusqu'à 90% de leur poids, alors que chez les glycoprotéines, il n'excèdera pas plus de 60%. De plus, chez un protéoglycane, au minimum une de ses chaînes de saccharide est un GAG. Les protéoglycanes sont aussi, très souvent, plus volumineux que les glycoprotéines.

Après synthèse de la protéine porteuse, celle-ci va subir des modifications dans le réticulum endoplasmique puis l'appareil de Golgi afin de devenir un protéoglycane et être ensuite sécrété. Dans la MEC, les protéoglycanes et les GAGs s'associent pour former des structures complexes. Par exemple, dans le cartilage, les protéoglycanes appelés agrécans, portant des chaînes de chondroïtine sulfaté et des chaînes de kératane sulfaté, vont s'associer avec l'acide hyaluronique par des protéines de liaison.

En plus de leur fonction hydrodynamique dans le tissu, les protéoglycanes jouent un rôle dans la régulation des molécules de la MEC. Ainsi, il est connu que des protéoglycanes composés d'HS, les syndécans, jouent un rôle de co-récepteurs en étant transmembranaires et en fixant les facteurs de croissance FGF, ce qui favorise l'activation de leurs récepteurs FGFR<sup>57</sup>. D'autres protéoglycanes, la décorine, jouent un rôle dans la régulation du TGF- $\beta$  qui se fixe à la protéine porteuse ce qui diminue

son activité<sup>58</sup>. La décorine forme aussi un complexe avec les microfibrilles et la protéine « microfibril-associated glycoprotein-1 » (MAGP-1)<sup>59</sup>.

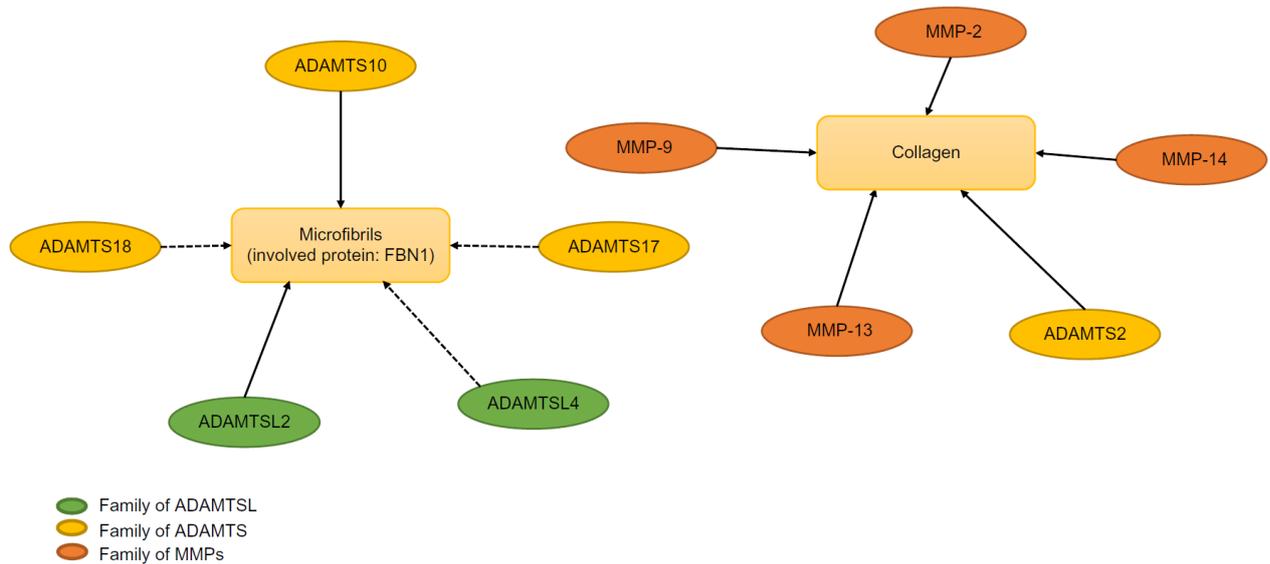
L'HS a aussi été démontré pour interagir avec les fibrillines, régulant ainsi leur assemblage en microfibrilles et la voie de signalisation TGF- $\beta$  via la séquestration de TGF- $\beta$ . Le degré de modification de l'HS régule l'interaction de la protéine avec l'HS. Ainsi FBN1 n'interagit qu'avec l'HS hautement sulfaté<sup>60</sup>. L'HS n'est jamais trouvé sous forme libre mais est toujours associé avec une protéine porteuse donnant ainsi un protéoglycane comme le syndécane ou le glypicane, qui sont localisés à la surface de la cellule, ou le perlécane, localisé dans la matrice.

FBN1 possède 7 régions fixant spécifiquement l'héparine/ HS et pas d'autres GAGs<sup>60</sup>. Il a ainsi été démontré que la moitié C-terminale des trois isoformes de fibrillines (-1, -2 et -3) fixent l'héparine/ HS et que l'affinité de cette association est renforcée par la multimérisation des fibrillines en C-terminale. L'ajout d'héparine dans des cultures de fibroblastes a permis de suggérer que l'HS joue un rôle dans l'assemblage du réseau microfibrillaire, en inhibant la formation des fibrilles de FBN1<sup>60,61</sup>. Plus précisément les syndécanes joueraient un rôle dans l'assemblage des fibrillines par adhésions focales<sup>62</sup>. Cependant, les fonctions de tous les sites de fixation de l'héparine/ HS de FBN1 n'ont pas toutes été déterminées.

### 3.3. Les enzymes protéolytiques de la matrice

La protéolyse des composants structuraux de la MEC et des molécules de signalisation cellulaire telles que les cytokines, les facteurs de croissance, les « binding proteins », les récepteurs et les molécules d'adhésion, a des conséquences biologiques importantes. Les protéases qui clivent de telles molécules jouent un rôle important dans le remodelage des tissus, la morphogenèse, les maladies dégénératives et inflammatoires et le cancer. Les métalloprotéases de la matrice sont les enzymes majeures dégradant l'ECM.

Les métalloprotéases matricielles (MMP) et les ADAMTS (A Disintegrin-like And Metalloproteinase domain with Thrombospondin-type 1 motifs) sont des protéases appartenant à la famille des metzincines. Elles participent au remodelage de la MEC et plusieurs pathologies leur sont associées (**Figure 11**).



**Figure 11 : Réseau entre les collagènes/les fibrillines et les métalloprotéases.** Les flèches hachurées montrent le lien potentiel entre les fibrillines et les ADAMTS/ADAMTSL<sup>63</sup>.

### 3.3.1. Les MMPs

Les MMPs sont toutes composées d'un domaine catalytique et d'un pro-domaine auto-inhibiteur qui maintient la protéine sous forme latente. L'activation de la protéine se fait par la suppression de ce pro-domaine. Leur C-terminal contient également un domaine hémapexine permettant l'interaction protéine-protéine. Ce domaine a un rôle dans la reconnaissance du substrat, l'activation enzymatique, la localisation, l'internalisation et la dégradation. MMP-2 et MMP-9 contiennent également trois domaines répétitifs fibronectine de type 2, qui permettent la liaison à la gélatine<sup>64</sup>. Six MMPs ne sont pas sécrétées mais sont transmembranaires. Les MMPs sont divisées en 6 sous-groupes selon leurs similarités de structure tridimensionnelle et leur affinité aux substrats : collagénases, matrilysines, stromélysines, gélatinases, métalloprotéases de type membranaire et un dernier groupe hétérogène.

La première fonction des MMPs est de dégrader les composants structuraux de la MEC. Les MMPs ont également un rôle majeur dans la régulation et le renouvellement de la MEC. Les MMPs peuvent avoir un impact sur la fonction cellulaire en régulant les protéines de la MEC. Par exemple, MMP-2 et MMP-9 sont connues pour activer le TGF- $\beta$  en le clivant, et par conséquent, favorisent l'invasion tumorale. L'analyse des souris mutantes a montré l'importance des MMPs dans le développement post-natal et le renouvellement des tissus. Certaines MMPs sont particulièrement impliquées dans le développement de l'os. Les maladies génétiques dans lesquelles ces MMPs ont été impliquées démontrent leur fonction-clé dans la régulation de la MEC.

**MMP-13 et MMP-9** : Les mutations hétérozygotes dans le gène MMP-13 sont impliquées dans la forme autosomique dominante de l'anadysplasie métaphysaire (MANDP1, MIM 602111). L'anadysplasie métaphysaire (MAD) est caractérisée par l'apparition précoce d'une forme régressive de la dysplasie métaphysaire<sup>65,66</sup>. La forme autosomique récessive de MAD est causée par des mutations dans le gène MMP-9 (MANDP2, MIM 613073). MMP-13 et MMP-9 sont impliquées dans la dégradation de la MEC qui participe au mécanisme de l'ossification endochondrale.

Les souris mutantes *Mmp-9* knock-out (KO) présentent des défauts dans le développement des os avec une diminution de la mort cellulaire des chondrocytes hypertrophiques et des anomalies dans la formation de l'os trabéculaire. La plaque de croissance de ces souris mutantes présente une accumulation des chondrocytes hypertrophiques associée à une accumulation de la galectine-3, un substrat de MMP-9. La galectine-3 est le régulateur de *Mmp-9*, qui agit sur le recrutement des ostéoblastes, à la jonction entre les chondrocytes et l'os. Le retard de croissance est compensé après 3 semaines et les souris déficientes en MMP-9 ont un squelette axial normal à l'âge adulte. La dérégulation des *Mmp-9* et *Mmp-2* (une autre gélatinase) conduit à une fragmentation sévère des fibres élastiques, ce qui peut expliquer l'anévrisme aortique observé chez la souris mutante *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, qui est un modèle du syndrome de Marfan<sup>67</sup>. MMP-9 est aussi impliqué dans le développement du système immunitaire et potentiellement dans le développement de maladies autoimmunes. Considérant la multitude de fonctions de MMP-9, le phénotype restrictif de la MAD peut être dû au fait de son rôle majeur dans l'homéostasie de l'os.

MMP-13 est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes au niveau de la bordure entre les deux zones, démontrant son rôle majeur dans la formation et le remodelage de l'os. MMP-13 est une collagénase dont les substrats sont les collagènes de types 1 et 2, deux collagènes majeurs respectivement de l'os et du cartilage. Les souris mutantes n'exprimant plus *Mmp-13* apparaissent saines à la naissance mais présentent des défauts de la plaque de croissance. Ces souris montrent une différenciation normale des chondrocytes mais ont une zone hypertrophique plus large comparée aux souris sauvages. Comme chez les souris déficientes en *Mmp-9*, les défauts dans leurs plaques de croissance augmentent après 5 semaines et se résorbent après 12 semaines. Ce modèle a permis de montrer que le Col2 et l'aggrécane sont dégradés par MMP-13. Ces deux substrats sont partagés par MMP-9 et MMP-13. Les souris doubles mutantes *Mmp-13/Mmp-9* montrent une détérioration dans le processus d'ossification enchondrale, des défauts de remodelage de la MEC, une diminution de l'apoptose des chondrocytes, un recrutement vasculaire altéré et une formation de l'os trabéculaire défectueux conduisant au raccourcissement des os longs. Ces résultats ont montré l'importance de la balance entre assemblage et dégradation des collagènes dans l'ossification endochondrale.

Les mutations dans *MMP-13* sont aussi impliquées dans la dysplasie spondyloméphysaire de type Missouri (MIM 602111) qui est caractérisée par des anomalies vertébrales, épiphysales et méphysales. Bien que le phénotype s'améliore à l'adolescence, les patients restent plus petits que leurs frères et sœurs non affectés par la pathologie, au même âge. MMP-13 est aussi impliqué dans l'ostéoarthritis<sup>68</sup>.

**MMP-14** : Les mutations dans le gène MMP-14 sont responsables de la forme autosomique récessive du syndrome de Winchester (WNCHRS, MIM 277950)<sup>69</sup>. Cette pathologie appartient au groupe des syndromes ostéolytiques, qui sont des maladies squelettiques rares caractérisées par une ostéolyse et une destruction des articulations. Les patients présentent une ostéolyse généralisée du carpe et du tarse, une arthropathie, une ostéoporose généralisée, des opacités cornéennes et des anomalies du myocarde. Les mutations dans le gène MMP-14 sont localisées dans la région hydrophobe du peptide signal, entraînant un défaut dans le transport de MMP-14 jusqu'à la membrane. MMP-14 est l'un des activateurs de MMP-2 et la conséquence de cette mauvaise localisation est une incapacité à activer MMP-2<sup>70</sup>.

Les souris *Mmp14* KO présentent une dysplasie squelettique avec une dysmorphie craniofaciale et une petite taille, de l'arthrose, une sévère ostéopénie et des anomalies dans d'autres tissus comme une fibrose de la peau. Les souris sont normales à la naissance mais développent de multiples défauts et meurent à l'âge de 3 à 12 semaines. Ce modèle murin est le seul léthal parmi les souris mutantes MMP. Ce modèle a confirmé l'importance de l'activité collagénique pour le développement et la croissance<sup>71</sup>.

**MMP-2** : Les mutations dans le gène MMP-2 sont responsables de la forme autosomique récessive du syndrome Torg (MIM 259600) qui est caractérisé par la présence de multiples et douloureux nodules sous-cutanés, d'une ostéoporose de sévérité moyenne à modérée et d'une ostéolyse du carpe et du tarse<sup>72</sup>.

Les souris mutantes déficientes pour *mmp-2* montrent des manifestations plus atténuées que les anomalies squelettiques humaines<sup>73</sup>. A l'opposé, les souris double KO *mmp2-mmp14* meurent à la naissance<sup>74</sup>.

### 3.3.2. Les ADAMTSs

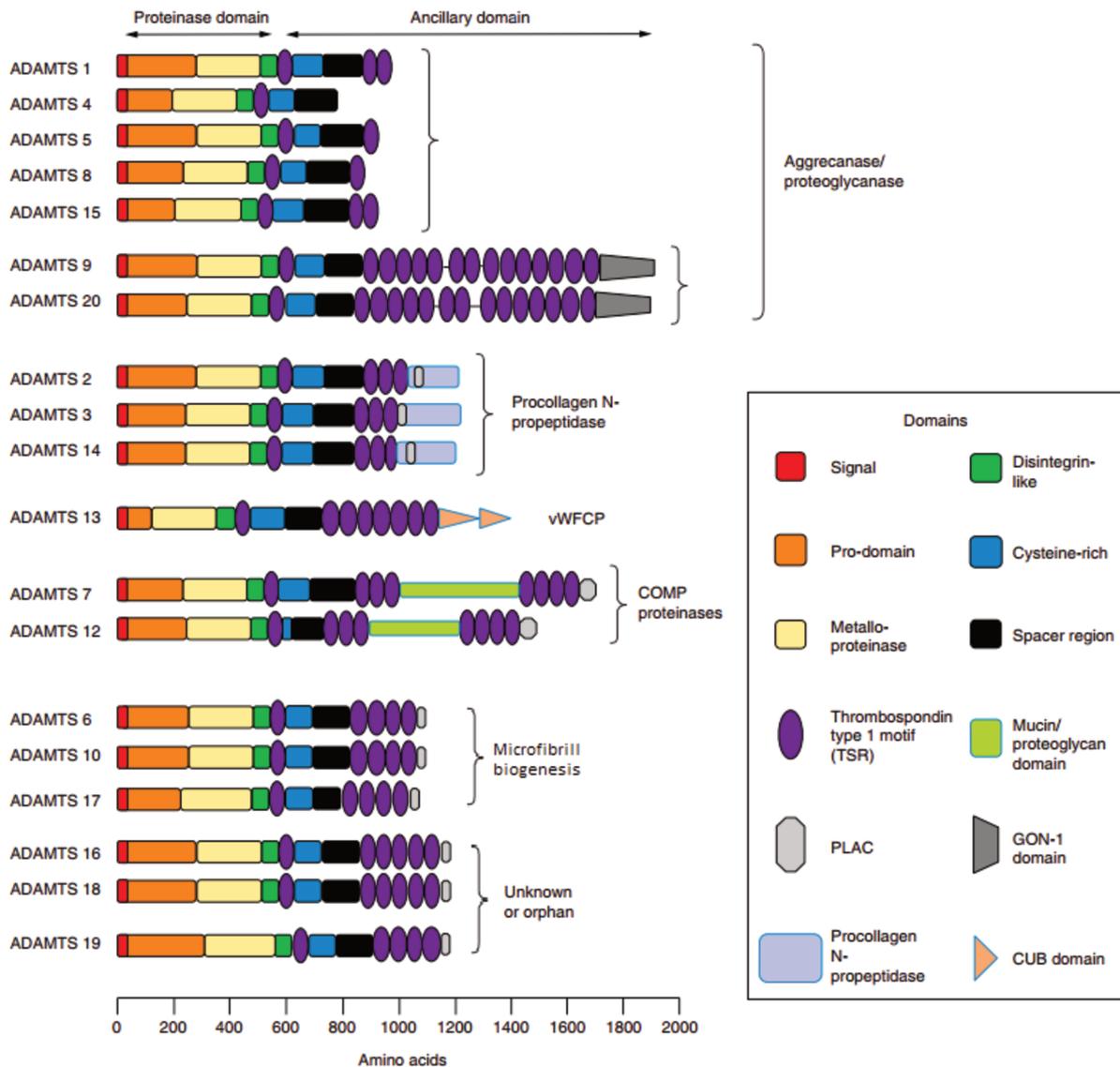
Parmi ces enzymes impliquées dans le remodelage de la MEC, les ADAMTS désignent une famille de 19 enzymes sécrétées, distinctes des ADAMS (qui sont, elles, ancrées dans la membrane) par la présence d'un ou plusieurs motifs de type thrombospondin (TSR). Les ADAMTS possèdent 2 domaines: un domaine catalytique et un domaine ancillaire qui est essentiel pour une interaction spécifique entre l'enzyme et le substrat. La superfamille des ADAMTS comprend également 7 ADAMTS-Like (ADAMTSLs).

#### *1) Caractéristiques et structure des ADAMTSs*

La première ADAMTS a été décrite en 1997<sup>75</sup>. La structure des ADAMTS est séparée en deux régions principales<sup>76</sup>.

- Une région N-terminale contenant le domaine catalytique, qui comprend :
  - un propeptide, préservant la latence enzymatique chez la plupart des membres de la famille des ADAMTS. Les ADAMTS sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs et le clivage, à la surface de la cellule, du propeptide par une furine, une enzyme de la famille des « convertases », induit leur activation.
  - un domaine métalloprotéase (le site catalytique) composé d'une séquence (HEXXHXXGXXH) partagée par les membres de la famille ADAMTS. Les ADAMTSs ont un mécanisme catalytique similaire aux MMPs et aux ADAMs employant un ion  $Zn^{++}$  qui interagit avec trois résidus histidine et dont l'interaction est facilitée par le résidu glycine. Un autre résidu conservé, la méthionine, situé entre 14 et 20 acides aminés après la première histidine du site de liaison au zinc, permet la conformation correcte du site actif<sup>77</sup>
  - un domaine désintégrine qui bien que similaire à celui des ADAM, ne contient pas de séquence arginine/glycine/acide aspartique (RGD) permettant la reconnaissance avec les intégrines. Aucune étude n'a montré, à ce jour, une interaction d'ADAMTS avec les intégrines.
  
- Une région C-terminale contenant le domaine ancillaire, qui comprend :
  - un ou plusieurs répétitions de thrombospondine de type 1 (TSR1). Les TSR1 sont situés après le domaine désintégrine et également, excepté ADAMTS4, proche de l'extrémité C-terminale. Ces domaines sont spécifiques de chaque ADAMTS et pourraient avoir un rôle dans leur fonction propre.

- un domaine riche en cystéine. ADAMTS-2 et -13 contiennent dans ce domaine une séquence RGD qui pourrait potentiellement interagir avec les intégrines<sup>78,79</sup>.
- un domaine spacer dont la fonction n'est pas vraiment défini.
- des domaines additionnels (comme Gon-1, PLAC, CUB, etc) qui sont corrélés à la répartition des ADAMTS selon leur rôle (**Figure 12**).



**Figure 12 : La famille ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs) family.** L'organisation basique des domaines des 19 membres de la famille ADAMTS et leurs groupes fonctionnels majoritaires. Structuellement les ADAMTS sont, de manière générale, organisées en un domaine protéase et un domaine ancillaire. Le domaine protéase comprend le peptide signal, le pro-domaine, le domaine métalloprotéase et domaine désintégrine. La plus grande variabilité entre les ADAMTS est trouvée dans le domaine ancillaire, qui est composé d'une ou plusieurs séquences répétées thrombospondine de type 1 (TSR), d'un domaine riche en cystéine et d'un domaine spacer. Quelques membres ont aussi des domaines spécialisés qui les répartit en sous-groupes<sup>80</sup>.

## 2) Rôles des ADAMTSs

Bien que de nombreuses fonctions des ADAMTS restent encore à être étudiées, il a été démontré que les ADAMTS sont impliquées dans divers processus biologiques (normaux ou pathologiques) chez l'homme tels que l'organisation du tissu conjonctif, l'angiogenèse, la coagulation, l'inflammation ou la migration cellulaire. Elles ont été regroupées par fonction biologique :

- **Les aggrecanases** : Les ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15 et -20 ont la capacité de cliver plusieurs protéoglycanes comme certaines hyalécanes (aggrecane, versicane et brevicane), les syndécanes et la décorine. ADAMTS-1 a des propriétés anti-angiogéniques, liées à la présence de ses domaines TSR et aussi à son activité catalytique sur de nombreux substrats impliqués dans la fonction vasculaire. Il a été démontré qu'ADAMTS-1 était impliquée dans l'accumulation du versicane dans les valves mitrales myxomateuses chez l'homme, via la voie de signalisation du TGF- $\beta$ <sup>81</sup>. Un modèle murin déficient en Adamts-1 existe et une très haute mortalité, un retard de croissance, des anomalies uro-génitales et une infertilité des femelles ont été observés pour ce modèle<sup>82</sup>. ADAMTS-1 est un médiateur du clivage protéolytique des protéoglycanes, des aggrecanes et du versicane et utilise la fibuline 1 comme cofacteur.

Les ADAMTS-9 et -20 possèdent un domaine Gon-1, Gon-1 étant une ADAMTS de *C. elegans* impliquée dans le développement des gonades<sup>83</sup>. ADAMTS-9 agit aussi comme une aggrecanase et une versicanase. ADAMTS-20 est impliquée dans le renouvellement du versicane durant l'embryogenèse et assure la survie et la prolifération des mélanoblastes dans le mésenchyme dermal<sup>84</sup>.

ADAMTS-5 est supposée être l'aggrecanase majeure impliquée dans l'ostéoarthrite ainsi qu'ADAMTS-4<sup>85</sup>.

ADAMTS-1 et ADAMTS-8 ont également une activité angiostatique. En effet, ADAMTS-1 a été impliquée dans l'inhibition de l'angiogenèse par sa capacité à séquestrer le VEGF<sup>86</sup>.

- **La maturation du collagène** : ADAMTS-2, -3 et -14 ont toutes un domaine propeptidase du N-terminal du procollagène (PNP) et permettent le clivage de l'amino-peptide des procollagènes I, II et III. De plus, il a été démontré qu'ADAMTS3 participait à l'activation protéolytique du facteur pro-angiogénique et pro-lymphangiogénique VEGF-C via son attachement à un potentiel cofacteur CCBE1 (collagen-and calcium-binding epidermal growth factor domains 1)<sup>87</sup>. Une étude a également révélé une nouvelle fonction des pNPs liée à leur potentielle implication dans la voie de signalisation TGF- $\beta$ . Plus particulièrement, ADAMTS2 clive le récepteur  $\beta$ -glycane (ou récepteur TGF- $\beta$  type 3 (T $\beta$ R3)) et ADAMTS3 clive

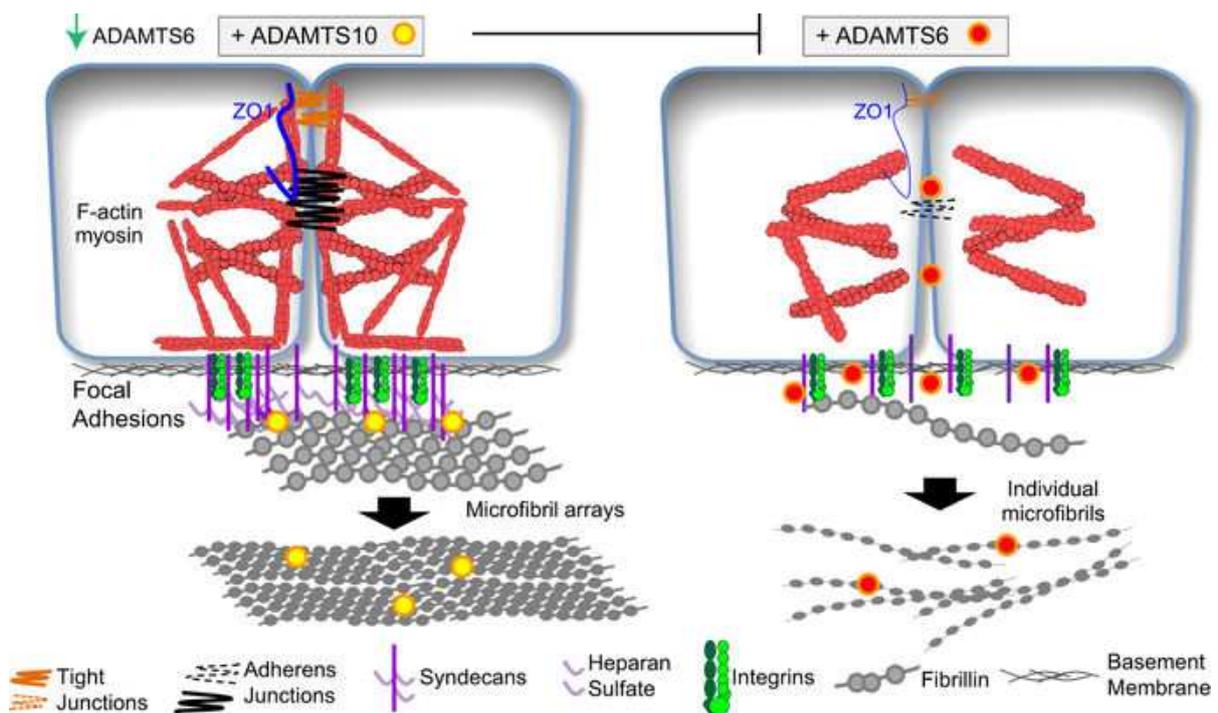
LTBP1<sup>88</sup>. L'implication d'ADAMTS2 dans le contrôle de l'activité de TGF- $\beta$  a été vérifiée dans des fibroblastes humains. ADAMTS-3 a également un rôle dans le clivage d'une protéine, la reeline et ainsi l'inactive dans le cortex cérébral et l'hippocampe<sup>89</sup>. Ces différentes études suggèrent que ces pNPs sont certainement impliquées dans de nombreux processus biologiques différents.

- **La protéolyse du facteur von Willebrand (FvW):** ADAMTS-13 possède un domaine CUB et régule l'homéostasie de la coagulation sanguine, en clivant les polymères de FvW, réduisant ainsi leur taille<sup>90</sup>.
- **La protéolyse du facteur COMP :** ADAMTS-7 et -12 possèdent un domaine protéase, ainsi qu'un domaine mucine sur lequel plusieurs chaînes de chondroïtine sulfatée peuvent être fixées, leur conférant un statut de protéoglycane<sup>91</sup>. Il a été montré qu'ADAMTS-7 et ADAMTS-12 jouent un rôle dans le développement du cartilage en clivant la protéine « Cartilage Oligomeric Matrix Protein » (COMP) dans le cartilage<sup>92,93</sup>. Une augmentation significative d'ADAMTS-7 dans le cartilage ainsi que dans la synoviale des patients atteints d'arthrite rhumatoïde a été observée par Liu et al<sup>94</sup>. ADAMTS-7 s'attache directement et dégrade COMP. L'ARNm d'ADAMTS-12 est surexprimé dans le cartilage de patients atteints d'arthrite et dans la synoviale. De plus, il a été récemment montré qu'ADAMTS-12 est une enzyme qui interagit avec COMP et le dégrade, suggérant un rôle important dans l'initiation et la progression de l'arthrite. ADAMTS-7 a également un rôle dans le maintien de l'homéostasie vasculaire via son rôle sur le COMP<sup>95</sup>.
- **L'implication dans la biogenèse des microfibrilles (Adamts-6, -10 et -17):** l'expression d'ADAMTS-10 est ubiquitaire dans des tissus embryonnaires de souris jusqu'au stade E12.5 puis l'expression devient plus spécifique dans les tissus en développement des poumons, des os longs et craniofaciaux<sup>91</sup>. Des études génétiques ont montré qu'ADAMTS-10 interagit avec FBN1 et FBN2 et favorise la formation des microfibrilles dans la MEC des cultures de fibroblastes<sup>96</sup>. Mais, il a aussi été démontré qu'ADAMTS-10 ne clive pas efficacement FBN1, probablement à cause de l'absence du site consensus de clivage de la furine dans le zymogène ADAMTS-10. Cependant, ADAMTS-10 reste un acteur essentiel dans la biogenèse des microfibrilles en tant que protéine structurelle plutôt qu'enzyme<sup>97</sup>.

Des études ont montré que si ADAMTS-10 supporte la déposition des microfibrilles, à l'inverse ADAMTS-6, une ADAMTS homologue à ADAMTS-10, inhibe cette déposition en réduisant l'HS à la surface des cellules (possiblement en dégradant le syndécan-4) et en bloquant les adhésions focales. L'augmentation d'ADAMTS-6 entraîne une augmentation de l'expression d'ADAMTS-10. A l'inverse une augmentation d'ADAMTS-10 aboutit à une

diminution de l'expression d'ADAMTS-6 suggérant qu'ADAMTS-10 régule négativement ADAMTS-6<sup>98</sup> (Figure 13).

Le rôle d'ADAMTS-17 est inconnu mais des études ont montré que son expression était très importante dans le fœtus au niveau du cerveau, du cœur, des reins et des yeux. ADAMTS-10 et ADAMTS-17 ont des structures similaires et sont toutes les deux exprimées dans des pathologies aux caractéristiques presque similaires suggérant qu'ADAMTS-17 a également un rôle dans la biogenèse du réseau microfibrillaire. Tous ces exemples soulignent la variété des fonctions de chaque ADAMTS. Plus les études avancent et plus de nouveaux substrats et fonctions sont découverts.



**Figure 13 : Modèle de la régulation par ADAMTS-6 et ADAMTS-10 des cellules et des adhésions focales et altèrent la déposition du réseau microfibrillaire de fibrillines dans les cellules épithéliales rétiniennes.** En présence d'ADAMTS-10, qui diminue l'expression d'ADAMTS-6, les cellules peuvent former des jonctions serrées et adhérentes et des adhésions focales qui, ensemble, supportent la formation d'un réseau microfibrillaire ordonné en favorisant la multimérisation de la fibrilline-1 et l'organisation des microfibrilles en paquet. Quand l'expression d'ADAMTS-10 est diminuée, et que par conséquent ADAMTS-6 est augmenté, les jonctions cellule-cellule sont perdues et la quantité de sulfate d'héparane à la surface des cellules est réduite. Ainsi, la multimérisation de la fibrilline-1 et la formation des microfibrilles sont réduites et désorganisées<sup>99</sup>.

### 3) Implication des ADAMTS dans des pathologies

Plusieurs ADAMTS sont impliqués dans des pathologies, très souvent liées à un défaut de la MEC (**Tableau 1**).

Ainsi des mutations dans le gène **ADAMTS2** sont responsables du syndrome d'Ehlers-Danlos de type VIIC (EDS Type VIIC, MIM 225410) transmise sur un mode autosomique récessif qui fait partie du groupe des EDS<sup>100</sup>. Ce syndrome est une maladie du tissu conjonctif caractérisée par une fragilité extrême de la peau mais dont la fragilité des articulations est modérée comparé aux autres EDS. Les autres caractéristiques sont des anomalies orofaciales, une hernie ombilicale et des sclérotiques bleutées<sup>101,102</sup>. Les mutations dans le gène **ADAMTS2**, qui est une PNP, entraîne une perte de l'activité d'ADAMTS2, bloquant le processus collagénogénèse. Il y a alors formation de collagènes « hiéroglyphiques », non fonctionnels, qui sont responsables de l'extrême fragilité cutanée<sup>48,100</sup>. Cependant, bien que la voie de synthèse du procollagène soit identique dans un grand nombre de tissus, le fait qu'un nombre limité de tissus soit impliqué dans le syndrome est expliqué par la redondance de fonction des autres PNP<sup>63</sup>. Deux autres enzymes, **ADAMTS-3 et -14**, appartiennent au même groupe de procollagène N-endopeptidases et sont impliquées dans la maturation de la triple hélice de collagène<sup>103,104</sup>. Une souris déficiente en **ADAMTS-2** a été générée et présente une fragilité de la peau à deux semaines<sup>105</sup>.

Déjà décrit dans la partie sur les dysplasies acroméliques, les mutations dans le gène **ADAMTS-10** sont responsables de la forme autosomique récessive du SWM<sup>8</sup>.

Les mutations inactivant le gène **ADAMTS-13** sont responsables de purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), une maladie de coagulation causée par une déficience du clivage du facteur de von Willebrand (FvW)<sup>90</sup>. Ce syndrome est caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique et peut-être accompagnée de dysfonctionnements neurologiques, d'insuffisance rénale et de fièvre. Cette pathologie touche très souvent les jeunes adultes, plutôt les femmes, et si elle reste non traitée, la mortalité peut excéder 90%. ADAMTS-13 possède des domaines CUB, qui ne sont retrouvés chez aucune autre ADAMTS, mais qui sont caractéristiques d'une autre famille, incluant la procollagène C-protéase (PCP). Les domaines CUB de cette protéase fixe le procollagène, permettant ainsi la reconnaissance du substrat<sup>106</sup>. De plus, le processus requiert un co-facteur, l'« enhancer » PCP, ayant deux domaines CUB et fixant également le procollagène<sup>107</sup>. Ces exemples suggèrent que les domaines CUB d'ADAMTS-13 pourraient interagir avec les ligands. **ADAMTS-13** subit un épissage alternatif et 7 variants ont été à ce jour identifiés. La fonctionnalité de chacun de ces variants n'est pas connue. L'épissage alternatif pourrait produire différentes protéines avec différentes capacités à interagir avec les co-facteurs, la MEC et le FvW. ADAMTS-13 coupe FvW à un

endroit bien précis, un pont Tyr-Met, et les mutations dans ADAMTS-13 conduisent à une accumulation de FvW de taille anormale. Cependant, le rôle exact d'ADAMTS-13 dans le PTT n'est pas encore complètement compris à ce jour.

**ADAMTS-17** est impliquée dans la forme autosomique récessive du SWM-like qui, comme décrit précédemment, rassemble plusieurs des caractéristiques du SWM sans la brachydactylie, la raideur articulaire ou la peau épaisse. Deux mutations dans *ADAMTS-17* associées au SWM-like aboutissent à des protéines dépourvues de séquence C-terminale, pouvant ainsi avoir un impact dans la structure de la MEC<sup>9</sup>.

Plus récemment, des mutations homozygotes dans le gène **ADAMTS-18** ont été démontrées comme responsables du syndrome de microcornée associé à une dystrophie chorio-rétinienne myopique et telecanthus (MMCAT, MIM 615458)<sup>108</sup>. ADAMTS-18 est exprimée durant le développement embryonnaire murin des yeux mais aussi dans les yeux de souris adulte, principalement dans la rétine et la lentille<sup>109</sup>. Un rôle potentiel d'ADAMTS-18 dans la formation ou la maintenance des microfibrilles reste à établir.

Gene	Expression	Substrats	Pathologies associées
<b>ADAMTS-1</b>	Ovaires, cellules épithéliales bronchiques, poumons fœtaux, placenta, muscles lisse, utérus, cortex surrénal, adipocytes, ganglion ciliaire, prostate, fibroblastes et cellules myoépithéliales du sein	Aggrécane, versicane, syndécane-4, TFPI-2, sémaphorine 3C, nidogène-1, -2, desmocolline-3, dystroglycane, mac-2, gélatine (collagène de type 1 dénaturé), amphirégulin, TGF- $\alpha$ , héparine liant EGF	Cancer (à la fois pro- et anti-tumorigénique/ métastatique), anti-angiogénique
<b>ADAMTS-2</b>	Adipocytes, muscles squelettiques, ganglion cervical supérieur, utérus, placenta, cœur, foie, poumons, langue, muscles lisses, fibroblastes du sein	Procollagènes fibrillaires de type 1-3 et 5	Syndrome d'Ehlers-Danlos de type VIIC
<b>ADAMTS-3</b>	Cellules endothéliales CD105+, cellules CD34+, glande pinéale, cartilage, os, muscles squelettiques, tendon, cellules myoépithéliales du sein	Procollagène fibrillaire de type 2, biglycane	
<b>ADAMTS-4</b>	Ovaires, moelle épinière, cortex surrénal, ganglion ciliaire, ganglion trigéminal, cerveau, rétine, pancréas (ilots), poumons, fœtaux, cellules myoépithéliales du sein	Aggrécane, versicane, reeline, biglycane, brévicanine, matriline-3, $\alpha$ 2-macroglobuline, COMP	Arthrite
<b>ADAMTS-5</b>	Adipocytes, utérus, cellules myoépithéliales du sein	Aggrécane, versicane, reeline, biglycane, matriline-4, $\alpha$ 2-macroglobuline	Arthrite, cancer (anti-tumorigénique, anti-angiogénique)
<b>ADAMTS-6</b>	Ganglion cervical supérieur, ganglion trigéminal, appendice, cœur, cellules épithéliales du cœur	Héparine, syndécane-4 <sup>99</sup>	
<b>ADAMTS-7</b>	Ganglion trigéminal, cortex surrénal, foie, cœur, muscles squelettiques, disques intervertébraux, fibroblastes du sein	COMP	Dissection aortique de type A (TAAD)
<b>ADAMTS-8</b>	Muscles squelettiques, cœur, foie, ganglion cervical supérieur, cortex surrénal, fibroblastes et cellules luminales du sein	Aggrécane	
<b>ADAMTS-9</b>	Ganglion spinal, cellules myoépithéliales du sein	Aggrécane, versicane	Cancer (anti-angiogénique)
<b>ADAMTS-10</b>	Cellules T CD8+, cerveau, utérus, fibroblastes du sein	Héparine, Syndécane-4, Fibrilline-1 <sup>99</sup>	Syndrome de Weill-Marchesani
<b>ADAMTS-12</b>	Foie, moelle osseuse, nœud atrioventriculaire, disques intervertébraux, fibroblastes et cellules myoépithéliales du sein	COMP	Cancer (pro- et anti-tumorigénique)
<b>ADAMTS-13</b>	Foie, érythrocytes CD71+, poumons, thyroïde, cellules myoépithéliales du sein	Facteur de von Willebrand	Purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)
<b>ADAMTS-14</b>	Thalamus, moelle osseuse, thyroïde fœtale, adipocytes, cervelet, os, peau, fibroblastes, cellules luminales et myoépithéliales du sein	Procollaganène fibrillaire de type 1	
<b>ADAMTS-15</b>	Colon, cerveau, cœur, utérus, système musculosquelettique, cellules myoépithéliales du sein	Aggrécane, versicane	Cancer (anti-tumorigénique/ métastatique, anti-angiogénique)
<b>ADAMTS-16</b>	Cellules myoépithéliales du sein		Hypertension
<b>ADAMTS-17</b>	Cellules myoépithéliales du sein		Syndrome de Weill-Marchesani-like
<b>ADAMTS-18</b>	Ganglion ciliaire, cœur, peau, cerveau, cellules myoépithéliales du sein		Syndrome de microcornée-myopie avec atrophie choroïdienne-télécanthus (MMCAT) <sup>108</sup>
<b>ADAMTS-19</b>	Ganglion spinal, cellules myoépithéliales du sein		
<b>ADAMTS-20</b>	Cerveau, appendice, cœur, foie, muscles squelettiques, hypophyse, ganglion trigéminal, cellules myoépithéliales du sein	Versicane	

**Tableau 1. Gènes ADAMTS. Leur expression dans les tissus, leurs substrats et leurs pathologies associées (chez l'homme et la souris)<sup>80</sup>.**

### 3.3.3. Les ADAMTS-Like

Les ADAMTSLs ont un domaine ancillaire similaire aux ADAMTS mais ne possèdent pas de domaine catalytique (**Figure 14**). Elles n'ont donc pas d'activité enzymatique. Ce sont également des protéines de la MEC mais leurs fonctions restent inconnues.

Cependant, il a été observé que la Papiline, également une glycoprotéine de la MEC qui partage des similarités structurales avec les ADAMTSL, a une action inhibitrice sur les ADAMTS<sup>110</sup>. Ces résultats additionnés aux similitudes des séquences C-terminales entre les ADAMTSL et les ADAMTS suggèrent que les ADAMTSL auraient un rôle d'inhibiteur compétitif avec les ADAMTS. Plusieurs études suggèrent que les ADAMTSL sont impliquées dans la biogenèse des microfibrilles.

**ADAMTSL-1**, appelée aussi punctine, est associée à un phénotype incluant le glaucome, la myopie et/ou des défauts rétiens ainsi que des anomalies craniofaciales, auditives, du cerveau, des reins et des membres<sup>111</sup>. La mutation hétérozygote identifiée entraîne une diminution de l'expression de la protéine et Adamtsl-1 mutée n'est plus sécrétée et reste intracellulaire. Le rôle d'ADAMTSL-1 n'est cependant, pas connu.

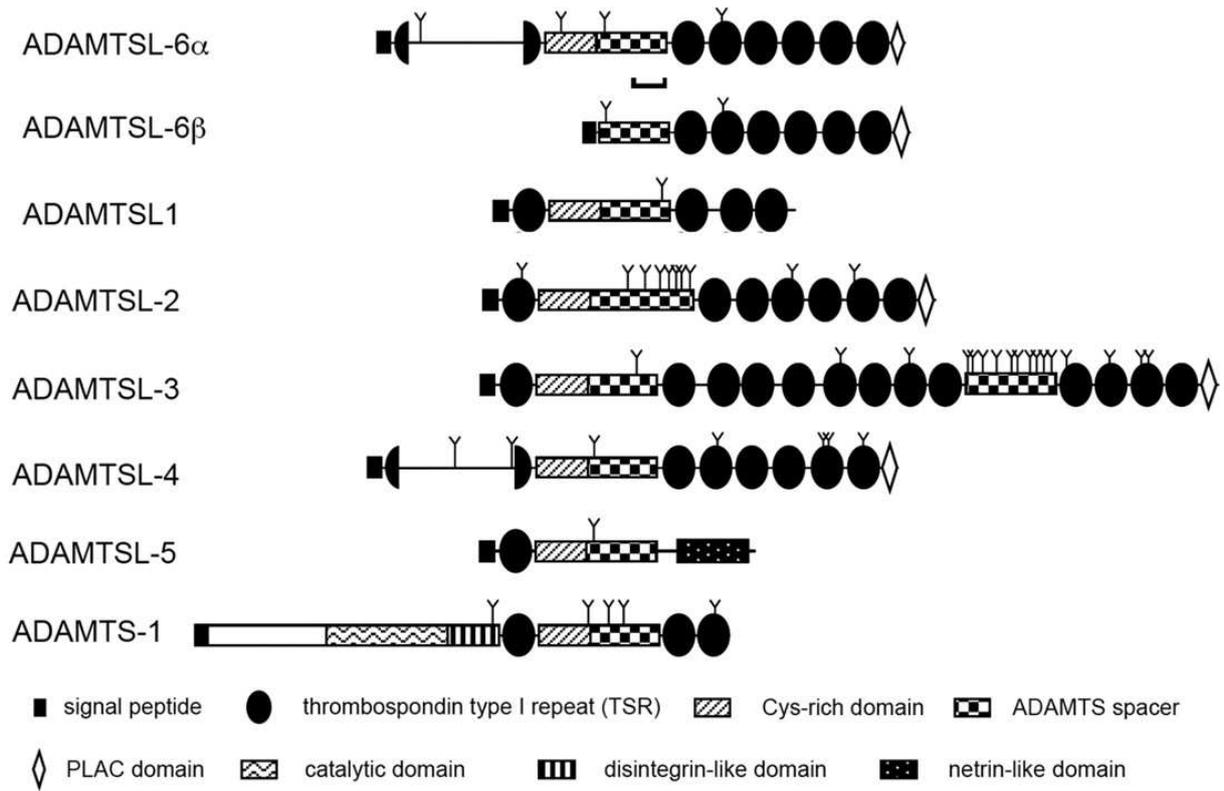
**ADAMTSL-2** est composée de 18 exons codants. La protéine, d'environ 140kDa, se compose de 7 motifs de type thrombospondine de type 1 (TSR), une en aval du peptide signal et 6 autres proche de l'extrémité C-terminale, d'un module riche en cystéine, d'un module d'espacement très long, retrouvé chez l'homme et la souris, d'un module riche en N-glycosylation et d'un module PLAC. ADAMTSL-2 est liée à la fois à la surface cellulaire, la matrice péri-cellulaire et à la MEC déposée sous les cellules. Des analyses sur des embryons des souris ont montré une plus forte expression d'Adamtsl2 vers E17.5 et plus particulièrement dans les muscles squelettiques, le foie, les muscles lisses artériels et bronchiques, la peau, les disques intervertébraux, le périchondrium, le pancréas et la corde spinale<sup>112</sup>. Par hybridation *in situ* sur des tissus de fœtus humain âgé de 35 semaines, il a été observé qu'ADAMTSL-2 était exprimée dans le cartilage des os longs, au niveau des chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques de la plaque de croissance fémorale, montrant un rôle éventuel d'ADAMTSL-2 dans la formation de l'os<sup>2</sup>. ADAMTSL-2 se lie à FBN1, FBN2 et LTBP-1. Les mutations dans le gène *ADAMTSL-2* sont responsables de la forme autosomique récessive de la DG. **Son rôle reste inconnu à ce jour, mais l'étude de ma thèse a pour but d'élucider sa fonction dans la chondrogenèse et la MEC.**

**ADAMTSL-3** fixe FBN1 et ADAMTS-10. Une hypothèse a été émise sur la formation d'un complexe entre ADAMTSL-3, ADAMTS-10 et FBN1 dans les microfibrilles, qui serait déstabilisé dans le cas du SWM. Il a aussi été démontré qu'ADAMTSL-3 interagit avec LTBP-1<sup>113</sup>.

**ADAMTSL-4** est une protéine encodée par un gène dont les mutations conduisent à la forme récessive de l'ectopie du cristallin isolée (ECTOL2, MIM 225100), la forme dominante étant causée par des mutations dans le gène FBN1<sup>114</sup>. L'ectopie du cristallin est une dislocation de la lentille due à une désorganisation des fibres zonulaires, qui sont des structures microfibrillaires maintenant la lentille. Le déplacement de la lentille conduit à une déficience aiguë ou chronique de la vue. Ceci peut être associé à des complications incluant la myopie, le détachement rétinien, la cataracte ou le glaucome. L'ectopie du cristallin peut aussi être retrouvée dans d'autres pathologies du tissu conjonctif comme le syndrome de Marfan, qui est aussi causé par des mutations dans le gène FBN1. Plus récemment, une délétion homozygote dans *ADAMTSL-4* a été identifiée comme responsable d'une craniosynostose en association avec une ectopie du cristallin. L'impact de ces mutations sur la protéine et le rôle d'ADAMTSL-4 sur les fibrilles zonulaires reste inconnu. Il a cependant, été démontré qu'ADAMTSL-4 se lie à FBN1, et il a été montré que l'ajout d'ADAMTSL-4 augmente la biogenèse des microfibrilles, démontrant qu'ADAMTSL-4 est également une protéine importante dans la déposition du réseau microfibrillaire. De plus, il a été montré qu'ADAMTSL-4 n'était pas exprimée seulement dans les corps ciliaires, mais aussi dans la cornée, l'iris, la lentille et la rétine<sup>115</sup>. ADAMTS-10, ADAMTS-17 et ADAMTSL-4 sont associées à des pathologies des yeux mais seules les mutations dans *ADAMTSL-4* conduisent à un phénotype aussi restrictif suggérant un rôle spécifique d'ADAMTSL-4 dans le zonule, qui ne pourrait pas être compensé par les deux autres ADAMTS.

**ADAMTSL-5**, qui est exprimée dans les muscles squelettiques, l'os et le cartilage, se lie à FBN1 et FBN2. Ainsi ADAMTSL-5 et ADAMTSL-2 semblent être les deux seuls membres de la famille des ADAMTSL à fixer FBN2. Cependant, à l'inverse d'autres ADAMTSL et bien qu'interagissant avec les fibrillines, il n'a pas été démontré qu'ADAMTSL-5 accélèrait la biogenèse des microfibrilles. Son rôle exact reste inconnu<sup>116</sup>.

**ADAMTSL-6** joue un rôle essentiel dans le développement et la régénération des tissus conjonctifs. Ainsi, l'expression d'ADAMTSL-6 restaure le réseau microfibrillaire dans des cultures de souris Marfan. Plus précisément, l'ajout d'ADAMTSL-6 améliore l'assemblage des fibrilles de FBN1 et diminue la suractivation du TGF- $\beta$ <sup>117,118</sup>.



**Figure 14 : Structure des protéines ADAMTSL.** Représentation schématique des domaines des différentes ADAMTSL découvertes à ce jour. La structure d'ADAMTS-1 est incluse comme référence<sup>117</sup>.

### 3.4. La voie de signalisation du TGF- $\beta$

La MEC joue un rôle essentiel dans la régulation des molécules comme les facteurs de croissance. L'une des voies qui est régulée par la MEC et qui est particulièrement importante dans le cas de mon projet de thèse est la voie de signalisation du TGF- $\beta$ .

#### 3.4.1. Les facteurs de croissance TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  est impliqué dans de nombreux processus physiologiques comme l'embryogenèse, le développement des organes et la maintenance de l'homéostasie des tissus. La dérégulation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  a de nombreuses conséquences pathologiques, comme l'inflammation, la fibrose de tissus et le développement de tumeur. TGF- $\beta$  existe sous trois isoformes, TGF- $\beta$ 1, 2 et 3.

Dans les os humains, l'expression des différentes protéines TGF- $\beta$  varie en fonction de la zone de la plaque de croissance. Ainsi, TGF- $\beta$ 2 est exprimé dans toutes les zones, mais avec une expression plus forte dans les zones hypertrophique et osseuse. TGF- $\beta$ 3 est plutôt exprimé dans les zones prolifératives et hypertrophiques. Quant à TGF- $\beta$ 1, son expression a été observée dans les zones proliférative et hypertrophique (partie supérieure). Cependant, TGF- $\beta$ 1 est l'isoforme le plus exprimé. Les récepteurs sont quant à eux exprimés dans les zones hypertrophique et osseuse<sup>119,120</sup>.

Bien que TGF- $\beta$  soit plutôt connu pour inhiber le cycle cellulaire, il a été démontré que ces effets *in vitro* étaient plutôt stimulateurs de la prolifération des chondrocytes et de la synthèse des composants de la MEC, comme l'aggrécane. TGF- $\beta$  stimulerait l'expression de PTHrP<sup>121</sup>.

#### 3.4.2. Le TGF- $\beta$ en complexe avec le LAP

A l'inverse des BMPs, le TGF- $\beta$  est sécrété, par les cellules, en complexe avec son peptide, le peptide LAP (pour « latency-associated peptide »). Ce complexe formé du TGF- $\beta$  mature et du LAP, qui interagissent via des liaisons non covalentes, est appelé le petit complexe latent (SLC pour small latent complex). Il maintient le TGF- $\beta$  sous une forme inactive en l'empêchant d'interagir avec son récepteur. Le SLC peut être sécrété seul, mais est usuellement accroché de manière covalente par des ponts disulfure à un LTBP, le complexe est alors appelé grand complexe latent (LLC pour large latent complex). Grâce aux interactions entre le LTBP et les composants de la matrice, comme la fibronectine et les fibrillines, le SLC va être incorporé à la MEC. Le TGF- $\beta$  est ainsi stocké dans la MEC sous une forme latente, prêt à être utilisé. Afin de pouvoir devenir actif et d'être reconnu par ses

récepteurs, le TGF- $\beta$  doit être relâché par le SLC et plus particulièrement par le LAP (**Figure 15**)<sup>122</sup>.

Différentes mécanismes d'activation du TGF- $\beta$  ont été proposés :

- **Activation impliquant les intégrines.**

L'intégrine  $\alpha\beta6$  est activatrice du TGF- $\beta1$  et - $\beta3$ <sup>123</sup>. Cette intégrine n'est exprimée que dans l'épithélium à un faible niveau et il a été montré que les souris n'exprimant plus l'intégrine  $\alpha\beta6$  avaient une inflammation de la peau et des poumons, corrélée avec une diminution de l'activation de la voie TGF- $\beta$ . L'intégrine interagit directement avec le LAP, via un domaine RGD. Cette activation du TGF- $\beta$  via l'intégrine  $\alpha\beta6$  requiert LTBP-1<sup>123</sup>. De plus la régulation du TGF- $\beta$  semble dépendre du type LTBP interagissant avec le LAP, comme le montre l'absence d'activation par l'intégrine  $\alpha\beta6$  du LLC formé avec le LTBP-3. D'autres intégrines comme  $\alpha\beta1$  ont aussi été reconnues pour interagir avec le LAP-TGF- $\beta1$ , activant le facteur de croissance<sup>124</sup>.

- **Dégradation du LLC par des protéases.**

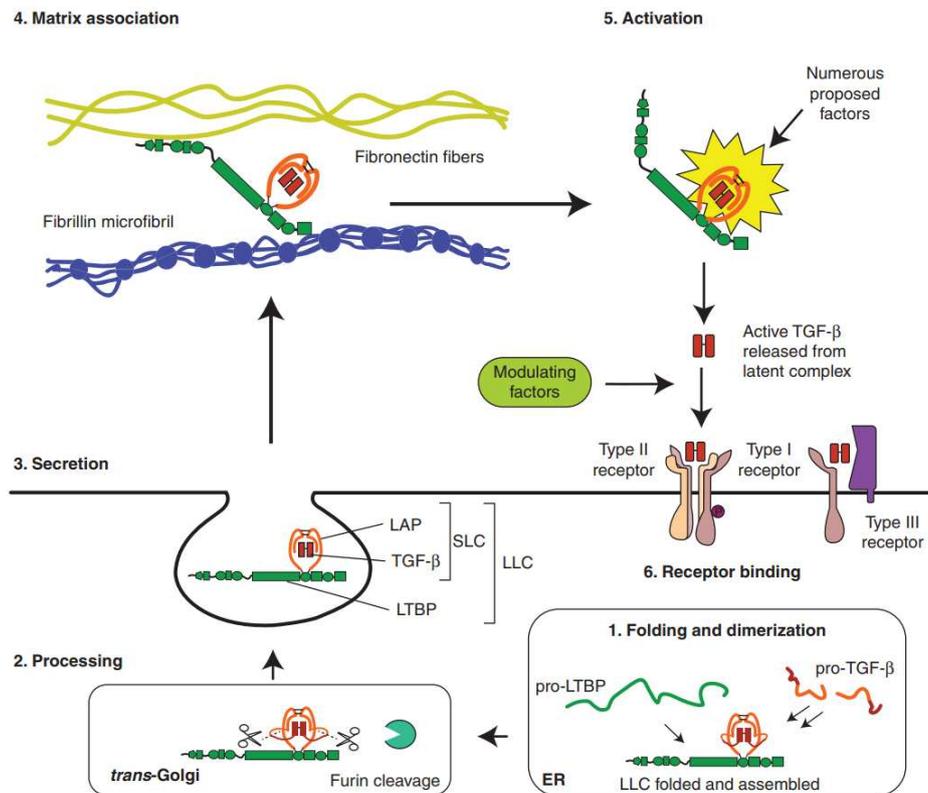
L'activation peut se faire par clivage du LAP par la plasmine ou des métalloprotéases matricielles comme MMP-2 et -9<sup>125,126</sup>. Il peut aussi y avoir clivage du LTBP-1 (mais ne libère LAP de LTBP-1), par BMP-1 par exemple, permettant au LAP d'être lui-même clivé par une métalloprotéase<sup>127</sup>.

- **Activation via la ténascine X**

L'activation peut se faire par un changement de conformation du SLC, impliquant la ténascine X, qui est une glycoprotéine responsable d'un syndrome d'Ehler-Danlos lorsqu'elle est déficiente<sup>128</sup>. Le domaine FBG (pour fibrinogen-like globe) situé en C-terminal de la ténascine, va interagir avec le SLC et par l'intervention de l'intégrine  $\alpha11\beta1$ , un récepteur de la ténascine X, induit un changement de conformation du complexe. Le facteur TGF- $\beta$  est alors exposé et peut activer ses récepteurs<sup>129</sup>.

- **Activation physico-chimique**

La plupart du temps cette activation est faite *in vitro* par acidification, alcalinisation ou par chauffage, pour citer quelques exemples. Cependant, il existe un exemple *in vivo* d'activation physico-chimique qui se passe lors de la résorption osseuse exercée par les ostéoclastes. Ce processus entraîne une très forte diminution du pH qui enclenche la déminéralisation du tissu et l'activation du TGF- $\beta$ <sup>130</sup>.



**Figure 15 : Schéma de la sécrétion et de la régulation extracellulaire du transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ).** Au départ (1) (en bas à droite), TGF- $\beta$  et le latent TGF- $\beta$ - binding protein (LTBP) sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (ER) où le pro-TGF- $\beta$  dimérise et est ensuite fixé via un pont disulfure au LTBP pour former un complexe ternaire. Le dimère de TGF- $\beta$  est séparé de son peptide (latency-associated peptide [LAP]) dans le site trans de l'appareil de Golgi. Cependant, le TGF- $\beta$  et son peptide LAP restent fortement associés via des interactions non-covalentes formant ainsi le large latent complexe (LLC)(en bas à gauche)(2). Une fois sécrété (au milieu à gauche)(3), le LTBP peut se fixer à différentes fibres de la matrice qui séquestreront le TGF- $\beta$  sous sa forme inactive jusqu'à qu'il soit relâché par un activateur (en haut à gauche)(4). Le complexe latent est ensuite activé (en haut à droite)(5), par un des différents mécanismes potentiels, relâchant le TGF- $\beta$  sous forme mature. Le TGF- $\beta$  actif peut fixer des récepteurs à la surface de la cellule (en bas à droite)(6), bien que d'autres facteurs peuvent aussi fixer le facteur de croissance à cette étape et ainsi soit inhiber ou soit favoriser la fixation à son récepteur<sup>122</sup>.

### 3.4.3. La voie de signalisation du TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  active de nombreuses voies de signalisation comme les voies MAPK, PAK ou PKC. La voie canonique est associée aux protéines SMAD. Les protéines SMAD sont réparties en trois groupes :

- Les **R-Smads** qui transduisent le signal (pour receptor-activated Smads) : Smad1, Smad5 et Smad8 pour la voie des BMPs, Smad2 et Smad3 pour la voie TGF- $\beta$ .
- Le **Co-Smad** (pour common mediator Smad) : Smad4
- Les Anti-Smads ou **I-Smads** (pour inhibitory Smads) : Smad6 et Smad7

Les récepteurs des membres de la superfamille des TGF- $\beta$  ont une activité intrinsèque sérine/thréonine kinase. L'interaction du TGF- $\beta$  avec le récepteur TGF- $\beta$  type 2 (T $\beta$ R2) entraîne la phosphorylation du récepteur TGF- $\beta$  type 1 (T $\beta$ R1) qui lui-même phosphoryle Smad2 et Smad3. Les Smads phosphorylées vont former un complexe avec Smad4 et ce complexe sera transloqué dans le noyau, où il ira réguler les gènes cibles de la voie TGF- $\beta$ . Les Anti-Smads vont bloquer l'activation de la voie comme compétiteurs aux R-Smads, en interagissant avec le T $\beta$ R1 activé mais aussi en activant la dégradation du récepteur. Smad7 est plutôt un inhibiteur spécifique de la voie TGF- $\beta$  alors que Smad6 est préférentiellement inhibiteur de la voie BMP<sup>131</sup>.

### 3.5. Les protéines du réseau microfibrillaire impliquées dans la voie de signalisation du TGF- $\beta$

#### 3.5.1. Les Fibrillines

##### 1) Caractéristiques

Dans la MEC, les composantes majeures du réseau microfibrillaire sont les fibrillines. Ce sont de grosses glycoprotéines riches en cystéine, retrouvées tant en association avec l'élastine que dans des structures dépourvues d'élastine. La famille des fibrillines comprend trois protéines extracellulaires, la fibrilline-1 (FBN1), la fibrilline-2 (FBN2) et la fibrilline-3 (FBN3), d'environ 350kDa et hautement homologues. Il n'y a pas de Fbn3 chez les rongeurs en raison de réarrangements chromosomiaux. Chez l'humain, les gènes codant FBN-1, -2 et -3 sont situés respectivement sur les chromosomes 15, 5 et 19 et sont hautement conservés entre les espèces.

##### 2) Expression dans les tissus au cours du développement

FBN1 est très fortement exprimée en postnatal alors que FBN-2 et -3 sont principalement exprimées durant l'embryogenèse. Il a été montré que le taux d'expression de la fibrilline-2, même à son maximal, ne dépassait jamais celui de FBN1. Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré différentes expressions des fibrillines. Ainsi, chez la souris, Fbn2 est exprimée tôt dans le développement fœtal puis diminue au cours du développement, alors que l'expression de Fbn1 apparaît plus tardivement dans le développement mais augmente de manière constante jusqu'à la vie néonatale<sup>132</sup>. De plus, les caractéristiques du syndrome de Marfan lorsque le gène FBN1 est muté, ont mis en évidence l'expression de FBN1 dans les tissus cardiovasculaires, oculaires et squelettiques<sup>133</sup>. Ces études ont également montré une grande variabilité d'expression du gène FBN1 chez l'homme<sup>134</sup>.

Les mutations dans le gène FBN2 conduisent à une pathologie, appelée syndrome de Beals ou Arachnodactylie Congénitale avec Contractures<sup>135</sup>. La souris Fbn2 KO est un autre exemple de la différence d'expression des deux fibrillines selon le contexte temporel et spatial. En effet, les souris Fbn2 KO présentent de la syndactylie causée par un défaut de l'activation de la voie BMP-7, induisant la mort cellulaire des cellules mésenchymateuses du tissu interdigital<sup>136</sup>. Malgré une expression plus forte, Fbn1 ne compense pas la perte de Fbn2 dans les extrémités en développement.

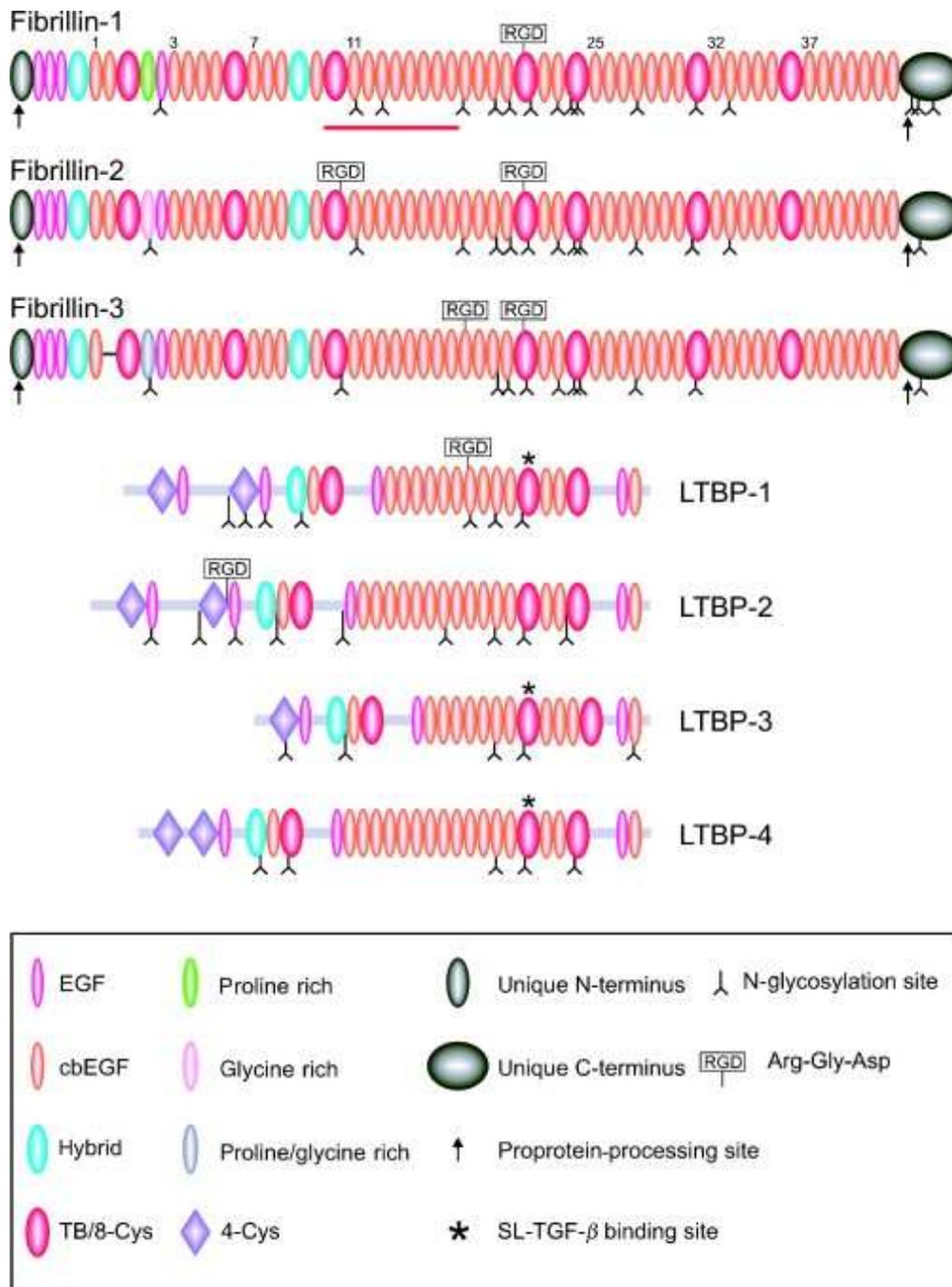
Les fibrillines ne représentent que 1 à 3% des protéines de la MEC des tissus mous et durs du squelette<sup>137</sup>.

### 3) Structure

Les fibrillines sont composées de<sup>138,139</sup> :

- **domaines « epidermal growth factor-like »** (EGF-like), 47 domaines EGF-like dans FBN-1 et -2, et 46 domaines dans FBN3. La plupart de ces domaines contiennent un domaine consensus fixant le calcium (calcium binding, cb). Ces domaines permettent ainsi la stabilisation structurale des fibrillines, les protègent de la protéolyse, et interviennent dans les interactions avec les autres composants de la MEC comme l'HS ou la fibuline.
- **7 domaines « TGFβ-binding protein-like »** (TB): Ce domaine est constitué d'une séquence très conservée de 8 cystéine. Les fibrillines ont un site RGD (arginine-glycine-acide aspartique) qui est un motif de 3 acides aminés retrouvé dans plusieurs protéines de la MEC. Ce site intervient dans l'interaction entre les protéines de MEC et les récepteurs transmembranaires, les intégrines. Toutes les fibrillines contiennent un site RGD dans leur domaine TB4. FBN-2 et -3 ont un site supplémentaire respectivement dans le TB3 et dans le domaine cbEGF18. Le domaine TB5 de FBN1 interagit avec l'HS<sup>98</sup>.
- **domaines hybrides** ayant des similarités avec les domaines TB en N-terminal et avec les domaines EGF-like en C-terminal.

Une des caractéristiques différenciant les 3 fibrillines est un domaine situé coté N-terminal qui est riche en proline dans FBN1, riche en glycine dans FBN2 et riche en proline et glycine dans FBN3 (**Figure 16**). Si les domaines EGF-like sont retrouvés dans beaucoup d'autres protéines de la MEC, les domaines TB et hybrides sont spécifiques des fibrillines et d'une autre famille de protéines de la MEC, les « latent TGF-β binding proteins » (LTBPs).



**Figure 16 : Structure des protéines de la famille LTBP/fibrillines chez l'humain.** Le nombre au-dessus de la fibrilline-1 indique les numéros des domaines cbEGF-like dans la molécule. Ici, seul le long variant de chaque LTBP a été indiqué. La barre rouge indique une région dans la fibrilline-1 où les mutations conduisent très souvent au syndrome de Marfan. Les sites d'interaction avec le TGF- $\beta$  sous sa forme latente sont indiqués par un astérisque<sup>145</sup>.

#### 4) Formations des microfibrilles

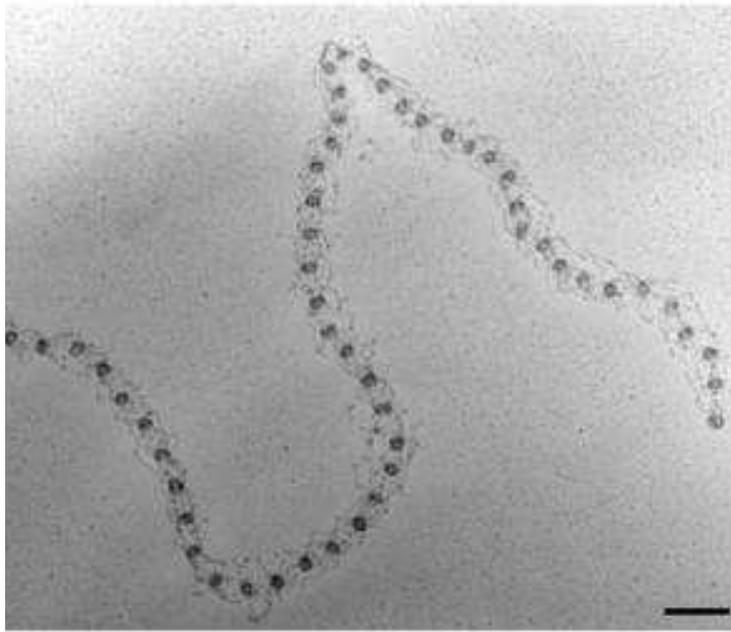
Par microscopie électronique, il a été montré que les microfibrilles composées de monomères de fibrillines avaient l'aspect d'un collier de perles avec une périodicité variable selon leur étirement (**Figure 17**). Le diamètre des microfibrilles est de 10-14 nm<sup>141</sup>.

Les fibrillines sont synthétisées sous la forme d'un pro-peptide, appelé pro-fibrilline, d'environ 350kDa qui va ensuite être modifié dans l'appareil de Golgi puis excrété via les vésicules sécrétoires. La pro-fibrilline va ensuite être clivée, produisant ainsi la fibrilline mature de 320kDa. Ainsi sécrétées et matures, les monomères de fibrilline vont s'assembler en polymère pour former les microfibrilles. Le mécanisme a surtout été étudié pour FBN1. Ainsi plusieurs hypothèses ont été émises pour l'assemblage des fibrillines :

- Par des **interactions entre les séquences C-terminales** de plusieurs molécules de fibrillines. Ainsi il a été démontré que les 3 derniers sites cbEGF des fibrillines-1 se lient entre eux via des ponts disulfure pour former les fameuses « perles » avec un « corps » dense au centre et des « bras » libres en périphérie. Les C-terminaux ainsi multimérisés augmenteraient ainsi leur affinité pour interagir avec les N-terminaux des autres perles, pour au final former cette structure en « collier de perles »<sup>138,140</sup>. Ainsi cette multimérisation en C-terminal augmenterait l'affinité de la fibrilline avec le N-terminal d'autres fibrillines, mais aussi avec la fibronectine et l'HS.
- Par des **interactions linéaires** (ou interactions « tête-à-queue ») où la séquence N-terminale d'une molécule va interagir avec le C-terminal d'une autre<sup>142,143</sup>.
- Par des **interactions latérales** mises en évidence par la présence de 6 à 8 molécules de FBN1.

Il a ainsi été démontré que l'ajout ou la suppression d'HS avait un impact sur la formation des microfibrilles<sup>60</sup>. Sabatier et al. ont démontré que la fibronectine était également essentielle pour la biogenèse du réseau microfibrillaire, en interagissant directement avec le C-terminal des multimères de FBN1<sup>144</sup>. De plus, les fibrillines ont aussi comme propriété de s'auto-aggréger (par exemple, par liaison C-terminal/N-terminal) pour former les microfibrilles.

Il a été montré également que FBN1 peut former des hétéro-polymères avec FBN2 par des expériences de doubles marquages sur des microfibrilles<sup>145,146</sup>. Des études ont montré que les épitopes de FBN2 pouvaient être masqués par FBN1, les rendant difficilement observables sans avoir au préalable digéré enzymatiquement la protéine FBN1 ou avoir génétiquement supprimé *FBN1*<sup>147</sup>.



**Figure 17 : Assemblage des microfibrilles.** Microscopie électronique de microfibrilles de fibrillines extraites de tissus conjonctifs montrant la structure en « collier de perles ». Echelle 100nm<sup>138</sup>.

### 5) Rôles des fibrillines

Le rôle des fibrillines et plus généralement des microfibrilles a été beaucoup étudié ces dernières années mais reste à être déterminé. Cependant, il a été démontré que les fibrillines avaient, non seulement un rôle de structure en formant des microfibrilles et en permettant l'assemblage des fibres élastiques, mais aussi un rôle plus dynamique en contrôlant la biodisponibilité du TGF- $\beta$  et des BMP dans la MEC. Ainsi les fibrillines jouent un rôle essentiel lors du développement.

#### i. La régulation de la biodisponibilité des facteurs de croissance

Les microfibrilles contribuent à la régulation du niveau de TGF- $\beta$  fonctionnel en fournissant à la MEC une plateforme structurale qui contrôle la diffusion, le stockage, la présentation et le relargage du TGF- $\beta$ . Cette interaction se fait via les LTBP dans le cas du TGF- $\beta$ <sup>148</sup>. Il a ainsi été suggéré que les microfibrilles pouvaient réguler positivement en concentrant les ligands localement pour réguler la différenciation cellulaire à travers un contexte spatial durant la formation d'un organe ou, au contraire, réguler négativement en restreignant la biodisponibilité de ces ligands pour moduler la performance cellulaire dans un contexte temporel lors de remodelage ou réparation tissulaire<sup>138</sup>. La perturbation de la régulation des facteurs de croissance par la matrice conduit fréquemment à des pathologies.

La régulation de la biodisponibilité des BMP (les BMP-2, -4, -5, -7 et -10) diffère de celle impliquée pour le TGF- $\beta$ . En effet, les BMP peuvent être directement ciblées par les microfibrilles via des interactions entre les prodomaines des BMP et les régions N-terminales de FBN-1 et -2<sup>149</sup>. La voie de signalisation BMP peut également être régulée simplement par le déplacement compétitif du prodomaine par le récepteur de type 2.

### ii. L'interaction avec les cellules

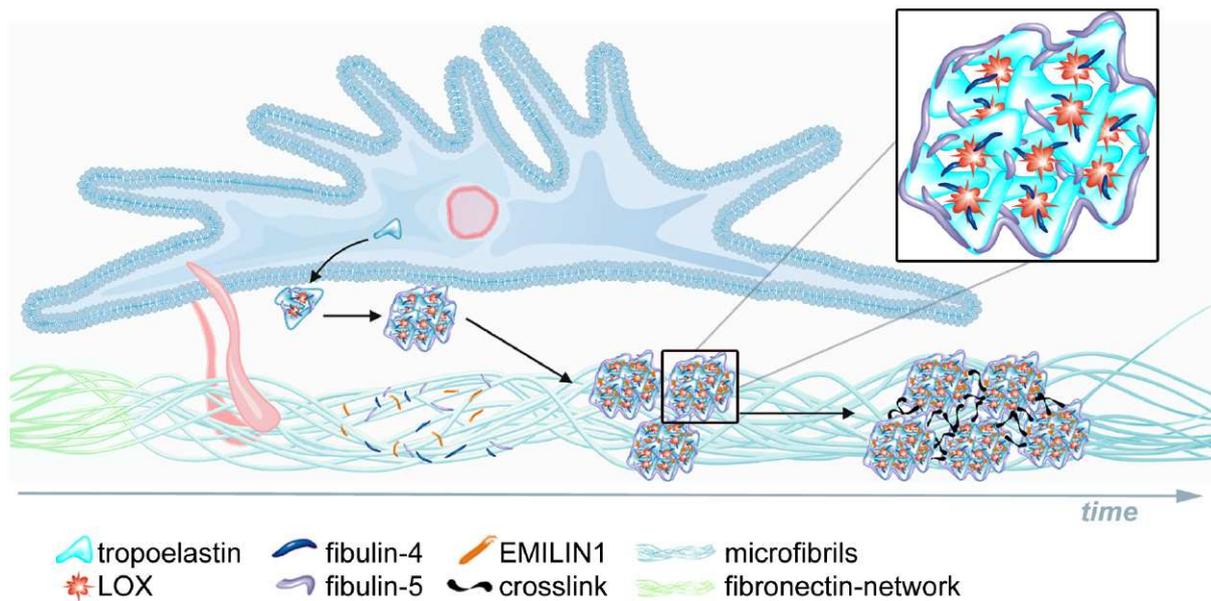
La matrice interagit avec les cellules principalement par l'intermédiaire d'une famille de récepteurs, les intégrines, qui ont donc un rôle de « senseur » pour la cellule. Les intégrines sont des glycoprotéines exprimées à la surface des cellules, à l'exception des érythrocytes. Le type d'intégrines et la quantité à la surface des cellules sont spécifiques de chaque type cellulaire. Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  associées de façon non-covalente. A ce jour, 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  ont été identifiées, mais le nombre de combinaisons possibles est limité (à ce jour, 24 combinaisons ont été trouvées)<sup>150</sup>.

Les intégrines ont un rôle dans la transmission du signal, agissant ainsi comme récepteur à la surface cellulaire. Elles ont aussi un rôle structural, en liant le cytosquelette de la cellule à l'environnement extérieur, comme les autres cellules ou la MEC. Elles sont impliquées dans le contrôle du destin cellulaire comme la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la polarité. Plus précisément, il a été montré que les intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha v\beta 6$  interagissent avec FBN1<sup>151-154</sup>. De plus, des expériences *in vitro* ont montré que l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  est indispensable à l'assemblage de FBN1 dans les microfibrilles<sup>155</sup>. Les fibrillines interagiraient également avec les cellules via des protéoglycanes comme, par exemple, les syndécanes. En effet, le domaine TB5 de FBN1 fixe l'HS. Cependant, le mécanisme et les fonctions impliquées restent encore à être étudiés.

### iii. L'assemblage des fibres élastiques

Les partenaires des fibrillines cruciaux pour l'assemblage sont, parmi d'autres, la tropoélastine et les fibulines-4 et -5<sup>156</sup>. L'assemblage des fibres élastiques est un processus qui a lieu dans la deuxième moitié du développement embryonnaire et pendant la phase de croissance de l'individu. Ce processus d'assemblage très complexe a été élucidé grâce aux études sur les aortes de souris. Dans les tissus élastiques, les microfibrilles sont essentielles pour la formation des fibres élastiques, ce qui a été démontré grâce au modèle déficient en *Fbn1*, la souris *Fbn1*<sup>-/-</sup><sup>157,158</sup>. Les souris *Fbn1*<sup>-/-</sup> meurent 2 semaines après la naissance à cause d'un défaut pulmonaire et d'une rupture d'anévrisme aortique dus à une désorganisation des fibres élastiques dans ces tissus. Le processus se fait de la

manière suivante (**Figure 18**) : la tropoélastine est sécrétée à la surface des cellules, ensuite elle reste accrochée par l'intermédiaire de récepteurs présents sur la membrane cellulaire (intégrines et GAGs entre autres). Elle est ensuite organisée en agrégats réticulés par des enzymes de la famille des « lysyl oxydases » (LOX). Les fibulines-4 et/ou 5 interagissent avec ces agrégats pour faciliter l'établissement de liaisons croisées ou limiter leur taille. Les agrégats d'élastine restent à la surface cellulaire en attendant que d'autres molécules de tropoélastine viennent s'associer à eux<sup>159</sup>. Les microfibrilles de FBN1 servent de support pour l'interaction des fibres élastiques avec la surface cellulaire via les intégrines.



**Figure 18 : Principe de l'élastogénèse.** L'élastine soluble est sécrétée par la cellule et s'agglomère à la surface cellulaire. Simultanément, les microfibrilles s'assemblent dans l'espace extracellulaire au même emplacement où la fibronectine préexiste. Les microfibrilles contenant les fibrillines-1 et -2 sont liées à la cellule via les intégrines (en rose). Les agrégats d'élastine/tropoélastine sont ensuite transférés aux microfibrilles, où ils sont ensuite regroupés et forment des fibres élastiques matures après la formation des liaisons covalentes (desmosine, isodesmosine, ...) laquelle est catalysée par une LOX<sup>160</sup>.

### 6) Implication de FBN1 dans des pathologies

Les fibrillines sont liées à de nombreuses maladies génétiques dont les caractéristiques cliniques sont dues à des défauts dans les tissus conjonctifs. Les mutations, toutes dominantes, dans le gène FBN1 peuvent aboutir à différentes pathologies, selon l'emplacement de la mutation :

- La **dysplasie gélophysique** et la **dysplasie acromicrique** : les mutations sont situées dans le domaine TB5. Il a été démontré que le domaine TB5 interagit avec l'héparine/HS bien que sa fonction reste inconnue<sup>98</sup>.

- Le **syndrome de Weill-Marchesani** : est dû à une délétion de 24 paires de base dans l'exon 41 du gène *FBN1*<sup>7</sup>. Une autre délétion de 7895 paires de base, de l'intron 8 à l'intron 11, est aussi responsable de ce syndrome et concerne le domaine riche en proline, le domaine EGF-like 4, et le premier domaine TB<sup>97</sup>. Il a été démontré que cette délétion abolit le site de fixation de *FBN1* aux ADAMTSL-2, -3, -6 et à la papiline<sup>113</sup>. Ainsi il a été suggéré que le complexe formé entre *FBN1*, ADAMTS-10 et ADAMTSL-3 serait déstabilisé à cause de la mutation WMS dans le gène *FBN1* aboutissant aux caractéristiques cliniques du syndrome.
- Le **syndrome Stiff-skin** : est une maladie cutanée, caractérisée par une peau épaisse, dont les mutations sont retrouvées dans le domaine TB4, qui contient un domaine RGD, interagissant avec les intégrines<sup>161</sup>.
- Le **syndrome de Marfan** : est caractérisé entre autres par une grande taille, une arachnodactylie, une dilatation aortique et une insuffisance mitrale. Les caractéristiques squelettiques sont à l'opposé de la DG bien que ce soit le même gène impliqué. A l'inverse des autres syndromes, les études suggèrent que les mutations Marfan ne sont pas restreintes à un domaine particulier de *FBN1* mais aucune mutation dans les domaines TB4 ou TB5 n'a été identifiée chez un patient Marfan<sup>162</sup>.
- **L'ectopie du cristallin** : Ce syndrome est une caractéristique du syndrome de Marfan. Cependant, il existe des cas isolés d'ectopie du cristallin avec mutation dans le gène *FBN1*<sup>163</sup>.

Ainsi, selon leur localisation, les mutations dans le gène *FBN1* entraînent des syndromes différents voire opposés, comme le syndrome de Marfan et la dysplasie géophysique, suggérant une relation génotype/phénotype.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les conséquences d'une mutation dans le gène *FBN1* dans le cadre du syndrome de Marfan<sup>164</sup> :

- Les caractéristiques cliniques seraient dues à une **haplo-insuffisance**, où le niveau de *FBN1* normale ne serait pas assez élevé, du fait que *FBN1* anormale ne serait pas synthétisée ou rapidement détruite. Ainsi, l'ajout de *Fbn1* normale chez des souris mutées dans le gène *Fbn1* et présentant les caractéristiques cliniques du syndrome de Marfan, restaure le phénotype vasculaire, déficient chez ce modèle.
- Une autre hypothèse est que la mutation dans le gène *FBN1* conduirait à une **dominance négative** des fibrillines anormales. Celles-ci polymériseraient avec les fibrillines normales, formant un réseau microfibrillaire aberrant et altérant les propriétés de la MEC.

### 3.5.2. Les LTBP

#### 1) *Caractéristiques et structure des LTBP*

Les « latent transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )-binding proteins » (LTBP) sont des protéines structurellement similaires aux fibrillines, qui font entre 125 et 240 kDa (**Figure 16**). LTBP-1 a été la première LTBP à avoir été décrite<sup>165</sup>. Les LTBP sont composées de deux motifs distincts riches en cystéine :

- Un est composé de 6 cystéine et est similaire au module EGF.
- Le second est composé de 8 cystéine (8-Cys) et est essentiel pour l'interaction entre le LAP et LTBP<sup>166</sup>. Les LTBP possèdent 4 domaines avec 8-Cys, et seul le troisième domaine avec 8-Cys forme des ponts disulfure avec un LAP. Ces domaines sont également retrouvés chez les fibrillines, ce sont les domaines TB. Mais, à l'inverse des LTBP, les fibrillines n'interagissent avec aucun LAP.

Le N-terminal de LTBP-1 est rigide alors que les régions cbEGF sont flexibles mais sont maintenues dans une certaine conformation par le calcium. La multimérisation du LTBP-1 en structures en forme de filament est dépendante du calcium<sup>167</sup>.

#### 2) *Rôles des LTBP dans La MEC et dans des pathologies*

Les LTBP jouent un rôle essentiel dans la biodisponibilité du TGF- $\beta$  en formant un complexe avec un LAP qui lui-même interagit avec un TGF- $\beta$ , gardant le facteur de croissance sous forme inactive.

LTBP-1, -3 et -4 sont aussi impliquées dans l'adhésion cellulaire, l'élastogénèse et la stabilisation des récepteurs à la surface des cellules en plus de leur rôle de fixation du TGF- $\beta$ <sup>168</sup>. Les LTBP auraient un rôle dans l'architecture de la MEC compte tenu de leurs similarités avec les fibrillines. Bien que les LTBP-1, -3 et -4 interagissent avec un LAP, c'est l'interaction LTBP-1/LAP qui est la plus décrite dans la littérature<sup>168</sup>.

A travers l'épissage, **LTBP-1** existe sous deux formes : une forme longue, LTBP-1L, et une forme courte, LTBP-1S<sup>169</sup>. LTBP-1L est plutôt exprimée pendant le développement embryonnaire alors que LTBP-1S est exprimée plus tardivement durant la vie fœtale et devient l'unique forme exprimée à l'âge adulte<sup>170</sup>. Bien que les deux formes fixent le TGF- $\beta$ , il a été démontré que c'était la forme longue qui interagissait le plus efficacement avec la MEC<sup>171</sup>. LTBP-1 (seule ou en complexe avec un LAP) est connue pour fixer le calcium, ce qui induirait des changements structurels, protégeant la protéine de la protéolyse<sup>172</sup>. Bien que ces hypothèses n'aient pas été vérifiées pour le moment, la fixation au

calcium pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation de l'activation du TGF- $\beta$ . Il a aussi été montré que LTBP-1, et plus précisément sa forme courte, était un des partenaires d'ADAMTSL-2. Les souris LTBP-1L KO, qui ne produisent plus de forme longue du LTBP-1, meurent juste après la naissance à cause de défaut dans le développement cardiaque. Ces anomalies sont associées à une diminution de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ <sup>168</sup>.

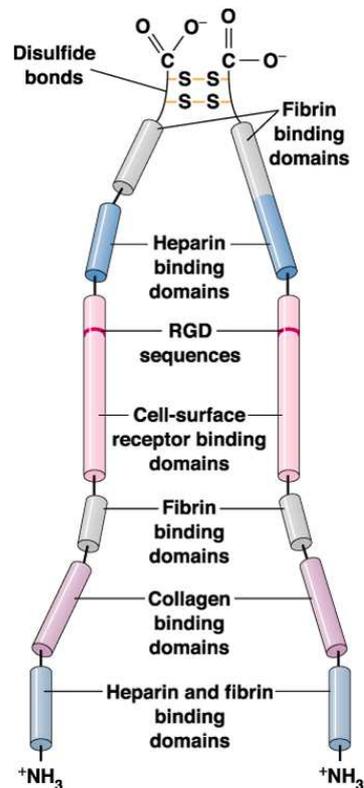
Le **LTBP-2** ne fixe aucun TGF $\beta$  et possède des fonctions indépendantes du TGF $\beta$ . LTBP-2 est exprimée dans les tissus élastiques et est associée à FBN1<sup>173</sup>. Les souris déficientes en *Ltbp-2* meurent avant le stade embryonnaire E6.5<sup>174</sup>. Les mutations dans *LTBP-2* sont responsables de la forme autosomique récessive du SWM<sup>10</sup>.

La déficience en **LTBP-3** conduit à des anomalies squelettiques, comme des déformations craniofaciales, et pulmonaires chez les souris. Ces souris développent également de l'ostéosclérose et de l'ostéoarthrite<sup>175,176</sup>. Cette protéine est également impliquée dans le spectre des dysplasies acroméliques dans le cas de patients avec une atteinte bronchopulmonaire sévère<sup>5</sup>.

La déficience en **LTBP-4** conduit à l'emphysème, à une cardiomyopathie progressive et au cancer colorectal. Ces défauts sont associés à une désorganisation structurelle des fibres élastiques avec une réduction du TGF- $\beta$  dans la MEC. Les souris *Ltbp-4*<sup>-/-</sup> ne présentent pas d'anomalies jusqu'à l'âge de 6-8 mois, puis leur état se dégrade rapidement<sup>177</sup>. LTBP-4 ne peut se lier qu'avec le TGF- $\beta$ 1 contrairement aux autres LTBP qui peuvent s'associer avec les TGF- $\beta$ <sup>166</sup>.

### 3.5.3. La fibronectine

La fibronectine est une large glycoprotéine de la MEC qui est assemblée en structure fibrillaire autour des cellules. Son poids moléculaire est de 460kDa. Elle est composée de 2 sous-unités qui sont reliées par deux ponts disulfure (**Figure 19**). Chaque sous-unité de fibronectine est composée de la répétition de trois types de domaines (I, II et III). Ces domaines contiennent des motifs permettant l'interaction de la fibronectine avec les récepteurs à la surface des cellules, comme les intégrines, et avec les différents composants moléculaires de la MEC.



**Figure 19 : Molécule de fibronectine.** La molécule consiste en deux chaînes polypeptidiques identiques liées par deux ponts disulfure (Addison Wesley Longman, 1999).

La fibronectine est synthétisée sous deux formes :

- Une forme plasmatique, soluble, circulant dans le plasma et impliquée dans la coagulation, la cicatrisation et la phagocytose.
- Une forme cellulaire, qui est insoluble, formant des fibrilles dans la MEC<sup>178</sup>.

La formation des fibrilles de fibronectine est dirigée par les récepteurs de surface cellulaire. L'assemblage est initié en N-terminale de la fibronectine à la surface de la cellule. Ceci induit le regroupement des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et l'adhésion entre les fibrilles, suivi d'une auto-association de la fibronectine. Il a aussi été montré que l'assemblage des microfibrilles de fibrilline est régulé par la

formation des fibrilles de fibronectine, qui dépendent des intégrines  $\alpha 5\beta 1$ <sup>179</sup>. En effet, en inhibant ou réduisant soit la fibronectine ou soit l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , il y a une très forte réduction de l'assemblage des microfibrilles de fibrilline. La région C-terminale de FBN-1, -2 et -3 et la région N-terminale de FBN1 interagissent avec la fibronectine<sup>144</sup>. Les fibronectines peuvent aussi s'assembler via les intégrines  $\alpha V\beta 3$ <sup>180</sup>.

La fibronectine est aussi requise pour l'assemblage des microfibrilles de LTBP-1, bien que LTBP-1 n'interagisse pas avec la fibronectine<sup>181</sup>. Dans des cultures d'ostéoblastes de rat, la fibronectine et LTBP1 co-localisent, bien que les deux protéines finissent par former des réseaux microfibrillaires séparés, et la fibronectine apparaît à la surface cellulaire avant LTBP1<sup>181</sup>. Ceci suggère que la fibronectine agit comme un modèle de départ pour la déposition des fibrilles de LTBP1. Les souris n'exprimant plus la fibronectine n'incorporent plus LTBP-1 dans la matrice mais continuent d'exprimer fortement LTBP1.

Les souris transgéniques qui n'expriment plus la fibronectine souffrent de très graves anomalies cardiaques<sup>182</sup>.

## 4. Les modèles invalidés pour les gènes *fbn1* et *adamts12*

Dans cette partie, nous décrivons les différents modèles existant pour les mutations dans les deux gènes responsables de la DG, à savoir, *FBN1* et *ADAMTSL-2*.

### 4.1. Les modèles murins *fbn1*

Comme il a été décrit dans la partie sur les fibrillines, *FBN1* est une protéine importante exprimée dans de nombreux tissus et c'est pourquoi les mutations, toutes dominantes, dans le gène *FBN1*, entraînent une multitude de pathologies.

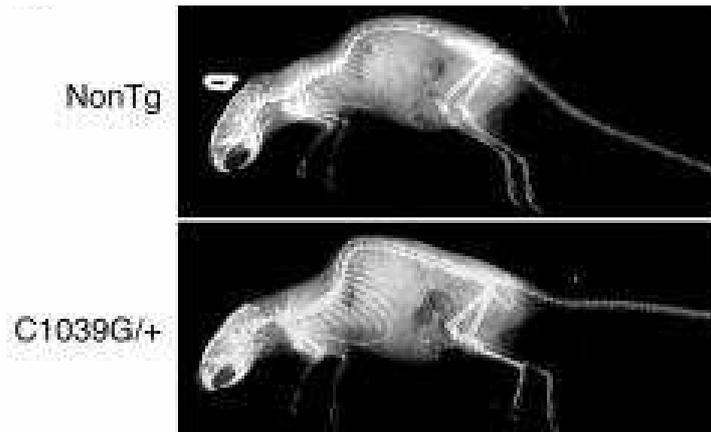
#### 4.1.1. Les modèles murins mimant le syndrome Marfan

L'une des maladies les plus étudiées en rapport avec le gène *FBN1* est le syndrome de Marfan qui est caractérisé par une grande taille, une arachnodactylie et un anévrisme de l'aorte ascendante. Plusieurs modèles de souris mimant ce syndrome ont été générés pour étudier le mécanisme physiopathologique de la maladie. Cependant, ces modèles ont pour beaucoup été utilisés pour analyser le phénotype de l'anévrisme aortique et non pour l'ossification.

- **Le modèle *Fbn1*<sup>mgΔloxPneo</sup>** : initialement, un premier modèle appelé *mgΔ* avait été généré, impliquant une délétion des exons 19-24 du gène *Fbn1*. Les souris *mgΔ/mgΔ* mouraient à la naissance à cause de l'expression, très faible, de *Fbn1* tronquée et les souris *mgΔ/+* ne montraient pas de différence phénotypique avec les souris sauvages. Cependant, ce modèle a été re-généré en enlevant le gène *neo*, qui interférait dans l'expression *Fbn1* mutée, permettant d'obtenir le modèle *mgΔloxPneo*. Les souris *mgΔloxPneo/+* montrent des caractéristiques du syndrome de Marfan, avec une détérioration cardiovasculaire, un emphysème, des défauts squelettiques et un réseau microfibrillaire anormal<sup>183</sup>.
- **Le modèle hypomorphe *Fbn1*<sup>mgR/mgR</sup>** : ce modèle dérive du modèle *mgΔ*, à la différence que *Fbn1* *mgR* n'est pas tronquée et bien qu'exprimée plus faiblement que *Fbn1* normale (environ 20% de l'expression normale), son expression reste plus forte que *Fbn1* *mgΔ*<sup>184</sup>. Les souris *mgR/mgR* meurent aux alentours de 3-4 mois et ne montrent pas de défauts phénotypiques à la naissance. Cependant, au fur et à mesure de la croissance, les souris mutantes homozygotes développent des os longs 10% plus grands que les souris sauvages,

ainsi que des défauts de la cage thoracique (dus à un allongement anormal des côtes) et une dissection aortique. Les souris mgR/+ ont un phénotype normal.

- **Le modèle hétérozygote *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>** : la mutation C1039G entraîne une substitution d'une cystéine dans un domaine cbEGF de *Fbn1*. Les souris C1039G/+ présentent une diminution de la déposition des microfibrilles, des déformations squelettiques et des défauts de la paroi aortique similaires aux manifestations cliniques humaines du syndrome de Marfan (**Figure 20**). Il est aussi intéressant de noter que les auteurs ont restauré le phénotype aortique en insérant un transgène *Fbn1* sauvage dans ce modèle<sup>185</sup>.
- **Le modèle hétérozygote *Fbn1*<sup>GT-8/+</sup>** : ces souris ont une mutation qui tronque *Fbn1* et qui marque la protéine à la GFP. Les souris hétérozygotes ont une dilatation aortique mais une longueur de vie normale, à l'inverse des souris homozygotes qui meurent à la naissance. Les souris GT-8/+ expriment *Fbn1* qui s'assemble en réseau microfibrillaire. Cependant, celui-ci est fortement désorganisé<sup>147</sup>.
- **Le modèle *Fbn1*<sup>mgN</sup>** : les souris homozygotes mgN/mgN n'exprime plus *Fbn1* et meurent dans les 2 semaines qui suivent la naissance, d'une rupture d'anévrisme de l'aorte, de défauts pulmonaires et/ou d'une rupture du diaphragme. Les souris hétérozygotes sont viables et fertiles<sup>158</sup>.



**Figure 20 : Phénotype du modèle *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>.** Radiographies prises sur des souris âgées d'un an. La croissance anormale des côtes et la scoliose sont évidentes chez la souris *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> comparé à la souris sauvage (*NonTg*)<sup>185</sup>.

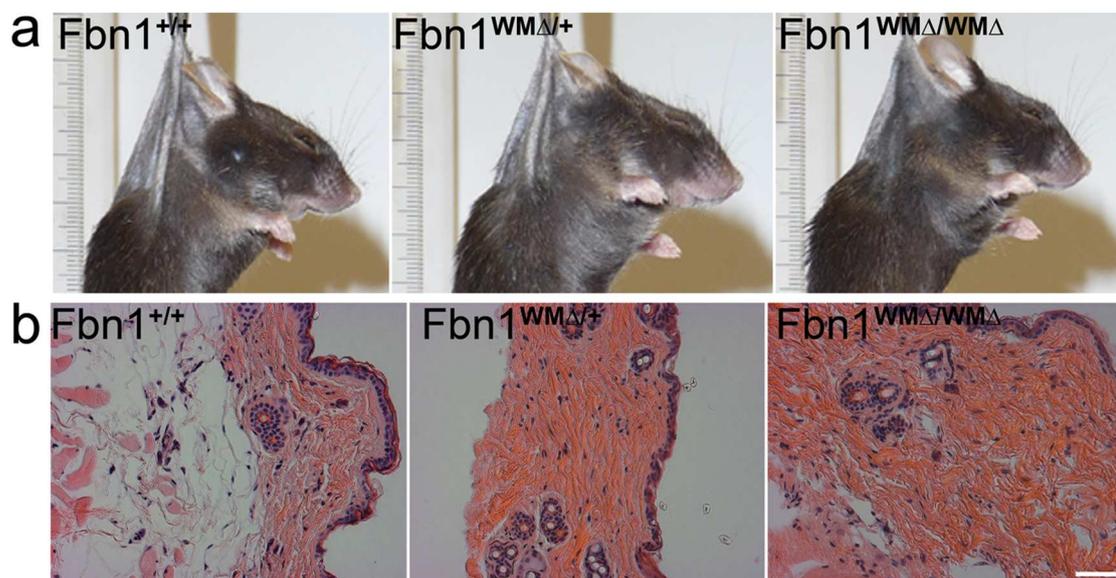
Une des caractéristiques du syndrome de Marfan, et que partage également les différents modèles murins, est la suractivation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ . Cela a conduit à des traitements pour le syndrome en utilisant des anticorps dirigés contre le TGF- $\beta$  ou en utilisant le losartan, un antagoniste du récepteur à l'angiotensine II de type 1, qui empêche ainsi l'activation du

TGF- $\beta$ . Ces thérapies utilisées sur les modèles murins Marfan ont restauré le phénotype des souris mutantes dans l'aorte, les valves mitrales et les poumons. Des premiers essais cliniques réalisés sur une cohorte de patients Marfan avec le losartan ont montré un ralentissement de l'avancée de la dilation aortique<sup>186</sup>.

De plus, une étude récente sur l'impact du losartan sur le développement osseux a été publiée. Des souris sauvages ont été traitées de la naissance jusqu'à 6 semaines et ont montré une augmentation du volume et de l'épaisseur osseux. La zone hypertrophique dans les souris traitées est plus allongée, et est accompagnée d'une augmentation de l'expression de Col10, avec peu de changement au niveau de la prolifération<sup>187</sup>.

#### 4.1.2. Le modèle murin du SWM

Le modèle *Fbn1*<sup>WMA</sup> est une souris avec une délétion des exons 9-11 qui reproduit une mutation humaine autosomique dominante. Les souris hétérozygotes et homozygotes, qui ont une longueur de vie normale, reproduisent les caractéristiques du SWM, c'est-à-dire la peau épaisse et des os longs raccourcis, et ne présentent pas de dissection aortique (**Figure 21**)<sup>113</sup>.



**Figure 21 : Peau épaisse chez les souris *Fbn1*<sup>WMA</sup>. (a) Examen des souris suggérant une peau moins élastique et plus épaisse chez les souris *Fbn1*<sup>WMA/+</sup> / *Fbn1*<sup>WMA/WMA</sup>. (b) Histologie de coupe de peau de souris *Fbn1*<sup>WMA</sup> montrant l'accumulation excessive de collagènes dans le derme à 1 mois<sup>113</sup>.**

#### 4.1.3. Le modèle murin du syndrome « Stiff Skin »

Le modèle *Fbn1*<sup>W1507C</sup> reproduit la mutation humaine du « Stiff skin » (peau rigide) ainsi que sa caractéristique principale, une fibrose de la peau, à la fois chez les souris hétérozygotes et homozygotes. Bien que les homozygotes aient un phénotype plus grave, elles restent viables. Un second modèle, appelé *Fbn1*<sup>D1545E</sup>, est porteur d'une mutation qui altère le site interagissant avec les intégrines, RGD, en RGE. Les souris hétérozygotes D1545E/+ miment les caractéristiques du syndrome de Stiff Skin à l'inverse des homozygotes qui meurent au stade embryonnaire<sup>188</sup>.

#### 4.1.4. Les autres modèles murins *Fbn1*

D'autres modèles de souris avec des mutations dans le gène FBN1 ont été développés. Un modèle, appelé **Tight skin** (*tsk*), est porteur d'une duplication en tandem de la région codant cbEGF7 à cbEGF24 et dans laquelle se trouve le domaine RGD. Les souris ont un phénotype qui ressemble à la sclérodémie et présentent aussi un emphysème et une hypertrophie myocardiale. Les homozygotes meurent au stade embryonnaire<sup>189</sup>.

Un autre modèle, généré par la même équipe du modèle *Fbn1* GT-8/+ et appelé *Fbn1* H1Δ, est délété de son premier domaine hybride. Les souris, ne montrant aucune caractéristique clinique d'un syndrome, et n'ayant pas de défauts dans les microfibrilles, ont permis de démontrer que toute l'intégrité de *Fbn1* ne doit pas forcément être conservée pour que celle-ci conserve ses rôles<sup>147</sup>.

## 4.2. Les modèles invalidés pour *Adamtsl2*

Récemment, un modèle de souris *Adamtsl2*<sup>-/-</sup> a été développé dans le but d'étudier le rôle d'*Adamtsl2* dans le développement pulmonaire. Ces souris ont été obtenues par délétion du gène *Adamtsl2* dans des souris C57BL/6N. Ces souris meurent à la naissance, très probablement à cause de défauts pulmonaires comme chez les enfants atteints de la DG. Une légère communication inter-ventriculaire a aussi été décrite chez ce modèle. Ce modèle a surtout permis de montrer l'interaction entre ADAMTSL2 et FBN2<sup>190</sup>.

Hubmacher et al. ont également observé des vésicules contenant des granules dans les bronches des souris, ce qui avait été aussi décrit dans certaines biopsies de peau, de foie et de cartilage de patients GD<sup>190</sup>. Ils ont identifié ces granules comme accumulation de glycogène mais n'en ont pas élucidé le mécanisme. Ils ont également observé une dérégulation du TGF-β dans l'épithélium des bronches à E17.5 mais qui ne persistait pas à la naissance des souris. Un traitement avec des anticorps dirigés contre le TGF-β a été réalisé à E13.5 et E17.5 sur ce modèle de souris mais

n'a pas restauré le phénotype des bronches, ni eu un effet sur les accumulations de glycogène. Ils en ont ainsi conclu que le phénotype de la dysplasie épithéliale des bronches, accompagné d'une désorganisation du réseau microfibrillaire était probablement dû à un autre mécanisme n'impliquant pas la voie TGF- $\beta$ .

Une mutation du gène ADAMTSL2 (c.660C>T; p.R221C) a été trouvée chez une race de chien, le Beagle<sup>191</sup>. Les chiens porteurs de la mutation développent une pathologie, le syndrome de Musladin-Lueke (SML), maladie autosomique récessive, qui a été la première fois identifiée chez des Beagles dans les années 70 caractérisée par une fibrose de la peau et des articulations. Une brachydactylie et une démarche similaire aux patients atteints de la DG ont été observées chez les Beagles SML (**Figure 22**). De plus, une augmentation du TGF- $\beta$  a été relevée dans les fibroblastes SML.



**Figure 22 : Syndrome de Musladin-Lueke chez le Beagle.** Photo illustrant la démarche sur la « pointe des pieds » et les caractéristiques faciales comme un museau large et des yeux écartés<sup>191</sup>.

# Objectifs

La dysplasie gélophysique (DG) est une pathologie avec des anomalies squelettiques telles que le retard statural, les os longs courts et une brachydactylie. L'équipe a identifié deux modes de transmission autosomiques : un mode récessif associé à des mutations dans *ADAMTSL2* et un mode dominant associé à des mutations dans *FBN1*. *ADAMTSL2* est une glycoprotéine extracellulaire appartenant à un sous-groupe de la grande famille des ADAMTS. A l'inverse des ADAMTS, les ADAMTSL n'ont pas d'activité enzymatique. Bien que des partenaires d'*ADAMTSL2* aient été identifiés, à savoir *LTBP-1*, *FBN1* et *FBN2*, son rôle reste inconnu. *FBN1* code la fibrilline-1 (*FBN1*), une protéine de la matrice extracellulaire et composante du réseau microfibrillaire qui est impliqué dans le stockage du TGF- $\beta$ . *FBN1* a été très étudié pour le syndrome de Marfan, dont il est le gène majeur impliqué dans la pathologie. Son rôle dans le développement squelettique est également inconnu.

**L'objectif principal de ma thèse était de définir les rôles d'*ADAMTSL2* et de *FBN1* dans le développement du squelette, permettant ainsi de mieux comprendre le mécanisme physiopathologique de la DG.**

Pour répondre à cette question, deux modèles murins ont été générés. Le premier, CreCMV; *Adamtsl2*<sup>f/f</sup>, est un modèle knock-out dont le gène *Adamtsl2* a été muté dans le codon initiateur afin d'empêcher l'expression de la protéine. Le second modèle, *Fbn1*<sup>TB5</sup>, est un modèle knock-in dans lequel une mutation provoquant le changement d'un acide aminé dans le domaine TB5 de *Fbn1* a été introduite. Les deux modèles ont pour but de mimer les caractéristiques de la dysplasie gélophysique. Cette thèse s'est focalisée sur l'analyse du squelette et plus particulièrement sur les os longs comme le fémur. Elle est découpée en deux parties portant chacune sur un des modèles.

# Matériels et méthodes/ Résultats

# 1<sup>ère</sup> partie : Caractérisation du modèle murin *Adamtsl2*

Cette première partie avait pour but de comprendre le rôle d'ADAMTSL2 dans le développement du squelette. Afin de comprendre ce rôle, un modèle murin CreCMV; *Adamtsl2*<sup>f/f</sup>, a été généré en partenariat avec la clinique de la souris à Strasbourg. Cette souris a été obtenue grâce à un système CreLox, où des souris porteuses du gène *Cre* sous un promoteur ubiquitaire, les CreCMV, ont été croisées avec des souris dont le codon initiateur du gène *Adamtsl2* est encadré de deux sites Lox. Nous avons ainsi obtenu des souris CreCMV; *Adamtsl2*<sup>+/-</sup> qui ont été croisées entre elles afin d'obtenir des souris mutées homozygotes n'exprimant plus la protéine ADAMTSL2. L'étude de ce modèle nous a permis d'identifier une fonction d'ADAMTSL2 qui, jusqu'alors, était inconnue.

## L'absence d'ADAMTSL2 aboutit à un retard statural chez les souris CreCMV; *Adamtsl2*<sup>f/f</sup>

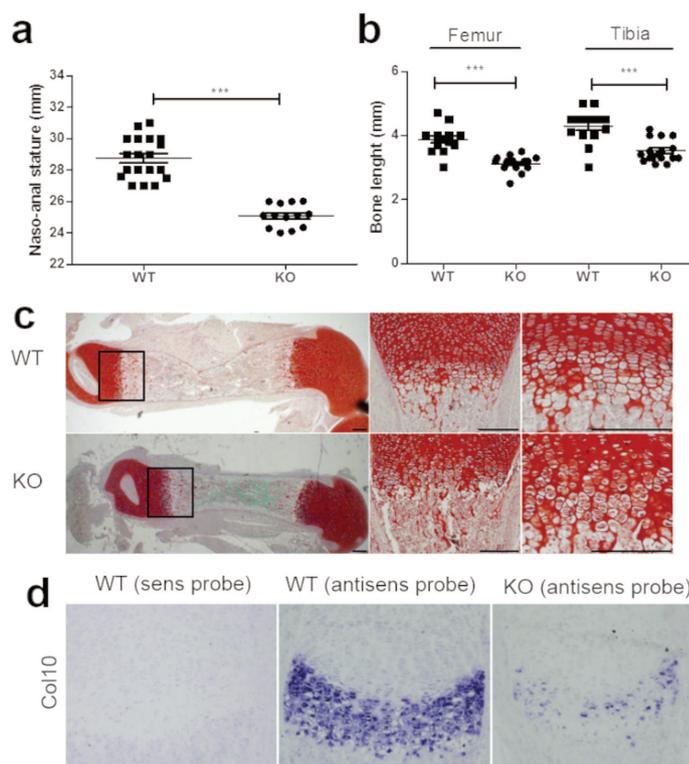
Si les souris CreCMV; *Adamtsl2*<sup>+/-</sup> ont un développement normal et sont fertiles, les souris CreCMV; *Adamtsl2*<sup>f/f</sup> ont un très haut taux de mortalité à la naissance. C'est pourquoi l'étude s'est focalisée sur le stade de développement P1 (1 jour après la naissance). La caractérisation du modèle a mis en évidence un retard statural des CreCMV; *Adamtsl2*<sup>f/f</sup> accompagné d'une réduction de la taille des os longs ainsi qu'une désorganisation de la plaque de croissance (Fig. 1).

**Figure 1 : Retard statural et désorganisation de la plaque de croissance chez les souris CreCMV; *Adamtsl2*<sup>f/f</sup> comparé aux souris sauvages**

**(a)(b)** Histogrammes montrant la taille naso-anale des souris et la taille des os longs (fémur et tibia) des souris sauvages (WT) et des souris CreCMV; *Adamtsl2*<sup>f/f</sup> (KO) (nWT>10 and nKO>10; Test Mann-Whitney U test, \*\*\*=p<0.001)

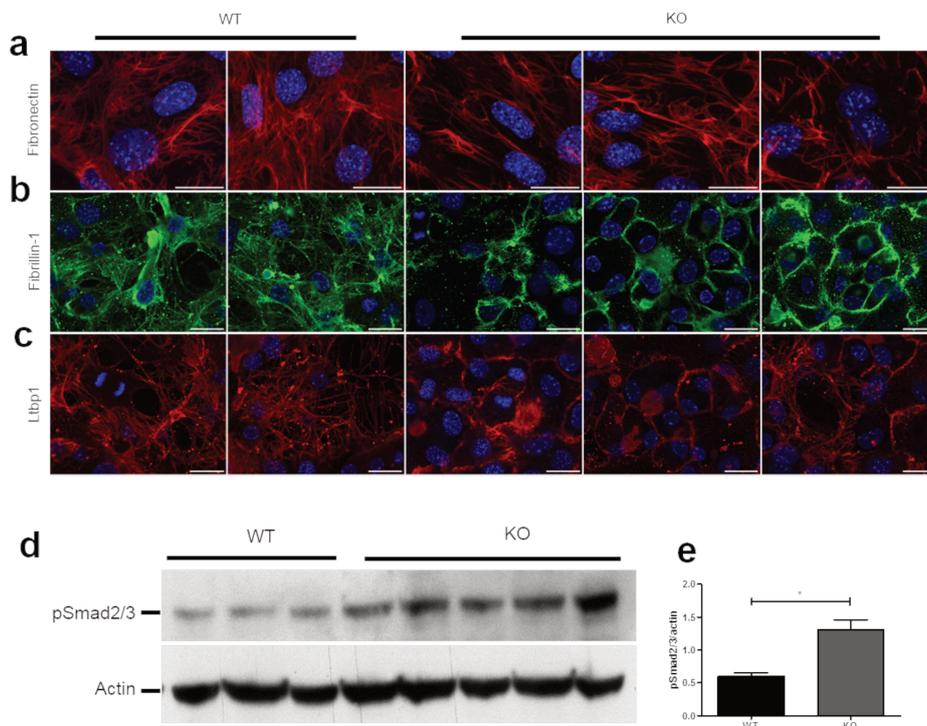
**(c)** Coloration rouge safranine O sur des coupes de fémur montrant les plaques de croissance à différents grossissements (x20, x100 and x200. Echelle : 200 µm)

**(d)** Hybridation *In Situ* sur coupes de fémur montrant l'expression du Col10 (Echelle : 200µm)



## L'absence d'ADAMTSL2 entraîne une désorganisation du réseau microfibrillaire et une suractivation de la voie TGF- $\beta$

Des analyses histologiques ont montré qu'un des composants majeurs de la MEC, la fibronectine, était fortement dérégulé en absence d'Adamtsl2 (**Fig. 2a**). De plus, nous avons observé une diminution des partenaires d'Adamtsl2, Fbn1 et Ltpb1, par immunofluorescence sur des cultures de chondrocytes primaires issus de côtes de souris, et ces résultats ont été confirmés par western blot sur des protéines du tissu fémoral. L'analyse sur les cultures a aussi permis de mettre en évidence que l'absence d'Adamtsl2 menait à une déstructuration du réseau microfibrillaire, aussi bien des fibrilles de Fbn1 que des fibrilles de Ltpb1 (**Fig. 2b et c**). Ces microfibrilles apparaissaient moins denses et plus diffuses que dans les cultures de chondrocytes contrôles. Les microfibrilles des cultures des mutants homozygotes semblaient stagner à la surface de la membrane cellulaire. Le réseau microfibrillaire étant impliqué dans la biodisponibilité du TGF- $\beta$ , l'activation de la voie de signalisation a été étudiée et une suractivation a été démontrée par western blot sur des lysats protéiques de tissus fémoraux et des lysats chondrocytaires, en utilisant un anticorps dirigé contre pSmad2 (Smad2 étant phosphorylé lorsque la voie de signalisation TGF- $\beta$  est activée)(**Fig. 2d et e**).



### Figure 2 : Réseau microfibrillaire et voie de signalisation TGF- $\beta$

Cultures de chondrocytes primaires provenant de côtes de souris à P1 marqués avec des anticorps dirigés contre la fibronectine (**a**), la fibrilline-1 (**b**) et LTBP-1 (**c**) et révélés par un anticorps secondaire fluorescent. (**d**)(**e**) Analyse et quantification par western blot de lysats protéiques provenant de tissus fémoraux avec un anticorps pSMAD2.

### Les autres caractéristiques du modèle murin CreCMV; Adamtsl2<sup>f/f</sup>

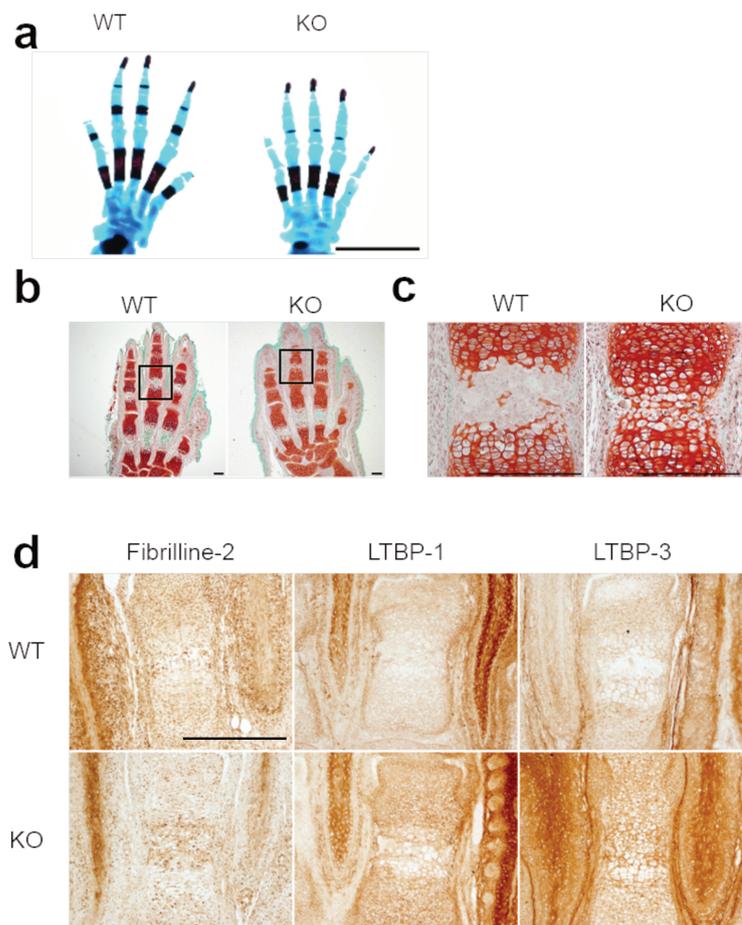
Les souris CreCMV; Adamtsl2<sup>f/f</sup> ont également des extrémités plus courtes, avec un retard d'ossification au niveau des phalanges, donnant ainsi l'impression d'une phalange en moins (**Fig. 3a et b**). Une désorganisation des plaques de croissance des phalanges a également été observée (**Fig. 3c**). Une dérégulation des composants de la MEC a été constatée, avec une augmentation de Fbn2 au niveau des chondrocytes hypertrophiques et une augmentation de Ltbp1 et Ltbp3 dans toute la plaque de croissance (**Fig. 3d**). Ces résultats suggèrent une différence de régulation entre la plaque de croissance des extrémités et celle du fémur.

#### Figure 3 : Raccourcissement des extrémités

(a) Coloration bleu Alcian et rouge Alizarine des pattes supérieures.

(b)(c) Coloration rouge safranine O sur des coupes de pattes avant montrant les plaques de croissance à différents grossissements (x20, x100. Echelle : 200 µm)

(d) Immunohistochimie sur des coupes de phalanges (Echelle : 200 µm)



### Adamtsl2 a un rôle dans la chondrogenèse tout au long du développement squelettique

Dans le but de préciser le rôle dans le cartilage d'Adamtsl2, un modèle CreCol2; Adamtsl2<sup>f/f</sup> (KO<sub>Col2</sub>) a été généré. Les KO<sub>Col2</sub> n'expriment ainsi plus Adamtsl2 dans les tissus cartilagineux, nous permettant de confirmer le rôle d'Adamtsl2 spécifiquement dans ces tissus. Les souris KO<sub>Col2</sub> avaient la même longévité que les souris sauvages (WT) issues de la même portée. Les souris KO<sub>Col2</sub> avaient également un retard statural avec une réduction de la taille des os longs et une désorganisation de la

plaque de croissance mais ne présentaient pas de réduction des extrémités. Ce retard statural a été observé à différents stades de développement (P1 et P30).

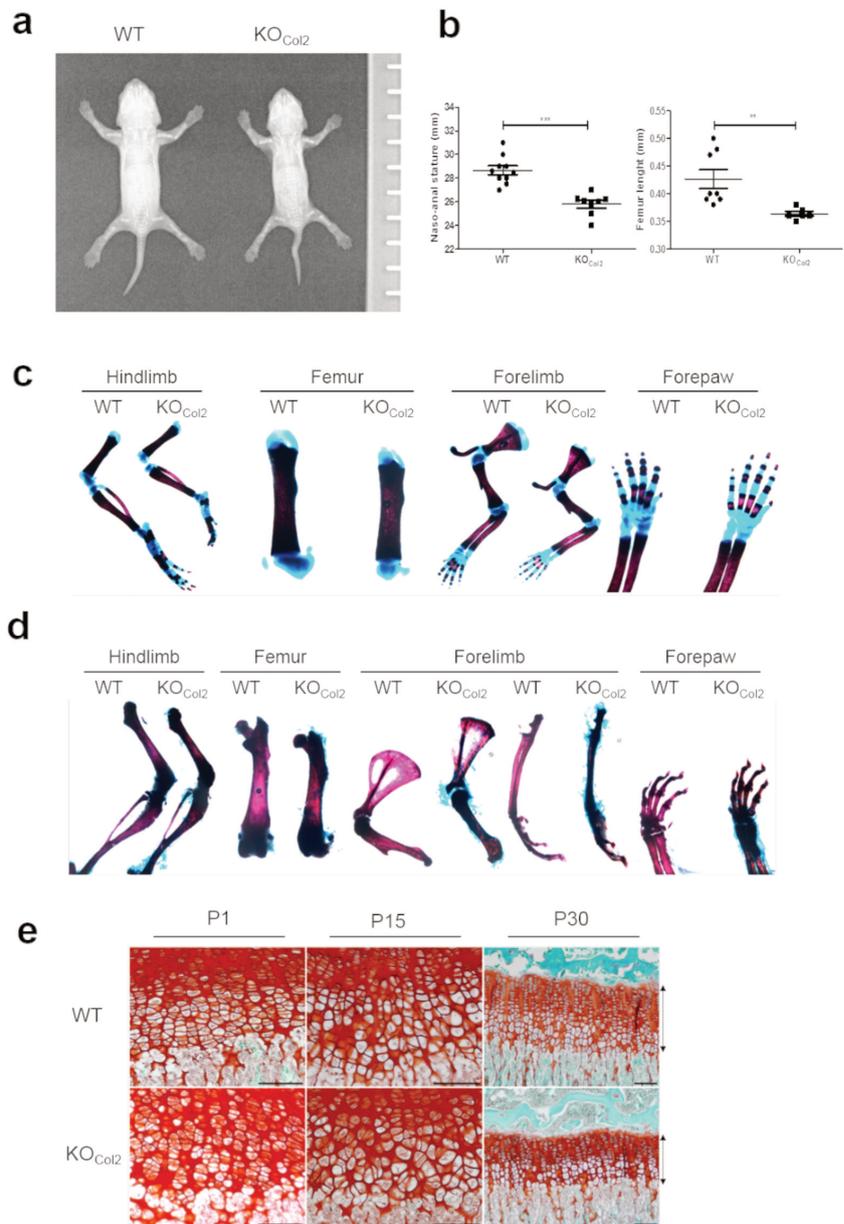
**Figure 3 : Caractérisation de la souris  $KO_{Col2}$**

**(a)** Radiographie du squelette entier d'une souris WT et d'une souris  $KO_{Col2}$  à P1.

**(b)** Histogrammes montrant la taille naso-anale et la taille des fémurs à P1.

Coloration bleu Alcian et rouge Alizarine de différentes parties du squelette de souris  $KO_{Col2}$  et WT à P1 **(c)** et à P30 **(d)**.

**(e)** Coloration rouge safranine O sur des coupes de pattes avant montrant les plaques de croissance à différents stades de développement (Echelle : 200  $\mu$ m)



## ADAMTSL2 regulates chondrogenesis by controlling the structure of microfibrillar network

Laure Delhon<sup>1</sup>, Clémentine Mahaut<sup>1</sup>, Nicolas Goudin<sup>2</sup>, Emilie Gaudas<sup>1</sup>, Kevin Piquand<sup>1</sup>, Valérie Cormier-Daire<sup>1-3</sup> and Carine Le Goff<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR1163, Laboratory of molecular and physiopathological bases of osteochondrodysplasia, Imagine Institute, Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>2</sup> SFR Necker, Imaging Platform, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris France

<sup>3</sup>Department of Medical Genetics, Reference Center for Skeletal dysplasia AP-HP, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France

\*Corresponding author C. Le Goff [carine.le-goff@inserm.fr](mailto:carine.le-goff@inserm.fr)

## **Abstract**

Mutations in ADAMTSL2 gene are responsible for the autosomal recessive form of Geleophysic Dysplasia (GD), characterized by short stature, short extremities and skeletal abnormalities. The exact function of ADAMTSL2 is still unknown. To explore the role of this protein in skeletal development, we generated knockout mouse model, Adamtsl2 KO. We found that Adamtsl2 KO mice displayed skeletal abnormalities, reminiscent of the human phenotype. Adamtsl2 deletion impacted the growth plate formation with abnormal differentiation and proliferation of chondrocytes. TGF $\beta$  signalling impairment was observed in Adamtsl2 KO limbs. Adamtsl2 KO chondrocytes failed to establish microfibrillar network composed by fibrillin1 and LTBP1 fibrils. These studies underscores the function of Adamtsl2 in the maintenance of the growth plate ECM by controlling the microfibrillar network and therefore in regulation of the growth plate organization.

The vertebrate skeleton provides the framework of the body but also structural and metabolic functions. The axial and appendicular skeleton is formed by endochondral ossification, in which chondrocytes form a cartilage template that will ultimately be replaced by bone. During this process, the chondrocytes undergo a process of maturation which involves mesenchymal stem cells condensation, chondrocyte proliferation, cells hypertrophy and mineralization of the extracellular matrix. This process named endochondral ossification is responsible for longitudinal bone growth, during embryonic development and postnatal growth period.

The chondrocytes reside within complex environment wherein their function and homeostasis are finely controlled. This environment is mostly constituted of extracellular matrix (ECM). However, little is known about the impact of the ECM on the skeleton development. The ECM is a complex network of multiple macromolecules which not only give to the cells their structure but also mediate signal transduction, conferring to ECM an essential role in tissue homeostasis<sup>1</sup>. Among those macromolecules, the ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase and Thrombospondin Repeats) proteins are secreted glycoproteins with two specific domains: a catalytic domain and an ancillary domain which is essential for substrate specificity<sup>2</sup>. The ADAMTS are synthesized under zymogen form which is cleaved by a convertase type furin and then secreted in the ECM. This family includes 19 members and has been previously involved in various human biological proteolytic processes (normal or pathological) including connective tissue structure, cancer, coagulation, arthritis, angiogenesis and cell migration<sup>3</sup>. ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15 and 20 belong to the emblematic group of the aggrecanases<sup>4</sup>. The procollagen N propeptidases have been the first group to be involved in human disorder namely Ehlers Danlos type VIIC related to *ADAMTS2* mutations<sup>5</sup>. Many of the ADAMTS have only been characterized and have not yet any associated functions. More recently the ADAMTS-Like (ADAMTSL) family has been described, sharing the same ancillary domain but distinct by the absence of any enzyme activity. This sub family is composed by 7 members ADAMTSL1 (punctin-1)/ADAMTSL6 and papillin. Their exact function is mostly unknown. The papilin, a component of basal membrane has a similar structure than the ADAMTS-like, and is able to act as non-competitive inhibitor of ADAMTS2<sup>6</sup>.

We, previously, identified the molecular basis of Geleophysic dysplasia (GD) as ADAMTS-like 2 (ADAMTSL2)<sup>7</sup>. GD is a rare skeletal disorder characterized by dysmorphic features, short stature, small hands and feet, delayed bone age and shortened tubular bones. ADAMTSL2 is an extracellular glycoprotein with unknown function. During mouse embryogenesis, *Adamtsl2* was expressed most strongly in the third week of gestation. In a human fetus at 35 weeks of gestation, we observed a correlation between the ADAMTSL2 mRNA expression pattern and the clinical manifestations<sup>7</sup>. However, different partners such as Latent TGF $\beta$  Binding Protein 1 (LTBP1), fibrillin-1 (FBN1) and fibrillin-2 (FBN2) have been identified so far<sup>7-9</sup>. FBN1, FBN2 and LTBP1 belong to the same family of fibrillar proteins. We demonstrated that ADAMTSL2 is involved in the microfibrillar network and in TGF $\beta$  signalling studying GD patient fibroblasts<sup>7,8</sup>. We also identified *FBN1* mutations in the autosomal dominant form of GD. All mutations have been localized in TB5 (TGF $\beta$  binding protein like domain 5) domain<sup>8</sup>. Recently, we described *LTBP3* heterozygous mutations in a subset of GD patients<sup>10</sup>.

The severity of the short stature and the skeletal abnormalities observed in GD supported a key role for ADAMTSL2 in endochondral ossification process. We therefore generated knockout (KO) mouse model with total deletion of *Adamtsl2* in order to explore the function of *Adamtsl2* in skeletal development.

## Results

### Generation of *Adamtsl2* KO mouse model

To investigate the role of *Adamtsl2* in development, we generated *Adamtsl2* KO mice using the CMV Cre promoter to delete *Adamtsl2* expression in all tissues. *Adamtsl2*<sup>f/f</sup> mice in which exon 2 of *Adamtsl2* gene is flanked by LoxP sites were generated as described in methods and Fig. 1a. The deletion of the fragment was checked by PCR on genomic DNA from mouse tails (Fig. 1b). The litters resulting of breeding pairs of mice CMVCre*Adamtsl2*<sup>f/+</sup> followed the normal Mendelian distribution. The heterozygotes were viable and fertile. They did not show any skeletal phenotypes (data not

shown). The absence of Adamtsl2 expression in Adamtsl2 KO mice was visualized by *in situ* hybridization on growth plate of mouse femur and confirmed by Western blot analyses using liver, skin and bone extracts from Adamtsl2 KO mice compared to control animals (Fig. 1c and d). All the experiments on Adamtsl2 KO mouse model have been performed at postnatal day 1 (P1) due to high level of lethality.

### **Multiple skeletal abnormalities in Adamtsl2 KO mice**

X rays and total naso-anal length measures demonstrated the reduced stature ( 12.8%) of the Adamtsl2 KO compared to controls (Fig. 2 a and b). Staining with alcian blue and alizarin red of whole mount skeleton revealed that all Adamtsl2 KO mice exhibited skeletal anomalies including significant forelimb and hindlimb shortening, impaired digit elongation, slight ovoid deformation of the vertebrae, shortened muzzle and calvaria (Fig. 2c and d).

### **Adamtsl2 controls chondrocyte function**

After condensation of the mesenchymal cells, the majority of these cells become chondrocytes that go into proliferation and differentiation as hypertrophic chondrocytes. As shown in Fig. 3 a, long bone length (femur) was shorter in Adamtsl2 KO compared to wild type (wt) mice (Fig. 3a left panel). Loss of Adamtsl2 greatly impacted chondrocyte size and organization in the growth plate (Fig. 3a right panel). In the prehypertrophic zone of the wt femoral growth plate, the chondrocytes were discoid and arranged in to regular columns like stacks of coins which were parallel to the long axis of the cartilage (Fig. 3a upper panel). By contrast, Adamtsl2 KO chondrocytes failed to form regular columns. Instead of forming the highly organized hypertrophic zone in the middle of long bones as observed in control animals, the Adamtsl2 KO chondrocytes were scattered throughout the growth plate (Fig. 3a lower panel). The size of hypertrophic chondrocytes is increased in Adamtsl2 KO mice (Fig. 3b). Alcian blue and alizarin red and Safranin O staining of Adamtsl2 KO mouse forelimb digits showed a defective elongation of digits (Fig. 3c). In addition loss of Adamtsl2 delayed formation of ossification center in phalanx bones (Fig. 3d).

### **Adamtsl2 deletion impacts the chondrocyte proliferation and differentiation**

We next evaluated the expression of chondrocyte markers by *in situ* hybridization of P1 growth plate cartilage RNA (Fig. 3e). Markers for hypertrophic chondrocytes such as collagen 10 (Col10), for prehypertrophic chondrocytes as Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and for proliferative chondrocytes, collagen 2 (Col2) and SRY box 9 (Sox9) were analyzed. As shown in Fig. 3e and f, Col10 positive zone in *Adamtsl2* KO mice growth plate was narrower with weaker signal intensity than in the control samples. The expression of the PTHrP was increased in hypertrophic *Adamtsl2* deficient zone (Fig. 3e lower panel). While Sox 9 was increased in the *Adamtsl2* Ko mice (Fig. 3g and h), one of its direct downstream targets in chondrocytes, Col2 had no altered expression (Fig. 3e upper panel).

Analysis of chondrocyte proliferation using Ki67 labelling revealed that the chondrocyte proliferation rate was significantly increased in the *Adamtsl2* deficient growth plates compared to controls at P1 (Fig. 3i and j). Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining of P1 femoral sections demonstrated that chondrocyte apoptosis in the proliferative zone was unchanged in *Adamtsl2* KO mice compared to control animals (Fig. 3k).

### **Loss of *Adamtsl2* impairs microfibrillar network and TGF $\beta$ signaling**

Because *Adamtsl2* is an extracellular matrix protein, we then analyzed the impact of *Adamtsl2* deficiency on the structure of the ECM in the growth plate. Immunohistochemical analysis revealed a decreased expression of *Ltbp1*, *Fbn1*, as well as fibronectin in ECM of *Adamtsl2* deficient femoral growth plate sections compared to controls (Fig. 4a and b). In addition, we observed an increased intracellular labelling of *Fbn2* in *Adamtsl2* deficient growth plates (Fig. 4a and b, middle panel). The expression of *Ltbp3* was not drastically altered in *Adamtsl2* KO mice but the localization of *Ltbp3* changed between the WT and the mutant from extracellular to intracellular (Fig. 4a and b). Quantification of *Fbn1* and *Ltbp1* protein levels by Western blot analyses confirmed the decreased expression of these proteins in femoral growth plates of *Adamtsl2* KO mice compared to WT animals (Fig. 4c, d and e).

Since Fbn1, Ltp1 and fibronectin are essential components in forming microfibrillar network, we then evaluated the formation of microfibrillar network in primary cell cultures of chondrocytes isolated from *Adamtsl2* KO and WT ribs. Visualization of fibrillins by confocal microscopy, led us to observe that wild type chondrocytes deposited abundant fibrillin 1 fibrils as well as Ltp1 fibrils and fibronectin forming large dense aggregates (Fig. 5). By contrast, *Adamtsl2* deficient chondrocytes failed to establish prominent bundles of fibrillin fibrils with fibrils being thinner and more diffuse (Fig. 5b). In addition, examination of the microfibrillar network of LTBP1 fibrils indicated that the fibrils were much thinner and less bundled in *Admts2* Ko animals compared to controls (Fig. 5c). The fibronectin network was also affected in *Adamtsl2* deficient chondrocytes (Fig.5a).

Considering the role of Fbn1 and Ltp1 in activation and storage of TGF $\beta$ , we investigated whether the loss of *Adamtsl2* in growth plate could impair TGF $\beta$  signaling<sup>11</sup>. Analysis of the activation of TGF $\beta$  signaling pathway by western blot showed that Smad2/Smad3 phosphorylation was increased in *Adamtsl2* deficient limbs compared to that of WT limbs (Fig. 6a and b). Immunohistochemical analysis revealed an increase of TGF $\beta$  in *Adamtsl2* deficient femoral growth plate (Fig. 6c). Finally, we observed a similar increase of Smad2/Smad3 phosphorylation in chondrocyte cell lysates as shown in total limbs (Fig. 6d).

## **Discussion**

In the present study, we demonstrated that *Adamtsl2* exerts a major role in skeleton development by controlling endochondral ossification as suggested by our finding of mutations in *ADAMTSL2* in Geleophysic Dysplasia. The skeletal abnormalities of *Adamtsl2* KO mouse model further demonstrated the role of *Adamtsl2* in cartilage development and suggested that *Adamtsl2* is a major positive regulator of chondrogenesis during mouse skeletal development.

Our findings showed that *Adamtsl2* controls chondrocyte proliferation and differentiation by controlling the expression of Col10, PTHrP and Sox9. The chondrocyte proliferation is increased in the *Adamtsl2* deficient growth plate as well as PTHrP and Sox 9 expression. In opposite, Col10, a

marker of hypertrophic chondrocytes, has a decreased expression. Indian hedgehog (IHH) is known to play a critical role in the activation of chondrocyte proliferation<sup>12</sup>. Reduced hypertrophy and increased proliferation may result from the dysregulation of the IHH/PTHrP axis which is known to inhibit the chondrocyte hypertrophy<sup>12</sup>. The transcription factor Sox9 is known to regulate positively the expression of ECM components in cartilage<sup>13</sup>. These findings may suggest the existence of a retro control loop leading to maintain ECM components such as Adamtsl2 microenvironment in cartilage.

To date, only few proteins of ADAMTS family have been involved in dysregulation of endochondral ossification process in mouse model. Recently, Adamtsl4 has been associated with a role in anchorage of zonule fibers to the lens capsule by studying homozygous Adamtsl4<sup>tvrm267</sup> mice<sup>14</sup>. Mutations in *ADAMTSL4* cause ectopia lentis<sup>15</sup>. Interestingly, ADAMTS10 and ADAMTS17 are involved in the same spectrum of skeletal human pathologies than ADAMTSL2. Indeed, *ADAMTS10* and *ADAMTS17* mutations are responsible respectively for Weill Marchesani Syndrome characterized by short stature, short extremities and microspherakia and Weill Marchesani syndrome like with also short stature and ocular defects<sup>16,17</sup>. The exact function of ADAMTS10 and ADAMTS17 are not yet known even if they seem to be involved in fibrillin-1 biogenesis. Moreover, it has been shown that ADAMTS7 and ADAMTS12 have a role in cartilage development by cleaving COMP protein in cartilage<sup>18,19</sup>. Interestingly, overexpression of Adamts7 in mice led to a dwarf like status during the early stages of mouse development suggesting a role of Adamts7 in chondrogenesis repression<sup>20</sup>.

The subsequent analysis of the cartilage growth plate in Adamtsl2 KO mice gave us more insight into the morphological changes and pathomolecular mechanisms, both induced by the Adamtsl2 defect. Adamtsl2 seems essential for chondrocyte column formation. Importantly, the absence of correct formation of chondrocyte column in Adamtsl2 KO mice suggests the importance of ECM in this process. We have shown previously that ADAMTSL2, which is an extracellular glycoprotein, interacted with LTBP1, FBN1 and FBN2, all being members of the fibrillin family<sup>7-9</sup>. Here, we reported that the deletion of Adamtsl2 in the growth plate drives a dysregulation of Fbn1, Ltbp1 and Fbn2. The analysis of the Adamtsl2 KO growth plate ECM showed a decrease in fibronectin expression which was equally accompanied by a decreased expression of Ltbp1 and Fbn1.

Fibronectin is known to be the origin point of ECM assembly by being a docking site for LTBP1 incorporation and regulating the pericellular FBN1 microfibril assembly<sup>21-22</sup>. Our data demonstrated that the fibronectin expression may be regulated by the presence of Adamtsl2. We have also identified heterozygous mutations in FBN1 gene in GD suggesting that a defect of FBN1 function is also associated with this phenotype<sup>8</sup>. Relatively little is known about the molecular mechanisms of fibrillin assembly into microfibrils. Previously we have shown that Adamtsl2 is involved in fibrillin-1 fibril biogenesis<sup>7,23</sup>. The abnormal structural appearance of fibrillin microfibrils observed in the Adamtsl2 KO animals confirmed the role of Adamtsl2 in fibrillin-1 microfibril formation. However the structure of Ltp1 microfibrils in Adamtsl2 KO mice was more altered compared to controls suggesting a function of Adamtsl2 in Ltp1 microfibril deposition. Altogether we proposed that Adamtsl2 may be the scaffold bearing microfibrillar network composed by Ltp1, Fbn1 and Fbn2 fibrils.

FBN1 mutations identified in GD have been shown to cause disruption of heparan sulfate interactions<sup>24</sup>. Heparan sulfate is proposed to regulate the early stages of microfibril assembly<sup>25</sup>. Heparan sulfate chains bind to integrins, form complexes which act as cell surface receptors for extracellular proteins<sup>26</sup>. The binding site of ADAMTSL2 in FBN1 is located closed to the vicinity of the RGD site of FBN1, an important site for integrin binding<sup>27</sup>. Interestingly the mutant mice lacking  $\beta 1$  integrin in chondrocytes develop a chondrodysplasia and mutant chondrocytes fail to arrange into columns in the growth plate<sup>28</sup>. As fibrillin1, we hypothesized that Adamtsl2 may interact with HS and therefore indirectly  $\beta 1$  integrin. However, the molecular mechanisms of this cooperation deserve to be further studied.

Altogether, our findings support the idea that the complex formed by Adamtsl2, Ltp1, Fbn2 and Fbn1 created a new microenvironment controlling the chondrocyte column formation. The impaired ability of chondrocytes to form columns in the absence of Adamtsl2 could be explained by the insufficient adhesion of the Adamtsl2 null chondrocytes to the surrounding matrix. The lack of chondrocytes adhesion may be due to a loss of interaction between the Adamtsl2 deficient microenvironment and a complex formed of  $\beta 1$  integrin/HS known to have a role in cell adhesion. A microenvironment composed by Adamts10/ Adamtsl3/ Fbn1 has been identified as a regulator of the

skin thickness and the musculoskeletal growth<sup>27</sup>. A dysregulation of this structure lead to Weill Marchesani syndrome, another acromelic dysplasia characterized by short stature, microspherakia and skin fibrosis.

We, previously, reported that abnormal TGF $\beta$  signaling in GD patient fibroblasts may contribute to the pathophysiology of geleophysic dysplasia<sup>7</sup>. Fibrillin 1 microfibrils constitute a storage of TGF $\beta$  interacting covalently with LTBP1. Here, the activation of TGF $\beta$  signaling in the *Adamtsl2* deficient growth plate may be explained by the altered configuration of the microenvironment which might facilitate the activation of the large latent complex formed by TGF $\beta$  and LTBP1. In cartilage, TGF $\beta$  plays also a primary role in regulating positively ECM composition such as Col2<sup>29</sup>. Then, TGF $\beta$  may be a part of a regulation loop as a consequence of the ECM dysregulation.

This original *Adamtsl2* deficient mouse model gives new insight into the pathogenic events underlying geleophysic dysplasia. Overall, reduced hypertrophic chondrocytes and disorganized chondrocyte column contribute to decreased longitudinal growth of long bones. We presently demonstrated that *Adamtsl2* has an important role of scaffold in the growth plate ECM and the column structure. Moreover *Adamtsl2* has a regulatory function in the microenvironment of the growth plate as described in the schema of Fig.7. Study of *Adamtsl2* provides important information in mechanisms controlling chondrogenesis by pointing out the pivotal role of ECM in this mechanism and allows new insights in GD.

## Methods

### Generation of *Adamtsl2*<sup>ff</sup> mice

To generate *Adamtsl2*<sup>ff</sup> mice, an *Adamtsl2*<sup>ff</sup> targeting vector was generated as described in Fig1 with the collaboration of the Clinique de la Souris (Strasbourg). The germ-line transmission of the floxed allele was obtained by crossing the chimeric mice with C57BL/6 mice. The *Adamtsl2*<sup>ff/+</sup> mice were intercrossed to generate homozygous floxed mice (*Adamtsl2*<sup>ff/ff</sup>). Both homozygous *Adamtsl2*<sup>ff/ff</sup> and heterozygous *Adamtsl2*<sup>ff/+</sup> displayed no phenotypic changes. *Adamtsl2*<sup>ff/ff</sup> were bred with CMVCre

mice to obtain CMVCre Adamts12<sup>fl</sup> mice. Genotyping were performed with tail or toe lysis and Direct PCR Lysis Reagent (Viagen Biotech Cat # 101-T, 102-T). All research protocols were approved by the respective Institutional Animal Care and Use committees of IMAGINE institute/Necker hospital and Paris Descartes university.

### **Bone histology**

All mice were analyzed by X-Ray (Faxitron MX-20DC12 Edimex) and measured after euthanasia. Bones for blue alcian and alizarine red staining were conserved in ethanol 95% until the beginning of the protocol. In brief, bones, conserved in ethanol 95%, were transferred in acetone overnight to eliminate fat tissues. Then bones were rinsed in H<sub>2</sub>O and incubated in blue Alcian dissolved in ethanol 95% and acetic acid during 24 hours or more, depending on bone age. Then bones were rinsed in ethanol 70% during 6 to 8 hours, according to staining intensity, and transferred overnight in alizarine red dissolved in potassium solution. Bones were placed in 1% potassium/20% glycerol solution until the total degradation of other tissues. For storage, stained bones were conserved in ½ glycerol/½ ethanol absolute and observe with binocular microscope.

For histology, tissues were fixed in 4% paraformaldehyde at 4 °C during 24 hours, decalcified in 0.5 M EDTA (pH7.4) for one week and embedded in paraffin. Bone sections of 5µm were performed with microtome (Thermo Scientific) and used for Safranin O staining, immunohistological analysis and *in situ* hybridization.

For Safranin O staining, tissue sections were deparafinized and rehydrated with ethanol. Slides were stained with Weigert's iron hematoxylin working solution for 5 minutes then rinsed in running tap water for 4-5 minutes. Slides were stained with 0,02% fast green (FCF) solution for 30 seconds then rinse with 1% acetic acid solution for 30 seconds and stained in 0.1% safranin O solution for 45 minutes. To finish, slides were mounted by using Euparal Mounting Medium.

### ***In Situ* Hybridization**

The PCR product was used to generate antisense and sense cRNA probes (see table1) with the T7 DIG RNA Labeling kit (Roche) and digoxigenin-11-UTP (Roche) according to the manufacturer's

specifications. Paraffin sections of paraformaldehyde-fixed tissues obtained from CMVCreAdamts12 model were hybridized to 1µg /ml DIG-11-UTP-labeled Col2a1, Col10 or PthRP cRNA probes as previously described. After staining with BCIP/NBT in the dark (Roche) according to the manufacturer's recommendations, the slides were observed using Olympus PD70-1X2-UCB microscope and analyzed with CellSens and ImagineJ.

Probes	Gene	Sequence
Col2 S forward	Col2a1 (sens probe)	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAACTGGTAAGTGGGGCAAGAC
Col2 S reverse	Col2a1 (sens probe)	CCACACCAAATTCCTGTTC A
Col2 AS forward	Col2a1 (antisens probe)	ACTGGTAAGTGGGGCAAGAC
Col2 AS reverse	Col2a1 (antisens probe)	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGACCACACCAAATTCCTGTTC A
Col10a1 S forward	Col10 (sens probe)	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAACGGCCTCTACTCCTCTGA
Col10a1 S reverse	Col10 (sens probe)	CGATGGAATTGGGTGGAAAG
Col10a1 AS forward	Col10 (antisens probe)	CAAACGGCCTCTACTCCTCTGA
Col10a1 AS reverse	Col10 (antisens probe)	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGATGGAATTGGGTGGAAAG
PthRP S forward	PthRP (sens probe)	TAATACGACTCACTATAGGGAGA GAACATCAGCTACTGCATGACAAG
PthRP S reverse	PthRP (sens probe)	TCTGATTTTCGGCTGTGTGGATC
PthRP AS forward	PthRP (antisens probe)	GAACATCAGCTACTGCATGACAAG
PthRP AS reverse	PthRP (antisens probe)	TAATACGACTCACTATAGGGAGA TCTGATTTTCGGCTGTGTGGATC

Table1. Riboprobe sequences

### Proliferation and apoptotic studies

Apoptosis was analysed using Dead-End™ Fluorimetric TUNEL assay (Promega). In order to reduce the background and the number of false positives the unmasking was performed using citrate buffer heat treatment instead of standard proteinase K unmasking<sup>30</sup>. Positive controls were generated by DNase I (Roche) treatment of the samples. The slides were mounted in ProLong® with DAPI (Life Technologies). Proliferation was analyzed with antibody Ki67 (Abcam ab92393) and DAB staining (see section above).

### Immunohistochemical analysis

Sox9 (1:50; Santa Cruz Biotechnology sc-20095), Fibronectin (1:250; Abcam ab2413), LTBP1 (1:100; Abcam ab78294), LTBP3 (1:50; Millipore ATB316), Fibrillin-1 (1:50; Sigma-Aldrich SAB4500863), Fibrillin-2 (1:400; Abcam ab53804) and TGFβ-1 (1:100; Abcam ab66043) antibodies were used for immunohistochemical staining of 5µm paraffin sections obtained from mouse hindlimbs. Immunohistochemistry was done using an indirect (two-step) immunoenzymatic method in

which the secondary goat-anti-rabbit antibody was labeled with horseradish peroxidase (HRP, Dako). HRP was detected using 3-3'-diaminobenzidine (DAB, Abcam) as the substrate. Pictures were taken with Olympus PD70-1X2-UCB microscope and analyzed with CellSens and ImagineJ.

### **Immunofluorescence and primary chondrocytes cultures**

Mice were sacrificed and chondrocytes were isolated from rib cage, were put in cultures as previously described<sup>31</sup>. Chondrocytes were grown in cell culture chambers with DMEM/HamF12 (with 10% SVF and antibiotics) until confluence. Then, cells were fixed with 3% formaldehyde during 20min. After a treatment of glycine 0.2M, cells were blocked with 3% BSA during 1h, then incubated with primary antibody diluted in 3% BSA overnight. The day after, cells were rinsed 3 times with PBS/MgCL<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>, incubated with secondary antibody diluted in BSA 3% during 45min. The cell culture chambers were mounted in ProLong® with DAPI (Life Technologies) and analyzed with confocal microscope LSM-700 from platform of Cell Imagery of Imagine Institute. Pictures were analyzed with ImageJ.

### **Western blot**

Tissues for protein extractions were placed in dry ice during dissections and conserved at -80°C until its utilization. For protein extraction, whole tissues were lysed with SCIENCEWARE® Liquid Nitrogen Cooled Mini Mortar and RIPA buffer (Thermo Scientific) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific). Protein extractions were dosed with Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Antibodies recognizing Fbn1 (1:1000; Sigma-Aldrich AV37969), Phospho-Smad2 (Ser465/467) (1:500; Cell signaling #3101S) and Ltbp1 (1:250; Abcam ab78294) were used. The levels of proteins were normalized to actin proteins (detected using actin antibody (1:1000; Abcam ab95437)).

### **Statistical analysis**

All statistical analysis were done with Graph Pad Prism 5.03.

### *References*

1. Melrose, J., Shu, C., Whitelock, J. M., Lord, M. S. The cartilage extracellular matrix as a transient developmental scaffold for growth plate maturation. *Matrix Biol.* **52-53**, 363-383 (2016).
2. Dubail, J., Apte, S. S. Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics. *Matrix Biol.* **44-46**, 24-37 (2015)
3. Apte, S. S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J. Biol. Chem.* **284**, 31493-31497 (2009).
4. Nandadasa, S., Foulcer, S., Apte, S. S. The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. *Matrix Biol.* **35**, 34-41 (2014).
5. Colige, A. *et al.* Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 308-317 (1999).
6. Kramerova, I. A. *et al.* Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development.* **127**, 5475-5485 (2000).
7. Le Goff, C. *et al.* ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat. Genet.* **40**, 1119-1123 (2008)
8. Le Goff, C. *et al.* Mutations in the TGFβ binding-protein-like domain 5 of FBN1 are responsible for acromicric and geleophysic dysplasias. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 7-14 (2011).
9. Hubmacher, D. *et al.* Adamtsl2 deletion results in bronchial fibrillin microfibril accumulation and bronchial epithelial dysplasia - a novel mouse model providing insights into geleophysic dysplasia. *Dis. Model. Mech.* **8**, 487-499 (2015).
10. McInerney-Leo, A. M. *et al.* Mutations in LTBP3 cause acromicric dysplasia and geleophysic dysplasia. *J. Med. Genet.* **53**, 457-464 (2016).
11. Chaudhry, S. S. *et al.* Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. *J. Cell. Biol.* **176**, 355-367 (2007).
12. Mak KK, Kronenberg HM, Chuang PT, Mackem S, Yang Y. Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development.* 2008 Jun;135(11):1947-56.
13. Liu, C. J. *et al.* Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by Sox9, Sox5, and Sox6 transcription factors and CBP/p300 coactivators. *Front. Biosci.* **12**, 3899-3910 (2007).
14. Collin, G. B. *et al.* Disruption of murine Adamtsl4 results in zonular fiber detachment from the lens and in retinal pigment epithelium dedifferentiation. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6958-6974. (2015).
15. Ahram, D. *et al.* A homozygous mutation in ADAMTSL4 causes autosomal-recessive isolated ectopia lentis. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 274-278 (2009).
16. Dagoneau, N. *et al.* ADAMTS10 mutations in autosomal recessive Weill-Marchesani syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 801-806 (2004).
17. Morales, J. *et al.* Homozygous mutations in ADAMTS10 and ADAMTS17 cause lenticular myopia, ectopia lentis, glaucoma, spherophakia, and short stature. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 558-568 (2009).
18. Liu, C. J. *et al.* ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB J.* **20**, 988-990 (2006).
19. Liu, C. J. *et al.* ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 15800-15808 (2006).
20. Lai, Y. *et al.* ADAMTS-7 forms a positive feedback loop with TNF-α in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1575-1584 (2014).

21. Dallas, S. L. *et al.* Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *J. Biol. Chem.* **280**, 18871-18880 (2005).
22. Kinsey, R. *et al.* Fibrillin-1 microfibril deposition is dependent on fibronectin assembly. *Cell Sci.* **121**, 2696-2704 (2008).
23. Hubmacher, D., Apte, S. S. Genetic and functional linkage between ADAMTS superfamily proteins and fibrillin-1: a novel mechanism influencing microfibril assembly and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3137-3148 (2011).
24. Cain, S. A. *et al.* Fibrillin-1 mutations causing weill-marchesani syndrome and acromicric and geleophysic dysplasias disrupt heparan sulfate interactions. *PLoS One.* **7**, e48634 (2012)
25. Yadin, D. A. *et al.* Structure of the fibrillin-1 N-terminal domains suggests that heparan sulfate regulates the early stages of microfibril assembly. *Structure.* **21**, 1743-1756 (2013).
26. Ballut, L. *et al.* Mapping of heparin/heparan sulfate binding sites on  $\alpha\beta 3$  integrin by molecular docking. *J. Mol. Recognit.* **26**, 76-85 (2013).
27. Sengle, G. *et al.* Microenvironmental regulation by fibrillin-1. *PLoS Genet.* **8**, e1002425 (2012).
28. Aszodi, A. *et al.* Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.* **17**, 2465-2479 (2003).
29. Morikawa, M., Derynck, R., Miyazono, K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8** (2016).
30. Piróg-Garcia, K. A. *et al.* Reduced cell proliferation and increased apoptosis are significant pathological mechanisms in a murine model of mild pseudoachondroplasia resulting from a mutation in the C-terminal domain of COMP. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2072-2088 (2007).
31. Jonquoy, A. *et al.* A novel tyrosine kinase inhibitor restores chondrocyte differentiation and promotes bone growth in a gain-of-function Fgfr3 mouse model. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 841-851 (2011).

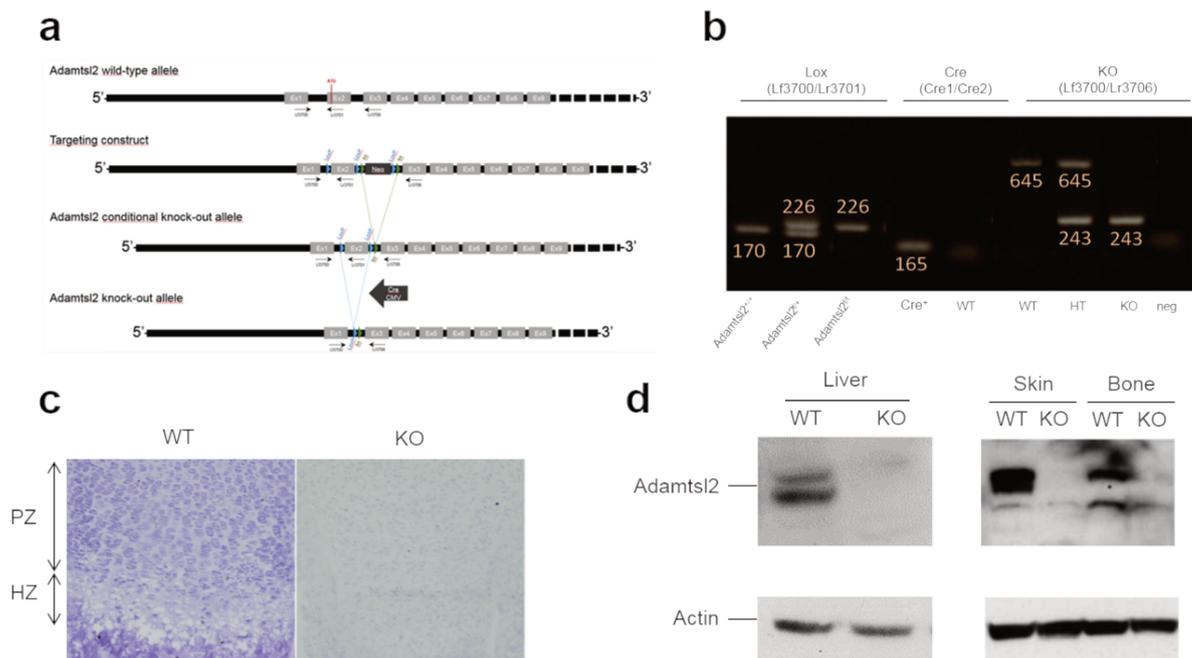
## Acknowledgments

The work presented here was supported by ANR R09183KS and FP7 Sybil program, (to V. Cormier-Daire), FRM prix Pomaret de Lalande (to C. Le Goff and L. Delhon). This program has received a state subsidy managed by the National Research Agency under the “Investments for the future” program (ANR-A0-IAHU-01). We thank the animal facilities and histology platform from Imagine institute. We thank also the mouse clinic from Strasbourg, (IGBMC).

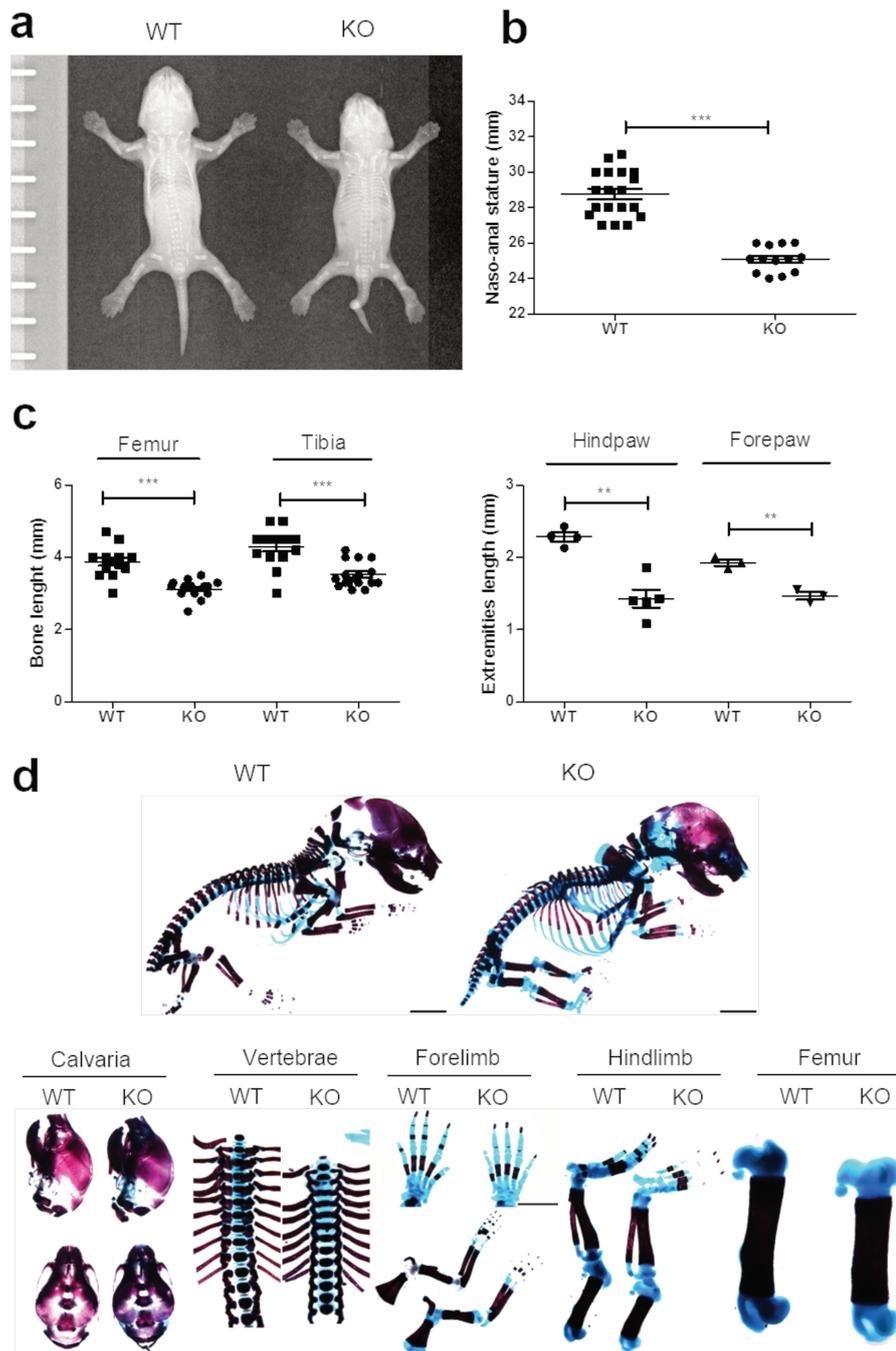
## Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

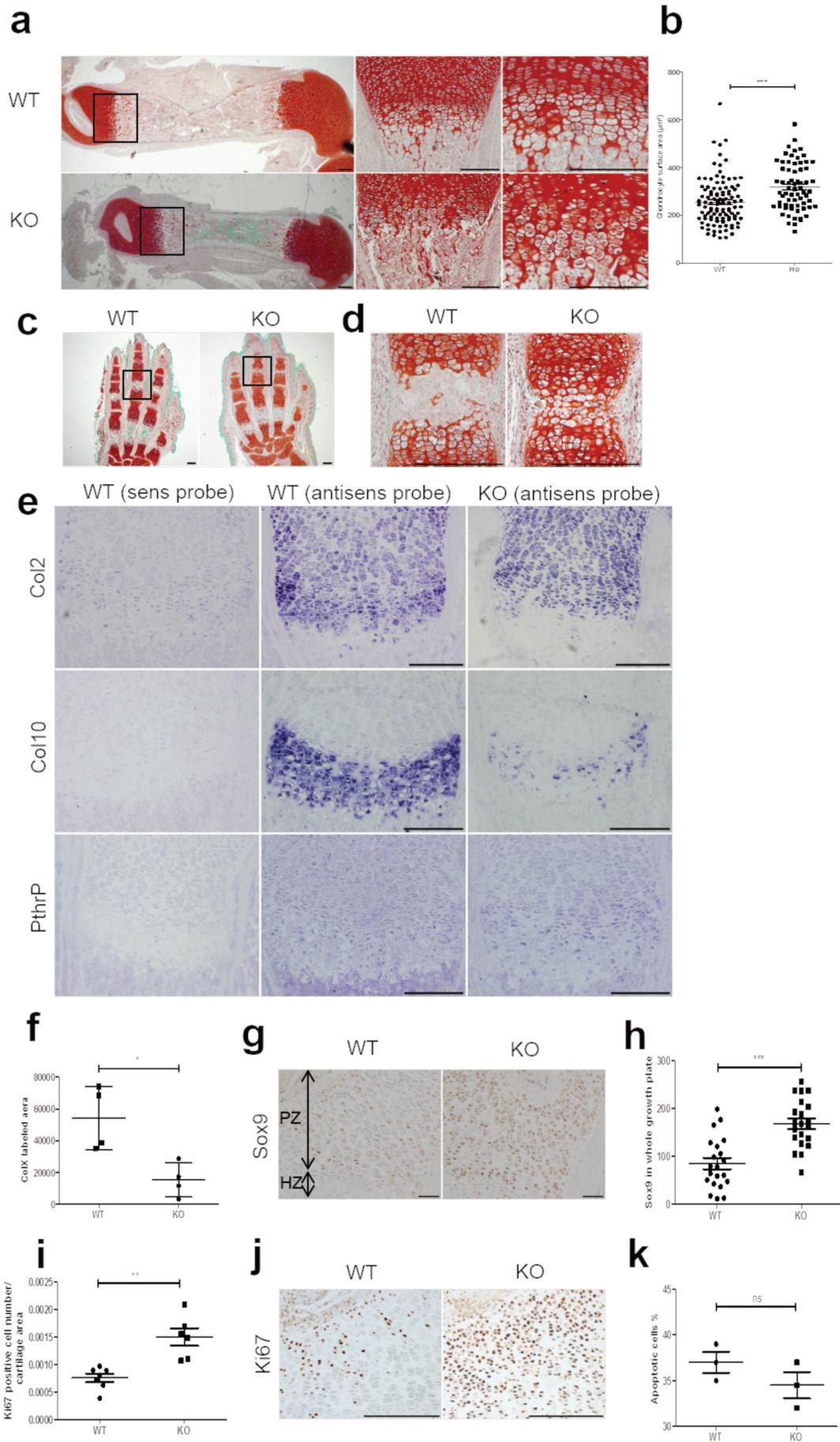
## Figures



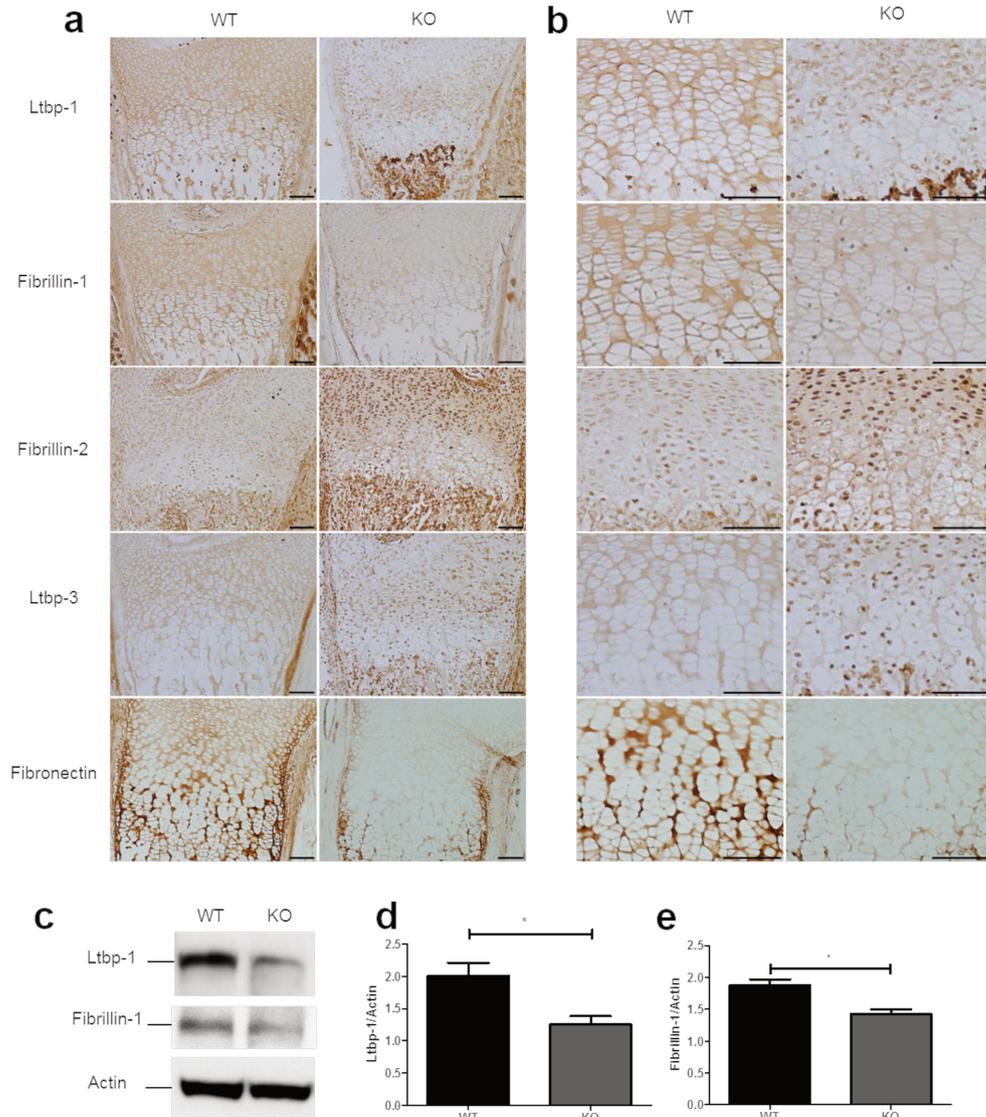
**Figure 1.** Generation of Adamtsl2 KO mice. **(a)** The targeted *Adamtsl2* locus. A neomycin selection cassette was placed between the exon 2 and 3. This cassette was removed by breeding targeted mice to FLP mice. Cre-Mediated recombination of the loxP sites led to deletion of exon 2 in where is located the ATG of Adamtsl2 gene. Probes used for genotyping are indicated with arrow. **(b)** Genotyping electrophoresis showing deletion of targeted sequence in *Adamtsl2*. **(c)** *In Situ* Hybridization on femoral growth plate sections using an antisense riboprobe for *Adamtsl2* in WT and Adamtsl2 KO mice. **(d)** WT and Adamtsl2 KO protein extracts from bone, liver and skin tissues subjected to Western blot analysis for Adamtsl2 level, normalized with actin level.



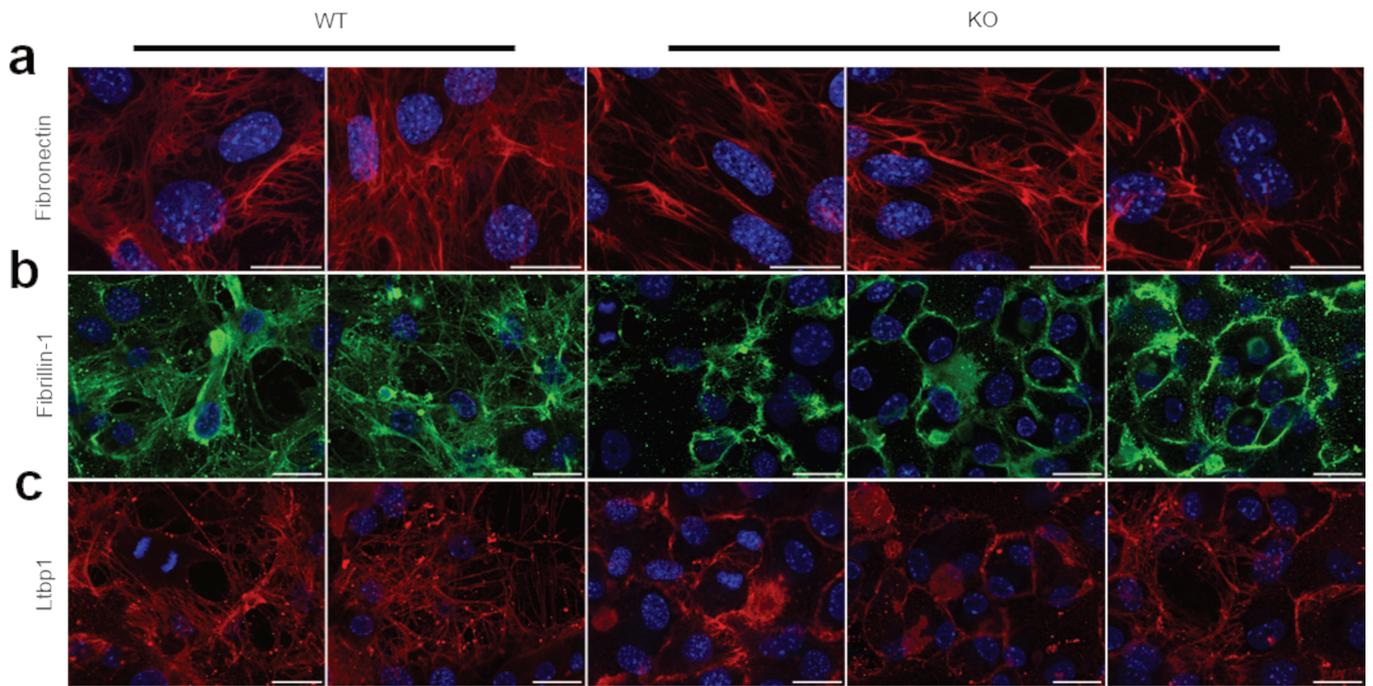
**Figure 2.** Adamtsl2 KO mice have skeletal defects at birth. **(a)** X-rays of the whole skeleton of WT and Adamtsl2 KO mice. **(b)** quantitative data from **a**. **and (c)** quantitative data from **d** ( $n_{WT}>10$  and  $n_{KO}>10$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM, \* denotes  $p < 0.05$ , \*\* denotes  $p < 0.01$ ) **(d)** Skeletons of new born WT and Adamtsl2 KO mice stained with Alcian Blue (cartilage) and Alizarin Red (bone). Lower panel Calvaria, Vertebrae, forelimb, hindlimb and femur from new born WT and Adamtsl2 KO mice. Scale bar, 1mm.



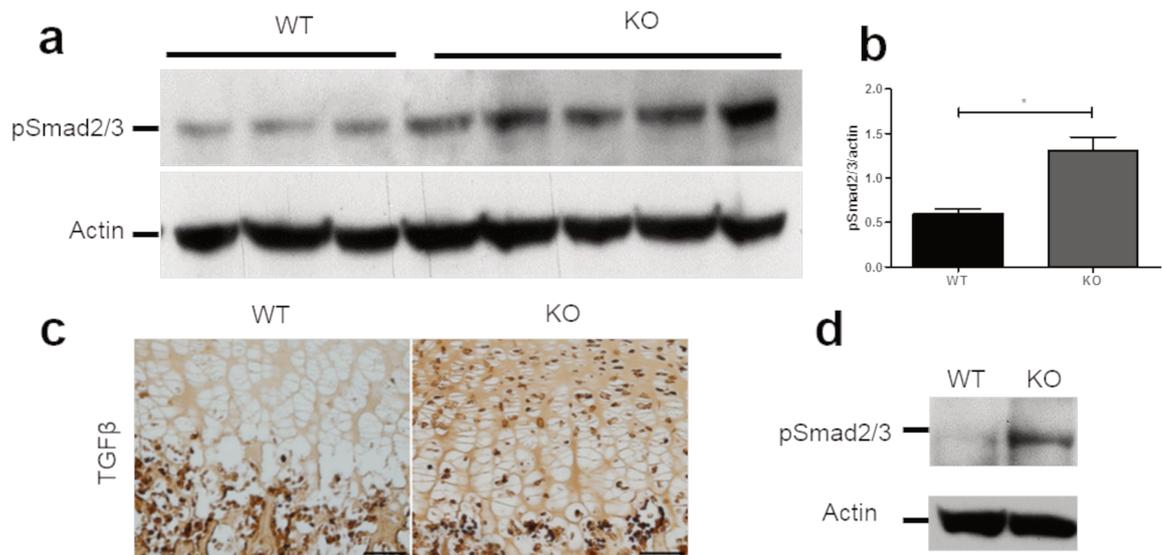
**Figure 3.** Impact of *Adamtsl2* deletion on chondrocyte function. **(a)** Safranin O staining on *Adamtsl2* Ko and WT new born mice (P1) femur and femoral proximal growth plate sections. Original magnification: x20, x100 and x200. Scale bar, 200  $\mu$ m. **(b)** quantification of hypertrophic chondrocyte size in WT and *Adamtsl2* KO femoral proximal growth plate **(c and d)** Safranin O staining on *Adamtsl2* Ko and WT mice (P1) left forepaw and higher magnification of proximal phalange 3. Original magnification x20 and x200. Scale bar 200 $\mu$ m, **(e)** *In situ* hybridization. WT and *Adamtsl2* KO femoral growth plate were hybridized with an antisense riboprobe for Col2, Col10 and PthrP. Negative control was obtained with a sense riboprobe. Scale bar, 200 $\mu$ m **(f)** Quantitation of Col10 positive cells from **e**. ( $n_{KO} \geq 5$ ;  $n_{WT} \geq 5$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM, \* denotes  $p < 0.05$ ). **(g)** Immunohistochemical staining of femoral growth plate sections using antibody against Sox9. Scale bar, 100  $\mu$ m **(h)** Quantitation of Sox9 positive cells from **g**. ( $n_{KO} \geq 5$ ;  $n_{WT} \geq 5$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM, \*\*\* denotes  $p < 0.0001$ ). **(i)** Immunohistochemical staining of femoral sections from WT and *Adamtsl2* KO mice at P1 with antibody against Ki67. Scale bar, 200  $\mu$ m **(j)** Quantitation of proliferative cells from **i**. ( $n_{KO} \geq 5$ ;  $n_{WT} \geq 5$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM, \*\* denotes  $p < 0.01$ ). **(k)** TUNEL assay performed on femoral growth plate sections from WT and *Adamtsl2* KO mice ( $n_{KO} = 3$ ;  $n_{WT} = 3$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM,  $p=0.26$ )



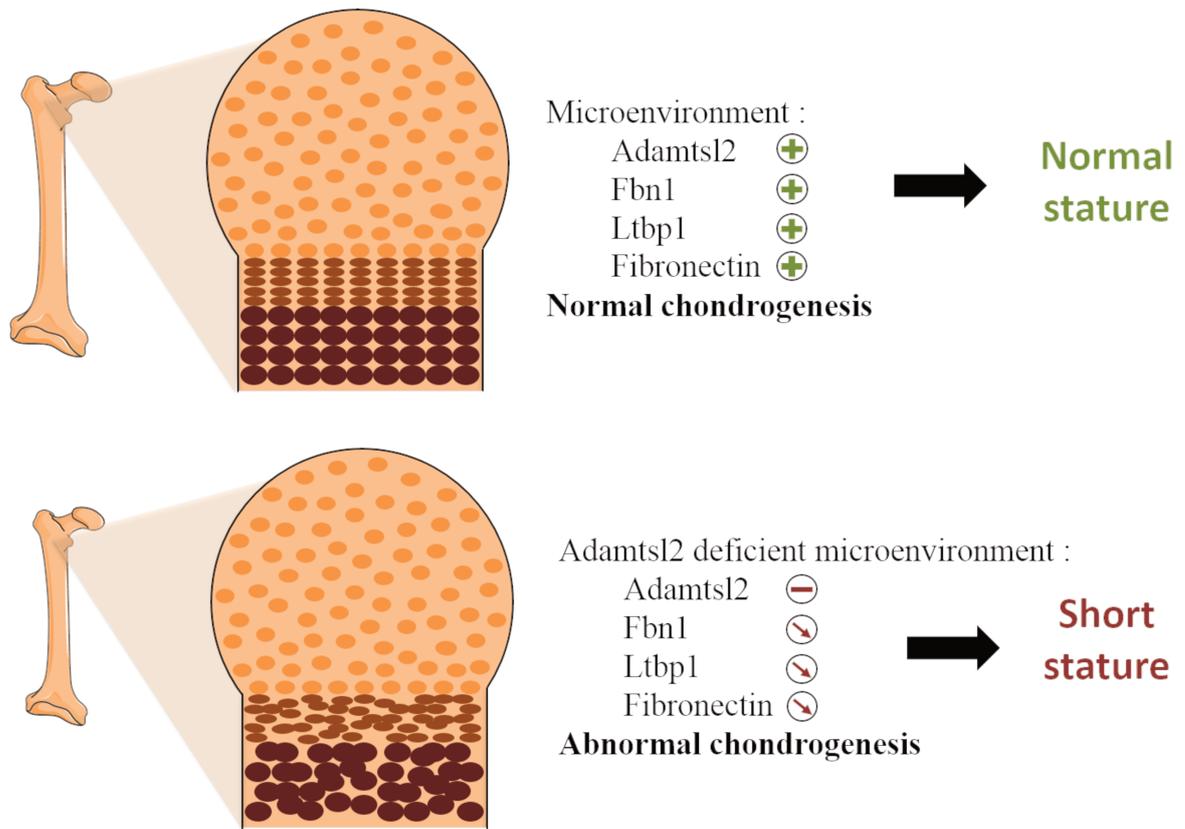
**Figure 4.** Dysregulation of extracellular matrix in growth plate of femur. **(a)(b)** Sections of P1 WT and *Adamtsl2* KO proximal femur stained with antibodies against Ltpb1, Fbn1, Fbn2, Ltpb3 and Fibronectin respectively. Original magnification respectively: x100 (a) and x200 (b). Scale bar, 100  $\mu$ m. **(c)** Protein blot analysis of Ltpb1 and Fbn1 in extracts from WT and *Adamtsl2* KO P1 lower limb tissues, relative to actin level ( $n_{KO} \geq 5$ ;  $n_{WT} \geq 5$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM, \* denotes  $p < 0.05$ ). **(d and e)** Quantitative data of Ltpb1 and fibrillin-1 proteins normalized with actin from three independent experiments (Mann–Whitney U test, error bars are SEM, \* denotes  $p < 0.05$ )



**Figure 5.** Impairment of microfibrillar network in *Adamtsl2* KO mice. Primary chondrocyte cells isolated from P1 WT and *Adamtsl2* KO ribs, stained with antibodies against Fibronectin (**a**), Fbn1 (**b**) and Ltbp1 (**c**) revealed by fluorescent secondary antibody. Original magnification: x63. Scale bar, 20 $\mu$ m.



**Figure 6.** Analysis of TGFβ signaling pathway **(a)** Protein blot analysis of phosphorylated SMAD2/SMAD3 in extracts from P1 WT and Adamts12 KO whole hindlimb, relative to actin level. **(b)** Quantitative data from a ( $n_{KO} \geq 5$ ;  $n_{WT} \geq 5$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM, \* denotes  $p < 0.05$ ). **(c)** Immunostaining of P1 WT and Adamts12 KO proximal femoral sections for TGFβ1. Scale bar, 100 μm. **(d)** Protein blot analysis of phosphorylated SMAD2/SMAD3 in extracts from P1 WT and Adamts12 KO primary chondrocyte cells, normalized with actin level.



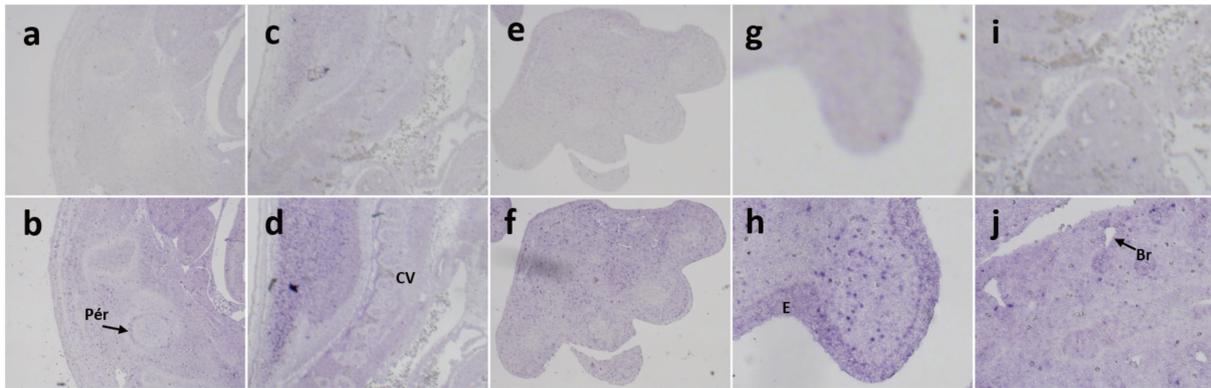
**Figure 7.** Schema representing the impact of microenvironment on chondrogenesis regulation. Above, the Adamtsl2, Fbn1, Ltbp1 and Fibronectin proteins are normally expressed in the growth plate, permitting a hypertrophic chondrocyte column formation which leads to normal long bone formation (normal stature). Below, the Adamtsl2 deficient microenvironment is dysregulated with a decreased expression of, Fbn1, Ltbp1 and Fibronectin leading to a disorganization of chondrocyte columns and to shorter long bones (short stature).

## 2<sup>ème</sup> partie : Caractérisation du modèle murin Fbn1

La deuxième partie de ma thèse a été consacrée à l'étude du rôle de Fbn1 dans le développement du squelette, Fbn1 étant un des gènes responsables de la DG. Jusqu'à présent FBN1 a surtout été étudiée pour une autre pathologie, le syndrome de Marfan et, principalement, pour son rôle dans la paroi aortique. A ce jour, aucune analyse n'a été faite sur FBN1 dans le tissu cartilagineux. Afin de comprendre l'implication de FBN1 dans la chondrogenèse et les mécanismes impliqués dans la forme dominante de la DG, un modèle murin knock-in, appelé Fbn1<sup>TB5</sup>, a été généré. Dans ce modèle, il a été introduit un changement d'une base dans l'exon 42 du gène Fbn1 correspondant à la substitution d'une tyrosine par une cystéine dans le domaine TB5 de la protéine (hTyr1696Cys (TAC>TGC)). Ainsi, par croisement, des souris Fbn1<sup>TB5</sup> hétérozygotes (Fbn1<sup>TB5+/-</sup> ou HT) et homozygotes (Fbn1<sup>TB5-/-</sup> ou Ho) ont été obtenues. En analysant leur squelette, nous avons pu démontrer que Fbn1 joue un rôle dans le développement du squelette.

### Profil d'expression de Fbn1 dans des embryons de souris à E14.5

L'expression de Fbn1 est assez peu détaillée dans la littérature surtout pour les tissus squelettiques. Chez la souris, le cartilage commence à être formé aux alentours des stades embryonnaires E13.5/E14.5. Par hybridation *In Situ*, nous avons analysé le profil d'expression de Fbn1 chez des embryons WT à E14.5 (**Fig. 1**). Nous avons observé une expression de Fbn1 au niveau de la tête fémorale avec un signal plus intense au niveau du périchondrium que du cartilage. Nous avons également observé un signal au niveau du périchondrium des extrémités des pattes. Les poumons sont également marqués avec un signal important au niveau des bronches et plus faiblement au niveau du parenchyme. Fbn1 est également exprimé au niveau de la peau, surtout au niveau de l'épiderme et au niveau des vertèbres.



**Figure 1 : Expression de *Fbn1* chez la souris à E14.5**

Expression dans le fémur (b), la colonne vertébrale (d), la patte (f), la peau (h) et les poumons (j). (a)(c)(e)(g) et (i) sont les contrôles réalisés grâce à la sonde sens.

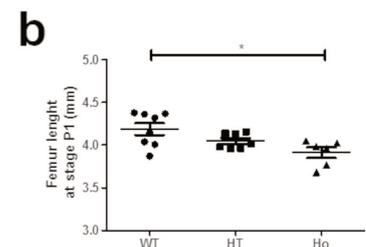
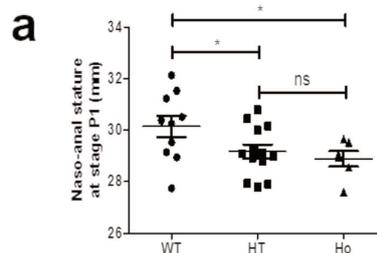
Pér : Périchondrium, CV : Colonne Vertébrale, E : Epiderme, Br : Bronche

### La mutation dans le domaine TB5 de *Fbn1* conduit à un retard statural

Les souris HT et Ho sont fertiles et viables à la naissance mais nous avons observé une très forte mortalité des Ho aux alentours de 2-3 mois. Les souris mutantes avaient un retard statural dès la naissance (à P1) comparé aux souris sauvages (WT), déjà visible chez les souris HT et encore plus important chez les souris Ho (Fig. 2a). La différence de taille entre les mutants et les WT s'aggravait avec l'âge (Fig. 2c et d). Nous avons également observé une différence dans la taille des os longs, avec des fémurs raccourcis chez les souris mutantes comparée au WT à P1 (Fig. 2b).

**Figure 2 : Retard statural chez les souris *Fbn1*<sup>TB5+/-</sup> et *Fbn1*<sup>TB5-/-</sup> comparé aux souris sauvages à différents stades de développement**

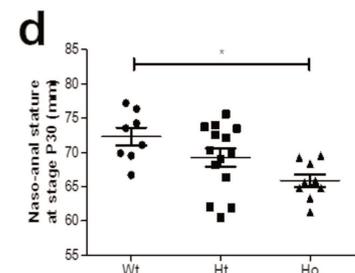
(a)(b) Histogrammes montrant la taille naso-anales et la taille des os longs (fémur) des souris sauvages (WT) et des souris *Fbn1*<sup>TB5+/-</sup> (HT) et *Fbn1*<sup>TB5-/-</sup> (Ho) à P1 ( $n_{WT} > 10$ ,  $n_{HT} > 10$  et  $n_{Ho} > 10$ ; Test Mann-Whitney U test, \* =  $p < 0.05$ )



(c) Radiographie de souris WT, HT et Ho à P30



(d) Histogrammes montrant la taille naso-anales des souris sauvages (WT) et des souris *Fbn1*<sup>TB5+/-</sup> (HT) et *Fbn1*<sup>TB5-/-</sup> (Ho) à P30 ( $n_{WT} > 10$ ,  $n_{HT} > 10$  et  $n_{Ho} > 10$ ; Test Mann-Whitney U test, \* =  $p < 0.05$ )



## Fbn1 est impliquée dans la régulation de la plaque de croissance

Nous avons observé une désorganisation de la plaque de croissance chez les souris HT et Ho avec des chondrocytes hypertrophiques plus gros au stade P1 (**Fig. 3a**). La zone hypertrophique est plus petite au stade P30 chez les souris mutantes comparée au WT (**Fig. 3b**). De plus une réduction de l'expression du marqueur des chondrocytes hypertrophiques, Col10, a été observée chez les souris HT et Ho à P1 (**Fig. 3c**). Enfin, une tendance a été observée avec une augmentation de Sox9 dans la plaque de croissance des souris mutantes à P1 et P30 (**Fig. 3d et e**). Cette même tendance a été observée pour la prolifération, grâce à l'anticorps Ki67 chez les souris mutantes, à P1 et P30 (**Fig. 3f et g**).

Nous avons également remarqué une certaine variabilité dans les plaques de croissance HT avec une désorganisation des colonnes de chondrocytes plus ou moins accentuée selon les individus (**Fig. 4**).

### Figure 3 : Défauts dans la plaque de croissance chez les souris $Fbn1^{TB5+/-}$ et $Fbn1^{TB5-/-}$ comparé aux souris sauvages à différents stades de développement

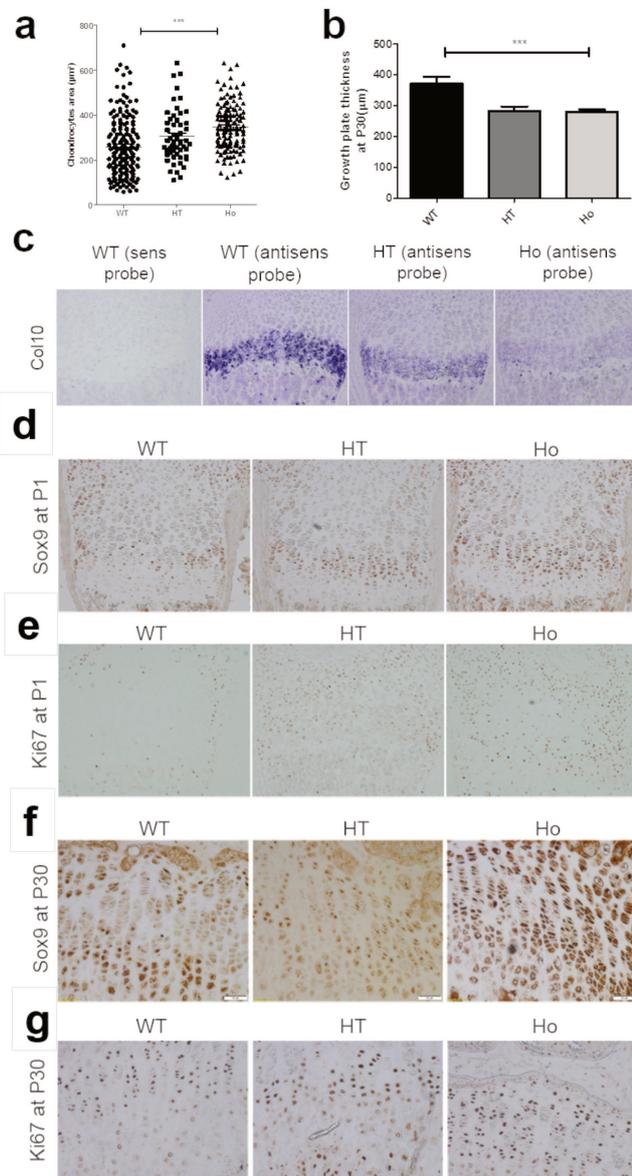
**(a)** Histogramme montrant la taille des chondrocytes hypertrophiques à P1 (Test Mann–Whitney U test, \*\*\* =  $p < 0.001$ )

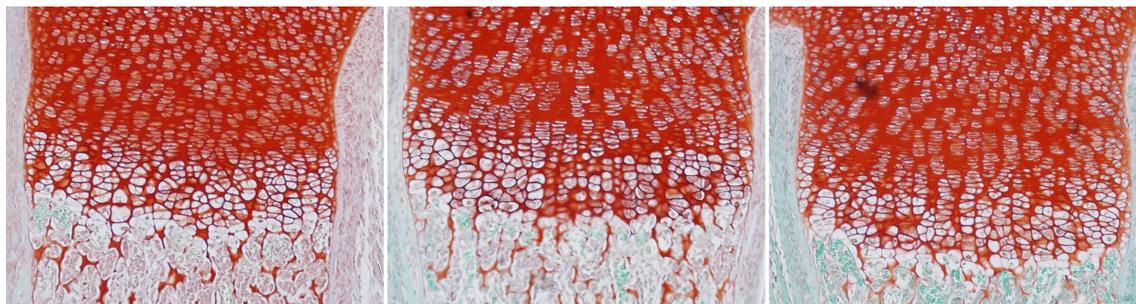
**(b)** Histogramme montrant la taille de la plaque de croissance à P30 (Test Mann–Whitney U test, \*\*\* =  $p < 0.001$ )

**(c)** Hybridation *In Situ* sur coupes de fémur montrant l'expression du Col10 à P1 (Echelle : 200 $\mu$ m)

**(d)(e)** Immunohistochimie avec Sox9 et Ki67 sur coupes de fémur à P1

**(f)(g)** Immunohistochimie avec Sox9 et Ki67 sur coupes de fémur à P30





**Figure 4 : Variabilité du phénotype dans la plaque de croissance chez les souris  $Fbn1^{TB5+/-}$ .** Coloration Safranine O montrant une désorganisation des colonnes chondrocytaires plus ou moins sévère.

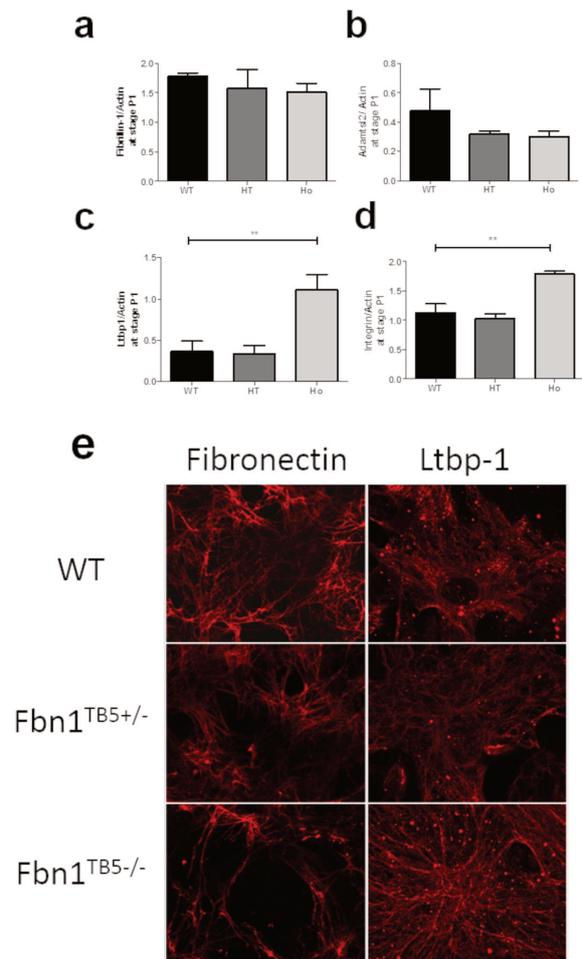
#### **La mutation dans le domaine TB5 de Fbn1 perturbe le réseau microfibrillaire de la MEC**

Fbn1 étant extracellulaire et composant du réseau microfibrillaire, nous avons observé l'expression et la structure de la matrice par Western Blot et par immunofluorescence sur des cultures de chondrocytes primaires à partir de côtes de souris à P1. La fibronectine, qui est le composant de base de la MEC, semble former un réseau moins dense et être en plus faible quantité chez les HT et Ho (**Fig. 5e**). Étonnamment, une augmentation de Ltpb-1, un des partenaires de Fbn1 et également composants des microfibrilles, a été quantifiée par WB chez les souris Ho et la visualisation du réseau de fibrilles de Ltpb-1 nous a permis d'observer un réseau qui semble beaucoup plus dense et étalé chez les Ho (**Fig. 5 c et e**). Nous n'avons pas observé de différence d'expression pour Fbn1 (**Fig. 5a**). Cependant, une tendance a été observée avec une diminution d'expression d'Adamtsl2 chez les mutants HT et Ho comparée au WB (**Fig. 5b**). Enfin, comme le site d'interaction avec Adamtsl2 chez Fbn1 se situe près du domaine RGD qui permet la liaison aux intégrines, nous avons analysé l'expression de l'intégrine  $\beta 1$ , nous permettant d'observer une augmentation expression chez les Ho (**Fig. 5d**).

**Figure 5 : Désorganisation de la matrice extracellulaire chez les souris  $Fbn1^{TB5+/-}$  et  $Fbn1^{TB5-/-}$  comparé aux souris sauvages à P1**

Histogramme montrant l'expression de (a) Fbn1, (b) Adamts12, (c) Ltp1 et (d) Intégrine- $\beta$ 1 dans le fémur par WB à P1 (Test Mann-Whitney U test, \*\* =  $p < 0.01$ )

(e) Cultures de chondrocytes primaires provenant de côtes de souris à P1 marqués avec des anticorps dirigés contre la fibronectine et Ltp-1 et révélés par un anticorps secondaire fluorescent.



## Involvement of FBN1/TB5 domain in regulation of chondrogenesis.

Laure Delhon<sup>1</sup>, Nicolas Goudin<sup>2</sup>, Cynthia Bou-Chaaya<sup>1</sup>, Valérie Cormier-Daire<sup>1-3</sup> and Carine Le Goff<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR1163, Laboratory of molecular and physiopathological bases of osteochondrodysplasia, Imagine Institute, Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>2</sup>SFR Necker, Imaging Platform, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris France

<sup>3</sup>Department of Medical Genetics, Reference Center for Skeletal dysplasia AP-HP, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France

<sup>4</sup> presently INSERM U1148, Laboratory of Vascular Translational Science, Bichat Hospital, Paris Diderot University, Paris, France

\*Corresponding author C. Le Goff [carine.le-goff@inserm.fr](mailto:carine.le-goff@inserm.fr)

## **Abstract**

Mutations in FBN1 gene are responsible for the autosomal dominant form of Geleophysic Dysplasia (GD), characterized by short stature, short extremities and skeletal abnormalities. The exact function of FBN1 in the chondrogenesis is still unknown. To explore the role of this protein in skeletal development, we generated knock in mouse model, Fbn1<sup>TB5</sup>. We found that Fbn1<sup>TB5/-</sup> mice displayed skeletal abnormalities, reminiscent of the human phenotype. Mutant Fbn1 impacted the growth plate formation with abnormal organization and structure of chondrocytes. Mutant Fbn1 chondrocytes failed to establish microfibrillar network composed by LTBP1 and fibronectin fibrils. More importantly, a dysregulation of integrin  $\beta$ 1 was observed in femoral growth plate. These studies underscores the link between Fbn1 microfibrillar network and the growth plate organization.

The geleophysic dysplasia (GD) is rare skeletal disorder which belong to acromelic dysplasia group. The pathology is characterized by short stature, short extremities, joint stiffness, facial dysmorphism, thick skin and cardiac defects which lead in early death in the first years of life<sup>1</sup>. The GD shows multiple skeletal abnormalities suggesting defects in skeletal development and more precisely in endochondral ossification, a process responsible for longitudinal bone growth, during embryonic development and postnatal growth period. This mechanism implies specific cells, the chondrocytes, which form a cartilage template that will ultimately be replaced by bone. The process starts with mesenchymal stem cell condensations, becoming chondrocytes which proliferate, hypertrophy and die by apoptosis. The chondrocyte also produce extracellular matrix, which is mineralized.

We identified heterozygous mutations in the gene *FBN1* responsible for the autosomal dominant form of the GD<sup>2</sup>. *FBN1* encodes the fibrillin-1, a glycoprotein of extracellular matrix and a component of microfibrillar network. It is mainly constituted by calcium binding (cb)-epidermal growth factor-like (EGF) domain and transforming growth factor (TGF)- $\beta$  binding protein like (TB) domain. Interestingly, all mutations have been localized in TB5 domain of *FBN1*. *FBN1* is also a major gene for the Marfan syndrome, which present opposite features to the GD, with tall stature, arachnodactyly and aortic dissection<sup>3</sup>. To date, no specific mutations in TB5 domain were found in Marfan patient, suggesting a correlation genotype/phenotype for the *FBN1* gene. Furthermore, *FBN1* have been deeply studied about its role in the aortic dissection but the knowledge on its role in skeletal development remain poorly understood.

We previously identified mutations in *ADAMTSL2* gene in the autosomal recessive form of the GD. fibrillin-1 (*FBN1*), Latent TGF $\beta$  Binding Protein 1 (*LTBP1*), and fibrillin-2 (*FBN2*), have been demonstrated to be partners of *ADAMTSL2* and it was also shown that *LTBP-1* and fibrillin-1 belong to the same microenvironment<sup>1, 4-5</sup>. Until recently, the role of *ADAMTSL2* was unknown, however, we demonstrated a function of *ADAMTSL2* in chondrogenesis and also in the formation of the microfibrillar network studying the mouse model *CreCMV; Adamtsl2<sup>ff</sup>* (Delhon et al. 2017 in revision)

Fibrillin-1 microfibrils are implied is the bioavailability of TGF $\beta$ <sup>6</sup>. TGF $\beta$  is synthesized inside the cells as protein precursors. The N-terminal peptide, the latency associated peptide (LAP), is necessary to permit the secretion of the molecule. Furin convertase cleaves the pro dimer of TGF $\beta$  to produce the small latent TGF $\beta$  complex (SLC)<sup>7</sup>. The mature TGF $\beta$  remains none covalently bound to the LAP. The SLC can covalently bind to the large latent TGF $\beta$  binding proteins (LTBPs) to form the large latent complex (LLC)<sup>8</sup>. LTBPs (LTBPs 1-4) are closely related to fibrillins. They have the same organization including repeating cysteine rich domains, epidermal growth factor (EGF) like repeats, eight cysteine domains and transforming growth factor protein-binding domain. The C-terminus of LTBP1 binds to the N-terminal region of fibrillin-1 leading to a link between LLC and elastic microfibrils<sup>9</sup>. LTBP also interacts with other extracellular matrix components such as fibronectin.

To allow the activation of TGF $\beta$ , the LLC must be released from microfibrils and the ECM. Various mode of activation have been described including protease mediated cleavage, integrin or metalloprotease mediated release. The mechanisms seem to depend of the cell type but all activating mechanisms directly target LAP. One example involves the integrins which bind to the LLC via the RGD (Arg/Gly/Asp) sequence of LAP. The mechanism remains unclear but interaction with the RGD domain of LAP may induce a conformational change leading to release or exposure of TGF $\beta$ <sup>10</sup>.

Some fragments of fibrillins are formed after proteolysis by elastases and particularly an internal fragment which has affinity with the N-terminal region of fibrillin1. This interaction between fragment of fibrillin and fibrillin microfibrils lead to the displacement of LTBP and the release of the LLC. This contributes to the activation of TGF $\beta$ <sup>6</sup>. By forming a complex, fibrilline-1 and LTBP-1 maintain TGF $\beta$  under inactive form. When TGF $\beta$  is released, it becomes active and may activates its signaling pathway. An overactivation of TGF $\beta$  pathway was observed in fibroblast cultures of patients GD and in mouse CreCMV; Adamts12<sup>ff</sup> primary chondrocyte cultures and femoral tissues.

We generated a knock-in mouse model, FBN1<sup>TB5+/-</sup> by reproducing the human mutation p.Tyr1696Cys of GD patient in order to understand the role of the domain TB5 in skeletal development.

## Results

### Generation of Fbn1 KI mouse model

To investigate the role of FBN1/TB5 domain in skeletal development, in collaboration with the ICS, we generated Fbn1<sup>TB5</sup> KI mice by introducing a mutation which mimic human mutation p.Tyr1696Cys. The mutation in exon 42 is a substitution of one base (A>G) leading to a change of amino acid (Tyr>Cys) as described in methods and Fig 1a. The substitution was checked by sequencing on genomic DNA from mouse tails (Fig. 1b). The litters resulting of breeding pairs of mice Fbn1<sup>TB5+/-</sup> followed the normal Mendelian distribution. The heterozygotes Fbn1<sup>TB5+/-</sup> (HT) were viable and fertile but we observe a lethality of homozygotes Fbn1<sup>TB5-/-</sup> (Ho) around 2 months and some difficulty of fertility.

### Multiple skeletal abnormalities in Fbn1 KI mice at different stages of development

Total naso-anal length measures demonstrated the reduced stature of the Fbn1 KI heterozygote and homozygote mice compared to controls at P1 (Fig. 1c) (WT/HT:3,2%; WT/Ho: 4,1%). The difference of stature between controls and mutants increase with age (Fig 1e, f and g) (at P30 (WT/HT:4,2%; WT/Ho: 8,9%). No difference in extremities between controls and mutants at P1 was observed with Alcian blue and Alizarin red staining (data not shown).

### Fbn1 controls chondrocyte function

After condensation of the mesenchymal cells, the majority of these cells become chondrocytes that go into proliferation and differentiation as hypertrophic chondrocytes. As shown in Fig. 1d, long bone length (femur) was shorter in Fbn1 mutants compared to wild type (wt) mice. Mutation in TB5 domain of Fibrillin-1 greatly impacted chondrocyte size and organization in the growth plate (Fig. 2a and b). In the prehypertrophic zone of the wt femoral growth plate, the chondrocytes were discoid and arranged in to regular columns like stacks of coins which were parallel to the long axis of the cartilage (Fig. 2a). By contrast, HT and Ho chondrocytes failed to form regular columns. Instead of forming the highly organized hypertrophic zone in the middle of long bones as observed in control animals, both Fbn1<sup>TB5</sup> mutants chondrocytes were scattered throughout the growth plate (Fig. 2a). The size of

hypertrophic chondrocytes is increased in HT and Ho mice (Fig. 2b). The hypertrophic zone was also disorganized in later stage of development, such as P30, in HT and Ho mice, with a reduction of this zone (Fig. 2c and d)

### **Mutation in TB5 domain of Fibrillin-1 impact proliferation and differentiation**

We next evaluated the expression of hypertrophic chondrocyte marker, type 10 collagen (Col10), by *in situ* hybridization of P1 growth plate cartilage RNA and of proliferative chondrocyte marker, SRY box 9 (Sox9). As shown in Fig. 2d, the signal intensity of Col10 was significantly lower in hypertrophic zone of HT and Ho mice growth plate than in the control samples at P1. At the stage of development P1, an increasing trend for Sox 9 was observed in both Fbn1<sup>TB5</sup> mutants (Fig. 2f, g and j) and analysis of chondrocyte proliferation using Ki67 labelling revealed also an increasing trend in both Fbn1<sup>TB5</sup> mutants growth plates compared to controls with a slight higher level for Fbn1<sup>TB5-/-</sup> mice (Fig. 2h, i and k).

### **Mutation in TB5 domain of fibrilline-1 impairs microfibrillar network**

Because Fbn1 is an extracellular matrix protein and a component of microfibrillar network, we then analyzed the impact of TB5 disruption on the structure of the ECM in the growth plate. Immunohistochemical analysis revealed a decreased expression of fibronectin in ECM of Fbn1 deficient femoral growth plate sections compared to controls at P1 (Fig. 4a). A slight increase of Ltp1 expression was demonstrated only in Ho mice. The expression of Ltp3 and Fbn1 was not drastically altered in both Fbn1<sup>TB5</sup> mutants (Fig. 4a). Quantification of Adamtsl2 protein levels by Western blot analyses shown a decreasing trend of this protein in femoral growth plates of Fbn1<sup>TB5-/-</sup> mice compared to WT animals (Fig. 4c). Interestingly, an increase of Ltp1 and Integrin-β1 were analysed by Western blot only in Ho mice (Fig. 4e and f).

As Ltp1 and fibronectin are essential components in forming microfibrillar network, we then evaluated the formation of microfibrillar network in primary cell cultures of chondrocytes isolated from Fbn1<sup>TB5</sup> mutants and WT ribs. Visualization of network by confocal microscopy, led us to observe that fibronectin network in Fbn1<sup>TB5+/-</sup> and Fbn1<sup>TB5-/-</sup> cultures seemed to be less dense and

occupied less space than in WT cultures (Fig. 4a). By contrast, we observed a Ltbp-1 network which was very important and dense in *Fbn1*<sup>TB5+/-</sup> and *Fbn1*<sup>TB5-/-</sup> cultures compared to WT (Fig. 4b) confirming the results of immunochemistry.

## Discussion

In the present work, we demonstrated for the first time the crucial role of *Fbn1* in the endochondral ossification. The skeletal anomalies of *Fbn1*<sup>TB5-/-</sup> demonstrated the role of *Fbn1* as a positive regulator of chondrogenesis. The mice heterozygous, *Fbn1*<sup>TB5+/-</sup>, showed some characteristics of Geleophysic Dysplasia such as short stature and short long bones and the mice homozygous, *Fbn1*<sup>TB5-/-</sup>, exhibited a more severe phenotype.

FBN1 was already shown to be linked to statural advance with Marfan syndrome and tight skin with Stiff skin syndrome. Our recent identification of *FBNI* mutations in GD patients in a specific domain, TB5, and the absence of TB5 mutations in Marfan patients suggested a phenotype-genotype correlation. The skeletal anomalies of our *Fbn1*<sup>TB5-/-</sup> model demonstrated that the inactivation of domain TB5 in *Fbn1* is correlated with short stature.

*Fbn1* was well study for the aortic dissection with generation of several mouse model such as *Fbn1*<sup>mgR/mgR</sup>, a hypomorph model, or *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, a model with substitution in a cbEGF domain. Both have aortic dissection and skeletal deformations. However, the studies on these models focus on the role of *Fbn1* in cardiac phenotype and its role in skeleton was relatively unexplored. However, it was revealed that fibrillins represent a tiny fraction of the total ECM proteins in skeleton<sup>11</sup>. While this fraction is about 1-3%, mutations in *FBNI* leads to severe skeletal anomalies. By controlling TGFβ and BMP signals, FBNI is indirectly involved in bone remodeling. Bone study on Marfan mouse model, *Fbn1*<sup>mgR/mgR</sup> revealed a decrease of mineral bone density and trabecular bone anomalies, which mimicked skeletal manifestations in Marfan patients. FBNI would have a negative role on osteoclastogenesis by sequestering RANKL, an osteoclastogenic factor, in ECM<sup>12</sup>. Osteopenia was observed in Mice *Fbn1*<sup>Prx1-/-</sup> and *Fbn1*<sup>Osx-/-</sup> and it was suggested to be due to a premature

osteoprogenitor differentiation<sup>13</sup>. Thereby FBN1 would be implied in osteoblast/osteoclast balance. The fate of mesenchymal stem cells depends of the partition of adult bone marrow tissue into functionally distinct microenvironments called niches<sup>14</sup>. Thus FBN1 regulate fate of skeletal stem cells by modulating the bioavailability of TGF- $\beta$  in the bone marrow niches<sup>15</sup>. Nevertheless, *FBN1* remained unknown for this role in chondrogenesis. Here we demonstrated that Fbn1 is implied in the differentiation of chondrocytes by controlling Col10, a hypertrophic chondrocyte marker, which was decreased in Fbn1<sup>TB5+/-</sup> and Fbn1<sup>TB5-/-</sup>. This decreased expression is associated with a tendency of increased Sox9, which inhibit Col10 expression and regulates positively other components such as Col2, suggest implication of Fbn1 in chondrocyte regulation.

Fbn1 being a component of microfibrillar network, our study demonstrated that defects in Fbn1<sup>TB5-/-</sup> growth plate were due to a loss of integrity of the network. By analyzing the network in chondrocyte cultures from mouse ribs, we observe a decrease of fibronectin, the basal component of ECM and an increase of Ltbp-1, a partner of Fbn1 and also a component of network. A slight decrease of Adamtsl2 was also observed and confirmed our results with our other “GD” model, CMV CreAdamtsl2<sup>ff</sup> with the necessity of normal microenvironment formed by Adamtsl2, Fbn1, Ltbp1 and fibronectin controlling the chondrocyte column formation. The expression of Fbn1 is unchanged which could be explained by the presence of a point mutation in TB5 domain. These mutation has no impact on microfibrils synthesis but these findings demonstrated importance of TB5 domain in the organization of proper microfibrillar network.

Mutations in TB5 domain identified in GD have been shown to cause disruption of heparan sulfate interactions in a cellular context<sup>16</sup>. Indeed, these findings have been demonstrated in co-culture between fibroblasts and mutants overexpressed HEK293 cells. Heparan sulfate permit interaction between cells and ECM. The phenotype of the growth plate of mouse Fbn1<sup>TB5-/-</sup> may be due to disruption of this interaction. The binding site of ADAMTSL2, partner of FBN1 and also involved in the recessive form of GD, is located closed to the vicinity of the RGD site of FBN1 in TB4 domain, an important site for integrin binding. Moreover, it is worth to notice that FBN1 mutations have been also identified in Stiff skin syndrome characterized by a thick skin a common feature with the GD. The

FBN1 mutations are all localized in the TB4 domain. Integrins act as cell surface receptors for extracellular proteins and cellular communication. We were able to observe an increasing of integrin  $\beta 1$  and a tendency to decreasing of Adamtsl2 in Fbn1<sup>TB5<sup>-/-</sup></sup>. Considering the skin anomalies of both pathologies, our result further suggested that disruption of TB5 domain may not only dysregulate interaction with heparan sulfate but also may compromise the interaction with integrin, TB4 domain and Adamtsl2, due to an inadequate conformation of Fbn1. However the molecular mechanisms of this cooperation deserve to be further studied.

Altogether, this original Fbn1 mutant mouse model gives new insight into the pathogenic events underlying geleophysic dysplasia. Our study demonstrated that Fbn1, a structural protein, is involved in the scaffold of the growth plate ECM and the column structure. This study pointed out the pivotal role of ECM in the control of chondrogenesis.

## **Methods**

### **Generation of Fbn1<sup>TB5</sup> mice**

To generate Fbn1<sup>TB5<sup>+/-</sup></sup> mice, an Fbn1<sup>TB5<sup>+/-</sup></sup> targeting vector with a substitution of one base was generated as described in Fig1 with the collaboration of the Clinique de la Souris (Strasbourg). The germ-line transmission of the mutated allele was obtained by crossing the chimeric mice with C57BL/6 mice. The Fbn1<sup>TB5<sup>+/-</sup></sup> mice were intercrossed to generate heterozygous (Fbn1<sup>TB5<sup>+/-</sup></sup>) and homozygous (Fbn1<sup>TB5<sup>-/-</sup></sup>) mice with mutations in TB5 domain of fibrillin-1. Genotyping were performed with tail lysis and Direct PCR Lysis Reagent (Viagen Biotech Cat # 101-T, 102-T) and sequencing. All research protocols were approved by the respective Institutional Animal Care and Use committees of IMAGINE institute/Necker hospital and Paris Descartes university.

### **Bone histology**

All mice were analyzed by X-Ray (Faxitron MX-20DC12 Edimex) and measured after euthanasia. For histology, tissues were fixed in 4% paraformaldehyde at 4 °C during 24 hours,

decalcified in 0.5 M EDTA (pH7.4) for one week and embedded in paraffin. Bone sections of 5µm were performed with microtome (Thermo Scientific) and used for Safranin O staining, immunohistological analysis and *in situ* hybridization.

For Safranin O staining, tissue sections were deparaffinized and rehydrated with ethanol. Slides were stained with Weigert's iron hematoxylin working solution for 5 minutes then rinsed in running tap water for 4-5 minutes. Slides were stained with 0,02% fast green (FCF) solution for 30 seconds then rinse with 1% acetic acid solution for 30 seconds and stained in 0.1% safranin O solution for 45 minutes. To finish, slides were mounted by using Euparal Mounting Medium.

### ***In Situ* Hybridization**

The PCR product was used to generate antisense and sense cRNA probes (see table1) with the T7 DIG RNA Labeling kit (Roche) and digoxigenin-11-UTP (Roche) according to the manufacturer's specifications. Paraffin sections of paraformaldehyde-fixed tissues obtained from CMVCreAdamts12 model were hybridized to 1µg /ml DIG-11-UTP-labeled Col2a1, Col10 or PthRP cRNA probes as previously described. After staining with BCIP/NBT in the dark (Roche) according to the manufacturer's recommendations, the slides were observed using Olympus PD70-1X2-UCB microscope and analyzed with CellSens and ImagineJ.

Probes	Gene	Sequence
Col10a1 S forward	Col10 (sens probe)	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAACGGCCTCTACTCCTCTGA
Col10a1 S reverse	Col10 (sens probe)	CGATGGAATTGGGTGAAAG
Col10a1 AS forward	Col10 (antisens probe)	CAAACGGCCTCTACTCCTCTGA
Col10a1 AS reverse	Col10 (antisens probe)	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGATGGAATTGGGTGAAAG

Table1. Riboprobe sequences

Proliferation was analyzed with antibody Ki67 (Abcam ab92393) and DAB staining (see section above).

### **Immunohistochemical analysis and proliferation analysis**

Proliferation was analyzed with antibody Ki67 (Abcam ab92393) and DAB. Sox9 (1:50; Santa Cruz Biotechnology sc-20095), Fibronectin (1:250; Abcam ab2413), LTBP1 (1:100; Abcam ab78294), LTBP3 (1:50; Millipore ATB316), Fibrillin-1 (1:50; Sigma-Aldrich SAB4500863),

Fibrillin-2 (1:400; Abcam ab53804) and TGF $\beta$ -1 (1:100; Abcam ab66043) antibodies were used for immunohistochemical staining of 5 $\mu$ m paraffin sections obtained from mouse hindlimbs. Immunohistochemistry was done using an indirect (two-step) immunoenzymatic method in which the secondary goat-anti-rabbit antibody was labeled with horseradish peroxidase (HRP, Dako). HRP was detected using 3-3'-diaminobenzidine (DAB, Abcam) as the substrate. Pictures were taken with Olympus PD70-1X2-UCB microscope and analyzed with CellSens and ImagineJ.

### **Immunofluorescence and primary chondrocytes cultures**

Mice were sacrificed and chondrocytes were isolated from rib cage, were put in cultures as previously described. Chondrocytes were grown in cell culture chambers with DMEM/HamF12 (with 10% SVF and antibiotics) until confluence. Then, cells were fixed with 3% formaldehyde during 20min. After a treatment of glycine 0.2M, cells were blocked with 3% BSA during 1h, then incubated with primary antibody diluted in 3% BSA overnight. The day after, cells were rinsed 3 times with PBS/MgCL<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>, incubated with secondary antibody diluted in BSA 3% during 45min. The cell culture chambers were mounted in ProLong® with DAPI (Life Technologies) and analyzed with confocal microscope LSM-700 from platform of Cell Imagery of Imagine Institute. Pictures were analyzed with ImageJ.

### **Western blot**

Tissues for protein extractions were placed in dry ice during dissections and conserved at -80°C until its utilization. For protein extraction, whole tissues were lysed with SCIENCEWARE® Liquid Nitrogen Cooled Mini Mortar and RIPA buffer (Thermo Scientific) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific). Protein extractions were dosed with Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Antibodies recognizing Adamtsl2 (1:350; Cusabio CSB-PA088599), Fbn1 (1:250; LS Bio LS-C358981), Integrin  $\beta$ 1 (1:5000; Abcam ab183666), Ltbp1 (1:250; Abcam ab78294) and Phospho-Smad2 (Ser467) (1:250; Abcam ab53100) were used. The levels of proteins were normalized to actin proteins (detected using actin antibody (1:1000; Millipore MAB1501)).

## References

1. Le Goff, C. *et al.* ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat. Genet.* **40**, 1119-1123 (2008)
2. Le Goff, C. *et al.* Mutations in the TGF $\beta$  binding-protein-like domain 5 of FBN1 are responsible for acromicric and geleophysic dysplasias. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 7-14 (2011).
3. Dietz, H. C. & Pyeritz, R. E. Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Hum. Mol. Genet.* **4 Spec No**, 1799–1809 (1995).
4. Hubmacher, D. *et al.* Adamtsl2 deletion results in bronchial fibrillin microfibril accumulation and bronchial epithelial dysplasia - a novel mouse model providing insights into geleophysic dysplasia. *Dis. Model. Mech.* **8**, 487-499 (2015).
5. Zilberberg, L. *et al.* Specificity of latent TGF- $\beta$  binding protein (LTBP) incorporation into matrix: role of fibrillins and fibronectin. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3828–3836 (2012).
6. Chaudhry, SS. *et al.* Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. *J Cell Biol.* **176**: 355-367. (2007)
7. Dubois, CM. *et al.* Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol. Chem.* **270**: 10618-10624 (1995)
8. Saharinen J, Keski-Oja J. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF- $\beta$  binding proteins, LTBPs, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol Biol Cell.* **11**: 2691-2704 (2000)
9. Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazzieri R, *et al.* Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem.* **278**: 2750-2757 (2003)
10. Sheppard D. Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor  $\beta$ . *Cancer Metastasis Rev.* **24**: 395-402 (2005)
11. Smaldone, S. & Ramirez, F. Fibrillin microfibrils in bone physiology. *Matrix Biol.* **52–54**, 191–197 (2016).
12. Nistala, H. *et al.* Differential effects of alendronate and losartan therapy on osteopenia and aortic aneurysm in mice with severe Marfan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4790–4798 (2010).
13. Cook, J. R. *et al.* Generation of Fbn1 conditional null mice implicates the extracellular microfibrils in osteoprogenitor recruitment. *Genes. N. Y. N 2000* **50**, 635–641 (2012).
14. Zhang, L. *et al.* The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology.* **48**, 1598-607 (2008)
15. Smaldone, S. *et al.* Fibrillin-1 Regulates Skeletal Stem Cell Differentiation by Modulating TGF $\beta$  Activity Within the Marrow Niche. *J. Bone Miner. Res. Off.* **31**, 86–97 (2016).
16. Cain, S. A. *et al.* Fibrillin-1 mutations causing weill-marchesani syndrome and acromicric and geleophysic dysplasias disrupt heparan sulfate interactions. *PLoS One.* **7**, e48634 (2012)

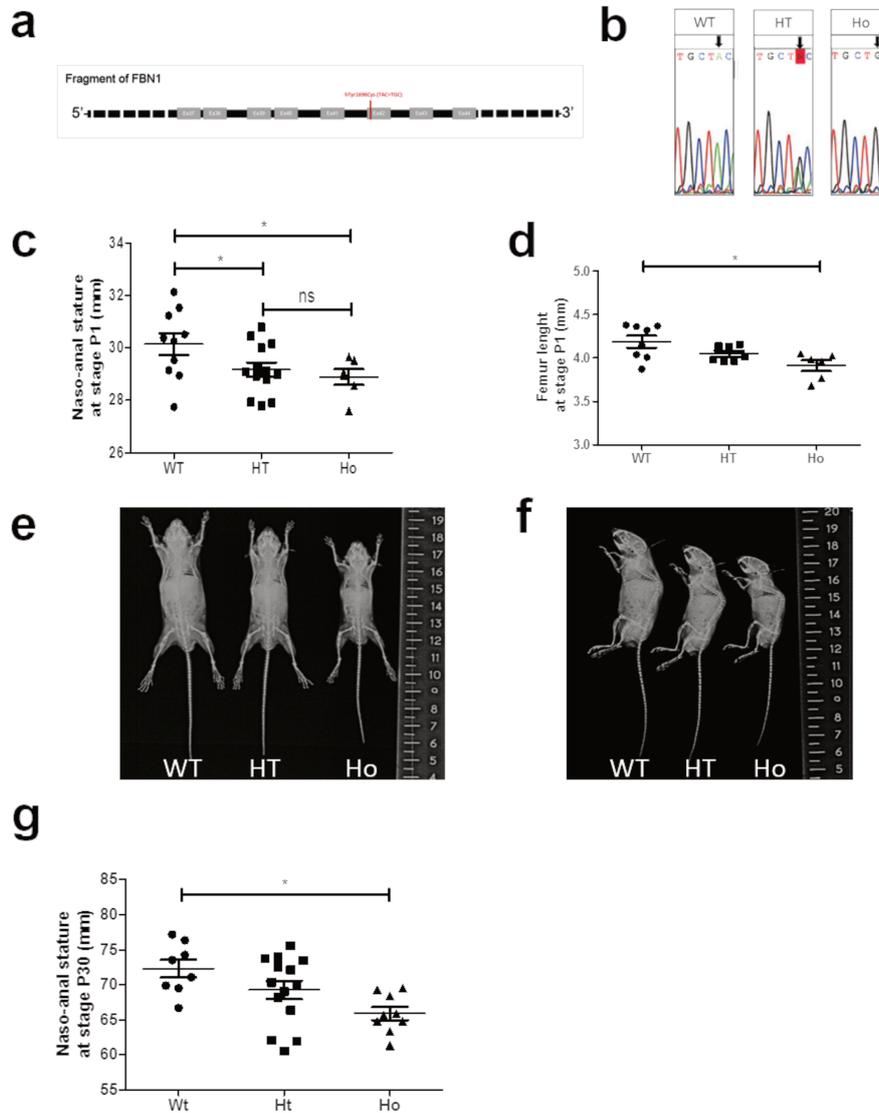
## **Acknowledgments**

The work presented here was supported by ANR R09183KS and FP7 Sybil program, (to V. Cormier-Daire and C. Le Goff), FRM prix Pomaret de Lalande (to C. Le Goff and L. Delhon). This program has received a state subsidy managed by the National Research Agency under the “Investments for the future” program (ANR-A0-IAHU-01). We thank the animal facilities (Gabiella) and histology platform from Imagine institute. We thank also the mouse clinic from Strasbourg, (IGBMC).

## **Conflict of interest statement**

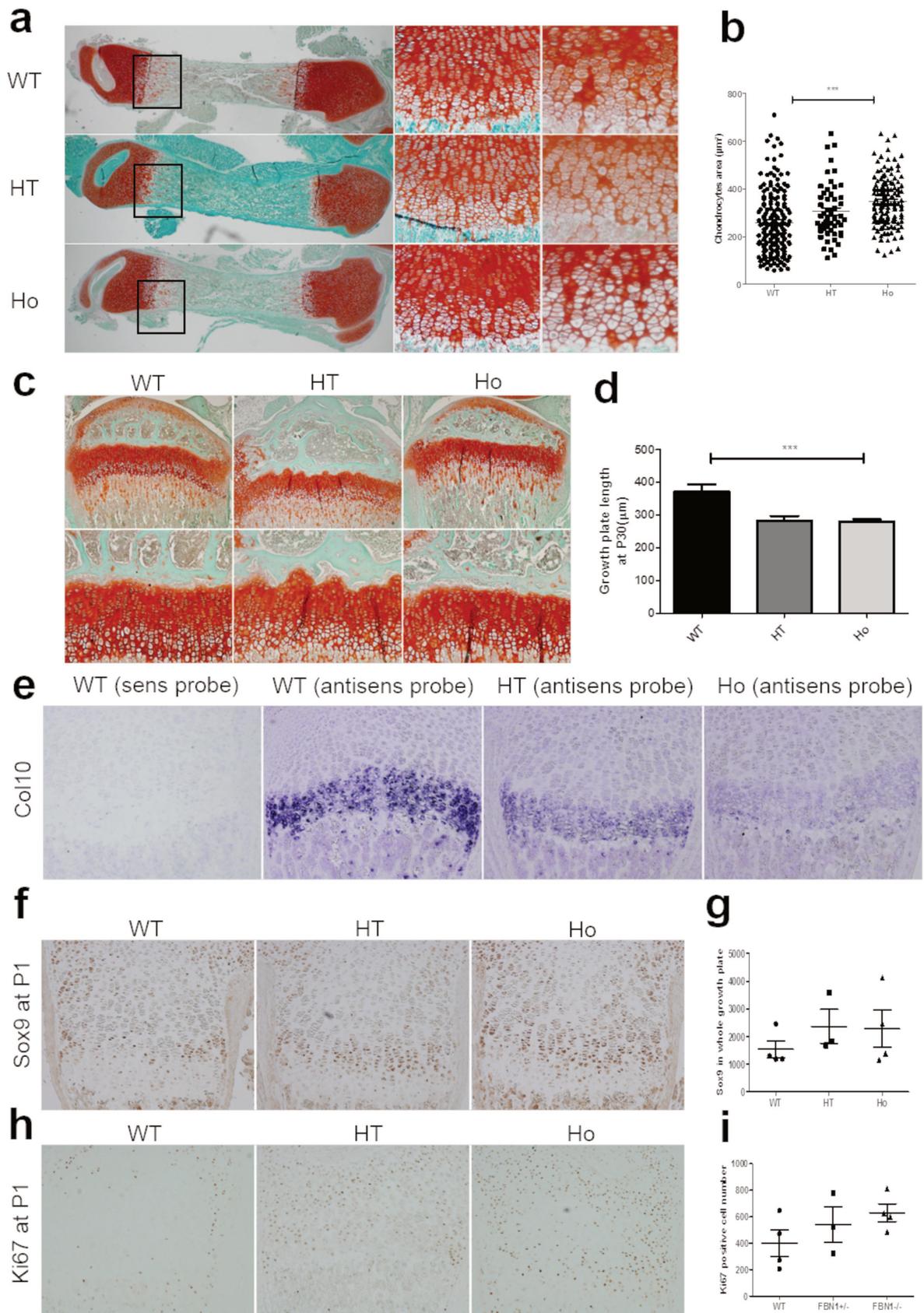
The authors declare no conflict of interest.

## Figures

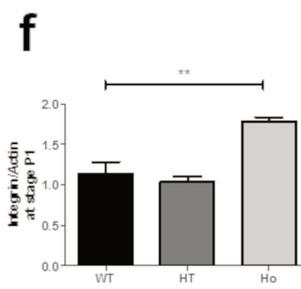
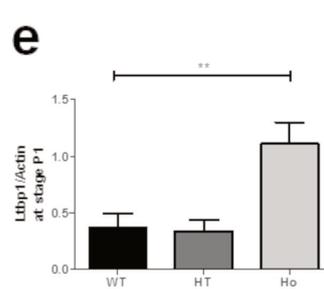
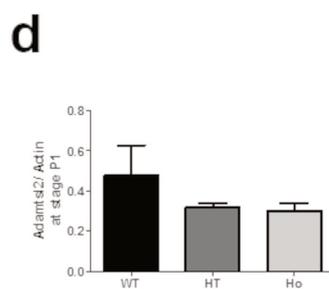
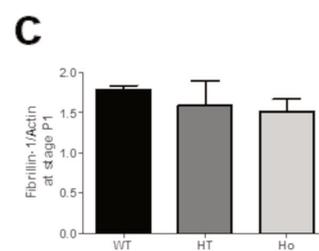
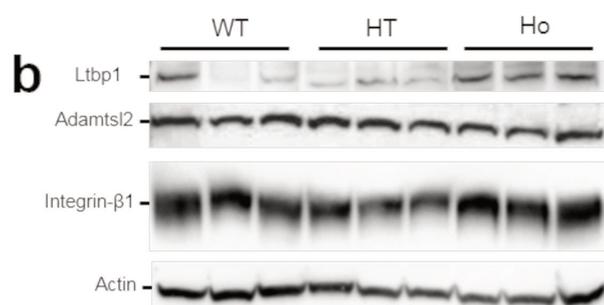
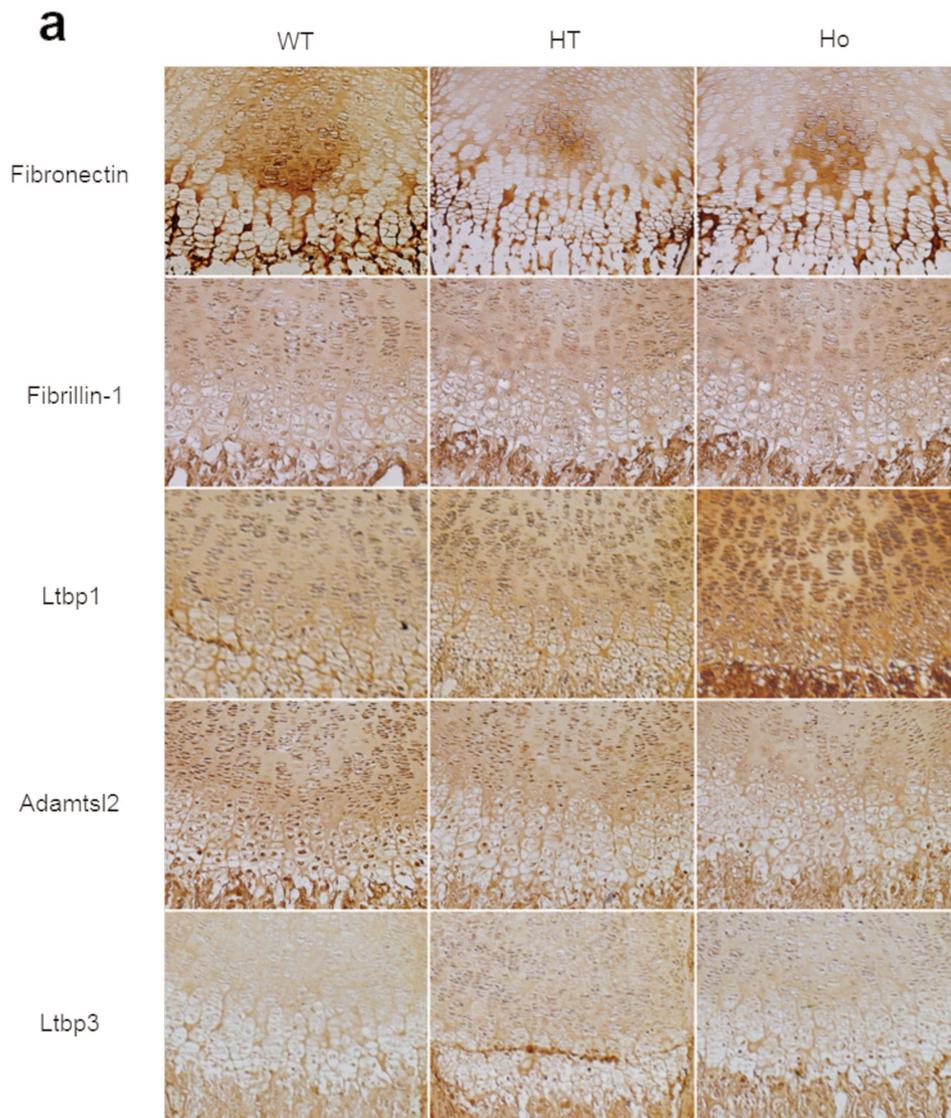


**Figure 1:**  $Fbn1^{TB5+/-}$  and  $Fbn1^{TB5-/-}$  have short stature. **(a)** The targeted *Fbn1* locus showing the point mutation. The substitution of the tyrosine1696 by a cysteine in the exon 42 is showed in red. **(b)** Sequencing electropherogram sections showing the point mutation (A>G) in  $Fbn1^{TB5}$  mutants. The heterozygous mutant shows a double peak corresponding to A and G (and translate by the letter R) whereas the homozygous mutant shows a single peak correspond to G. **(c)(d)** Quantitative data for the naso-anal stature and femur length at P1 ( $n_{WT}>5$ ,  $n_{HT}>5$  and  $n_{Ho}>5$ ; Mann–Whitney U test, error bars

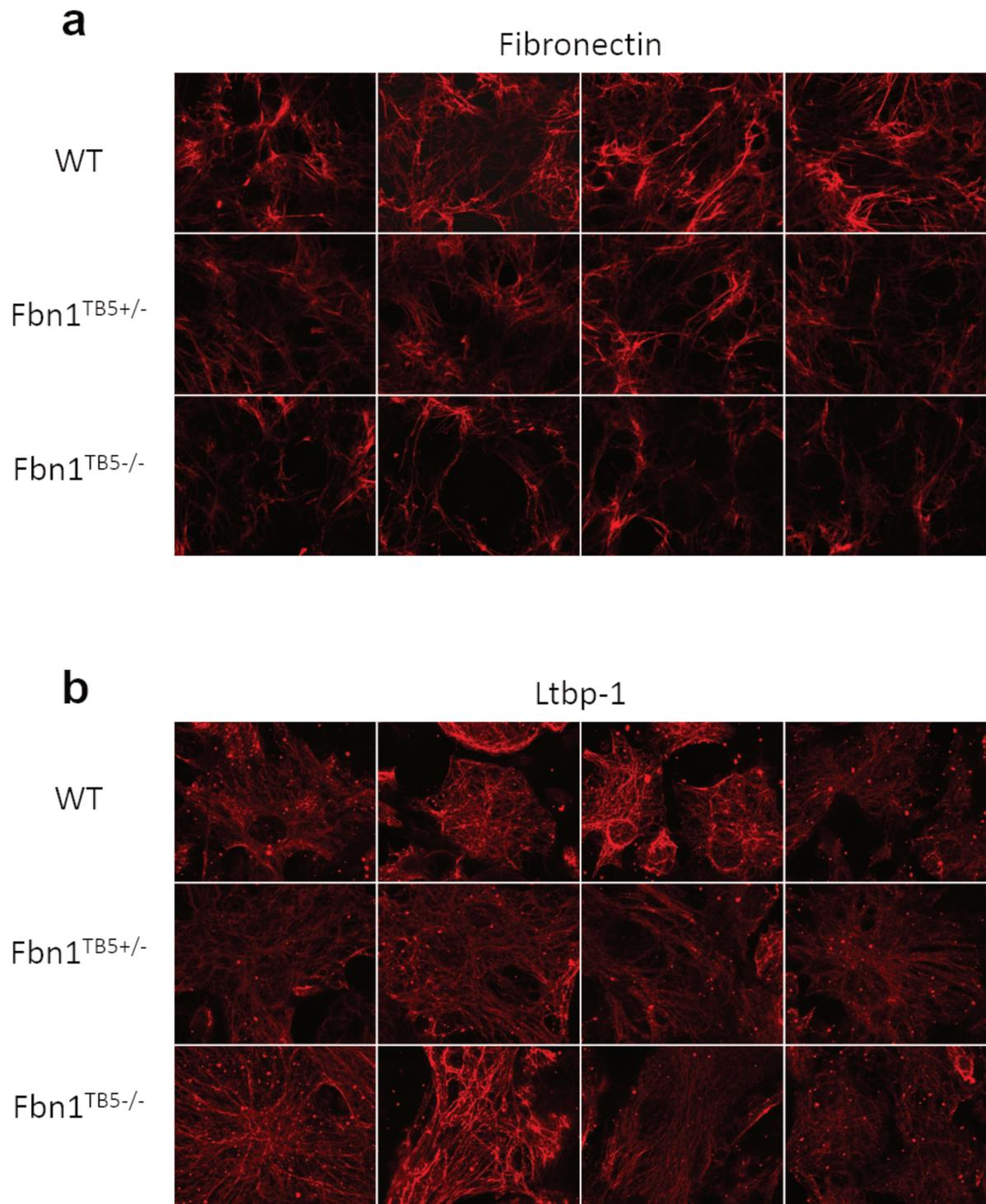
are SEM, \* denotes  $p < 0.05$ ). **(e)(f)** Front and side X-rays of the whole skeleton of WT and Fbn1<sup>TB5</sup> KI mice at P30. **(g)** quantitative data from a.



**Figure 2.** Impact of TB5 domain of fibrillin-1 disruption on chondrocyte function. **(a)** Safranin O staining on HT, Ho and WT new born mice (P1) femur and femoral proximal growth plate sections. Original magnification: x20, x100 and x200. Scale bar, 200  $\mu$ m. **(b)** Quantification of hypertrophic chondrocyte size in WT, HT and Ho femoral proximal growth plate at P1. **(c)** Safranin O staining on HT, Ho and WT femoral proximal growth plate sections at P30. Original magnification: x40 and x100. Scale bar, 200  $\mu$ m. **(d)** Quantification of hypertrophic zone length in WT, HT and Ho femoral proximal growth plate at P30. **(e)** In situ hybridization. WT, HT and Ho femoral growth plate were hybridized with an antisense riboprobe for Col10. Negative control was obtained with a sense riboprobe. Scale bar, 200 $\mu$ m. **(f)** Immunohistochemical staining of femoral growth plate sections at P1 using antibody against Sox9. Scale bar, 100  $\mu$ m **(g)** Quantitation of Sox9 positive cells from f. ( $n_{WT}>3$ ,  $n_{HT}>3$  and  $n_{Ho}>3$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM). **(h)** Immunohistochemical staining of femoral sections at P1 with antibody against Ki67. Scale bar, 100  $\mu$ m. **(i)** Quantitation of proliferative cells from h. ( $n_{WT}>3$ ,  $n_{HT}>3$  and  $n_{Ho}>3$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM).



**Figure 3.** Dysregulation of extracellular matrix in growth plate of femur. **(a)** Sections of P1 WT, HT and Ho proximal femur stained with antibodies against Fibronectin, Fbn1, Ltbp1, Adamtsl2 and Ltbp3 respectively. Original magnification respectively: x100. Scale bar, 100  $\mu$ m. **(b)**. Protein blot analysis of Ltbp1, Adamtsl2 and Integrin- $\beta$ 1 in extracts from WT and Adamtsl2 KO P1 lower limb tissues, relative to actin level. ( $n_{WT}>3$ ,  $n_{HT}>3$  and  $n_{Ho}>3$ ; Mann–Whitney U test, error bars are SEM). **(c, d, e and f)** Quantitative data of Fibrillin-1, Adamtsl2, Ltbp1 and Integrin- $\beta$ 1 proteins normalized with actin from three independent experiments (Mann–Whitney U test, error bars are SEM, \*\* denotes  $p < 0.01$ )



**Figure 4.** Impairment of microfibrillar network in Fbn1 KI mice. Primary chondrocyte cells isolated from P1 WT and Fbn1<sup>TB5</sup> KI ribs, stained with antibodies against Fibronectin (**a**) and Ltbp1 (**b**) revealed by fluorescent secondary antibody. Original magnification: x63. Scale bar, 20µm.

# Discussion/ Perspectives

## Rôle d'Adamtsl2 dans la chondrogenèse

Les mutations identifiées dans le gène *ADAMTSL2* associées à la dysplasie géleophysique, qui est caractérisée par des anomalies squelettiques, suggéraient un rôle potentiel d'ADAMTSL2 dans le développement squelettique. Les anomalies du squelette observées chez les souris CreCMV; Adamtsl2<sup>ff</sup> ont confirmé qu'Adamtsl2 avait un rôle dans la chondrogenèse et ont démontré que cette protéine était un régulateur positif de ce processus. En effet les souris mutantes ont une petite taille dès la naissance, ainsi qu'un raccourcissement des extrémités et des os longs et une déformation du crâne, mimant ainsi les anomalies squelettiques de la pathologie chez l'humain.

Les ADAMTSL sont des protéines appartenant à la famille des ADAMTS, n'ayant pas encore de fonction connue à ce jour<sup>76</sup>. Elles ont été associées, ayant une structure similaire à la papiline, à un rôle d'inhibition des ADAMTS. En effet, Kramerova a démontré que la papiline avait une fonction inhibitrice sur ADAMTS2<sup>110</sup>. Mais à ce jour aucune autre ADAMTSL n'a montré de fonction d'inhibitrice des ADAMTS. Le modèle murin Adamtsl4<sup>trm267</sup> a permis de démontrer une potentielle fonction d'Adamtsl4 dans l'ancrage des fibres au niveau de la capsule de la lentille<sup>192</sup>. Nous avons démontré, à travers cette thèse, le rôle d'Adamtsl2 dans la chondrogenèse. Très peu d'ADAMTS et aucune ADAMTSL n'ont été impliquées dans ce processus cellulaire. Les mutations dans les gènes *ADAMTS10* et *ADAMTS17* ont été associées à une petite taille mais aucun modèle animal à ce jour n'a pu démontrer leur rôle exact dans la chondrogenèse<sup>8,9</sup>. Le modèle murin Adamts7KO suggère qu'Adamts7 aurait un rôle répresseur sur la chondrogenèse. En effet, quand Adamts7 est surexprimée, la souris transgénique présente un retard statural<sup>193</sup>.

Afin d'identifier le rôle d'Adamtsl2, nous avons, en collaboration avec l'ICS, généré des souris CreCMV; Adamtsl2<sup>ff</sup>. Nous avons fait le choix, dans un premier temps, d'inactiver le gène dans la totalité des tissus utilisant le promoteur CreCMV. Dans ce contexte, les souris présentent un très fort taux de mortalité dès la naissance. Chez l'humain, 30% des patients DG meurent dans les cinq premières années de leur vie, d'infiltration valvulaire cardiaque ou d'atteinte broncho-pulmonaire. Néanmoins, la cause de mortalité des souris mutantes n'est pas liée à un phénotype cardiaque. En effet, nous avons établi une collaboration avec S. Zaffran (Marseille) qui a étudié le développement du cœur chez des souris invalidées pour le gène *Adamtsl2*. Malgré une expression d'Adamtsl2 au cours du développement cardiaque, les souris mutantes à E17.5 et à la naissance ne présentent pas d'anomalie du cœur au niveau fonctionnel et structural. Ces travaux suggèrent que contrairement à chez l'homme, Adamtsl2 chez la souris n'a pas de rôle majeur dans le développement cardiaque ou qu'Adamtsl2 peut être compensée par une autre Adamts ou Adamtsl. Pour continuer d'explorer les causes de mortalité de nos souris mutantes, nous avons donc décidé d'explorer le phénotype pulmonaire qui montre un retard sévère de la formation des alvéoles pulmonaires. Le phénotypage

pulmonaire plus approfondi est en cours, en collaboration avec Arnaud Mailleux (Hôpital Bichat, Paris). Du fait de ce très fort taux de mortalité des souris CreCMV; Adamtsl2<sup>ff</sup> à la naissance, il nous a été impossible d'étudier cette lignée de souris à des stades plus tardifs, ce qui a limité notre étude dans un premier temps.

Nous avons également noté que le phénotype de nos souris mutantes est beaucoup plus sévère que la pathologie humaine. Cela peut s'expliquer en partie par l'absence d'identification de mutations stop chez les patients DG. Des mutations hétérozygotes composites ont été identifiées avec une mutation stop mais jamais deux<sup>3</sup>. La plupart des mutations identifiées chez les patients DG sont des mutations faux-sens. Par conséquent, une mutation homozygote stop dans le gène *ADAMTSL2* ou deux mutations hétérozygotes composites stop dans ce même gène pourraient être létales.

Dans un second temps, le développement du modèle CreCol2; Adamtsl2<sup>ff</sup> qui avait pour but d'étudier les conséquences fonctionnelles d'une absence d'Adamtsl2 uniquement dans les tissus cartilagineux, nous a permis d'étudier les souris mutantes au cours de la croissance car ces souris étaient viables. Ces souris CreCol2; Adamtsl2<sup>ff</sup> ayant une petite taille et des os longs plus courts, nous ont permis de confirmer le rôle spécifique d'Adamtsl2 dans l'ossification endochondrale. Chez la souris, Col2 est exprimé par les cellules mésenchymateuses avant que celles-ci ne se différencient en chondrocytes, entre E12.5 et E14<sup>194</sup>. Bien qu'il ait été montré qu'Adamtsl2 était exprimé vers E17.5, soit après Col2, les modèles CreCMV; Adamtsl2<sup>ff</sup> et CreCol2; Adamtsl2<sup>ff</sup> présentent des différences phénotypiques au niveau du squelette. En particulier, un retard statural plus modéré et une absence de raccourcissement des extrémités ont été observés chez le modèle CreCol2; Adamtsl2<sup>ff</sup>. Cependant, bien que l'expression d'Adamtsl2 n'ait été détectée qu'à partir de E17.5, nous ne pouvons pas exclure la possible expression de cette protéine à un stade plus précoce du développement, avant E12.5. Ainsi l'inactivation d'Adamtsl2 avec la CreCol2 se faisant plus tardivement, il n'y aurait pas d'anomalie au niveau des doigts. Cette hypothèse est renforcée par la récente publication montrant le rôle de fbn1, partenaire d'Adamtsl2, dans le contrôle de TGFβ au niveau de la niche des cellules souches mésenchymateuses<sup>195</sup>. Adamtsl2 étant partenaire de fbn1, elle pourrait avoir un rôle précoce identique.

Une absence d'Adamtsl2 aboutit aussi à des membres plus courts. En étudiant la plaque de croissance, qui est le tissu permettant l'allongement des os, nous avons observé une désorganisation des colonnes de chondrocytes. Dans un environnement normal, les chondrocytes hypertrophiques forment des colonnes régulières alors que, dans un environnement où Adamtsl2 est absent, les colonnes semblent désorganisées et les chondrocytes sont plus gros que chez les individus sauvages.

Le phénotype des chondrocytes et de la plaque de croissance en général nous ont amené à nous intéresser aux marqueurs de la chondrogenèse. Ainsi nous avons observé une augmentation de Sox9 qui est un des premiers marqueurs de la chondrogenèse, apparaissant dès le début de l'ossification endochondrale dans les cellules mésenchymateuses. Une de ses cibles, le Col2, marqueurs des chondrocytes prolifératifs, ne varie pas entre les KO et les WT. Cependant, Col10, marqueurs des chondrocytes hypertrophiques et qui est régulé négativement par Sox9 est beaucoup moins exprimé dans les KO, concordant ainsi parfaitement avec la hausse de Sox9. Nous avons aussi observé une augmentation de la prolifération dans les plaques de croissance des souris KO mais pas de différence au niveau de l'apoptose. Ces résultats suggèrent qu'Adamtsl2 a un rôle dans la prolifération et la différenciation des chondrocytes.

De plus, nous avons démontré qu'Adamtsl2 était aussi impliquée dans la formation du réseau microfibrillaire. En effet celui-ci se retrouve totalement désorganisé chez les souris KO, avec une diminution d'expression de Fbn1 et de Ltp1. L'absence d'adamtsl2 impacterait toute l'organisation de la MEC, étant donné que même la fibronectine, qui est le composant de base de la MEC, se retrouve être dérégulée chez les souris KO. Nous montrons ainsi pour la première fois un lien entre le réseau microfibrillaire déstructuré et une anomalie de la plaque de croissance. Les chondrocytes n'ont ainsi plus un environnement favorable permettant la formation correcte en colonnes. Tout ceci aboutirait à une dérégulation du processus d'ossification endochondrale et donc à des os longs plus courts et une taille plus petite. De plus, il a été démontré qu'ADAMTS10, dont les mutations sont responsables du Syndrome de Weill Marchesani (SWM), favorisait les adhésions focales entre les cellules riches en HS et la MEC<sup>99</sup>. Ainsi, réduire l'expression d'ADAMTS10 entraîne une diminution des adhésions focales et conduit également à une diminution de la formation des microfibrilles FBN1. A l'inverse, la surexpression d'ADAMTS10 induit une augmentation des adhésions de la matrice à la cellule via l'HS. Ce même mécanisme pourrait être applicable à ADAMTSL2 qui pourrait interagir avec l'HS et augmenter les adhésions focales entre les chondrocytes et les microfibrilles de FBN1. Cette hypothèse est renforcée du fait que FBN1 interagit avec ADAMTS10 et ADAMTSL2. Il sera donc intéressant d'étudier les interactions entre ADAMTSL2 et l'HS afin de confirmer cette hypothèse.

## Rôle de FBN1 dans le développement du squelette

Notre étude démontre pour la première fois le rôle majeur de Fbn1 dans le développement du squelette en contrôlant l'ossification endochondrale. Les anomalies squelettiques du modèle Fbn1<sup>TB5</sup>, démontrent le rôle de régulateur positif de FBN1 au cours de la chondrogenèse. En effet, nos souris hétérozygotes mutantes Fbn1<sup>TB5/+</sup> présentent un retard statural comme les homozygotes ainsi que des os longs plus courts. Les souris homozygotes Fbn1<sup>TB5-/-</sup> présentent un phénotype plus sévère. L'étude des souris Fbn1<sup>TB5-/-</sup> nous ont ainsi permis d'aller plus loin dans notre raisonnement avec des résultats plus significatifs que les souris Fbn1<sup>TB5+/-</sup>.

Les premières mutations dans le gène FBN1 ont été identifiées dans des patients Marfan qui sont caractérisés par une avance staturale, une arachnodactylie et une dilatation aortique<sup>162</sup>. Notre récente identification de mutations dans ce même gène chez des patients DG caractérisés par un phénotype complètement opposé aux patients Marfan nous suggérait une corrélation phénotype-génotype entre les mutations dans le domaine TB5 de la protéine FBN1 et la petite taille. En effet, toutes les mutations identifiées dans *FBN1* et associées à un retard statural étaient localisées dans les exons codant le domaine TB5 de FBN1<sup>4</sup>. Le phénotype de nos souris mutantes confirme cette hypothèse.

Malgré l'avance staturale des patients Marfan, FBN1 a été peu étudiée dans le développement du squelette. Tout d'abord, les fibrillines constituent seulement une infime fraction de la totalité des protéines de la MEC au niveau du squelette<sup>137</sup>. Alors qu'elles représentent seulement 1 à 3%, les mutations dans le gène codant FBN1 entraînent des anomalies squelettiques sévères. FBN1 a été impliquée indirectement dans le remodelage osseux, en contrôlant les signaux intrinsèques tels que les voies BMP et TGFβ. Le modèle murin Fbn1<sup>mgR/mgR</sup> présentait une densité minérale osseuse réduite ainsi que des anomalies de l'os trabéculaire mimant correctement les manifestations osseuses des patients Marfan<sup>196</sup>. Ces résultats ont été corrélés à l'implication de FBN1 dans la balance ostéoblaste-ostéoclaste. L'ostéopénie observée chez les souris Fbn1<sup>Prx1-/-</sup> et Fbn1<sup>Osx-/-</sup> a démontré que la perte osseuse observée chez les Marfan était liée à une accélération de la différenciation des ostéoprogéniteurs<sup>197</sup>. FBN1 aurait un rôle négatif sur l'ostéoclastogénèse en séquestrant RANKL, un facteur ostéoclastique, dans la MEC. FBN1 a aussi un rôle dans les cellules souches mésenchymateuses, précurseurs des chondrocytes, en modulant la biodisponibilité de TGFβ au niveau des niches de la moelle osseuse<sup>195</sup>. Peu de données sont disponibles sur le rôle de FBN1 dans la chondrogenèse. Notre étude montre que FBN1 a un impact sur la régulation du Col10. En effet Col10, marqueur des chondrocytes hypertrophiques a une expression réduite au niveau des plaques de croissance des souris Fbn1<sup>TB5-/-</sup>. Cette baisse d'expression est associée à une tendance d'augmentation du facteur de transcription Sox9 et de la prolifération des chondrocytes. Ces

résultats montrent l'implication de Fbn1 dans la différenciation des chondrocytes et suggèrent aussi son implication dans leur prolifération.

De plus, l'analyse des plaques de croissance des souris Fbn1<sup>TB5+/-</sup> montre qu'il n'y a pas une constance dans la désorganisation de la plaque. Une étude sur des patients atteints du syndrome de Marfan et sur les différences de sévérité des phénotypes en fonction de la quantité de fibrilline encodée par l'allèle sauvage, a montré que plus le taux d'expression de l'allèle sauvage était bas, plus le phénotype était sévère<sup>134</sup>. Dans la population contrôle, une variabilité d'expression de la fibrilline sauvage peut varier d'un facteur quatre. Nous supposons donc que cette variabilité existe également dans nos animaux hétérozygotes expliquant ainsi la variabilité de sévérité d'anomalie de la plaque de croissance.

L'analyse de la plaque de croissance des souris Fbn1<sup>TB5-/-</sup> semble montrer la nécessité d'un réseau microfibrillaire de FBN1 intègre pour la formation de colonne chondrocytaire. Nous avons démontré précédemment l'existence d'un microenvironnement formé par Adamtsl2, Fbn1 et Ltp1 associé à la fibronectine. Tous ces composants de la MEC sont nécessaires au bon déroulement de la chondrogenèse. Dans notre étude, nous avons observé que la mutation ponctuelle dans le domaine TB5 conduisait à une dérégulation d'Adamtsl2, Ltp1 et de la fibronectine. Nous avons observé une tendance à la baisse d'expression d'Adamtsl2, ce qui corroborerait nos précédents résultats obtenus avec le modèle CreCMVAdamtsl2<sup>-/-</sup> et démontre la nécessité de ces deux protéines pour une chondrogenèse normale. Par contre l'augmentation de l'expression de Ltp1 et le réseau dense que forment les fibrilles de Ltp1 confirme l'indépendance du dépôt de Ltp1 vis-à-vis de Fbn1<sup>198</sup>. Les fibrilles de Fbn1 ne sont pas moins exprimées, ce qui peut être expliqué par la présence d'une mutation ponctuelle qui n'empêche pas la synthèse des Fbn1. L'analyse de la structure du réseau formé par les fibrilles Fbn1 est en cours et nous permettra de juger si la mutation a des conséquences sur la structure de ce réseau.

Il a été démontré que le domaine TB5 interagit avec l'HS et que les mutations retrouvées dans le SWM et la DG perturbent cette interaction<sup>98</sup>. Ces résultats ont été observés en coculture entre des cellules HEK 293 surexprimant les mutations identifiées et des fibroblastes. Comme l'HS permet l'interaction entre les composants de la matrice extracellulaire et la cellule, il est possible que la désorganisation de la plaque de croissance et des chondrocytes soient justement en lien avec la perturbation de cette interaction. Les cellules ne seraient plus attachées à cette matrice et le réseau microfibrillaire ne recevrait plus correctement les messages provenant de la cellule. D'ailleurs il est aussi intéressant de relever que FBN1 est aussi le gène majeur pour le syndrome de Stiff skin, qui est caractérisé par une peau épaisse, anomalie aussi retrouvée dans la DG. Les mutations du Stiff Skin

sont localisées dans le domaine TB4 où se trouve le seul site RGD de FBN1, permettant l'interaction avec les cellules via les intégrines. Ainsi pour aller plus loin, une perte d'interaction de FBN1 avec l'HS conduirait à une petite taille et une perte d'interaction avec les intégrines lors de mutation dans le domaine TB4 conduirait aux caractéristiques du syndrome de Stiff skin. Et il serait possible au vue des caractéristiques cliniques de la Dysplasie Géléophysique, à savoir la peau épaisse, que les mutations DG impacteraient également la bonne fonctionnalité du domaine TB4. Nous avons en effet observé une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$ , qui pourrait être due à une perte d'interaction avec le domaine TB4 de FBN1. Il serait intéressant d'étudier plus en détails les interactions du HS avec FBN1 chez le modèle  $Fbn1^{TB5}$  mais également chez le modèle  $CreCMV; Adamts12^{f/f}$ . Une collaboration est en cours avec C. Kielty qui a démontré l'impact des mutations DG sur l'interaction entre TB5 et l'HS.

Les souris hétérozygotes présentent un phénotype intermédiaire bien que significatif. A l'inverse des patients DG, ce sont les souris homozygotes  $Fbn1^{TB5/-}$  qui ont le phénotype le plus sévère. Les souris  $Fbn1^{TB5/-}$  survivent à la naissance, bien que plus fragiles que les souris hétérozygotes  $Fbn1^{TB5+/-}$  et les souris sauvages issues de la même lignée. Cependant, nous avons observé un pic de mortalité des souris  $Fbn1^{TB5/-}$  aux alentours de 2/3 mois. Nous pensons que comme chez l'humain, la mutation dans le domaine TB5 entraînerait des défauts au niveau cardiaque ou pulmonaire conduisant à la mort de l'individu. Toutefois, cette hypothèse reste à être vérifiée.

## Comparaison des deux modèles murins $CreCMV; Adamts12^{f/f}$ et $Fbn1^{TB5}$

Les modèles générés récapitulent tous deux le retard statural observé chez les patients DG ainsi que les os longs raccourcis. Ils présentent tous deux une dérégulation de la plaque de croissance avec des chondrocytes anormaux et une désorganisation du réseau microfibrillaire dans la MEC.

Nous avons pu également observer des différences entre les deux modèles. La première différence est que le modèle  $Fbn1^{TB5}$  a un phénotype général plus modéré que le modèle  $CreCMV; Adamts12^{f/f}$ . Ceci peut-être expliqué par le fait que nous soyons dans un knock-in dans le cas de la mutation pour  $Fbn1$ , et que la protéine soit toujours exprimée, alors que dans le second cas, nous sommes dans un knock-out où il y a absence d'expression de la protéine, ce qui pourrait expliquer le phénotype plus sévère. Nous avons également observé une différence dans l'expression de  $Ltbp-1$  entre les deux modèles, où une diminution d'expression a été observée chez le modèle  $CreCMV; Adamts12^{f/f}$  alors qu'à l'inverse une augmentation a été quantifiée chez la souris  $Fbn1^{TB5/-}$ . L'analyse

de l'activation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  est en cours et nous permettra de juger des conséquences de cette hausse de Ltbp-1 chez la souris *Fbn1*<sup>TB5-/-</sup>.

De plus, à la naissance, il n'y a pas de différence au niveau des extrémités chez les souris *Fbn1* à l'inverse des souris *CreCMV; Adamts12*<sup>ff</sup>. Cependant, il est intéressant de remarquer que le phénotype des extrémités du modèle *Fbn1*<sup>TB5</sup> est similaire à celui du modèle *CreCol2; Adamts12*<sup>ff</sup>. Il se pourrait que chez la souris, *Fbn1* ne serait pas majeur dans le développement des doigts, mais que ce soit plutôt *Fbn2*. Par ailleurs les mutations dans *Fbn2* sont responsables de syndactylie chez la souris, renforçant cette hypothèse<sup>199</sup>. Nous aurions alors un microenvironnement impliquant plutôt *Adamts12/Fbn2* dans le tissu squelettique au niveau des extrémités. Ce microenvironnement serait ainsi dérégulé chez le modèle *CreCMV; Adamts12*<sup>ff</sup> mais pas chez le modèle *Fbn1*<sup>TB5</sup> où c'est le gène *Fbn1* qui est muté. Il ne serait pas non plus dérégulé chez le modèle *CreCol2; Adamts12*<sup>ff</sup> peut-être du fait que *Fbn2* est exprimé très tôt dans le développement embryonnaire, soit potentiellement avant l'expression de la Cre sous le promoteur *Col2* et donc la délétion d'*Adamts12*.

Grâce à l'étude de nos deux modèles, nous montrons que le microenvironnement formé par *Adamts12*, *Fbn1* et potentiellement *Ltbp-1* est essentiel pour la formation des colonnes de chondrocytes hypertrophiques. Ainsi dans les deux modèles, nous aurions une perte d'adhésion de la matrice au chondrocytes, très probablement via un complexe formé par l'HS et les intégrines. De même, il a été montré le microenvironnement formé *Fbn1/Adamts10/Adamts13* régule l'épaisseur de la peau et la croissance musculosquelettique. Une dérégulation de ce microenvironnement conduit au syndrome de Weill Marchesani. Ceci montre l'importance du microenvironnement pour des processus de développement comme la chondrogenèse.

## Implication de la voie de signalisation du TGF- $\beta$

Ce microenvironnement formé par *Adamts12*, *Fbn1* et *Ltbp1* est non fonctionnel chez la souris *CreCMVAdamts12*<sup>ff</sup> ce qui entraînerait des dérégulations des facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ . En effet, ce microenvironnement se retrouve être, via la fonction de *Fbn1*, un lieu de stockage du TGF- $\beta$ <sup>200</sup>. Du fait de la malformation de ce réseau, le TGF- $\beta$  se retrouve, en continu, potentiellement actif dans la matrice extracellulaire ce qui expliquerait une augmentation d'activation de cette voie de signalisation. Il a été montré également que TGF- $\beta$  régule positivement la composition de la MEC. Dans notre contexte, on peut émettre l'hypothèse que la cellule déclenche une libération du TGF- $\beta$  pour compenser la dérégulation des composants de la MEC. Une autre équipe a développé un modèle murin avec une délétion au milieu du gène *Adamts12* au niveau de l'exon 5. Une étude au niveau des poumons de cette souris invalidée pour *Adamts12* a montré qu'un traitement d'anticorps anti TGF- $\beta$  ne rétablissait pas le phénotype sauvage<sup>190</sup>. Dans ce cas, la suractivation de la voie de

signalisation de TGF- $\beta$  se faisait au stade E17.5 et non en postnatal comme dans notre cas au niveau de la plaque de croissance. Les auteurs suggèrent donc une autre voie de signalisation activée ou au moins dérégulée sans clairement la définir. De plus les auteurs n'ont pas étudié la même souris mutante. Nous suggérons donc qu'il peut aussi y avoir une réponse tissu spécifique, c'est-à-dire une différence de régulation entre les bronches pulmonaires et les chondrocytes. L'augmentation de l'activation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  est une des cibles pour la thérapie dans le syndrome de Marfan. En effet, chez les patients Marfan, il a été démontré en 2006 qu'avec un traitement au losartan, un inhibiteur de l'angiotensine II, il y avait une réduction de la dilatation aortique chez le modèle murin Marfan *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup><sup>186</sup>. Néanmoins ces résultats ont été remis en question par deux autres études qui n'ont pas trouvé d'effets bénéfiques avec le losartan en comparaison avec le placebo<sup>201,202</sup>. Cibler la voie TGF- $\beta$  reste cependant, une piste pour traiter le syndrome de Marfan et pourrait l'être également pour la Dysplasie Géléophysique.

# Bibliographie

1. Le Goff, C. & Cormier-Daire, V. Genetic and molecular aspects of acromelic dysplasia. *Pediatr. Endocrinol. Rev. PER* **6**, 418–423 (2009).
2. Le Goff, C. *et al.* ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat. Genet.* **40**, 1119–1123 (2008).
3. Allali, S. *et al.* Molecular screening of ADAMTSL2 gene in 33 patients reveals the genetic heterogeneity of geleophysic dysplasia. *J. Med. Genet.* **48**, 417–421 (2011).
4. Le Goff, C. *et al.* Mutations in the TGFβ Binding-Protein-Like Domain 5 of FBN1 Are Responsible for Acromicric and Geleophysic Dysplasias. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 7–14 (2011).
5. McInerney-Leo, A. M. *et al.* Mutations in LTBP3 cause acromicric dysplasia and geleophysic dysplasia. *J. Med. Genet.* **53**, 457–464 (2016).
6. Maroteaux, P., Stanescu, R., Stanescu, V. & Rappaport, R. Acromicric dysplasia. *Am. J. Med. Genet.* **24**, 447–459 (1986).
7. Faivre, L. *et al.* In frame fibrillin-1 gene deletion in autosomal dominant Weill-Marchesani syndrome. *J. Med. Genet.* **40**, 34–36 (2003).
8. Dagoneau, N. *et al.* ADAMTS10 mutations in autosomal recessive Weill-Marchesani syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 801–806 (2004).
9. Morales, J. *et al.* Homozygous mutations in ADAMTS10 and ADAMTS17 cause lenticular myopia, ectopia lentis, glaucoma, spherophakia, and short stature. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 558–568 (2009).
10. Haji-Seyed-Javadi, R. *et al.* LTBP2 mutations cause Weill-Marchesani and Weill-Marchesani-like syndrome and affect disruptions in the extracellular matrix. *Hum. Mutat.* **33**, 1182–1187 (2012).
11. Le Goff, C. *et al.* Mutations at a single codon in Mad homology 2 domain of SMAD4 cause Myhre syndrome. *Nat. Genet.* **44**, 85–88 (2011).
12. Zelzer, E. & Olsen, B. R. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* **423**, 343–348 (2003).
13. Lefebvre, V. & Bhattaram, P. Vertebrate skeletogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **90**, 291–317 (2010).

14. Karsenty, G., Kronenberg, H. M. & Settembre, C. Genetic Control of Bone Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 629–648 (2009).
15. Thompson, E. M., Matsiko, A., Farrell, E., Kelly, D. J. & O'Brien, F. J. Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, 889–902 (2015).
16. Martel-Pelletier, J. *et al.* Osteoarthritis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16072 (2016).
17. Abad, V. *et al.* The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* **143**, 1851–1857 (2002).
18. Smits, P. *et al.* The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* **1**, 277–290 (2001).
19. Maes, C. *et al.* Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev. Cell* **19**, 329–344 (2010).
20. Yang, L., Tsang, K. Y., Tang, H. C., Chan, D. & Cheah, K. S. E. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12097–12102 (2014).
21. Kozhemyakina, E., Lassar, A. B. & Zelzer, E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Dev. Camb. Engl.* **142**, 817–831 (2015).
22. Green, J. D. *et al.* Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes Dis.* **2**, 307–327 (2015).
23. Wagner, T. *et al.* Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79**, 1111–1120 (1994).
24. Lefebvre, V. & Smits, P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **75**, 200–212 (2005).

25. Lefebvre, V., Li, P. & de Crombrughe, B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* **17**, 5718–5733 (1998).
26. Akiyama, H., Chaboissier, M.-C., Martin, J. F., Schedl, A. & de Crombrughe, B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813–2828 (2002).
27. Bell, D. M. *et al.* SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.* **16**, 174–178 (1997).
28. Leung, V. Y. L. *et al.* SOX9 Governs Differentiation Stage-Specific Gene Expression in Growth Plate Chondrocytes via Direct Concomitant Transactivation and Repression. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
29. Ingham, P. W. & McMahon, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**, 3059–3087 (2001).
30. St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. & McMahon, A. P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* **13**, 2072–2086 (1999).
31. Long, F., Zhang, X. M., Karp, S., Yang, Y. & McMahon, A. P. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Dev. Camb. Engl.* **128**, 5099–5108 (2001).
32. Vortkamp, A. *et al.* Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **273**, 613–622 (1996).
33. Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332–336 (2003).
34. Otto, F. *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765–771 (1997).

35. Massagué, J., Cheifetz, S., Boyd, F. T. & Andres, J. L. TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **593**, 59–72 (1990).
36. Yang, X. *et al.* TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J. Cell Biol.* **153**, 35–46 (2001).
37. Ferguson, C. M. *et al.* Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology* **141**, 4728–4735 (2000).
38. Valcourt, U., Gouttenoire, J., Moustakas, A., Herbage, D. & Mallein-Gerin, F. Functions of transforming growth factor-beta family type I receptors and Smad proteins in the hypertrophic maturation and osteoblastic differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 33545–33558 (2002).
39. Finsson, K. W., Parker, W. L., ten Dijke, P., Thorikay, M. & Philip, A. ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **23**, 896–906 (2008).
40. Blaney Davidson, E. N. *et al.* Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 7937–7945 (2009).
41. Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M. & Vortkamp, A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell* **3**, 439–449 (2002).
42. Zehentner, B. K., Dony, C. & Burtscher, H. The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **14**, 1734–1741 (1999).
43. Ornitz, D. M. & Marie, P. J. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev.* **29**, 1463–1486 (2015).
44. Shimokawa, K. *et al.* Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo. *Dev. Cell* **21**, 257–272 (2011).

45. Ornitz, D. M. & Itoh, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 215–266 (2015).
46. Peters, K. G., Werner, S., Chen, G. & Williams, L. T. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* **114**, 233–243 (1992).
47. Colvin, J. S., Bohne, B. A., Harding, G. W., McEwen, D. G. & Ornitz, D. M. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* **12**, 390–397 (1996).
48. Bekhouche, M. & Colige, A. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **44–46**, 46–53 (2015).
49. Mouw, J. K., Ou, G. & Weaver, V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 771–785 (2014).
50. Rowe, D. W., Shapiro, J. R., Poirier, M. & Schlesinger, S. Diminished type I collagen synthesis and reduced alpha 1(I) collagen messenger RNA in cultured fibroblasts from patients with dominantly inherited (type I) osteogenesis imperfecta. *J. Clin. Invest.* **76**, 604–611 (1985).
51. Li, S. W. *et al.* Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev.* **9**, 2821–2830 (1995).
52. Aszódi, A., Chan, D., Hunziker, E., Bateman, J. F. & Fässler, R. Collagen II Is Essential for the Removal of the Notochord and the Formation of Intervertebral Discs. *J. Cell Biol.* **143**, 1399–1412 (1998).
53. Kirsch, T. & von der Mark, K. Isolation of human type X collagen and immunolocalization in fetal human cartilage. *Eur. J. Biochem.* **196**, 575–580 (1991).
54. Zheng, Q. *et al.* Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J. Cell Biol.* **162**, 833–842 (2003).
55. Warman, M. L. *et al.* A type X collagen mutation causes Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Nat. Genet.* **5**, 79–82 (1993).

56. Ho, M. S. P. *et al.* COL10A1 nonsense and frame-shift mutations have a gain-of-function effect on the growth plate in human and mouse metaphyseal chondrodysplasia type Schmid. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1201–1215 (2007).
57. Ornitz, D. M. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **22**, 108–112 (2000).
58. Ruoslahti, E. & Yamaguchi, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* **64**, 867–869 (1991).
59. Reinboth, B., Hanssen, E., Cleary, E. G. & Gibson, M. A. Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 3950–3957 (2002).
60. Tiedemann, K., Bätge, B., Müller, P. K. & Reinhardt, D. P. Interactions of fibrillin-1 with heparin/heparan sulfate, implications for microfibrillar assembly. *J. Biol. Chem.* **276**, 36035–36042 (2001).
61. Yadin, D. A. *et al.* Structure of the fibrillin-1 N-terminal domains suggests that heparan sulfate regulates the early stages of microfibril assembly. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **21**, 1743–1756 (2013).
62. Bax, D. V. *et al.* Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* **120**, 1383–1392 (2007).
63. Delhon, L., Cormier-Daire, V. & Goff, C. L. Metalloproteinases and their inhibitors in the pathophysiology of heritable connective tissue disorders: current evidence. *Metalloproteinases In Medicine* (2016). doi:10.2147/MNM.S63634
64. Strongin, A. Y. *et al.* Human 92kDa type IV collagenase: Functional analysis of fibronectin and carboxyl-end domains. *Kidney Int.* **43**, 158–162 (1993).
65. Wiedemann, H. R. & Spranger, J. [Metaphyseal chondrodysplasia (metaphyseal dysostosis)--a new type?]. *Z. Kinderheilkd.* **108**, 171–186 (1970).

66. Maroteaux, P., Verloes, A., Stanescu, V. & Stanescu, R. Metaphyseal anadysplasia: a metaphyseal dysplasia of early onset with radiological regression and benign course. *Am. J. Med. Genet.* **39**, 4–10 (1991).
67. Chung, A. W. Y. *et al.* Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ. Res.* **101**, 512–522 (2007).
68. Patel, A. C., McAlister, W. H. & Whyte, M. P. Spondyloepimetaphyseal dysplasia: clinical and radiologic investigation of a large kindred manifesting autosomal dominant inheritance, and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **72**, 326–342 (1993).
69. Winchester, P., Grossman, H., Lim, W. N. & Danes, B. S. A new acid mucopolysaccharidosis with skeletal deformities simulating rheumatoid arthritis. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* **106**, 121–128 (1969).
70. Evans, B. R. *et al.* Mutation of membrane type-1 metalloproteinase, MT1-MMP, causes the multicentric osteolysis and arthritis disease Winchester syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 572–576 (2012).
71. Holmbeck, K. *et al.* MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99**, 81–92 (1999).
72. Zankl, A. *et al.* Torg syndrome is caused by inactivating mutations in MMP2 and is allelic to NAO and Winchester syndrome. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **22**, 329–333 (2007).
73. Inoue, K. *et al.* A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. *J. Biol. Chem.* **281**, 33814–33824 (2006).
74. Oh, J. *et al.* Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. *Oncogene* **23**, 5041–5048 (2004).

75. Kuno, K. *et al.* Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 556–562 (1997).
76. Apte, S. S. A Disintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **284**, 31493–31497 (2009).
77. Jones, G. C. & Riley, G. P. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **7**, 160–169 (2005).
78. Colige, A. *et al.* cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: A new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2374–2379 (1997).
79. Soejima, K. *et al.* ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* **102**, 3232–3237 (2003).
80. Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G. N. & Edwards, D. R. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* **16**, 113 (2015).
81. Hulin, A. *et al.* Metallothionein-dependent up-regulation of TGF- $\beta$ 2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve. *Cardiovasc. Res.* **93**, 480–489 (2012).
82. Shindo, T. *et al.* ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.* **105**, 1345–1352 (2000).
83. Somerville, R. P. T. *et al.* Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 9503–9513 (2003).
84. Silver, D. L. *et al.* The Secreted Metalloprotease ADAMTS20 Is Required for Melanoblast Survival. *PLoS Genet.* **4**, (2008).
85. Verma, P. & Dalal, K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *J. Cell. Biochem.* **112**, 3507–3514 (2011).

86. Inagaki, J. *et al.* ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor. *Exp. Cell Res.* **323**, 263–275 (2014).
87. Colige, A. *et al.* Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *J. Biol. Chem.* **280**, 34397–34408 (2005).
88. Bekhouche, M. *et al.* Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- $\beta$  signaling as primary targets. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **30**, 1741–1756 (2016).
89. Ogino, H. *et al.* Secreted Metalloproteinase ADAMTS-3 Inactivates Reelin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **37**, 3181–3191 (2017).
90. Zheng, X. *et al.* Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem.* **276**, 41059–41063 (2001).
91. Somerville, R. P. T. *et al.* ADAMTS7B, the full-length product of the ADAMTS7 gene, is a chondroitin sulfate proteoglycan containing a mucin domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 35159–35175 (2004).
92. Liu, C. *et al.* ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 15800–15808 (2006).
93. Luan, Y. *et al.* Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. *Osteoarthritis Cartilage* **16**, 1413–1420 (2008).
94. Liu, C.-J. The role of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 in the pathogenesis of arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **5**, 38–45 (2009).
95. Wang, L., Wang, X. & Kong, W. ADAMTS-7, a novel proteolytic culprit in vascular remodeling. *Sheng Li Xue Bao* **62**, 285–294 (2010).

96. Kutz, W. E. *et al.* Functional analysis of an ADAMTS10 signal peptide mutation in Weill-Marchesani syndrome demonstrates a long-range effect on secretion of the full-length enzyme. *Hum. Mutat.* **29**, 1425–1434 (2008).
97. Kutz, W. E. *et al.* ADAMTS10 protein interacts with fibrillin-1 and promotes its deposition in extracellular matrix of cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **286**, 17156–17167 (2011).
98. Cain, S. A., McGovern, A., Baldwin, A. K., Baldock, C. & Kielty, C. M. Fibrillin-1 Mutations Causing Weill-Marchesani Syndrome and Acromicric and Geleophysic Dysplasias Disrupt Heparan Sulfate Interactions. *PLoS ONE* **7**, (2012).
99. Cain, S. A., Mularczyk, E. J., Singh, M., Massam-Wu, T. & Kielty, C. M. ADAMTS-10 and -6 differentially regulate cell-cell junctions and focal adhesions. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
100. Colige, A. *et al.* Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 308–317 (1999).
101. Lapière, C. M. & Nusgens, B. V. Ehlers-Danlos type VII-C, or human dermatosparaxis. The offspring of a union between basic and clinical research. *Arch. Dermatol.* **129**, 1316–1319 (1993).
102. Nusgens, B. V. *et al.* Evidence for a relationship between Ehlers-Danlos type VII C in humans and bovine dermatosparaxis. *Nat. Genet.* **1**, 214–217 (1992).
103. Fernandes, R. J. *et al.* Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *J. Biol. Chem.* **276**, 31502–31509 (2001).
104. Colige, A. *et al.* Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J. Biol. Chem.* **277**, 5756–5766 (2002).
105. Li, S. W. *et al.* Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *Biochem. J.* **355**, 271–278 (2001).
106. Sieron, A. L. *et al.* Structure and function of procollagen C-proteinase (mTolloid) domains determined by protease digestion, circular dichroism, binding to procollagen type I, and computer modeling. *Biochemistry (Mosc.)* **39**, 3231–3239 (2000).

107. Takahara, K. *et al.* Type I procollagen COOH-terminal proteinase enhancer protein: identification, primary structure, and chromosomal localization of the cognate human gene (PCOLCE). *J. Biol. Chem.* **269**, 26280–26285 (1994).
108. Aldahmesh, M. A. *et al.* The syndrome of microcornea, myopic chorioretinal atrophy, and telecanthus (MMCAT) is caused by mutations in ADAMTS18. *Hum. Mutat.* **34**, 1195–1199 (2013).
109. Aldahmesh, M. A. *et al.* Identification of ADAMTS18 as a gene mutated in Knobloch syndrome. *J. Med. Genet.* **48**, 597–601 (2011).
110. Kramerova, I. A. *et al.* Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Dev. Camb. Engl.* **127**, 5475–5485 (2000).
111. Hendee, K. *et al.* Identification and functional analysis of an ADAMTSL1 variant associated with a complex phenotype including congenital glaucoma, craniofacial, and other systemic features in a three-generation human pedigree. *Hum. Mutat.* (2017). doi:10.1002/humu.23299
112. Koo, B.-H. *et al.* ADAMTS-like 2 (ADAMTSL2) is a secreted glycoprotein that is widely expressed during mouse embryogenesis and is regulated during skeletal myogenesis. *Matrix Biol.* **26**, 431–441 (2007).
113. Sengle, G. *et al.* Microenvironmental regulation by fibrillin-1. *PLoS Genet.* **8**, e1002425 (2012).
114. Aragon-Martin, J. A. *et al.* Role of ADAMTSL4 mutations in FBN1 mutation-negative ectopia lentis patients. *Hum. Mutat.* **31**, E1622-1631 (2010).
115. Gabriel, L. A. R. *et al.* ADAMTSL4, a secreted glycoprotein widely distributed in the eye, binds fibrillin-1 microfibrils and accelerates microfibril biogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 461–469 (2012).
116. Bader, H. L. *et al.* A Disintegrin-Like and Metalloprotease Domain Containing Thrombospondin Type 1 Motif-like 5 (ADAMTSL5) is a novel fibrillin-1-, fibrillin-2-, and heparin-binding member of the ADAMTS superfamily containing a netrin-like module. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **31**, 398–411 (2012).

117. Tsutsui, K. *et al.* ADAMTSL-6 is a novel extracellular matrix protein that binds to fibrillin-1 and promotes fibrillin-1 fibril formation. *J. Biol. Chem.* **285**, 4870–4882 (2010).
118. Saito, M. *et al.* ADAMTSL6 $\beta$  protein rescues fibrillin-1 microfibril disorder in a Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. *J. Biol. Chem.* **286**, 38602–38613 (2011).
119. Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr. Rev.* **26**, 743–774 (2005).
120. Li, T.-F., O’Keefe, R. J. & Chen, D. TGF-beta signaling in chondrocytes. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **10**, 681–688 (2005).
121. Pateder, D. B. *et al.* PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes. *Exp. Cell Res.* **256**, 555–562 (2000).
122. Robertson, I. B. & Rifkin, D. B. Regulation of the Bioavailability of TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ -Related Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
123. Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S. & Rifkin, D. B. Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *J. Cell Biol.* **165**, 723–734 (2004).
124. Munger, J. S., Harpel, J. G., Giancotti, F. G. & Rifkin, D. B. Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin alphavbeta1. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2627–2638 (1998).
125. Sato, Y. & Rifkin, D. B. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J. Cell Biol.* **109**, 309–315 (1989).
126. Yu, Q. & Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* **14**, 163–176 (2000).

127. Ge, G. & Greenspan, D. S. BMP1 controls TGF $\beta$ 1 activation via cleavage of latent TGF $\beta$ -binding protein. *J. Cell Biol.* **175**, 111–120 (2006).
128. Valcourt, U., Alcaraz, L. B., Exposito, J.-Y., Lethias, C. & Bartholin, L. Tenascin-X: beyond the architectural function. *Cell Adhes. Migr.* **9**, 154–165 (2015).
129. Alcaraz, L. B. *et al.* Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF- $\beta$ . *J. Cell Biol.* **205**, 409–428 (2014).
130. Oreffo, R. O. C., Mundy, G. R., Seyedin, S. M. & Bonewald, L. F. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 817–823 (1989).
131. Massagué, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* **19**, 2783–2810 (2005).
132. Zhang, H., Hu, W. & Ramirez, F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* **129**, 1165–1176 (1995).
133. Dietz, H. C. & Pyeritz, R. E. Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Hum. Mol. Genet.* **4 Spec No**, 1799–1809 (1995).
134. Aubart, M. *et al.* The clinical presentation of Marfan syndrome is modulated by expression of wild-type FBN1 allele. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2764–2770 (2015).
135. Putnam, E. A., Zhang, H., Ramirez, F. & Milewicz, D. M. Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nat. Genet.* **11**, 456–458 (1995).
136. Arteaga-Solis, E. *et al.* Regulation of limb patterning by extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* **154**, 275–282 (2001).
137. Smaldone, S. & Ramirez, F. Fibrillin microfibrils in bone physiology. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **52–54**, 191–197 (2016).
138. Ramirez, F. & Sakai, L. Y. Biogenesis and function of fibrillin assemblies. *Cell Tissue Res.* **339**, 71–82 (2010).

139. Kielty, C. M. & Shuttleworth, C. A. Fibrillin-containing microfibrils: structure and function in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 747–760 (1995).
140. Hubmacher, D. *et al.* Biogenesis of extracellular microfibrils: Multimerization of the fibrillin-1 C terminus into bead-like structures enables self-assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6548–6553 (2008).
141. Kielty, C. M. *et al.* Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**, 207–217 (2002).
142. Lin, G. *et al.* Homo- and heterotypic fibrillin-1 and -2 interactions constitute the basis for the assembly of microfibrils. *J. Biol. Chem.* **277**, 50795–50804 (2002).
143. Marson, A. *et al.* Homotypic Fibrillin-1 Interactions in Microfibril Assembly. *J. Biol. Chem.* **280**, 5013–5021 (2005).
144. Sabatier, L. *et al.* Fibrillin assembly requires fibronectin. *Mol. Biol. Cell* **20**, 846–858 (2009).
145. Hubmacher, D., Tiedemann, K. & Reinhardt, D. P. Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions. *Curr. Top. Dev. Biol.* **75**, 93–123 (2006).
146. Kielty, C. M. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **8**, 1–23 (2006).
147. Charbonneau, N. L. *et al.* In vivo studies of mutant fibrillin-1 microfibrils. *J. Biol. Chem.* **285**, 24943–24955 (2010).
148. Gregory, K. E. *et al.* The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **280**, 27970–27980 (2005).
149. Sengle, G. *et al.* Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J. Biol. Chem.* **283**, 13874–13888 (2008).
150. Anderson, L. R., Owens, T. W. & Naylor, M. J. Integrins in development and cancer. *Biophys. Rev.* **6**, 191–202 (2013).
151. Pfaff, M., Reinhardt, D. P., Sakai, L. Y. & Timpl, R. Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1. *FEBS Lett.* **384**, 247–250 (1996).

152. Sakamoto, H. *et al.* Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* **271**, 4916–4922 (1996).
153. Bax, D. V. *et al.* Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J. Biol. Chem.* **278**, 34605–34616 (2003).
154. Jovanovic, J. *et al.* alphaVbeta6 is a novel receptor for human fibrillin-1. Comparative studies of molecular determinants underlying integrin-rgd affinity and specificity. *J. Biol. Chem.* **282**, 6743–6751 (2007).
155. Tsuruga, E. *et al.* Integrin alphavbeta3 regulates microfibril assembly in human periodontal ligament cells. *Tissue Cell* **41**, 85–89 (2009).
156. El-Hallous, E. *et al.* Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *J. Biol. Chem.* **282**, 8935–8946 (2007).
157. Wagenseil, J. E. & Mecham, R. P. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **81**, 229–240 (2007).
158. Carta, L. *et al.* Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J. Biol. Chem.* **281**, 8016–8023 (2006).
159. Kozel, B. A. *et al.* Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *J. Cell. Physiol.* **207**, 87–96 (2006).
160. Hinderer, S. *et al.* In vitro elastogenesis: instructing human vascular smooth muscle cells to generate an elastic fiber-containing extracellular matrix scaffold. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **10**, 034102 (2015).
161. Loeys, B. L. *et al.* Mutations in fibrillin-1 cause congenital scleroderma: stiff skin syndrome. *Sci. Transl. Med.* **2**, 23ra20 (2010).
162. Dietz, H. C. *et al.* Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* **352**, 337–339 (1991).
163. Loeys, B. L. *et al.* The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J. Med. Genet.* **47**, 476–485 (2010).

164. Jondeau, G., Michel, J. B. & Boileau, C. The translational science of Marfan syndrome. *Heart Br. Card. Soc.* **97**, 1206–1214 (2011).
165. Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C. & Heldin, C. H. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J. Biol. Chem.* **263**, 6407–6415 (1988).
166. Chen, Y. *et al.* Amino acid requirements for formation of the TGF-beta-latent TGF-beta binding protein complexes. *J. Mol. Biol.* **345**, 175–186 (2005).
167. Troilo, H., Steer, R., Collins, R. F., Kielty, C. M. & Baldock, C. Independent multimerization of Latent TGF $\beta$  Binding Protein-1 stabilized by cross-linking and enhanced by heparan sulfate. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
168. Todorovic, V. & Rifkin, D. B. LTBP, more than just an escort service. *J. Cell. Biochem.* **113**, 410–418 (2012).
169. Koski, C., Saharinen, J. & Keski-Oja, J. Independent promoters regulate the expression of two amino terminally distinct forms of latent transforming growth factor-beta binding protein-1 (LTBP-1) in a cell type-specific manner. *J. Biol. Chem.* **274**, 32619–32630 (1999).
170. Weiskirchen, R., Moser, M., Günther, K., Weiskirchen, S. & Gressner, A. M. The murine latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein (Ltbp-1) is alternatively spliced, and maps to a region syntenic to human chromosome 2p21–22. *Gene* **308**, 43–52 (2003).
171. Olofsson, A. *et al.* Efficient association of an amino-terminally extended form of human latent transforming growth factor-beta binding protein with the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **270**, 31294–31297 (1995).
172. Colosetti, P., Hellman, U., Heldin, C.-H. & Miyazono, K. Ca<sup>2+</sup> binding of latent transforming growth factor- $\beta$ 1 binding protein. *FEBS Lett.* **320**, 140–144 (1993).
173. Gibson, M. A. *et al.* Bovine latent transforming growth factor beta 1-binding protein 2: molecular cloning, identification of tissue isoforms, and immunolocalization to elastin-associated microfibrils. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6932–6942 (1995).

174. Shipley, J. M. *et al.* Developmental Expression of Latent Transforming Growth Factor  $\beta$  Binding Protein 2 and Its Requirement Early in Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4879–4887 (2000).
175. Dabovic, B. *et al.* Bone abnormalities in latent TGF-[beta] binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-[beta] bioavailability. *J. Cell Biol.* **156**, 227–232 (2002).
176. Colarossi, C. *et al.* Lung alveolar septation defects in Ltbp-3-null mice. *Am. J. Pathol.* **167**, 419–428 (2005).
177. Sterner-Kock, A. *et al.* Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes Dev.* **16**, 2264–2273 (2002).
178. Muro, A. F. *et al.* Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J. Cell Biol.* **162**, 149–160 (2003).
179. Kinsey, R. *et al.* Fibrillin-1 microfibril deposition is dependent on fibronectin assembly. *J. Cell Sci.* **121**, 2696–2704 (2008).
180. Takahashi, S. *et al.* The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *J. Cell Biol.* **178**, 167–178 (2007).
181. Dallas, S. L. *et al.* Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *J. Biol. Chem.* **280**, 18871–18880 (2005).
182. George, E. L., Baldwin, H. S. & Hynes, R. O. Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood* **90**, 3073–3081 (1997).
183. Lima, B. L. *et al.* A New Mouse Model for Marfan Syndrome Presents Phenotypic Variability Associated with the Genetic Background and Overall Levels of Fbn1 Expression. *PLOS ONE* **5**, e14136 (2010).

184. Pereira, L. *et al.* Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3819–3823 (1999).
185. Judge, D. P. *et al.* Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 172–181 (2004).
186. Habashi, J. P. *et al.* Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *Science* **312**, 117–121 (2006).
187. Chen, S. *et al.* Losartan increases bone mass and accelerates chondrocyte hypertrophy in developing skeleton. *Mol. Genet. Metab.* **115**, 53–60 (2015).
188. Gerber, E. E. *et al.* Integrin-modulating therapy prevents fibrosis and autoimmunity in mouse models of scleroderma. *Nature* **503**, 126–130 (2013).
189. Siracusa, L. D. *et al.* A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res.* **6**, 300–313 (1996).
190. Hubmacher, D., Wang, L. W., Mecham, R. P., Reinhardt, D. P. & Apte, S. S. Adamtsl2 deletion results in bronchial fibrillin microfibril accumulation and bronchial epithelial dysplasia--a novel mouse model providing insights into geleophysic dysplasia. *Dis. Model. Mech.* **8**, 487–499 (2015).
191. Packer, R. A. *et al.* Clinical Phenotype of Musladin-Lueke Syndrome in 2 Beagles. *J. Vet. Intern. Med.* **31**, 532–538 (2017).
192. Collin, G. B. *et al.* Disruption of murine Adamtsl4 results in zonular fiber detachment from the lens and retinal pigment epithelium dedifferentiation. *Hum. Mol. Genet.* (2015).  
doi:10.1093/hmg/ddv399
193. Lai, Y. *et al.* ADAMTS-7 forms a positive feedback loop with TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1575–1584 (2014).
194. Cheah, K. S., Lau, E. T., Au, P. K. & Tam, P. P. Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. *Development* **111**, 945–953 (1991).

195. Smaldone, S. *et al.* Fibrillin-1 Regulates Skeletal Stem Cell Differentiation by Modulating TGF $\beta$  Activity Within the Marrow Niche. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **31**, 86–97 (2016).
196. Nistala, H. *et al.* Differential effects of alendronate and losartan therapy on osteopenia and aortic aneurysm in mice with severe Marfan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4790–4798 (2010).
197. Cook, J. R. *et al.* Generation of Fbn1 conditional null mice implicates the extracellular microfibrils in osteoprogenitor recruitment. *Genes. N. Y. N 2000* **50**, 635–641 (2012).
198. Zilberberg, L. *et al.* Specificity of latent TGF- $\beta$  binding protein (LTBP) incorporation into matrix: role of fibrillins and fibronectin. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3828–3836 (2012).
199. Chaudhry, S. S. *et al.* Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 835–843 (2001).
200. ten Dijke, P. & Arthur, H. M. Extracellular control of TGF $\beta$  signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 857–869 (2007).
201. Lacro, R. V. *et al.* Atenolol versus losartan in children and young adults with Marfan's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2061–2071 (2014).
202. Milleron, O. *et al.* Marfan Sartan: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur. Heart J.* **36**, 2160–2166 (2015).

# Annexe

# Metalloproteinases and their inhibitors in the pathophysiology of heritable connective tissue disorders: current evidence

Laure Delhon  
Valerie Cormier-Daire  
Carine Le Goff

INSERM UMR 1163, Laboratory of Molecular and Physiopathological Bases of Osteochondrodysplasias, Imagine Institute, Paris Descartes University, Paris, France

**Abstract:** Extracellular matrix is composed of macromolecules constituting a complex network that allows the regulation of major cellular functions and maintenance of normal tissue homeostasis. The turnover of extracellular matrix is mediated by matrix-degrading enzymes such as metalloproteinases during normal and pathological conditions. Matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats (ADAMTS) are metalloproteinases that have been identified in distinct genetic disorders. The aim of our review was to emphasize the role of the metalloproteinases based on heritable connective tissue disorder phenotypes identified in relation with ADAMTS, ADAMTS-like, or metalloproteinases mutations.

**Keywords:** MMP, ADAMTS, connective tissue, collagen, disorder

## Introduction

Extracellular matrix (ECM) is composed of macromolecules such as collagens, proteoglycans, elastin, fibronectin, laminins, and several other glycoproteins, which form a complex network around cells in all tissues and organs. This network plays a role in signal transduction allowing the regulation of major cellular functions and maintenance of normal tissue homeostasis. The remodeling of ECM is mediated by matrix-degrading enzymes such as metalloproteinases during normal and pathological conditions.

Matrix metalloproteinase (MMP), a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats (ADAMTS) are proteases that belong to the metzincin family, named after the presence of zinc ion and the conserved Met residue at the active site.

Mammalian MMPs share a conserved domain structure that consists of a catalytic domain and an autoinhibitory prodomain.<sup>1</sup> The removal of the prodomain is mandatory to activate the MMPs. Their C-termini also contain a hemopexin domain that mediates protein-protein interactions.<sup>2</sup> The C-terminal domain has a role in substrate recognition, enzyme activation, and protease localization, internalization, and degradation. MMP-2 and MMP-9 contain three fibronectin type-II repeats that mediate binding of collagens.<sup>1</sup> All MMPs are not secreted, six MMPs are transmembrane. MMPs are divided into six subgroups according to their similarities in tridimensional structure and substrate affinity: collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane-type metalloproteinases, and others.<sup>3</sup> The primary function of MMPs is to degrade the structural components of ECM. MMPs have also a major role in the regulation and turnover of ECM. MMPs can impact on cellular function by regulating the

Correspondence: Carine Le Goff  
INSERM UMR 1163, Laboratory of Molecular and Physiopathological Bases of Osteochondrodysplasias, Imagine Institute, Paris Descartes University  
24 boulevard de Montparnasse,  
75015 Paris, France  
Tel +33 1 42 75 43 05  
Email carine.le-goff@inserm.fr

ECM proteins. For example, MMP-2 and MMP-9 are known to cleave transforming growth factor (TGF) $\beta$ , and through this activation module they promote tumor invasion.<sup>4</sup> Studies on mmp-mutant mice have pointed out the requirement of MMPs in postnatal development and tissue remodeling but not in embryogenesis.

The superfamily of ADAMTS contains 19 ADAMTS and 7 ADAMTS-like (ADAMTSL) proteins, which are secreted enzymes. ADAMTS are organized into two domains: catalytic domain and ancillary domain.<sup>5</sup> The catalytic domain, at the N-terminus, includes a metalloproteinase domain and a disintegrin-like domain. The ancillary domain, at the C-terminus, is organized with a modular structure comprising, at least, one or more thrombospondin type-I repeats. ADAMTS precursors are activated intracellularly in the Golgi or extracellularly by the cleavage of furin, a pro-protein convertase.<sup>6</sup> They are distinct from the membrane-anchored ADAMTS mainly involved in protein ectodomain shedding from the cell surface. ADAMTS proteases are implicated in different biological processes: procollagen propeptidase (ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14), aggrecanase in arthritis (ADAMTS4, ADAMTS5), other aggrecanases (ADAMTS1, ADAMTS8, ADAMTS9, ADAMTS15, and ADAMTS20), von Willebrand factor proteolysis (ADAMTS13), and cartilage oligomeric matrix protein proteolysis (ADAMTS7, ADAMTS12).<sup>5,7-12</sup>

ADAMTSL proteins have an ancillary domain similar to ADAMTS proteins but do not possess enzymatic activity because of the lack of a catalytic domain. Similar to ADAMTS, they are ECM proteins, but their functions are unknown.<sup>13-16</sup> However, it was observed that papilin, another ECM glycoprotein that shares similar structures with ADAMTSL, has an inhibitory action on ADAMTS proteinase similar to ADAMTS2.<sup>17,18</sup>

ADAMTSs and MMPs are regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). The family comprises four protease inhibitors (TIMP1-4).<sup>5</sup>

Deregulation of ECM composition and structure is associated with the development and progression of several pathologic conditions such as connective tissue disorders. Connective tissue disease refers to a group of disorders involving fibrous tissues that maintain the form of organs and other parts of the body such as bones, tendons, and cartilages. Through the past decades, molecular bases of numerous connective tissue disorders have been identified. This review focuses on a group of heritable connective tissue disorders related to metalloproteinases and their inhibitors.

## MMPs

### MMP-9 and MMP-13 mutations and metaphyseal anadysplasia

Metaphyseal anadysplasia (MAD) is characterized by an early-onset regressive form of metaphyseal dysplasia.<sup>19</sup> It is reported in the first months when distal metaphyses of long bones are found to be very irregular. The main clinical features are hypoplastic femoral necks and vertical edges of the metaphyses. These anomalies disappear after 2 years of age. Stature is usually not affected. The first patient with this disorder was reported by Wiedemann and Spranger and four other boys were diagnosed by Maroteaux et al.<sup>19,20</sup>

Two types of MAD have been described: type 1 (Spranger type), a clinically more severe type with reduced stature and autosomal dominant inheritance, and type 2 (Maroteaux type), a milder type with normal stature and autosomal recessive inheritance. The radiographic features of both types are indistinguishable.<sup>21</sup>

The autosomal recessive form of MAD (MIM 613073) is caused by homozygous loss of function of gene *MMP-9*.<sup>21</sup> The autosomal dominant form of MAD (MANDP1 [MIM 602111]) is caused by heterozygous mutations in gene *MMP-13*.<sup>22</sup> MMP-9 and MMP-13 are both involved in the degradation of ECM in the context of bone development.

*mmp-9-null* mice exhibited an abnormal endochondral bone development with a decreased hypertrophic chondrocyte apoptosis and trabecular bone formation.<sup>23</sup> The growth plate of *mmp-9-null* mice presented an accumulation of galectin 3, the substrate of MMP-9. Galectin 3 is a regulator of MMP-9 which acts on the recruitment of osteoclast at the chondro-osseous junction. The growth retardation was compensated after 3 weeks and the *mmp-9-null* mice had a normal axial skeleton at adult age.<sup>24</sup> MMP-2 and MMP-9 deregulation leads to severe elastic fiber fragmentation and degradation and may explain the thoracic aortic aneurysm observed in mutant *fn1<sup>C1039G/+</sup>*, a model of Marfan syndrome.<sup>25</sup> MMP-9 is also involved in immune system development and potentially in autoimmune disease development.<sup>26</sup>

Considering the multiple function of MMP-9, the restricted phenotype of MAD patients is due to the major role of MMP-9 in bone homeostasis.

MMP-13 is expressed by both terminal hypertrophic chondrocytes and osteoblasts, supporting its crucial role in bone formation and remodeling.<sup>27</sup> MMP-13 is considered as a collagenase. Its substrates are collagen I and II, two major collagens in chondrogenesis.<sup>28</sup> MMP-13 is also involved in

human osteoarthritis cartilage pathophysiology.<sup>29</sup> *mmp-13-null* mice that appeared healthy at birth showed defects in the growth plate. These mice showed normal differentiation of chondrocytes but the hypertrophic zone was larger as compared to the wild-type. Like *mmp-9-null* mice, the growth plate defect increased after 5 weeks and was resolved by 12 weeks of age. This model showed that collagen II and aggrecan are degraded by MMP-13,<sup>30</sup> those two substrates being shared by MMP-9 and MMP-13. The double *mmp-13*- and *mmp-9-null* mice also exhibited endochondral ossification impairment, ECM remodeling defect, increased chondrocyte survival, delayed vascular recruitment, and defective trabecular bone formation leading to shortened long bones.<sup>30</sup> These findings showed the requirement of balance between the assembly and degradation of collagen in endochondral ossification.

### MMP-13 mutations and Missouri-type spondyloepimetaphyseal dysplasia

Spondyloepimetaphyseal dysplasia is characterized by vertebral, epiphyseal, and metaphyseal anomalies.<sup>31</sup> The Missouri type (MIM 602111), an autosomal dominant disorder, displays moderate to severe metaphyseal changes, mild epiphyseal involvement, pear-shaped vertebrae in childhood, and rhizomelic shortening of the lower limbs.<sup>32</sup> The modeling defects improved spontaneously by early adolescence, but the affected individuals remained shorter than their age-matched unaffected sibs. The bowing deformities predispose to osteoarthritis of the knees.<sup>33</sup> *MMP-13* mutations are responsible for spondyloepimetaphyseal dysplasia – Missouri type. The missense mutation in *MMP-13*, F56S leads to the degradation of misfolded proenzyme.<sup>32</sup> MAD and Missouri type appear clinically distinct but are allelic conditions.

### MMP-14 mutations and Winchester syndrome

Winchester syndrome (WNCHRS; MIM 277950) belongs to a group of osteolytic syndromes, which are rare skeletal disorders characterized by osteolysis and joint destruction. Generalized osteolysis of the carpals and tarsals, arthropathy, generalized osteoporosis, corneal opacities, and myocardial damages are the main features of this syndrome.<sup>34</sup>

This autosomal recessive syndrome is caused by mutations in *MMP-14*. Mutations are localized in the hydrophobic region of the signal peptide resulting in a defect of MMP-14 transport to the membrane. MMP-14 is an activator of MMP-2. Due to the mislocalization of MMP-14, MMP-2 is not activated.<sup>35</sup>

The *mmp-14-null* mice displayed skeletal dysplasia with craniofacial dysmorphism and dwarfism, arthritis, severe osteopenia, and fibrosis of the dermis.<sup>36</sup> The mice were normal at birth but developed multiple defects and died by 3–12 weeks of age. The *mmp-14-null* mouse model is the only lethal *mmp*-mutant mice.<sup>37</sup> This model confirmed the importance of collagenolytic activity for the development and growth.

### MMP-2 mutations and Torg syndrome

Torg syndrome (MIM 259600), Winchester syndrome, and nodulus, arthropathy, osteolysis constitute a continuous clinical spectrum.<sup>38</sup> Torg syndrome is characterized by the presence of multiple, painless, subcutaneous nodules, mild to moderate osteoporosis, and osteolysis of the carpal and tarsals. Radiographically, the osteolysis is associated with a widening of the metacarpal and metatarsal bones.<sup>39,40</sup>

This syndrome is transmitted with an autosomal recessive mode of inheritance and due to *MMP-2* mutations.<sup>38</sup>

Mutant *mmp-2-null* mice showed attenuated features of human skeletal abnormalities.<sup>41</sup> In contrast, *mmp-2*- and *mmp-14-null* mice died at birth. These double mutants resemble the much older *mmp-14* single mutants, indicating that MMP-2 and MMP-14 function redundantly.<sup>42</sup>

### MMP-20 mutations and pigmented hypomaturational-type amelogenesis imperfecta (type IIA)

Amelogenesis imperfecta (AI) is a group of hereditary defects of the enamel which are not associated with any other generalized defect.<sup>43</sup> Pigmented hypomaturational-type amelogenesis imperfecta (MIM 612529) is characterized by anomalies of the maturation stage during the formation of enamel, resulting in an opaque and porous enamel. The enamel has a normal thickness but is hypomineralized. Radiographs show a lack of contrast between enamel and dentin.<sup>44,45</sup> The enamel layer of the teeth was pigmented, showing an agar brown discoloration. Pigmented hypomaturational-type amelogenesis imperfecta is an autosomal recessive disorder associated with *MMP-20* mutations.<sup>44,45</sup>

The exact function of MMP-20 is unknown. Recently, it has been shown that *mmp-20-null* mice presented with thin and soft enamel.<sup>46</sup> Unexpectedly, introduction of transgene expressing *mmp-20* in null mice, in order to compensate the thin enamel, resulted in decreased hardness. This suggests that an essential balance takes place between active and non-active MMP-20 in the formation of a properly hardened enamel layer.<sup>47</sup>

## ADAMTS and ADAMTSL ADAMTS2 mutations and Ehlers–Danlos syndrome – type VIIC

The Ehlers–Danlos syndrome (EDS) is a group of soft connective tissue disorders which are characterized by fragility in skin, ligaments and joints, blood vessels, and internal organs.<sup>48</sup> The dermatosparaxis type of EDS (EDS type VIIC [MIM 225410]) is a recessively inherited connective tissue disorder, mainly characterized by extreme skin fragility. Joint laxity is moderate compared to other EDS.<sup>49</sup> Other characteristics are reported such as orofacial features, umbilical hernia, and blue sclera after minor trauma.<sup>48,49</sup>

Mostly EDS are linked to mutations in one of the genes encoding fibrillar collagen proteins or enzymes involved in their maturation. EDS VIIA (MIM120150) and B (120160) autosomal dominant disorders caused by mutations in the *COL1A1* and *COL1A2* genes, respectively, are characterized by joint hyperlaxity and only moderate skin fragility.<sup>50</sup> EDS VIIC is due to mutations in *ADAMTS2* which encodes a procollagen N-proteinase (PNP), involved in the processing of type-I procollagen.<sup>51</sup> In the absence of *ADAMTS2* activity, the unprocessed procollagens interfere in their assembly and lead to the formation of “hieroglyphic” collagen, which is not functional and responsible for skin fragility in EDS patients.<sup>7</sup> Interestingly, the difference in clinical manifestations between these three types of EDS VII seems related to variation in processing the type I procollagen in tissues or a potential PNP compensation.

Considering the common biosynthetic pathway, it was expected that defects in *ADAMTS2* would have an impact on a wide number of tissues. The limited number of tissues involved in EDS type VIIC might be explained by redundant functions of other PNPs, with the ability to process procollagen I in tissues other than skin.

Two other enzymes, *ADAMTS3* and *ADAMTS14*, belong to the same group of procollagen N-endopeptidase involved in the maturation of collagen fibrils.<sup>52</sup> In the process of collagen maturation, the amino- and carboxyl-propeptide of procollagen are cleaved leading to proper assembly in collagen fibrils. The PNP processes the aminopeptide of procollagens I, II, and III in vitro.<sup>7</sup> Their gene expression pattern during mouse embryogenesis has shown how closely related proteases with similar substrate may have distinct biological roles owing to tissue-specific gene expression.<sup>52</sup> For example, during the mouse embryogenesis, *ADAMTS3* seems able to process collagen I- and collagen II-rich tissues during the development. *ADAMTS2* also plays a major role in the cleavage of aminopropeptide of type-III collagen.

While the first description of PNP activity was reported in a study of dermatosparaxis in Belgian cattle, studies on *adamts2*-deficient mice showed that these mice displayed skin fragility at 2 weeks of age.<sup>53</sup>

## ADAMTS10 mutations and Weill- Marchesani syndrome I

Weill–Marchesani syndrome (WMS) belongs to the acromelic dysplasia group which also includes geleophysic dysplasia (GD) and acromicric dysplasia (AD).<sup>54</sup> Weill–Marchesani syndrome 1 (MIM 277600) is a rare connective tissue disorder characterized by short stature, brachydactyly, joint stiffness, thick skin, and lens abnormalities. WMS is distinct from GD and AD by the presence of dislocation of microspherophakic lens that causes severe myopia, glaucoma, or cataract.<sup>55,56</sup> Two modes of inheritance have been reported: autosomal dominant and autosomal recessive. Weill–Marchesani syndrome 1 is an autosomal recessive disorder caused by mutations in *ADAMTS10* which disrupt the metalloprotease domain.<sup>57</sup> Our group also showed that *FBN1* is responsible for the dominant form of WMS2.<sup>58</sup> Another autosomal recessive form of WMS (WMS3) is caused by mutation in *LTBP2* (latent TGF $\beta$  binding protein 2).<sup>59</sup>

The expression of *adamts10* is ubiquitous in the mouse embryonic tissues until 12.5 days of gestation and then its expression is more specific with especially strong expression in developing lung, bone, and craniofacial region.<sup>60</sup> Our genetic findings suggested a direct functional link between *ADAMTS10* and fibrillins, extracellular microfibrils assembled from large glycoproteins. Indeed it was shown that *ADAMTS10* binds to fibrillin 1 (FBN1) and fibrillin 2 (FBN2) and promotes microfibril deposition in the ECM of cultured fibroblasts.<sup>61</sup> Despite this interaction, *ADAMTS10* does not cleave FBN1 efficiently. This may be due to the absence of correct consensus sequence of the furin site in *ADAMTS10* zymogen. These findings support a role of *ADAMTS10* in microfibril biogenesis as a structural protein rather than as an enzyme.

## ADAMTS17 mutations and Weill–Marchesani-like syndrome

Patients with Weill–Marchesani-like syndrome (WMS-like; MIM 613195) have many characteristics of WMS such as short stature and lens abnormalities but they do not show brachydactyly, joint stiffness, or stiff skin. It is an autosomal recessive disorder due to mutations in *ADAMTS17*.<sup>62</sup>

The function of *ADAMTS17* is unknown. Studies on *ADAMTS17* tissue distribution showed a high expression

in fetal brain, heart, kidney, and eye. Two mutations in *ADAMTS17* associated with WMS-like lead to proteins without the C-terminal Thrombospondin (TS) repeats, which may be involved in the ECM structure.<sup>62</sup> The absence of some WMS characteristics could be explained by the lack of *ADAMTS17* expression in those tissues or the activity of another ADAMTS. *ADAMTS10* and *ADAMTS17* have structural similarities and both are expressed in the eyes supporting that *ADAMTS10* and *ADAMTS17* play a critical role in crystalline lens zonule.

## ADAMTSL2 mutations and geleophysic dysplasia

GD (MIM231050) is the more severe form of acromelic dysplasia and is transmitted with an autosomal recessive mode of inheritance. The main distinctive features are short stature, short hands and feet, facial features, joint contractures, a progressive cardiac valvular thickening often leading to an early death, toe walking, tracheal stenosis, and respiratory insufficiency. Radiological manifestations include delayed bone age, cone-shaped epiphyses, shortened long tubular bones, and ovoid vertebral bodies.<sup>63,64</sup>

Mutations in *ADAMTSL2* are responsible for GD autosomal recessive form. This gene encodes a secreted glycoprotein of unknown function.<sup>65</sup>

Functional studies in HEK293 cells showed that *ADAMTSL2* mutations lead to a decreased secretion of the mutated proteins, possibly due to the misfolding of *ADAMTSL2*. A first partner – *LTBP1* – of *ADAMTSL2* has been identified. Considering the role of *LTBP1* in TGF $\beta$  signaling, we have studied the TGF $\beta$  signaling pathway in the culture medium of GD patient fibroblasts. Our findings suggested that a dysregulation of TGF $\beta$  signaling is the underlying mechanism of GD and that *ADAMTSL2* is directly involved in TGF $\beta$  bioavailability.<sup>65</sup>

Interestingly, the identification of heterozygous *FBN1* mutations was reported in a dominant form of GD, strictly fulfilling the diagnostic criteria for GD. We identified a total of 16 heterozygous *FBN1* mutations (15 missense and 1 insertion), all mutations were located in exons 41–42, encoding TGF $\beta$  binding protein-like domain 5 (TB5) of *FBN1* in 19 GD.<sup>66</sup> Moreover, a direct interaction between *ADAMTSL2* and *FBN1* emphasizes the potential role of ADAMTS and ADAMTSL protein in microfibril formation and function.<sup>66</sup> *FBN1* encodes the *FBN1*, the principal component of the microfibrillar network.<sup>67</sup> Microfibrillar network disorganization was also consistently observed in GD fibroblasts. Recently, it has been shown that *FBN1*

mutations in GD and WMS2 disrupt fibrillin binding to heparin sulfate proteoglycans.<sup>68</sup>

Hubmacher et al generated an *adamtsl2-null* mouse model, which showed a high level of mortality at birth with lung anomalies associated with an increased expression of *FBN2*. They showed that *ADAMTSL2* binds *FBN2*, another extracellular component of fibrillin family.<sup>69</sup>

## ADAMTSL4 mutations and isolated ectopia lentis

Isolated ectopia lentis 2 (ECTOL2; MIM 225100) is a lens dislocation due to the disruption of zonular fibers, which are microfibrillar structures maintaining the lens. The displacement of the lens leads to an acute or chronic visual impairment. It could be associated with complications including myopia, retinal detachment, cataract, and glaucoma.<sup>70</sup>

Two transmission modes were discovered for ECTOL. The autosomal dominant form of ECTOL, named ECTOL1, is caused by mutations in *FBN1*.<sup>71</sup> ECTOL2 is an autosomal recessive form of ECTOL associated with nonsense mutations in *ADAMTSL4*.<sup>70</sup> Ectopia lentis can also be found in other connective tissue disorders, such as Marfan syndrome, caused by *FBN1* mutations.<sup>72</sup> More recently, a homozygous deletion in *ADAMTSL4* was identified causing craniosynostosis in association with ectopia lentis.<sup>73</sup> The impact of these mutations on the protein and the role of *ADAMTSL4* in zonular fibers are unknown. The pattern of *ADAMTSL4* expression shows its presence not only in ciliary body but also in cornea, iris, lens, and retina.<sup>74</sup> But, it was shown that the presence of *ADAMTSL4* increases the biogenesis of microfibrils by addition of *ADAMTSL4* in fetal bovine nuchal ligament cells culture.<sup>74</sup>

*ADAMTS10*, *ADAMTS17*, *ADAMTSL4* are associated with eye pathology, but only *ADAMTSL4* mutations lead to a restricted phenotype suggesting a specific role of *ADAMTSL4* in the lens zonule which cannot be compensated by the two other ADAMTS.

## ADAMTS18 mutations and microcornea

Microcornea with myopic chorioretinal atrophy and telecanthus (MIM 615458) is an ocular syndrome, recently described in five children from four consanguineous families.<sup>75</sup> The children had also a slight posterior rotation of the ears. It was discovered that this disorder was caused by homozygous mutations in *ADAMTS18*.<sup>76</sup> *ADAMTS18* is expressed during the development of not only murine embryo eye but also adult mouse eye, mainly in the retina and the lens.<sup>77</sup> The potential

role of ADAMTS18 in the formation or maintenance of microfibrils remains to be established.

## TIMP (inhibitor of MMP):TIMP3 and Sorsby's fundus dystrophy

Sorsby's fundus dystrophy (MIM 136900) is characterized by the loss of central color vision during the fourth to fifth decade and peripheral visual loss in late life due to untreatable submacular neovascularization. Some patients suffer from night blindness.<sup>78</sup>

Sorsby's fundus dystrophy is an autosomal dominant retinal dystrophy caused by *TIMP3* mutations.<sup>79</sup> *TIMP3* has been involved in different biological processes such as liver injury, cancer, and lung development.

## Conclusion

Although there are 26 different MMPs and 26 different ADAMTS(L), only a few genetic disorders have been associated with metalloproteinases (Table 1). The metalloproteinases involved in connective tissues disorders constitute two main groups: one linked to collagen fibrils and another to fibrillin microfibrils. Unlike collagen, fibrillins are not known to be important components of the ECM. The first group includes proteins that degrade not only different collagens such as MMP-2, MMP-9, MMP-13, and MMP-14 but also ADAMTS2, which is involved in the process of collagen maturation. Studies on mutant mice have shown that metalloproteinases such as MMP-9, MMP-13, and MMP-14 play

crucial roles in bone development and remodeling. Their association with human bone disorders confirms this finding and also reveals their function as active regulators of postnatal tissue formation.

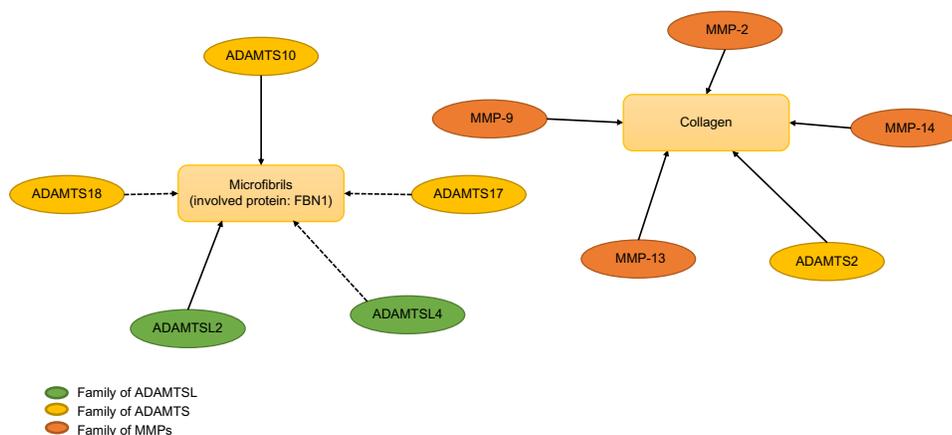
The metalloproteinases, the ADAMTS or (-like) which are implicated or may implicate in the microfibril network as ADAMTSL2, ADAMTSL4, ADAMTS10, ADAMTS17, and ADAMTS18 form the second group (Figure 1). It is now established that ADAMTS10 directly binds FBN1 and FBN2, two principal components of microfibrils, and is involved in microfibril biogenesis. ADAMTSL2 interacts with FBN1, FBN2, and LTBP1 and accelerates the microfibril formation. *ADAMTSL2* mutations are linked to the most severe human phenotype (patients present a cardiac disease leading to an early death) which can be explained by the unique relation between ADAMTSL2 and TGF $\beta$ . The short stature associated with *ADAMTSL2*, *ADAMTS10*, and *ADAMTS17* mutations suggests a role of microfibril biogenesis in endochondral ossification even if no link has been demonstrated between ADAMTS17 and formation or maintenance of microfibrils.

Moreover, the identification of *ADAMTS10*, *ADAMTS17*, and *ADAMTSL4* mutations related to ectopia lentis supports an association between these proteins in zonule formation. As the eye is the only affected tissue in isolated ectopia lentis, it is considered that ADAMTSL4 seems to have a specific function in eyes even if ADAMTSL4 is widely expressed in other tissues.

**Table 1** Main clinical features of human heritable disorders related to metalloproteinases and associated proteins

Gene	Pathology	Clinical features	MIM number	Mode of inheritance
<i>MMP-2</i>	Torg syndrome	Subcutaneous nodules, osteolysis of the carpal and tarsals	259600	AR
<i>MMP-9</i>	Metaphyseal anadysplasia 2	Hypoplastic femoral necks and vertical edges of the metaphysis, regression of symptoms in adulthood, normal stature	613073	AR
<i>MMP-13</i>	Metaphyseal anadysplasia I	MAD2 features with reduced stature	602111	AD
<i>MMP-13</i>	SEMD – Missouri type	Metaphyseal changes, mild epiphyseal anomalies and pear-shaped vertebrae	602111	AD
<i>MMP-14</i>	Winchester syndrome	Osteolysis of the carpals and tarsals, arthropathy, osteoporosis, corneal opacities, and myocardial damages	277950	AR
<i>MMP-20</i>	Pigmented hypomaturation-type amelogenesis imperfecta	Anomalies of the enamel	612529	AR
<i>ADAMTS2</i>	Ehlers–Danlos type VIIC	Extreme skin fragility	225410	AR
<i>ADAMTS10</i>	Weill–Marchesani syndrome	Short stature, brachydactyly, joint stiffness, thick skin, and microspherophaky	277600	AR
<i>ADAMTS17</i>	Weill–Marchesani-like syndrome	Short stature and lens dislocation	613195	AR
<i>ADAMTS18</i>	Microcornea	Myopic chorioretinal atrophy and telecanthus	615458	AR
<i>ADAMTSL2</i>	Geleophysic dysplasia	Short stature, brachydactyly, facial features, joint stiffness, progressive cardiac valvular disease	231050	AR
<i>ADAMTSL4</i>	Isolated ectopia lentis	Lens dislocation	225100	AR

**Abbreviations:** AR, autosomal recessive; AD, autosomal dominant; SEMD, spondyloepimetaphyseal dysplasia; MMP, matrix metalloproteinases; MIM, Mendelian Inheritance in Man.



**Figure 1** Network between collagen and metalloproteinases/fibrillins and metalloproteinases.

**Note:** The dashed arrows show potential link between fibrillins and ADAMTSL.

**Abbreviations:** MMP, matrix metalloproteinase; ADAM, a disintegrin and metalloproteinase; ADAMTS, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats; ADAMTSL, ADAMTS-like.

Like ADAMTS1, ADAMTS15, or ADAMTS12, which display anti-angiogenic activities apart from their enzymatic activities, ADAMTS10 and ADAMTS17 may act as ADAMTSL proteins in the context of microfibrils. The function of ADAMTSL is not clearly defined yet; however, it appears that ADAMTSL2, ADAMTSL4, and ADAMTSL6 have a role in microfibril network at a structural level.

Different ADAMTS or ADAMTSL interacts with the proteins belonging to the fibrillin family such as LTBP1 and LTBP2 or FBN1 and FBN2. Ongoing studies will permit understanding of the eventual formation of complex constituted of ADAMTSL and one or more fibrillins in the manner of specific tissue.

## Disclosure

LD has a PhD financing from FRM (Fondation de la Recherche Medicale-Prix Pomaret Delalande). CLG acknowledges the Association Française contre les Myopathies (AFM). The authors declare no other conflicts of interest in this work.

## References

- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3): 221–233.
- Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie.* 2005;87(3–4):249–263.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(2):197–250.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000;14(2):163–176.
- Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *Intern J Biochem Cell Biol.* 2004;36:981–985.
- Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem.* 2009;284:31493–31497.
- Bekhouche M, Colige A. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biol.* 2015;44–46:46–53.
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* 2005;434: 648–652.
- Sandy JD, Verscharen C. Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo. *Biochem J.* 2001;358:615–626.
- Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res.* 1985;38:469–479.
- Luan Y, Kong L, Howell DR, et al. Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(11):1413–1420.
- Liu CJ, Kong W, Ilalov K, et al. ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB J.* 2006;20(7):988–990.
- Hirohata S, Wang LW, Miyagi M, et al. Punctin, a novel ADAMTS-like molecule, ADAMTSL-1, in extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2002;277:12182–12189.
- Hall NG, Klenotic P, Anand-Apte B, Apte SS. ADAMTSL-3/punctin-2, a novel glycoprotein in extracellular matrix related to the ADAMTS family of metalloproteases. *Matrix Biol.* 2003;22:501–510.
- Koo BH, Le Goff C, Jungers KA, et al. ADAMTS-like 2 (ADAMTSL2) is a secreted glycoprotein that is widely expressed during mouse embryogenesis and is regulated during skeletal myogenesis. *Matrix Biol.* 2007;26:431–441.
- Tsutsui K, Manabe R, Yamada T, et al. ADAMTSL-6 is a novel extracellular matrix protein that binds to fibrillin-1 and promotes fibrillin-1 fibril formation. *J Biol Chem.* 2010;285:4870–4882.
- Kramerova IA, Kawaguchi N, Fessler LI, et al. Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development.* 2000;127:5475–5485.
- Fessler JH, Kramerova I, Kramerov A, Chen Y, Fessler LI. Papilin, a novel component of basement membranes, in relation to ADAMTS metalloproteinases and ECM development. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(6):1079–1084.
- Maroteaux P, Verloes A, Stanescu V, Stanescu R. Metaphysealanadysplasia: a metaphyseal dysplasia of early onset with radiological regression and benign course. *Am J Med Genet.* 1991;39:4–10.
- Wiedemann H-R, Spranger J. Chondrodysplasia metaphysaria (Dyostosismetaphysaria) – ein neuer Typ? *Z Kinderheilk.* 1970;108:171–186.

21. Lausch E, Keppler R, Hilbert K. Mutations in MMP9 and MMP13 determine the mode of inheritance and the clinical spectrum of metaphyseal dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2009;85:168–178.
22. Bonafe L, Liang J, Gorna MW, et al. MMP13 mutations are the cause of recessive metaphyseal dysplasia, Spahr type. *Am J Med Genet.* 2014;164A:1175–1179.
23. Ortega N, Behonick DJ, Colnot C, Cooper DN, Werb Z. Galectin-3 is a downstream regulator of matrix metalloproteinase-9 function during endochondral bone formation. *Mol Biol Cell.* 2005;16(6):3028–3039.
24. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 1998;93:411–422.
25. Chung AWY, Yeung KA, Sandor GG, et al. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res.* 2007;101:512–522.
26. Dubois B, Masure S, Hurtenbach U, et al. Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. *J Clin Invest.* 1999;104:1507–1515.
27. Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol.* 2000;151(4):879–889.
28. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1996;97:761–768.
29. Reboul P, Pelletier J-P, Tardif G, Cloutier J-M, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: a role in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 1996;97:2011–2019.
30. Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, et al. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development.* 2004;131(23):5883–5895.
31. Borochoy ZU, Scheffer D, Adir V, Dagoneau N, Munnich A, Cormier-Daire V. Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia (SEMD) matrilin 3 type: homozygote matrilin 3 mutation in a novel form of SEMD. *J Med Genet.* 2004;41:366–372.
32. Kennedy AM, Inada M, Krane SM, et al. MMP13 mutation causes spondyloepimetaphyseal dysplasia, Missouri type (SEMD(MO)). *J Clin Invest.* 2005;115:2832–2842.
33. Patel AC, McAlister WH, Whyte MP. Spondyloepimetaphyseal dysplasia: clinical and radiologic investigation of a large kindred manifesting autosomal dominant inheritance, and a review of the literature. *Medicine.* 1993;72:326–342.
34. Winchester P, Grossman H, Lim WN, Danes BS. A new acid mucopolysaccharidosis with skeletal deformities simulating rheumatoid arthritis. *Am J Roentgen.* 1969;106:121–128.
35. Evans BR, Mosig RA, Lobl M, et al. Mutation of membrane type-1 metalloproteinase, MT1-MMP, causes the multicentric osteolysis and arthritis disease Winchester syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012;91:572–576.
36. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell.* 1999;99:81–92.
37. Zhou Z, Apte SS, Soininen R, et al. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(8):4052–4057.
38. Zankl A, Pachman L, Poznanski A, et al. Torg syndrome is caused by inactivating mutations in MMP2 and is allelic to NAO and Winchester syndrome. *J Bone Miner Res.* 2007;22:329–333.
39. Torg JS, DiGeorge AM, Kirkpatrick JA Jr, Trujillo MM. Hereditary multicentric osteolysis with recessive transmission: a new syndrome. *J Pediatr.* 1969;75:243–252.
40. Eisenstein DM, Poznanski AK, Pachman LM. Torgosteolysis syndrome. *Am J Med Genet.* 1998;80:207–212.
41. Inoue K, Mikuni-Takagaki Y, Oikawa K, et al. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocyticcanalicular formation and bone metabolism. *J Biol Chem.* 2006;281(44):33814–33824.
42. Oh J, Takahashi R, Adachi E, et al. Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. *Oncogene.* 2004;23(29):5041–5048.
43. Witkop CJ Jr. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Path.* 1989;17:547–553.
44. Kim J-W, Simmer JP, Hart TC, et al. MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 2005;42:271–275.
45. Ozdemir D, Hart PS, Ryu OH, et al. MMP20 active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Dent Res.* 2005;84:1031–1035.
46. Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem.* 2002;277:49598–49604.
47. Shin M, Hu Y, Tye CE. Matrix metalloproteinase-20 over-expression is detrimental to enamel development: a *Mus musculus* model. *PLoS One.* 2014;9(1):e86774.
48. Lapiere CM, Nusgens BV, Ehlers DANLOS type VIIC or human dermatosparaxis. The offspring of a union between basic and clinical research. *Arch Dermatol.* 1993;129:1316–1319.
49. Nusgens BV, Verellen-Dumoulin C, Hermans-Le T, et al. Evidence for a relationship between Ehlers-Danlos type VII C in humans and bovine dermatosparaxis. *Nat Genet.* 1992;1:214–217.
50. Malfait F, De Paepe A. The Ehlers-Danlos syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802:129–143.
51. Colige A, Sieron AL, Li SW, et al. Human Ehlers-Danlos syndrome type VIIC and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N proteinase gene. *Am J Hum Genet.* 1999;65:308–317.
52. Le Goff C, Somerville RP, Kesteloot F. Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. *Development.* 2006;133:1587–1596.
53. Li SW, Arita M, Fertala A, et al. Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *Biochem J.* 2001;355(Pt 2):271–278.
54. Le Goff C, Cormier-Daire V. Genetic and molecular aspects of acromelic dysplasia. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2009;6(3):418–423.
55. Weill G. Ectopie du cristallin et malformations générales. *Ann Occul.* 1932;169:21–44.
56. Marchesani O. Brachydaktylie und angerobene kugellines als systemerkrnakung. *Klin Mibl Augenheilk.* 1939;103:392–406.
57. Dagoneau N, Benoist-Lassel C, Huber C, et al. ADAMTS 10 mutations in autosomal recessive Weill-Marchesani syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004;75:801–806.
58. Faivre L, Gorlin RJ, Wirtz MW, et al. In-frame fibrillin-1 gene deletion in autosomal dominant Weill-Marchesani syndrome. *J Med Genet.* 2003;240:34–35.
59. Haji-Seyed-Javadi R, Jelodari-Mamaghani S, Paylakhi SH. LTBP2 mutations cause Weill-Marchesani and Weill-Marchesani-like syndrome and affect disruptions in the extracellular matrix. *Hum Mutat.* 2012;33(8):1182–1187.
60. Somerville RP, Jungers KA, Apte SS. Discovery and characterization of a novel, widely expressed metalloprotease, ADAMTS10, and its proteolytic activation. *J Biol Chem.* 2004;279(49):51208–51217.
61. Kutz WE, Wang LW, Bader HL, et al. ADAMTS10 protein interacts with fibrillin-1 and promotes its deposition in extracellular matrix of cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 2011;286:17156–17167.
62. Morales J, Al-Sharif L, Khalil DS, et al. Homozygous mutations in ADAMTS10 and ADAMTS17 cause lenticular myopia, ectopia lentis, glaucoma, spherophakia, and short stature. *Am J Hum Genet.* 2009;85:558–568.

63. Spranger JW, Gilbert EF, Tuffli GA, Rossiter FP, Opitz JM. Geleophysic dwarfism – a “focal” mucopolysaccharidosis? *Lancet*. 1971; 10:97–98.
64. Allali S, Le Goff C, Pressac-Diebold I, et al. Molecular screening of ADAMTSL2 gene in 33 patients reveals the genetic heterogeneity of geleophysic dysplasia. *J Med Genet*. 2011;48:417–421.
65. Le Goff C, Morice-Picard F, Dagoneau N, et al. ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat Genet*. 2008;40: 1119–1123.
66. Le Goff C, Mahaut C, Wang LW, et al. Mutations in the TGFβ binding-protein-like domain 5 of FBN1 are responsible for acromicric and geleophysic dysplasias. *Am J Hum Genet*. 2011;89:7–14.
67. Ramirez F, Sakai LY. Biogenesis and function of fibrillin assemblies. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):71–82.
68. Cain SA, McGovern A, Baldwin AK, Baldock C, Kielty CM. Fibrillin-1 mutations causing Weill-Marchesani syndrome and acromicric and geleophysic dysplasias disrupt heparan sulfate interactions. *PLoS One*. 2012;7(11):e48634.
69. Hubmacher D, Wang LW, Mecham RP, Reinhardt DP, Apte SS. Adamtsl2 deletion results in bronchial fibrillin microfibril accumulation and bronchial epithelial dysplasia – a novel mouse model providing insights into geleophysic dysplasia. *Dis Model Mech*. 2015;8(5):487–499.
70. Ahram D, Sato TS, Kohilan A, et al. A homozygous mutation in ADAMTSL4 causes autosomal-recessive isolated ectopialentis. *Am J Hum Genet*. 2009;84:274–278.
71. Lonqvist L, Child A, Kainulainen K, Davidson R, Puhakka L, Peltonen L. A novel mutation of the fibrillin gene causing ectopialentis. *Genomics*. 1994;19:573–576.
72. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991;352:337–339.
73. Chandra A, Aragon-Martin JA, Sharif S, Parulekar M, Child A, Arno G. Craniosynostosis with ectopialentis and a homozygous 20-base deletion in ADAMTSL4. *Ophthalmic Genet*. 2013;34(1–2):78–82.
74. Gabriel LA, Wang LW, Bader H. ADAMTSL4, a secreted glycoprotein widely distributed in the eye, binds fibrillin-1 microfibrils and accelerates microfibril biogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(1): 461–469.
75. Khan AO. Microcornea with myopic chorioretinal atrophy, telecanthus and posteriorly-rotated ears: a distinct clinical syndrome. *Ophthalmic Genet*. 2012;33:196–199.
76. Aldahmesh MA, Alshammari MJ, Khan AO, Mohamed JY, Alhabib FA, Alkuraya FS. The syndrome of microcornea, myopic chorioretinal atrophy, and telecanthus (MMCAT) is caused by mutations in ADAMTSL18. *Hum Mutat*. 2013;34:1195–1199.
77. Peluso I, Conte I, Testa F. The ADAMTSL18 gene is responsible for autosomal recessive early onset severe retinal dystrophy. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:16.
78. Sorsby A, Mason MEJ, Gardner N. A fundus dystrophy with unusual features (late onset and dominant inheritance of a central retinal lesion showing oedema, haemorrhage and exudates developing into generalized choroidal atrophy with massive pigment proliferation). *Brit J Ophthalmol*. 1949;33:67–97.
79. Weber, BHF, Vogt G, Pruett RC, Stohr H, Felbor U. Mutations in the tissue inhibitor metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby’s fundus dystrophy. *Nature Genet*. 1994;8:352–356.

## Metalloproteinases In Medicine

### Publish your work in this journal

Metalloproteinases In Medicine is an international, peer reviewed, open access journal that aims to provide a platform for the discussion and dissemination of knowledge about the role that metalloproteinases – such as matrix metalloproteinases (MMP), ADAMs, ADAMTSs, and astacins, as well as their inhibitors – play in diseases.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/metalloproteinases-in-medicine-journal>

Dovepress

The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.