

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTE DE MEDECINE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES TISSUS CONJONCTIFS

Docteur A. Colige

**Identification de nouvelles fonctions des métalloprotéases par
détermination de leur répertoire de substrats :
Applications aux aminoprocollagène peptidases**

LEDUC Cédric

**Thèse soumise en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques**

Année académique 2018-2019

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTE DE MEDECINE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES TISSUS CONJONCTIFS

Docteur A. Colige

**Identification de nouvelles fonctions des métalloprotéases par
détermination de leur répertoire de substrats :
Applications aux aminoprocollagène peptidases**

LEDUC Cédric

**Thèse soumise en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques**

Année académique 2018-2019

REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, je tiens à remercier et à exprimer toute ma sympathie aux personnes qui m'ont aidé, soutenu et permis de mener à bien ce projet au cours de ces 4 années au laboratoire.

Je tiens tout d'abord à remercier particulièrement le Docteur Alain Colige, mon promoteur, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, malgré certains avis contraires. Tout a en effet commencé par un entretien afin de se forger sa propre opinion malgré ces différents avis à mon égard. Merci pour tes conseils et remarques, le savoir que tu as partagé avec moi et pour m'avoir inculqué une plus grande rigueur scientifique durant ces 4 années. J'espère que tu ne regrettes pas ton choix.

Je suis également particulièrement reconnaissant envers le Docteur Mourad Bekhouche qui m'a encadré pendant environ 2 ans et sans qui ce travail n'aurait pu être possible. Merci pour tes enseignements, ta patience et les moments de franche rigolade.

Merci au Professeur Betty Nusgens pour ses remarques constructives, pour la transmission de son expérience et de son savoir, pour sa gentillesse et pour ses corrections tout au long de ce travail qui m'ont permis de mener à bien ce projet de recherche.

J'aimerais remercier l'ensemble du LBTC qui m'a donné envie chaque jour (ou presque) de me lever le matin pour venir au laboratoire dans une ambiance particulièrement agréable et bon-enfant. Merci à tous pour les discussions intéressantes, qu'elles fussent politiques, socio-économiques, scientifiques, ou qu'elles concernent la culture potagère, voire des sujets complètement décalés.

Christophe, même si le contact a parfois été plus rugueux, merci pour tes conseils scientifiques inestimables et les informations que tu partages volontiers! Tu es une véritable mine d'or et toujours prêt à aider et conseiller. Les conversations entre nous ont porté sur des sujets divers et variés mais furent toujours intéressantes et enrichissantes ! Tes coups de gueule m'auront quand même fait rire, tant qu'ils n'étaient pas dirigés contre moi.

Haaaaaa Toto, Tony, Antoine, Papyto, Mister T,... qu'auraient été ces 4 années sans tes râleries ... heuuuu ton travail de qualité qui m'aura été plus que précieux et pour lequel je te remercie grandement! Le doyen du labo qui reste jeune dans sa tête (sauf pour l'adaptation à l'informatique), qui n'en loupe pas une, et avec qui j'aurai bien ri ! Merci pour ton dévouement, ta gentillesse, tes conseils,... merci pour tout Tony ! Merci à Lola pour son travail de qualité et sa bonne humeur ! Un énorme merci à Christine C pour toute la gestion administrative des dossiers notamment.

Benoit, merci pour tous les moments partagés au laboratoire mais surtout en dehors. L'initiation au crossfit et les nombreux entraînements, les soirées, ... et les discussions sportives heuuuu scientifiques (évidemment) !

Merci Laura D pour ta gentillesse, tous tes conseils et le matériel que tu as partagé bien volontiers. Merci pour la bonne ambiance, les délires et les ragots à l'animalerie notamment. Un très bon souvenir restera le congrès à Athènes ! Je souhaite beaucoup de succès et de courage à Christine M pour la maîtrise des méandres des outils bioinformatiques (rire sadique). Merci pour les délires mais également les discussions intéressantes et tout le reste ;)

Merci Nancy (Bobonne) pour ton humour et tes petites piques cinglantes qui me correspondent bien ainsi que pour ta bonne humeur (et tes trucs et astuces pour faire des siestes)! Charly, merci pour ta disponibilité et pour tes remarques constructives lors des réunions de laboratoire, pour tes capacités entropiques et d'expansion qui forcent le respect, et pour tes « insultes » envers toi-même lors de tes manips qui m'auront bien fait rire. Merci Aurore pour toutes les discussions, ta capacité d'écoute, les ragots, et pour avoir mis la bonne ambiance (malgré toi). Merci à Laura B pour la bonne ambiance et pour ton réseau social surdéveloppé dont les capacités, les connaissances et les expériences ne peuvent que nous épater (ironie quand tu nous tiens ...). Mon bon Jéjé, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur quotidienne, pour tes têtes de lendemain de veille, les quelques joggings au Sart Tilman, et tes conseils notamment en terme de microscopie.

Enfin, merci aux anciens qui ont quitté le laboratoire et qui ont aussi contribué à la bonne ambiance du laboratoire. Merci à mes amis, et ma famille pour le soutien dont ils m'ont fait part lors des périodes moins faciles.

Je souhaite également remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré durant ce travail. En particulier la plateforme de spectrométrie de masse et spécialement Dominique Baiwir. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, tes explications et pour avoir rendu aussi agréable ce projet et notre collaboration.

Merci également à mes amis du groupe « Biomed » avec qui ce fut un réel plaisir de partager ces quelques années d'étude lors de notre bachelier et qui ont certainement contribué à l'attrait que je porte au monde de la recherche en général, et ce même si mon chemin s'en éloigne quelque peu pour le moment.

J'aimerais clôturer ces remerciements par une pensée particulière à tous ceux qui ont contribué à cette thèse, et à l'avancée de la recherche médicale de manière générale, en donnant du matériel biologique, qu'il s'agisse de sang, des cellules,... et sans qui la recherche ne serait pas aussi performante, même si elle est actuellement entravée par des moyens budgétaires qui ne font que se réduire ! Merci à vous !

Cédric, Ken, Johnny Bravo,....

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	6
PARTIE 1 : INTRODUCTION GENERALE	7
1. LES TISSUS CONJONCTIFS ET LEUR MATRICE EXTRACELLULAIRE (MEC)	8
1.1. COMPOSANTS DE LA MEC.....	12
1.1.1. Structures fibrillaires.....	13
1.1.2. Glycoprotéines.....	26
1.1.3. Protéoglycans	31
1.1.4. Cellules.....	35
1.1.5. Interactions cellules-MEC	35
2. ENZYMES PROTÉOLYTIQUES	37
2.1. LES MÉTALLOPROTÉASES MATRICIELLES (MMP)	37
2.2. LES ADAMALYSINES	40
2.2.1. Les ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinases).....	40
2.2.2. Les ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeat).....	41
3. PROTÉOLYSE ET « DÉGRADOMIQUE ».....	57
3.1. LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE AU SERVICE DE LA PROTÉOMIQUE	60
3.2. L'ITRAQ-TAILS (ISOBARIC TAG FOR RELATIVE AND ABSOLUTE QUANTIFICATION - TERMINAL AMINE ISOTOPIC LABELING OF SUBSTRATES)	62
PARTIE 2 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	67
PARTIE 3 : RESULTATS.....	70
CHAPITRE 1 : DÉTERMINATION DES NOUVELLES FONCTIONS DES AMINOPROCOLLAGÈNE PEPTIDASES PAR ÉLARGISSEMENT DE LEUR RÉPERTOIRE DE SUBSTRATS.....	71
CHAPITRE 2 : ÉTUDE DES SUBSTRATS ET DE L'IMPLICATION DES ADAMTS2 ET 14 <i>IN VIVO</i> DANS LA PEAU PAR ITRAQ-TAILS	103
CHAPITRE 3 : ÉTUDES PAR ITRAQ-TAILS DU RÉPERTOIRE D'AUTRES MÉTALLOPROTÉASES.	133
PARTIE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES	135
PARTIE 5 : PUBLICATIONS PERSONNELLES	138
PARTIE 6 : ANNEXES	140
PARTIE 7 : BIBLIOGRAPHIE.....	186

LISTE DES ABREVIATIONS

α -SMA: α -Smooth Muscle Actin	KLK: Kallikrein related peptidase
ADAM: A disintegrin and metalloproteinase	LAP: Latent associated peptide
ADAMTS: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I repeat	LH: Lysyl hydroxylase
ADAMTSL: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I repeat-like	LLC: Large latent complex
BMP1: Bone morphogenetic protein 1	LOX : Lysyl oxidase
CCBE1: Collagen and calcium binding EGF domain-containing protein 1	LTBP: Latent TGF- β binding protein
COMP: Cartilage oligomeric matrix protein	MEC: Matrice extracellulaire
CRD: carbohydrate-recognition domain	MMP: Métalloprotéase matricielle
CTGF: Connective tissue growth factor	MS/MS : spectrométrie de masse en tandem
Cub: Complément C1r/C1s, Uegf et BMP1	mTLD: Tolloid de mammifère
DKK3 : Dickkopf Related Protein 3	MT-MMP: Métalloprotéase matricielle de type membranaire
Domaine NC : Domaine non collagénique	OI: Ostéogenèse imparfaite
EDS: Ehlers Danlos Syndrome	PCPE : Procollagen C-proteinase enhancer 1
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique	PLAC: Protease and lacunin domain
EGF: Epidermal growth factor	PNP: Procollagen N-propeptidase
FACIT: Fibril-associated collagens with interrupted triple helices	PRELP: proline and arginine rich end leucine rich repeat protein
FDH: Fibroblaste dermatosparactique humain	PSM: Peptide spectra match
FGF: Fibroblast growth factor	SLRP: Small leucine-rich proteoglycan
FOI: Fibroblaste issu d'un patient atteint d'ostéogenèse imparfaite	SMAD: Sma and mad related protein
FN: Fibronectine	SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
FNH: Fibroblaste normal humain	RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
GAG: Glycosaminoglycan	TAILS: Terminal Amine Isotopic Labelling of Substrates
GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor	TGF- β : Transforming growth factor beta
GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol	TGF- β RIII : Récepteur de type III du TGF- β (bétaglycan)
HEK293: Cellule human embryonic kidney 293	TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase
HPG-ALD: Hyperbranched polyglycerol – aldehyde	TNF: Tumor necrosis factor
HSP47: Heat Shock Protein 47 (également appelée Serpine H1)	TPP: Trans Proteomic Pipeline
HSPG: Héparan sulfate protéoglycan	TSP: Thrombospondin
Ig: Immunoglobuline	TSR1: Thrombospondin type 1 repeat
IGF: Insulin growth factor	VD: Veau dermatosparactique
IGFBP: Insulin growth factor binding protein	VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
IL: Interleukine	VEGFR: VEGF receptor
iTRAQ: isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation	VN: Veau normal
	vWF: von-Willebrand factor
	WMS: Weill-Marchesani Syndrome
	ZP: Zona pellucida

PARTIE 1 :
INTRODUCTION GENERALE

1. Les tissus conjonctifs et leur matrice extracellulaire (MEC)

Les tissus conjonctifs représentent l'une des quatre structures principales du corps, avec les *epithelia*, les muscles et les tissus nerveux. Ils apportent un soutien et une stabilité mécanique aux différents tissus et organes, et constituent un environnement permettant l'échange des nutriments, des métabolites et des déchets entre les cellules résidentes et les systèmes circulatoires sanguins et lymphatiques. Par leur structure et composition, ils permettent également la communication intercellulaire, le stockage énergétique, les réponses inflammatoires et immunitaires, la mise à disposition de facteurs de croissance et de chémokines. En outre, ils sont directement impliqués dans la plupart des processus de réparation, notamment en constituant une matrice provisoire permettant de combler rapidement les pertes tissulaires locales.

Le compartiment cellulaire des tissus conjonctifs se compose principalement de cellules d'origine mésodermique, dont font partie les fibroblastes. Ces cellules sont en général dispersées dans une matrice extracellulaire (MEC) abondante qu'elles ont sécrétée et qu'elles renouvellent en permanence. Cette MEC est notamment constituée de fibres, de macromolécules diverses et d'une « substance fondamentale », le nom générique donné au gel hydraté emplissant les espaces laissés entre les structures matricielles et les cellules. Les tissus conjonctifs contiennent également des vaisseaux sanguins et lymphatiques de même que des structures nerveuses.

Différents types de tissus conjonctifs sont distingués sur base de la composition et de l'état physique de leur MEC, leur conférant des propriétés diverses et des rôles multiples (**Tableau 1**) :

- **Les tissus conjonctifs « souples »** sont composés d'une substance fondamentale hydratée et peu rigide remplissant les espaces interfibrillaires et dont les proportions de leurs différents constituants (cellules, fibres et substance fondamentale) peuvent varier. Ceci permet la distinction de plusieurs sous-types :
 - Les tissus conjonctifs lâches présentent des proportions quasi-équivalentes de leurs constituants. Ils jouent un rôle de soutien et permettent le passage des réseaux vasculaires et nerveux. Ils participent également à la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires. Un exemple de tissu conjonctif lâche est le derme papillaire qui constitue la partie la plus superficielle du derme, sous-jacente à l'épiderme.
 - Les tissus conjonctifs cellulaires, dont les tissus adipeux ou le cortex ovarien, contiennent peu de MEC et sont majoritairement composés de cellules, comme l'évoque leur nom.
 - Les tissus conjonctifs denses contiennent une grande proportion de fibres. Les tendons constituent un exemple de ce type de tissus dans lesquels les fibres de collagène de type I sont majoritaires et se disposent en faisceaux. De même, le derme réticulaire, plus profond que le derme papillaire, est un tissu conjonctif dense car il est principalement composé d'un entrecroisement de faisceaux de fibres de collagènes et de fibres élastiques.
 - La gelée de Wharton qui emplit le cordon ombilical est principalement composée de substance fondamentale.
- **Les tissus cartilagineux** sont caractérisés par la présence d'une substance fondamentale relativement solide mais déformable et « élastique ». Ces propriétés résultent de l'abondance de

glycosaminoglycans qui forment, dans les espaces interfibrillaires, un gel hydraté résistant aux forces de compression. Les tissus cartilagineux sont aussi caractérisés par l'absence de vaisseaux sanguins, obligeant les chondrocytes (les cellules résidentes des cartilages) à subvenir à leurs besoins vitaux grâce à une diffusion à partir du périchondre, le tissu conjonctif recouvrant l'entièreté des cartilages. Trois types de tissus cartilagineux se distinguent selon la composition de la MEC :

- Le cartilage hyalin est le plus répandu dans le corps humain. Il est principalement composé de collagène de type II et de protéoglycans. Il constitue la majorité des surfaces des articulations mobiles en continuité du périoste, l'extrémité des côtes et les côtes flottantes, les anneaux de la trachée et des bronches les plus importantes, ainsi que le squelette embryonnaire.
 - Le cartilage fibreux comprend des fibres de collagène de type II mais également de type I, ce qui le rend résistant aux forces de traction. Ce type de cartilage se retrouve par exemple au niveau des disques intervertébraux ou des ménisques des genoux.
 - Le cartilage élastique contient des fibres élastiques en plus des fibres de collagène de type II, ce qui lui confère la capacité de se déformer. Il se retrouve notamment dans le pavillon de l'oreille.
- **Les tissus osseux** sont très riches en collagène de type I, qui est calcifié par des cristaux d'hydroxyapatite, et possèdent une substance fondamentale solide et rigide. Ils résultent généralement de la métaplasie de tissus cartilagineux. Une manière de distinguer les différents tissus osseux provient de la manière dont les fibres de collagènes se déposent dans ceux-ci :
- L'os fibreux (ou tissu osseux primaire) est caractérisé par la présence de fibres de collagène formant des faisceaux irréguliers qui s'entremêlent. Il se retrouve principalement au cours du développement et est destiné à être rapidement remplacé par du tissu osseux lamellaire. Sa MEC est peu calcifiée ce qui lui confère une faible résistance.
 - Le tissu osseux lamellaire (ou tissu osseux secondaire) est formé à partir du tissu osseux primaire. Deux types de tissus osseux lamellaires existent : le type haversien (ou compact) et le type non haversien (ou trabéculaire ou spongieux). La MEC du tissu osseux lamellaire est fortement minéralisée et confère aux os leur solidité et leur rigidité.

Types de tissu conjonctif	Sous-types de tissu conjonctif	Exemples
Tissu conjonctif souple	Tissu conjonctif lâche	Derme papillaire
	Tissu conjonctif cellulaire	Tissu adipeux
	Tissu conjonctif dense	Tendon
	Gelée de Wharton	Cordon ombilical
Tissu cartilagineux	Hyalin	Surfaces articulaires
	Fibreux	Disques intervertébraux
	Cartilagineux élastique	Pavillon de l'oreille
Tissu osseux	Fibreux	Os embryonnaire
	Lamellaire	Os adulte

Tableau 1 : Classification des tissus conjonctifs et exemples.

Sur base de sa composition, de sa structure et de sa localisation par rapport aux cellules, la MEC qui compose les tissus conjonctifs peut être divisée en deux types principaux : **la MEC interstitielle et les lames basales (Figure 1)** (Theocharis et al., 2016). La MEC interstitielle entoure les cellules alors que les lames basales constituent l'interface entre ces cellules et les tissus environnants.

Les lames basales correspondent à de fins feuillets organisés qui offrent un ancrage aux multiples cellules afin de maintenir la structure de l'organe (Theocharis et al., 2016). Elles jouxtent notamment les *epithelia*, les fibres musculaires lisses, cardiaques et squelettiques, les vaisseaux sanguins et lymphatiques... (Halfter et al., 2015). Elles sont composées principalement de collagènes de types IV, XV et XVIII, de laminines, d'entactine / nidogène et de protéoglycans tels que le perlécan et l'agrine (LeBleu et al., 2007). Selon un modèle classiquement accepté, les lames basales sont composées de deux réseaux interconnectés formés respectivement de laminines et de collagène de type IV (**Figure 2**) (Halfter et al., 2015). Le réseau de laminine permet l'adhésion des cellules via des récepteurs spécifiques, tels les intégrines, alors que le réseau de collagène est plutôt responsable de la stabilisation de l'ensemble de la structure. D'autres composants (perlécan, l'entactine ...) assurent l'interconnexion de ces deux réseaux et influencent donc l'intégrité des lames basales (LeBleu et al., 2007). Le perlécan modifie également certaines propriétés mécaniques des lames basales en raison de sa grande capacité d'hydratation. Le collagène de type VII va quant à lui renforcer et ancrer les lames basales en les connectant aux fibres de collagène de types I et III sous-jacentes. Alors que les collagènes se trouvent principalement du côté « stromal » des lames basales, le réseau de laminines permet l'ancrage cellulaire par l'intermédiaire des hémidesmosomes (Theocharis et al., 2016). Ces structures particulières se forment lorsque les intégrines (et notamment l'intégrine alpha 6 beta 4) interagissent avec les laminines de la lame basale (en particulier la laminine 5) et les filaments intermédiaires intracellulaires (**Figure 2**).

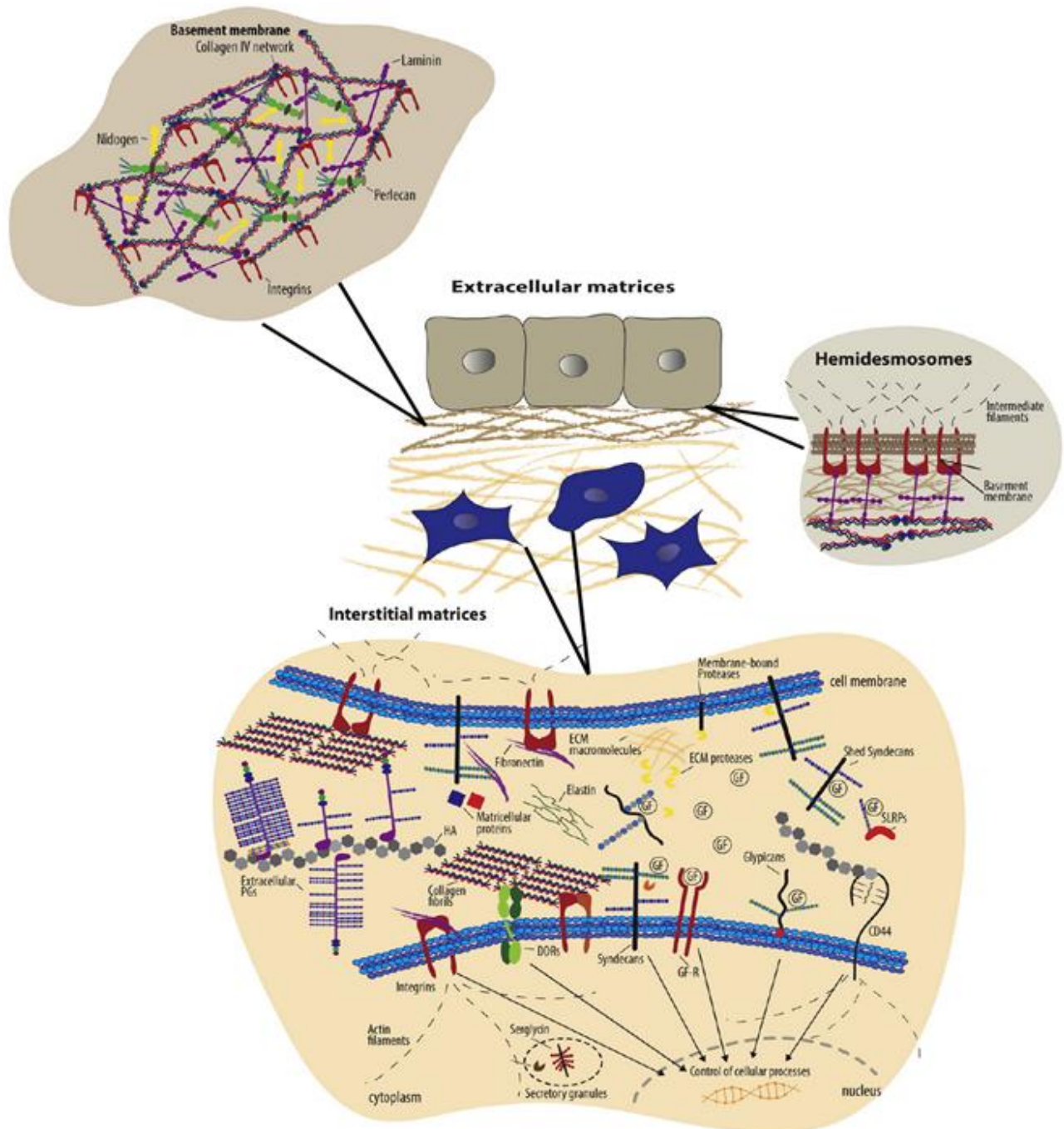


Figure 1: Représentation schématique des matrices extracellulaires (MEC) et de leurs principaux composants.

Il existe deux types de MEC, la MEC interstitielle et les lames basales. Les lames basales constituent l'interface entre les cellules épithéliales et les tissus conjonctifs de l'organe. Elles sont principalement composées d'un réseau de collagène de type IV qui s'associe aux composants de la MEC incluant des nidogènes, des laminines, le perlécane, les collagènes de types XV et XVIII, ... Les cellules épithéliales sont ancrées aux lames basales par l'intermédiaire d'hémidesmosomes. Ces derniers résultent de l'interaction d'intégrines avec des laminines et du collagène transmembranaire XVII.

Les MEC interstitielles sont principalement composées de fibrilles de collagène, d'élastine, de protéoglycans et d'acide hyaluronique, ainsi que de diverses protéines et glycoprotéines matricielles. Les interactions entre ces composants génèrent un réseau tridimensionnel dynamique. Les cellules se lient aux composants matriciels par des récepteurs spécifiques, dont les intégrines, mais aussi par l'intermédiaire des protéoglycans associés à la surface cellulaire (syndécans, glypicans) ou encore par le récepteur à l'acide hyaluronique CD44.

Diverses enzymes protéolytiques (les MMP, ADAM, ADAMTS, cathepsines, ...) sont responsables de la dégradation des MEC et du remodelage tissulaire tant physiologique (cicatrisation par exemple) que pathologique (cancer par exemple) (Theocharis et al., 2016).

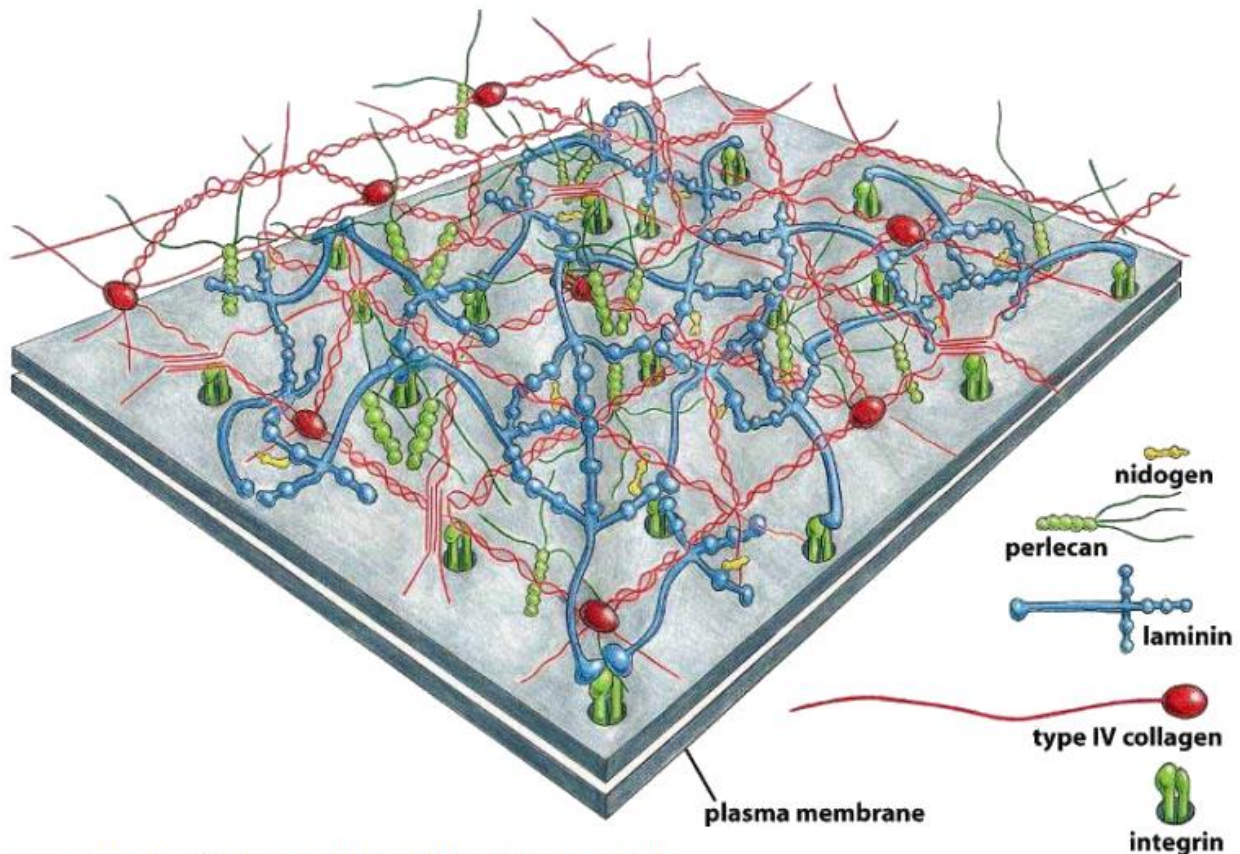


Figure 19-43 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Figure 2 : Représentation schématique du double réseau interconnecté des lames basales.

Les laminines permettent l'ancrage cellulaire à la lame basale par l'intermédiaire d'intégrines. Le réseau de collagène de type IV est connecté d'une part au réseau de laminines par l'intermédiaire des entactines / nidogènes et du perlécane, et, d'autre part, aux tissus conjonctifs interstitiels, notamment le derme, par le collagène de type VII. Figure Adaptée de *Molecular Biology of the Cell*, 2008.

1.1. Composants de la MEC

Bien que la structure et la composition de la MEC varient selon le type de tissu, la MEC est communément composée d'une substance fondamentale plus ou moins abondante dans laquelle baignent les cellules ainsi que des structures fibrillaires et des macromolécules, dont des glycoprotéines et des protéoglycans. La MEC fournit non seulement le support structural et nourricier aux cellules qu'elle contient mais elle régule également bon nombre de leurs processus tels que croissance, migration, différenciation, survie ou encore homéostasie. De plus, des variations de la composition de la MEC permettent l'établissement, la séparation et le maintien des différents tissus en régulant l'abondance des facteurs de croissance et de leurs récepteurs, le niveau d'hydratation et le pH de l'environnement local.

Les principales structures des tissus conjonctifs peuvent être classées en trois catégories. Les structures fibrillaires comprennent les faisceaux de fibres de collagène et les fibres élastiques. Les

glycoprotéines et protéoglycans forment le milieu extracellulaire non fibrillaire. Enfin, à ces différents composants s'ajoutent les cellules comprises dans les tissus conjonctifs.

1.1.1. Structures fibrillaires

Les propriétés biologiques et mécaniques des différents tissus conjonctifs sont largement dictées par la nature, l'abondance et l'organisation des réseaux fibrillaires qui forment leur charpente. Les deux principales structures fibrillaires présentes dans les MEC sont les fibres de collagène et les fibres élastiques, en plus des fibrilles formées par la fibronectine (FN) qui sera abordée plus en détails dans la suite de ce travail.

1.1.1.1. Les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont des structures fibrillaires formant un réseau qui procure élasticité, amortissement mécanique et résistance à des tissus tels que les parois artérielles, le derme, le cœur, les poumons, certains ligaments et cartilages élastiques (Theocharis et al., 2016; Wise and Weiss, 2009). Leur architecture est différente selon le tissu élastique considéré et reflète des fonctions spécifiques. Ainsi, dans la *media* des artères, ces fibres sont présentes sous forme de lamelles concentriques fenestrées qui sont séparées par des couches de cellules musculaires lisses. Au cours d'une vie, cet arbre aortique peut subir plus d'un milliard de cycles d'étirement et de relaxation. Ces propriétés rhéologiques sont assurées par l'élastine. Dans le derme profond, les fibres élastiques tendent à s'organiser parallèlement à l'épiderme alors que dans le derme papillaire elles sont constituées de fibres plus fines qui s'intercalent dans la jonction dermo-épidermique.

La formation des fibres élastiques débute par l'assemblage de microfibrilles composées de fibrillines et de protéines auxiliaires, telles les fibulines (Wagenseil and Mecham, 2007). Les mailles de ce réseau sont progressivement remplies d'élastine, une protéine très hydrophobe dont les molécules s'associent suite à l'action des lysyl oxydases formant des aldéhydes réactionnelles sur des résidus lysine. Ces aldéhydes vont par la suite réagir et ainsi former des liaisons croisées (ou cross-links) qui vont stabiliser le réseau. La complexité du système provient en grande partie du nombre important de molécules identifiées dans les fibres élastiques. En plus des protéines déjà mentionnées, on y retrouve également des glycoprotéines (telles que MAGP, émiline), de petits protéoglycans riches en leucine (la décorine, le biglycan), des protéines LTBP (Latent TGF-beta Binding Proteins), ainsi que des ADAMTS et ADAMTSL.

1.1.1.2. Les collagènes

Le terme « collagène » provient d'un néologisme issu de la contraction de « colle » et « gène » en grec, et fut utilisé par les histologistes français du XIX^{ème} siècle pour décrire la substance fondamentale des tissus conjonctifs (van der Rest and Garrone, 1991). Dans leur ensemble, les collagènes constituent la classe protéique la plus abondante chez les animaux puisqu'ils représentent environ 30% de la masse protéique totale chez l'humain (Ricard-Blum, 2011). Ils confèrent aux différents tissus une part importante de leurs propriétés mécaniques et participent à des processus cellulaires variés (prolifération, différenciation, adhésion, migration, survie,...) par l'intermédiaire d'interactions avec les autres composants de la MEC.

La superfamille des collagènes comporte à ce jour 28 membres (sans compter les diverses isoformes de chaque type). Ceux-ci résultent de l'assemblage d'au moins 46 polypeptides différents, appelés chaînes α , qui sont encodés par autant de gènes chez l'humain (**Tableau 2**) (Gordon and Hahn, 2010; Ricard-Blum, 2011). Tous les collagènes sont composés de 3 chaînes α formant des structures homo ou hétérotrimériques selon qu'elles comportent 1, 2 ou 3 chaînes α différentes (**Tableau 2**) (**Figure 3**). Ces chaînes alpha s'assemblent, en au moins une région, en triple hélice droite qui peut être plus ou moins étendue selon le type de collagène (Ricard-Blum, 2011). La séquence des chaînes alpha est fortement conservée (entre espèces et entre les différents types de collagène), en particulier au niveau des domaines en triple hélice puisque ceux-ci sont constitués par la répétition d'un triplet caractéristique « Gly-X-Y » dans lequel les positions X et Y sont fréquemment occupées par une Proline et une Hydroxyproline, respectivement (**Figure 3**). La glycine est requise au sein de ce triplet car, en raison de sa taille réduite, elle est le seul acide aminé permettant un repliement en triple hélice. En cas de mutation, sa substitution par un autre acide aminé entraîne une distorsion locale de la triple hélice et cause des maladies génétiques telles que l'ostéogénèse imparfaite (Brodsky and Persikov, 2005). La stabilisation de la structure hélicoïdale des chaînes α riches en hydroxyproline est assurée par des ponts hydrogène et des interactions électrostatiques impliquant des résidus lysine et des aspartate (Fallas et al., 2009) (Persikov et al., 2005).

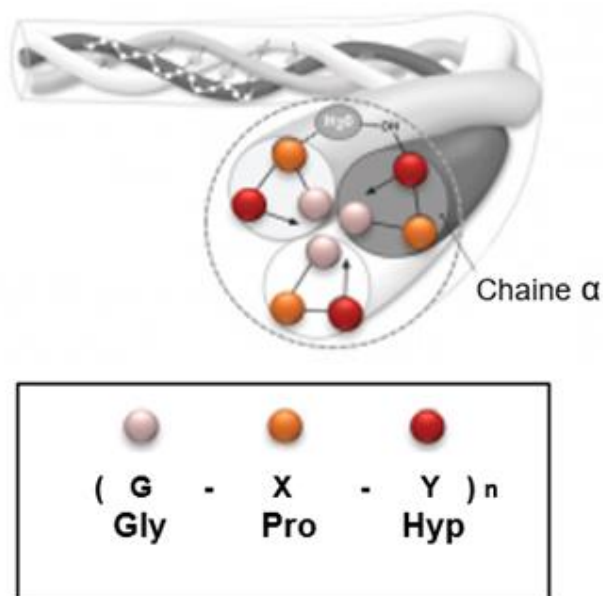


Figure 3 : Structure en triple hélice du collagène.

Les domaines en triple hélice des collagènes sont constitués de l'association de 3 chaînes α , chacune d'elles étant composée de répétitions G-X-Y où les X et Y sont très fréquemment des prolines et hydroxyprolines, respectivement. Les résidus glycine sont toujours centraux au sein de la triple hélice alors que les résidus X et Y se trouvent en périphérie.

Collagènes	Chaines α	Espèces moléculaires
Collagène I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	$[\alpha 1(I)]_2, \alpha 2(I)$ $[\alpha 1(I)]_3$
Collagène II	$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$
Collagène III	$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$
Collagène IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV), \alpha 3(IV), \alpha 4(IV),$ $\alpha 5(IV), \alpha 6(IV)$	$[\alpha 1(IV)]_2, \alpha 2(IV)$ $\alpha 3(IV), \alpha 4(IV), \alpha 5(IV)$ $[\alpha 5(IV)]_2, \alpha 6(IV)$
Collagène V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V), \alpha 4(V)$	$[\alpha 1(V)]_2, \alpha 2(V)$ $[\alpha 1(V)]_3$ $[\alpha 1(V)]_2, \alpha 4(V)$
Collagène VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI), \alpha 4(VI)^a,$ $\alpha 5(VI)^b, \alpha 6(VI)$	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$ $\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 4(VI)$ $\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 5(VI)$ $\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 6(VI)$
Collagène VII	$\alpha 1(VII)$	$[\alpha 1(VII)]_3$
Collagène VIII	$\alpha 1(VIII)$	$[\alpha 1(VIII)]_2, \alpha 2(VIII)$ $\alpha 1(VIII), [\alpha 2(VIII)]_2$ $[\alpha 1(VIII)]_3$ $[\alpha 2(VIII)]_3$
Collagène IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$
Collagène X	$\alpha 1(X)$	$[\alpha 1(X)]_3$
Collagène XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$ $\alpha 1(XI), \alpha 1(XI), \alpha 3(XI)$
Collagène XII	$\alpha 1(XII)$	$[\alpha 1(XII)]_3$
Collagène XIII	$\alpha 1(XIII)$	$[\alpha 1(XIII)]_3$
Collagène XIV	$\alpha 1(XIV)$	$[\alpha 1(XIV)]_3$
Collagène XV	$\alpha 1(XV)$	$[\alpha 1(XV)]_3$
Collagène XVI	$\alpha 1(XVI)$	$[\alpha 1(XVI)]_3$
Collagène XVII	$\alpha 1(XVII)$	$[\alpha 1(XVII)]_3$
Collagène XVIII	$\alpha 1(XVIII)$	$[\alpha 1(XVIII)]_3$
Collagène XIX	$\alpha 1(XIX)$	$[\alpha 1(XIX)]_3$
Collagène XX	$\alpha 1(XX)$	$[\alpha 1(XX)]_3$
Collagène XXI	$\alpha 1(XXI)$	$[\alpha 1(XXI)]_3$
Collagène XXII	$\alpha 1(XXII)$	$[\alpha 1(XXII)]_3$
Collagène XXIII	$\alpha 1(XXIII)$	$[\alpha 1(XXIII)]_3$
Collagène XXIV	$\alpha 1(XXIV)$	$[\alpha 1(XXIV)]_3$
Collagène XXV	$\alpha 1(XXV)$	$[\alpha 1(XXV)]_3$
Collagène XXVI	$\alpha 1(XXVI)$	$[\alpha 1(XXVI)]_3$
Collagène XXVII	$\alpha 1(XXVII)$	$[\alpha 1(XXVII)]_3$
Collagène XXVIII	$\alpha 1(XXVIII)$	$[\alpha 1(XXVIII)]_3$

Tableau 2 : Chaines α et espèces moléculaires des différents types de collagènes.

^a La chaîne $\alpha 4(VI)$ n'existe pas chez l'humain. ^b La chaîne $\alpha 5(VI)$ a aussi été désignée comme la chaîne $\alpha 1(XXIX)$.
D'après (Ricard-Blum, 2011).

Les collagènes diffèrent par le nombre et la taille des domaines en triple hélice ainsi que par la nature et la diversité des domaines « non collagène » (NC) (domaines von Willebrand factor A, Thrombospondine, FN de type III, Kunitz, ...) (**Figure 4**). Ceux-ci contribuent à l'assemblage des trimères et permettent des interactions avec d'autres protéines, participant ainsi de manière directe à la diversité des fonctions et propriétés des collagènes (Ricard-Blum, 2011).

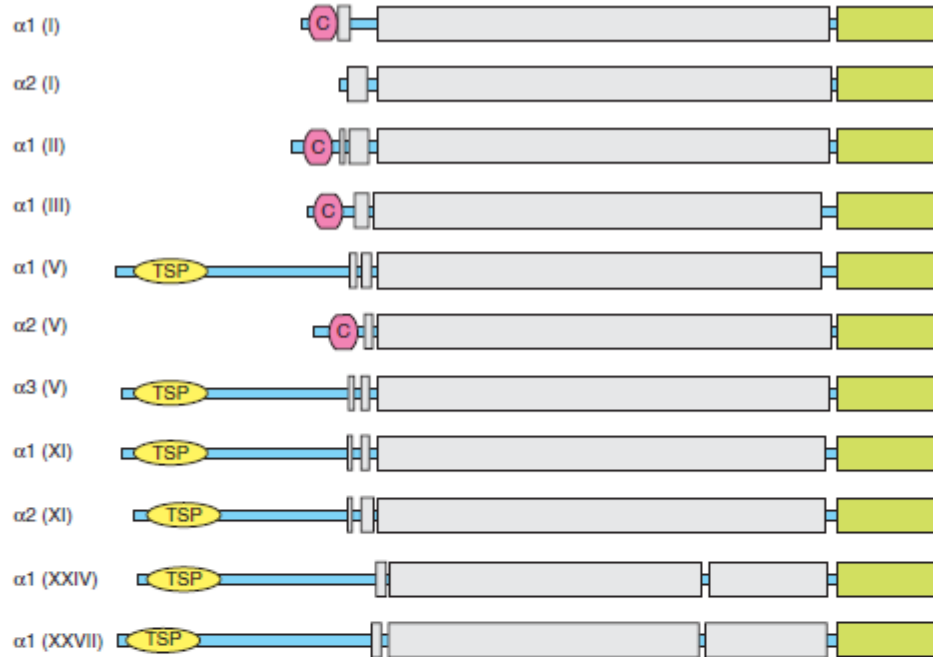
L'assemblage des structures supramoléculaires de collagènes débute systématiquement avec la trimérisation des chaînes α en triple hélice qui s'effectue progressivement à la manière d'une fermeture éclair (Ricard-Blum, 2011). Les domaines permettant l'initiation de la trimérisation varient selon le type de collagène. Celle-ci débute à l'extrémité C-terminale pour les collagènes fibrillaires et les collagènes de types IV, VII et X qui forment des réseaux. A l'inverse, l'interaction initiale se réalise à l'extrémité N-terminale pour les collagènes transmembranaires et au second domaine NC à partir de l'extrémité C-terminale pour les collagènes IX et XIX (FACITs).

Les collagènes ont été communément divisés et classés en sous-familles sur base des structures supramoléculaires qu'ils forment (**Figures 4 et 5**). Il existe :

- Les collagènes fibrillaires (types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII)
- Les collagènes FACIT (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices) ou collagènes associés aux fibrilles avec une triple hélice interrompue (types IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII)
- Les collagènes formant des réseaux qui comprennent :
 - Les collagènes des membranes basales (type IV)
 - Les collagènes à réseau hexagonal (types VIII et X)
- Les collagènes à filaments perlés (types VI et XXVIII (Veit et al., 2006))
- Le collagène des fibrilles d'ancrage (types VII)
- Les collagènes transmembranaires (type XIII, XVII, XXIII et XXV)
- Les collagènes à multiples domaines en triple hélice ou multiplexines (types XV et XVIII)

De nombreuses protéines présentant elles aussi des domaines en triple hélice ne sont pourtant pas considérées comme des collagènes au sens strict (Myllyharju and Kivirikko, 2004; Ricard-Blum, 2011). Parmi celles-ci figurent notamment l'adiponectine, les ficolines 1, 2 et 3, les Emilin1 et 2 (des glycoprotéines associées aux fibres élastiques), des récepteurs de macrophage (collectines, Marco, MBL),...

Fibril-forming collagens



Fibril-associated collagens with interrupted triple helices

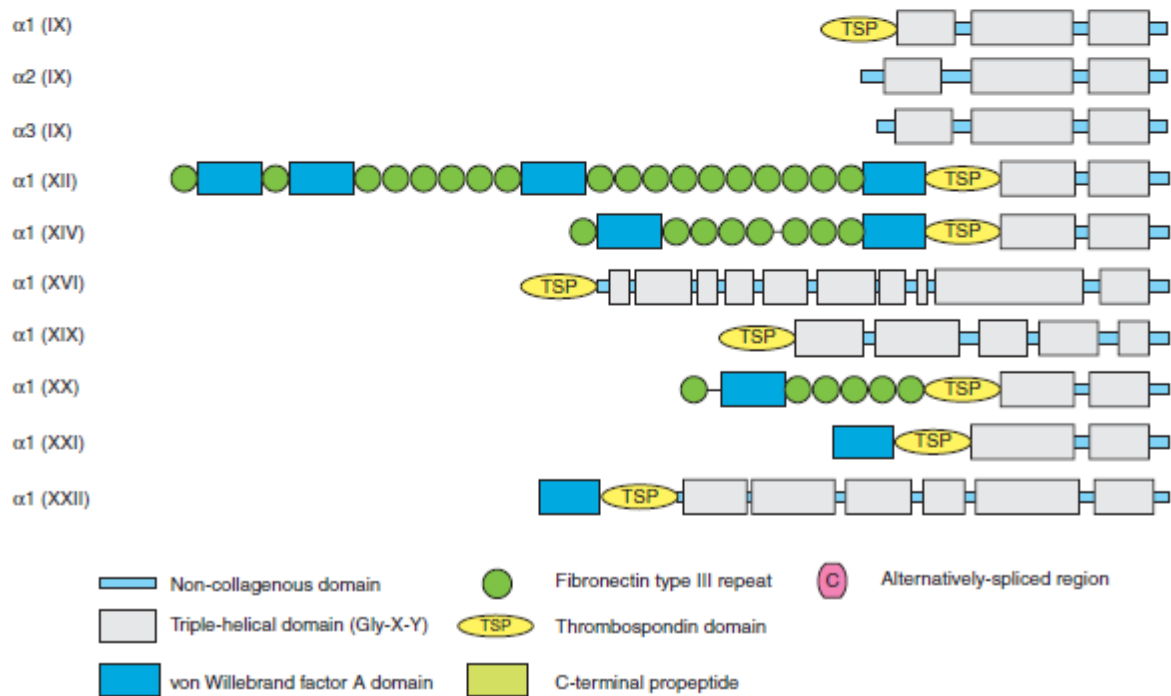
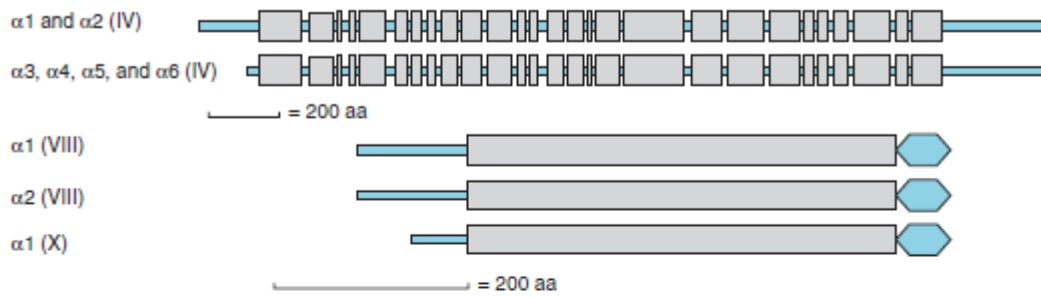


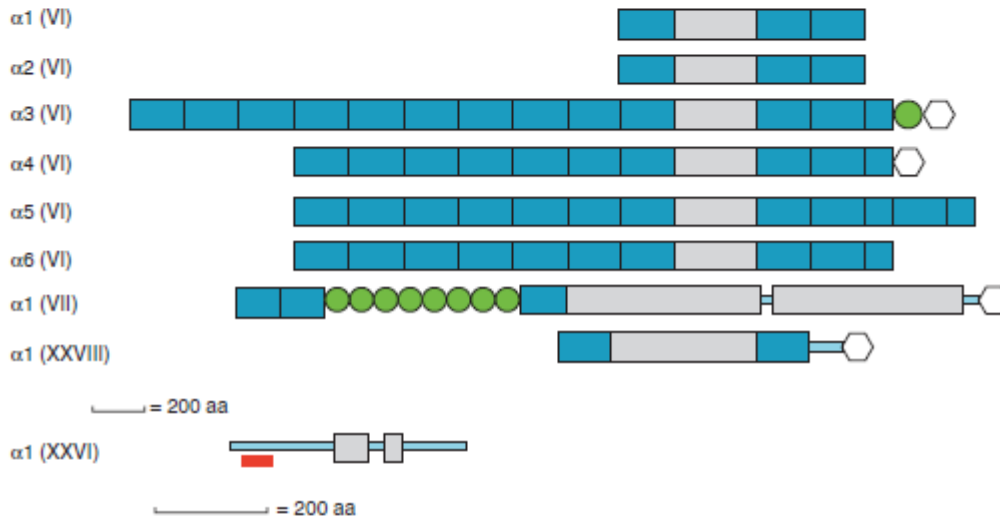
Figure 4 : Organisation structurale et composition des domaines des collagènes.

Suite de la figure à la page suivante (Ricard-Blum, 2011).

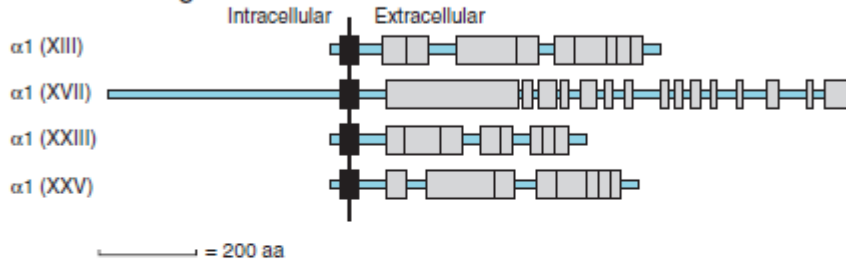
Network-forming collagens



Collagens VI, VII, XXVI, and XXVIII



Membrane collagens



Multiplexins (collagens XV and XVIII)

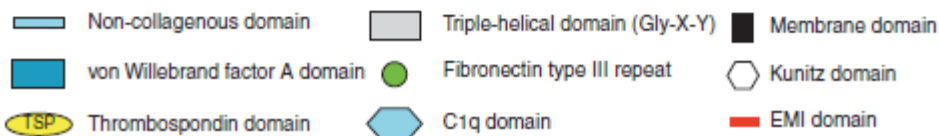
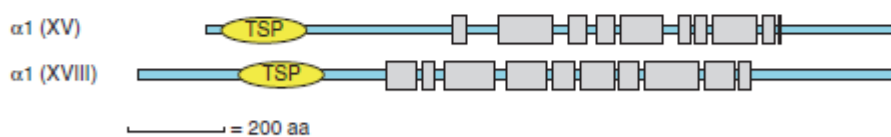


Figure 4 : Organisation structurale et composition des domaines des collagènes (suite).

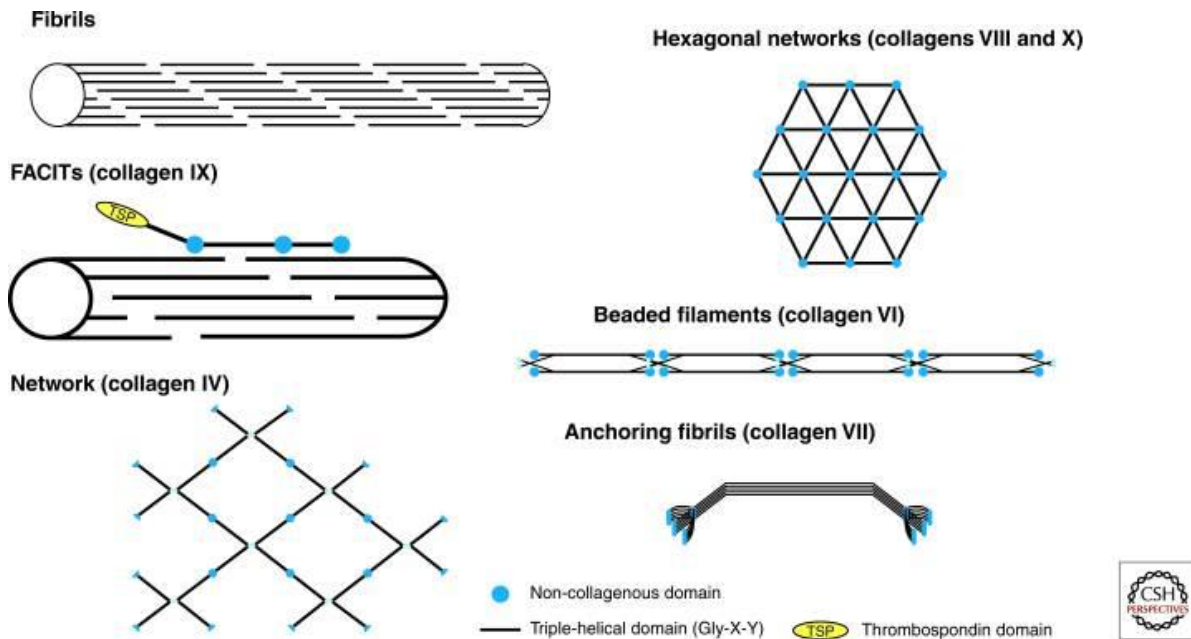


Figure 5 : Assemblages supramoléculaires des différentes sous-familles de collagènes.

La famille des collagènes est divisée en sous-familles sur base des assemblages supramoléculaires de leurs différents membres. La sous-famille des collagènes fibrillaires comprend les types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII. Les FACITs (Fibril Associated with Interrupted Triple Helices) comprennent les collagènes IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII. Les collagènes formant des réseaux comprennent le collagène de type IV qui forme les lames basales ainsi que les types VIII et X qui constituent des réseaux hexagonaux. Enfin, les sous-familles des collagènes à filaments perlés et des fibrilles d'ancrage reprennent respectivement les collagènes VI et XXVIII, et de type VII. Tiré de (Ricard-Blum, 2011).

a. Collagènes fibrillaires

Compte tenu de l'importance revêtue par les collagènes fibrillaires dans ce travail, ils sont abordés de manière détaillée. Ils constituent les protéines les plus abondantes chez les vertébrés. Sept collagènes fibrillaires (les types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII) formés par 12 chaînes α différentes ont été recensés à ce jour (Gelse et al., 2003; Myllyharju and Kivirikko, 2004). Les membres les plus représentés quantitativement sont les collagènes de types I, II et III, alors que les autres types sont des composants relativement peu abondants (Brodsky and Persikov, 2005).

Les collagènes fibrillaires s'associent entre eux pour former des fibrilles qui sont bien souvent hétérotypiques, c'est-à-dire qu'elles sont composées de différents types de collagène. Par exemple, même si le collagène de type II est majoritaire dans le cartilage, il y est associé au collagène de type XI, un autre collagène fibrillaire. Dans la peau, les fibrilles de collagène sont principalement composées de collagènes de types I et III, alors que dans la cornée les collagènes I et V sont les plus abondants (Bruckner, 2010). Bien que les collagènes fibrillaires restent majoritaires dans les fibrilles, celles-ci comprennent également des FACIT ainsi que d'autres protéines et protéoglycans.

Les fibrilles de collagènes sont linéaires et présentent une périodicité caractéristique de 64 à 67 nm (Bruckner, 2010) en raison du décalage de l'alignement des molécules de collagène dans chaque fibrille (**Figure 6**). Le diamètre des fibrilles varie généralement entre 15 et 500 nm (Bruckner, 2010; Kadler et al., 2007). Les fibrilles s'organisent en faisceaux dans la MEC sous forme de fibres longues et ordonnées qui confèrent aux tissus leur résistance aux forces de traction. Ces fibres sont particulièrement présentes dans des tissus tels que la peau, les tendons, l'os, le cartilage et les vaisseaux sanguins.

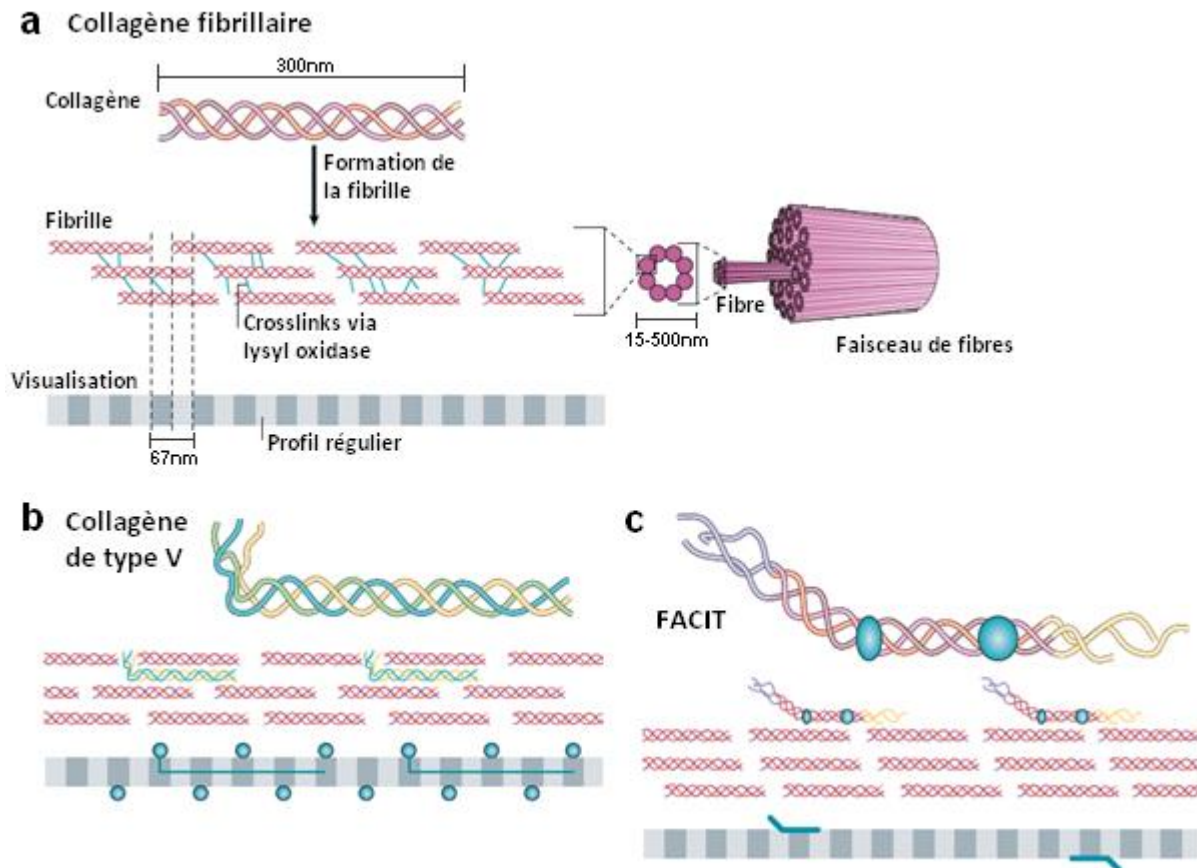


Figure 6 : Assemblage des collagènes fibrillaires.

(a) Après sécrétion et clivage par les N- et C- procollagène peptidases, les molécules matures de collagène s'assemblent spontanément en fibrilles, lesquelles forment à leur tour des fibres. Ces structures sont renforcées par la création de liaisons covalentes en leur sein grâce à l'action des lysyl oxydases. Ces fibrilles, qui apparaissent striées en microscopie électronique, présentent une périodicité caractéristique d'environ 67nm en raison du décalage des molécules trimériques qui les constituent. La formation des fibres de collagène de type I et le diamètre de ces fibres sont deux paramètres régulés par la présence de collagène de type V qui co-polymérise avec le collagène de type I (b), mais aussi par l'association à leur surface de FACIT (type XII et/ou XIV) et de protéoglycans (c). Adapté de (Mouw et al., 2014).

La fibrillogenèse permet de convertir des molécules solubles en fibrilles puis en fibres, insolubles et résistantes aux forces mécaniques (Shoulders and Raines, 2009). Ce processus nécessite de multiples étapes successives, intra et extracellulaires, qui sont catalysées par des enzymes spécifiques. Le mécanisme débute dans le réticulum endoplasmique rugueux par la synthèse des chaînes α sous forme de précurseurs (préprocollagènes) (**Figure 7**). Ceux-ci sont successivement composés d'un peptide signal, d'un propeptide aminoterminal (pN), du domaine en triple hélice central et d'un propeptide carboxyterminal (pC). Ils font l'objet d'une série de modifications post-traductionnelles, dont le clivage du peptide signal et l'hydroxylation de certains résidus lysine et proline par les lysyl et prolyl hydroxylases, respectivement. Des résidus galactose et glucose sont alors ajoutés aux groupements hydroxyles des hydroxylysines par la collagène galactosyltransferase et la collagène glucosyltransferase, respectivement (Canty and Kadler, 2005). Il est à noter que ces réactions enzymatiques ne sont possibles que sur des chaînes alpha monomériques. Les 3 pro-chaînes α s'assemblent alors à partir de leurs propeptides C-terminaux qui dictent ainsi la composition finale

des trimères. Le repliement en triple hélice s'effectue alors progressivement vers l'extrémité aminotermine des chaînes α , avec le concours de la chaperone HSP47 (Heat Shock Protein 47, également appelée Serpine H1) (Widmer et al., 2012). Puisque la stabilité de la triple hélice dépend du taux d'OH-Pro et que les hydroxylases ne sont actives que sur les chaînes monomériques, la vitesse de repliement du domaine collagène en triple hélice sera directement fonction de l'activité de ces enzymes.

Après sécrétion, les propeptides N- et C-terminaux sont excisés par des endopeptidases spécifiques (**Figures 7 et 8**). Les ADAMTS2, 3 et 14 (ou aminoprocollagène peptidases) excisent les propeptides aminotermiaux des procollagènes fibrillaires (Colige et al., 2005) alors que les propeptides C-terminaux sont clivés par la BMP1 (Bone Morphogenetic Protein 1) ou des membres de la même famille (« tolloid-like metalloproteinases ») (Greenspan, 2005; Vadon-Le Goff et al., 2015). Après ces clivages ne persistent que deux courtes séquences « non hélicoïdales » de part et d'autre du domaine triple hélice, les N- et C- télopeptides (**Figure 8**) (Shoulders and Raines, 2009). La disparition des propeptides engendre une réduction de la solubilité des trimères de collagène à la température corporelle qui auront ainsi tendance à s'assembler spontanément en fibres organisées et régulières (**Figure 7**). Celles-ci ne présenteront toutefois les propriétés de résistance mécanique adéquates qu'après la formation de liaisons covalentes sous l'effet catalytique de la lysyl oxydase et l'établissement d'interactions complexes avec des protéines ou autres molécules présentes dans la MEC.

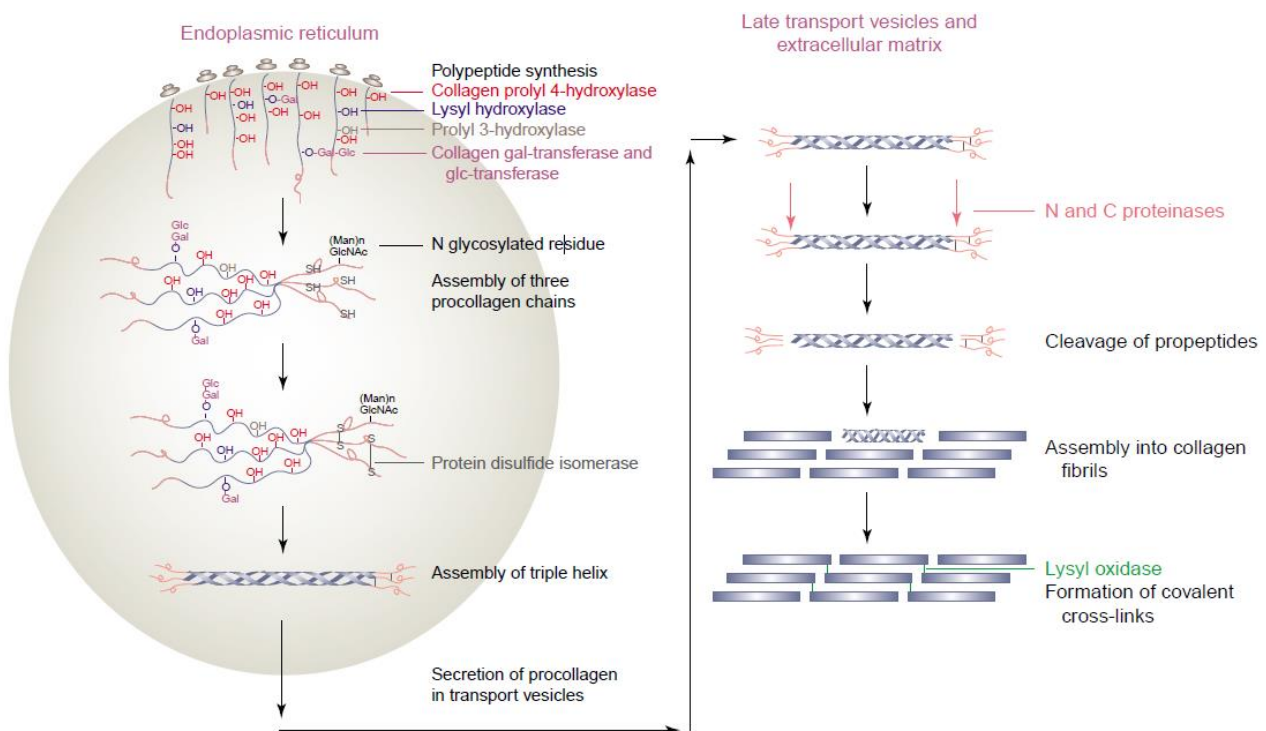


Figure 7 : Fibrillogénèse des collagènes fibrillaires et assemblages supramoléculaires.

Suite à la traduction des chaînes de préprocollagène, le peptide signal est clivé dans le réticulum endoplasmique, libérant les pro chaînes α . Certains résidus proline et lysine sont hydroxylés et certaines des hydroxylysines générées sont alors glycosylées. Les chaînes alpha monomériques s'assemblent alors à partir de leur extrémité C-terminale pour former la triple hélice, résultant en la formation de procollagène. Ces molécules de procollagène sont alors sécrétées via des vésicules de transport golgien. Les N- et C-propeptides sont excisés par des N- et C- procollagène peptidases, ce qui permet l'assemblage spontané des molécules trimériques en fibrilles. La consolidation de ces structures s'opère ensuite par la formation de liaisons covalentes initiées par oxydation de certains résidus lysine et hydroxylysine en dérivés aldéhydes réactifs (Mylyharju and Kivirikko, 2004).

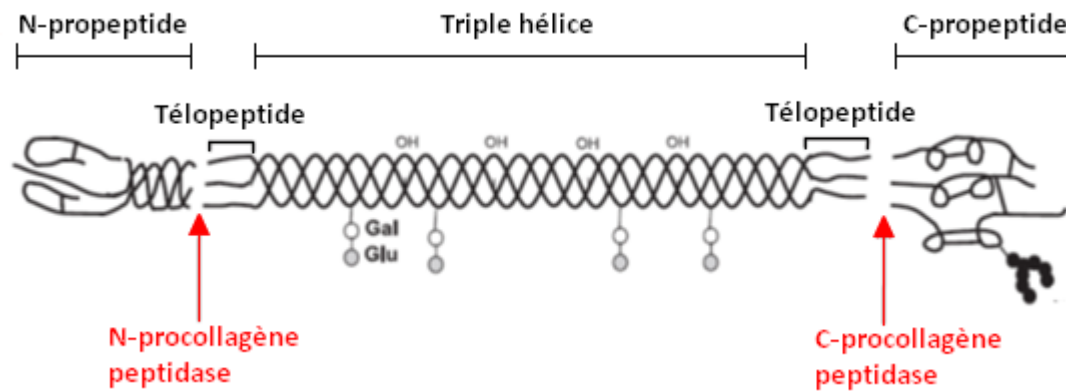


Figure 8 : Structure moléculaire des (pro)collagènes fibrillaires et localisation des sites de clivage des propeptides.

Après l'assemblage de la triple hélice et la sécrétion du procollagène, les extrémités amino (N-) et carboxy (C-) terminales sont clivées par les aminoprocollagène peptidases (ADAMTS2, 3 et 14) et par les carboxypocollagène peptidases (principalement BMP1 et les protéases tolloïdes), respectivement, qui libèrent les N- et C- propeptides. Adapté de (Gelse et al., 2003).

- Le **collagène de type I**, un hétérotrimère composé de 2 chaînes $\alpha 1(I)$ et d'une chaîne $\alpha 2(I)$, est la protéine la plus abondante du corps humain. Il est le constituant majeur de nombreux tissus conjonctifs tels que le derme, la cornée, le tendon, le ligament et l'os où il représente jusqu'à 90% de la masse organique (Gelse et al., 2003). Il est toutefois absent du cartilage hyalin et du corps vitreux de l'œil. *In vivo*, il forme des fibres comprenant également du collagène de type III (peau, vaisseaux sanguins, fibres réticulaires ...) et/ou de type V (tendon, os, peau, cornée). Il procure aux tissus leur résistance à l'élongation, tel qu'illustré dans le tendon, alors que dans l'os son association avec des cristaux d'hydroxyapatite détermine les propriétés biomécaniques de résistance aux torsions, à la traction et aux forces de cisaillement.
- Le **collagène de type II** est le composant prédominant du cartilage hyalin qui contient environ 80% de la totalité du collagène de type II. On le retrouve également dans le corps vitreux de l'œil, dans l'épithélium de la cornée, dans la notochorde et dans le *nucleus pulposus* des disques intervertébraux (Gelse et al., 2003). Il est constitué d'un homotrimère de 3 chaînes $\alpha 1(II)$. Dans le cartilage, il s'associe aux collagènes IX et XI ainsi qu'à d'autres protéines non-collagènes pour former des hétérofibrilles. Il présente un contenu en hydroxylysine, en glucose et en galactose supérieur à ce qui est observé dans le collagène de type I, favorisant ainsi les interactions avec les protéoglycans ce qui contribue à l'hydratation de la MEC formant le cartilage (Gelse et al., 2003).
- Le **collagène de type III** est un homotrimère composé de 3 chaînes $\alpha 1(III)$. Il est présent dans les tissus qui expriment aussi le collagène de type I, à l'exception des os. Le collagène de type III forme avec le type I des fibres hétérotypiques (Gelse et al., 2003). Son abondance relative est supérieure dans les tissus élastiques tels que les vaisseaux sanguins ou le poumon. Par ailleurs, des modèles de fibrillogenèse *in vitro* indiquent que sa présence induit une diminution du diamètre des fibres de collagène.
- Le **collagène de type V** est un collagène fibrillaire mineur quantitativement, si ce n'est dans la cornée où il représente jusqu'à 20% des collagènes (Birk, 2001). Il est présent dans les tissus qui expriment les collagènes de types I et III, et forme avec ceux-ci des fibrilles hétérotypiques

(Gelse et al., 2003). On le retrouve donc également dans l'os, les muscles, le tendon et le poumon. Trois chaînes α différentes ($\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ et $\alpha 3(V)$) ont été identifiées, menant à la formation de trois trimères différents ($\alpha 1\alpha 2\alpha 3$, $(\alpha 1)_3$, $(\alpha 1)_2\alpha 2$) même si la forme $(\alpha 1)_2\alpha 2$ est de loin la plus abondante. Le collagène de type V est considéré comme un régulateur du diamètre des fibrilles de collagène, en favorisant leur nucléation et en modulant leur croissance (Sun et al., 2011).

- Le **collagène de type XI** est lui aussi un collagène fibrillaire mineur quantitativement. Il est formé de 3 chaînes α différentes, deux chaînes α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) de type XI et une chaîne α de type II ($\alpha 1(II)$). Le collagène XI est co-exprimé avec le collagène de type II dans le cartilage articulaire où il régule le diamètre des hétérofibrilles (Gelse et al., 2003).
- Les **collagènes de types XXIV et XXVII** ont été découverts au début des années 2000 et semblent être des homotrimères composés de 3 chaînes $\alpha 1(XXIV)$ et 3 $\alpha 1(XXVII)$, respectivement. A la différence des autres collagènes fibrillaires, ils présentent des interruptions dans leur domaine en triple hélice. Ils sont tous deux principalement exprimés chez l'embryon, dans le cartilage et l'os en cours de minéralisation (Koch et al., 2003). Le collagène de type XXVII semble apporter un support idéal à la minéralisation du cartilage et à l'invasion des vaisseaux sanguins dans le futur tissu osseux (Hjorten et al., 2007). Bien qu'il représente une des molécules les moins abondantes de ce tissu, le collagène XXIV est également exprimé dans l'os de souris adultes et pourrait participer à sa minéralisation (Matsuo et al., 2008). Le collagène XXIV est aussi exprimé dans la cornée où, à l'instar du collagène de type V, il régulerait le diamètre des fibres de collagène de type I (Koch et al., 2003).

b. Les collagènes à triple hélice interrompue associés aux fibrilles (FACIT)

La sous-famille des FACIT est formée par les collagènes de types IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII et XXVI. Ils ne forment pas de structures particulières, mais s'associent directement ou indirectement à la surface de fibres formées par les collagènes fibrillaires (**Figure 6, C**) (Gerecke et al., 2003) où ils participent à la régulation de leur diamètre et sont également impliqués dans les interactions entre les fibrilles et d'autres composants matriciels. Les neuf types de collagène qui composent les FACIT contiennent au minimum deux domaines collagène en triple hélice séparés par un domaine non collagène (NC). Cette structure interrompue les rend plus souples que les collagènes fibrillaires, ce qui facilite les arrangements supramoléculaires potentiels.

Le collagène de type IX représente l'archétype des FACIT. Il s'agit d'un hétérotrimère exprimé dans le cartilage où il se retrouve associé à la surface des hétérofibrilles de collagènes de types II et XI. Il agit comme pont moléculaire et permet les interactions avec les autres composants matriciels afin de fournir au cartilage ses propriétés physico-chimiques (Kalchishkova et al., 2011). De manière analogue, les collagènes de types XII et XIV s'accumulent à la surface des fibrilles de collagène de type I et modulent ainsi leur interactions avec leur environnement (Ansorge et al., 2009).

c. Le collagène de type IV ou collagène des membranes basales

Le collagène de type IV représente le collagène prépondérant dans les membranes basales. Il se caractérise par sa capacité à s'auto-assembler en tétramères formant un réseau (**Figure 5**). Cet

assemblage particulier est essentiel aux propriétés et à l'intégrité des lames basales (Myllyharju and Kivirikko, 2004).

Concernant le collagène de type IV, six chaînes α différentes (nommées $\alpha 1(IV)$ à $\alpha 6(IV)$) ont été identifiées (**Tableau 2**). Bien que les combinaisons théoriques soient très nombreuses, seuls trois hétérotrimères ont été identifiés à ce jour : $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$, $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (**Tableau 2**). Les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$ sont appelées « chaînes classiques » en raison de leur présence ubiquitaire dans les lames basales de tous les tissus alors que les 4 autres chaînes ont des distributions restreintes à certains tissus (Khoshnoodi et al., 2008). L'hétérotrimère $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ est présent dans les membranes basales des glomérules rénaux, des poumons, des testicules et des yeux alors que la forme $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ se retrouve dans les membranes basales cutanées, des muscles lisses et des reins.

d. Maladies héréditaires associées aux collagènes

Il existe de nombreuses maladies héréditaires causées par des mutations affectant les collagènes mais aussi les enzymes impliquées dans leur maturation post-traductionnelle (Myllyharju and Kivirikko, 2004). En 2004, un total de plus de 1100 mutations affectant les gènes des chaînes $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$, $\alpha 1(II)$, $\alpha 1(III)$, $\alpha 5(IV)$ et $\alpha 1(VII)$ ont été associées à des maladies génétiques. De nombreuses autres mutations dommageables ont également été identifiées dans 17 autres chaînes α (Myllyharju and Kivirikko, 2004). Un grand nombre de ces mutations résultent en la substitution d'une glycine nécessaire au repliement de la triple hélice en un autre acide aminé plus encombrant (Myllyharju and Kivirikko, 2004; Shoulders and Raines, 2009), créant ainsi des distorsions plus ou moins conséquentes dans le domaine en triple hélice. De manière générale, il semble que les conséquences de telles mutations soient plus dommageables lorsqu'elles surviennent dans des certaines régions particulières, telles les régions de la triple hélice pauvres en proline et/ou proches du propeptide carboxyterminal, comme illustré dans l'ostéogenèse imparfaite.

La plupart des maladies héréditaires liées au collagène sont relativement rares. Un aperçu représentatif est fourni dans le **Tableau 3** (Myllyharju and Kivirikko, 2004; Shoulders and Raines, 2009).

- L'ostéogenèse imparfaite est caractérisée principalement par une fragilité osseuse dont l'ampleur peut toutefois varier en fonction de la nature et de la localisation de la mutation causale. D'autres tissus conjonctifs peuvent également être atteints, mais de manière moins marquée et moins systématique. Bien que la majorité des mutations identifiées à ce jour affectent les chaînes $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ (I), il est maintenant clair que d'autres protéines peuvent également être impliquées dans cette maladie (Marini and Blissett, 2013). Par exemple, diverses formes d'ostéogenèse imparfaite ont été constatées dans le cas de mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'hydroxylation de résidus proline (les prolyl 3-hydroxylase-1 (P3H1), cartilage-associated protein (CRTAP) et cyclophilin B (CypB) qui forment le « collagen prolyl 3-hydroxylation complex », responsable de l'hydroxylation de la Pro986 des chaînes $\alpha 1(I)$ et $\alpha 1(II)$ (Chang et al., 2010)), mais aussi dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans le repli de la triple hélice (Serpine H1) ou dans le clivage du C-propeptide (BMP1 et enzymes similaires) (Marini and Blissett, 2013; Shaker et al., 2015).

- Le syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS) regroupe un ensemble hétérogène de maladies génétiques rares. De manière générale, elles sont caractérisées principalement par une hypermobilité des articulations, une hyperélasticité de la peau, une fragilité vasculaire, des problèmes de cicatrisation tissulaire avec des cicatrices atrophiques et l'apparition spontanée d'hématomes difficilement résorbables,... (Beighton et al., 1998; Malfait et al., 2010). Des mutations dominantes

dans les gènes COL5A1, COL5A2 et COL1A1 sont impliquées dans la majorité des EDS de type classique. Des altérations du collagène de type III sont responsables de l'EDS de type vasculaire, alors que des mutations proches de l'extrémité N-terminale du domaine en triple hélice des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de type I causent l'EDS de type arthrochalasique. En plus des mutations identifiées dans les gènes codant pour des collagènes, des mutations de la tenascine X (EDS de type classique), de la lysyl hydroxylase 1 (EDS de type cyphoscoliotique), de l'ADAMTS2 (EDS de type dermatosparactique), de la filamine A (variant d'hétérotopie périventriculaire), de la galactosyltransferase 1 (type progéroïde) ont également été identifiées (Malfait et al., 2010; Myllyharju and Kivirikko, 2004).

- De nombreuses mutations menant à des chondrodysplasies de sévérité variable, allant de la létalité périnatale à une atteinte relativement bénigne ont également été identifiées dans plusieurs gènes (COL2A1, COL10A1, COL11A1, COL11A2). Les patients sont généralement caractérisés par une petite taille, principalement en raison d'une calcification précoce des cartilages interférant avec une croissance normale.

- Différentes formes du syndrome d'Alport (formes autosomales, ou liées à l'X) sont caractérisées par une néphropathie progressive menant à une protéinurie, une hypertension et ultimement à une insuffisance rénale. Les formes autosomales sont notamment liées à des mutations des gènes COL4A3, COL4A4, COL4A6, alors que la forme liée à l'X provient de mutation du gène COL4A5.

- La myopathie de Bethlem et la dystrophie musculaire d'Ullrich sont liées à des mutations des gènes COL6A1, COL6A2, COL6A3.

- Deux formes d'épidermolyse bulleuse, une maladie cutanée liée au décollement de l'épiderme qui forme des lésions bulleuses, proviennent de mutations dans le gène du COL17 et du COL7A1.

- Deux formes de dystrophie endothéliale de la cornée sont associées à des mutations du gène COL8A2.

- Le syndrome de Knobloch, caractérisé par une forte myopie, un détachement de la rétine et un encéphalocèle occipital est lié à des mutations du gène COL18A1

- Le syndrome de Bruck, caractérisé par de l'ostéoporose et une fragilité osseuse, ainsi qu'une petite stature est associé à des mutations dans le gène LH-1, codant pour la lysyl hydroxylase 1.

Gène muté	Maladie(s) humaine(s)* ou phénotype chez la souris déficiente
COL1A1, COL1A2	Ostéogénèse imparfaite, ostéoporose, EDS de type arthrochalasique
COL2A1	Différentes chondrodysplasies, ostéoarthrites
COL3A1	EDS de type vasculaire, anévrismes artériels
COL4A3, COL4A4, COL4A6	Formes autosomales du syndrome d'Alport
COL4A5	Formes liées à l'X du syndrome d'Alport
COL4A5 et COL4A6	Syndrome d'Alport avec leiomyomatose oesophagienne diffuse
COL5A1, COL5A2	EDS de type classique
COL6A1, COL6A2, COL6A3	Myopathie de Bethlem, dystrophie musculaire d'Ullrich
COL7A1	Formes dystrophiques d'épidermolyse bulleuse

COL8A2	Formes de dystrophie endothéliale de la rétine
COL9A1, COL9A2, COL9A3	Multiples dysplasies de l'épiphyse, ostéoarthrite, discopathie
COL10A1	Chondrodysplasie
COL11A1, COL11A2	Diverses chondrodysplasies modérées, perte de l'audition non syndromique, ostéoarthrite
COL12A1	Myopathie de Bethlem ; Perturbation de la structure matricielle des ligaments périodontaux et de la peau chez la souris
COL13A1	Mortalité embryonnaire ou atrophie musculaire progressive chez la souris
COL15A1	Myopathie et problèmes cardiovasculaires chez la souris
COL17A1	Diverses formes d'épidermolyse bulleuse
COL18A1	Syndrome de Knobloch et syndrome de dispersion pigmentaire
COL19A1	Couche musculaire de l'œsophage anormale chez la souris
P4H- α (I)	Létalité embryonnaire chez la souris
LH1	EDS de type cyphoscoliotique
LH2	Syndrome de Bruck
LH3	Mortalité embryonnaire et manque de collagène de type IV dans les membranes basales chez la souris
ADAMTS2	EDS de type dermatosparactique
BMP1	Mortalité périnatale chez la souris Ostéogenèse imparfaite à haute densité osseuse (Marini and Blissett, 2013)
Tolloid-like-1	Communication interauriculaire (Stanczak et al., 2009); mortalité embryonnaire et problème cardiaque chez la souris
LOX	Létalité périnatale et anévrismes aortiques ainsi que dysfonctions cardiovasculaires chez la souris

Tableau 3 : Association entre maladies humaines et gènes codant pour des collagènes ou pour des enzymes impliquées dans leur maturation

*Dans certains cas, les maladies n'ont pas été identifiées chez l'homme mais les conséquences de mutations ont été décrites chez la souris. Tableau adapté de (Myllyharju and Kivirikko, 2004; Shoulders and Raines, 2009).

1.1.2. Glycoprotéines

La glycosylation est une des principales modifications post-traductionnelles des protéines qui consiste en la liaison de molécules glucidiques sur leur chaîne peptidique de manière covalente. On en distingue deux types. La N-glycosylation s'opère sur un résidu asparagine (N) au sein d'une séquence N-X-S/T (où X représente n'importe quel acide aminé hormis une proline, S représente une sérine et T représente une thréonine). La biosynthèse des glycoprotéines débute par l'addition d'un N-acétylglucosamine sur lequel seront ensuite ajoutés de manière successive d'autres molécules glucidiques. Dans le cas de N-glycosylation, les chaînes glycosylées sont le plus souvent assez courtes mais peuvent être très ramifiées. L'ajout d'une chaîne glucidique peut également se réaliser sur un groupement hydroxyle des résidus sérine, thréonine ou hydroxylysine des chaînes peptidiques; on parle alors de O-glycosylation. Une différence entre N- et O-glycosylation est que la N-glycosylation débute dans le

réticulum endoplasmique et se termine dans l'appareil de Golgi, alors que la O-glycosylation est exclusivement golgienne.

Les glycoprotéines matricielles comportent souvent différents domaines structuraux possédant des propriétés et activités distinctes. Cette diversité structurale est responsable de leurs multiples fonctions (cohésion entre composants de la MEC, interactions avec les cellules, régulation de la biodisponibilité de facteurs solubles, co-facteurs pour des récepteurs cellulaires transmembranaires, ...). En raison de la multitude des glycoprotéines, il est impossible de toutes les détailler dans ce travail (**Tableau 4**). Seules la fibronectine et les laminines seront donc brièvement décrites à titre d'exemples.

Protéines	Localisations	Descriptions/fonctions
Thrombospondines	Tissus conjonctifs	Large distribution, rôles multiples dans les tissus intervenant dans la réparation tissulaire, l'angiogenèse, l'organisation de la MEC, la synaptogenèse,... (Adams and Lawler, 2011).
Sialoprotéine	Os et dents	Essentielle pour la structure de la MEC minéralisée ; se lie au calcium et à l'hydroxyapatite ; régule l'adhésion cellulaire.
Fibrinogène	Sang	Glycoprotéine soluble, qui, après son clivage par la thrombine, est convertie en monomères de fibrine qui s'associent pour former les caillots sanguins.
Fibulines	Membranes basales, sang et artères	Glycoprotéines pouvant lier le calcium, présentes dans les matrices fibrillaires et dans le sang.
SPARC/Ostéonectine	Os	Impliquée dans la calcification du collagène, l'initiation de la minéralisation et l'ossification.
Ostéopontine	Os et reins	Impliquée dans l'attachement des cellules à la MEC osseuse minéralisée.
Reelin	Cerveau	Guidage des neurones et des cellules gliales dans le cerveau en développement.
Ténascines	Tissus conjonctifs	Régulation des processus inflammatoires et fibrotiques.
Vitronectine	Sang	Glycoprotéine d'adhésion impliquée dans la coagulation sanguine et dans la réparation tissulaire.

Tableau 4 : Exemples non exhaustifs de glycoprotéines de la MEC (Mouw et al., 2014).

1.1.2.1. La fibronectine

La fibronectine (FN) est une glycoprotéine essentielle en raison de son rôle structurel dans la MEC mais aussi de son implication dans de multiples processus cellulaires (Pankov and Yamada, 2002; To and Midwood, 2011; Zollinger and Smith, 2016). Elle est en effet capable d'interagir avec de nombreux composants matriciels tels que les protéoglycans, les collagènes et gélatines, les facteurs de croissance, les récepteurs cellulaires comprenant les intégrines, les fibrines I et II,... (**Figure 9**). Elle est exprimée par de nombreux types cellulaires et joue des rôles importants dans l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaires, de même qu'au cours de la réparation tissulaire. Son importance capitale pour le développement est d'ailleurs illustrée par la létalité embryonnaire de sa délétion chez la souris (George et al., 1993).

La FN se présente généralement sous forme d'un dimère composé de 2 sous-unités liées entre elles de manière covalente par deux ponts disulfures à leur extrémité C-terminale (Pankov and Yamada, 2002; To and Midwood, 2011). Les molécules de FN consistent en de multiples répétitions de structures modulaires : 12 répétitions de modules de type I (FNI), 2 répétitions de type II (FNII) et 15

de type III (FNIII) (**Figure 9**). Bien qu'il n'y ait qu'un seul gène codant pour la FN humaine, il existe de nombreux variants protéiques issus d'épissages alternatifs du pré-ARN unique. Les modules soumis à ces mécanismes sont les deux modules de type III EDA et EDB, de même qu'un domaine de connexion variable et non-homologue (FNIIICS). Cette structure modulaire qui comporte des régions intermodulaires permet une grande flexibilité de la molécule, ce qui facilite / empêche l'accès à certains des modules et régule donc les fonctions de la FN. Ces modules sont généralement organisés en domaines fonctionnels qui incluent le domaine N-terminal de 70kDa, le domaine central de liaison de 120kDa et le domaine de liaison à l'héparine HepII de 40kDa.

La FN existe sous deux formes : la forme plasmatique qui est très soluble (où sa concentration est d'environ 300 à 400 µg/ml), et la forme cellulaire, moins soluble, retrouvée notamment dans la MEC (Pankov and Yamada, 2002; To and Midwood, 2011). La FN plasmatique, qui n'est que peu soumise à l'épissage alternatif, est principalement synthétisée par les hépatocytes et joue un rôle important dans la cascade de coagulation sanguine. La FN cellulaire consiste quant à elle en un groupe bien plus hétérogène d'isoformes relativement spécifiques à certains types cellulaires. Ce mécanisme permet donc de générer différentes formes de FN aux propriétés plus ou moins exacerbées en termes d'adhésion cellulaire, de liaison à des ligands spécifiques, et de solubilité en fonction du tissu, du stade de développement ou des conditions matricielles.

Les FN plasmatiques et cellulaires se trouvent dans une conformation fermée et inactive, et nécessitent une « activation » afin qu'elles puissent remplir leurs divers rôles, et notamment la formation d'un réseau fibrillaire apportant un support structurel à la MEC (Geiger et al., 2001; Pankov and Yamada, 2002; To and Midwood, 2011) (**Figure 10**). Cet état de compaction est maintenu par des interactions électrostatiques intramoléculaires (**Figure 10 A**). Le dépôt de FN active dans la MEC résulte de sa capture et / ou de sa synthèse et de son assemblage séquentiel en fibrilles par les cellules. Ce processus complexe débute par la liaison de la FN à des récepteurs de surface cellulaire tels que des intégrines via son domaine N-terminal de 70kDa et ses domaines FNIII 9 et 10 (**Figure 10 A, i et ii**). Ces liaisons engendrent l'activation des intégrines en un état de plus haute affinité (**Figure 10 A, iii**) et leur association aux adhésions focales, permettant de surcroît la liaison de la FN à des HSPG de surface cellulaire, à l'image du syndécan 2 (**Figure 10 A, iv**). L'ensemble des liaisons entre la FN et ses récepteurs cellulaires permet un changement de conformation de la FN et son « dépliement » en réponse à des tensions exercées par la cellule, ce qui rend accessibles des sites cryptiques d'assemblage, en plus de ceux déjà accessibles (**Figure 10 B**) (Geiger et al., 2001). Le déroulement de la FN et l'exposition de sites cryptiques qui en résulte permet des nouvelles interactions entre molécules de FN ce qui engendre la polarisation et l'élongation des fibrilles de FN, donnant naissance à des réseaux en surface cellulaire et dans la MEC (**Figure 10 C**) (Pankov and Yamada, 2002; To and Midwood, 2011). Les réseaux de FN jouent des rôles structurels importants notamment en régulant la composition de la MEC en collagènes I et III, en fibrillines 1 et 2, fibulines, laminines, tenascines,... Ces réseaux sont capables de séquestrer dans la MEC des facteurs de croissance tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le TGF-β associé aux protéines LTBP (Latent TGF-β Binding Protein),... (To and Midwood, 2011), ce qui permet de les mobiliser rapidement en cas de besoin et de réguler les voies de signalisation associées.

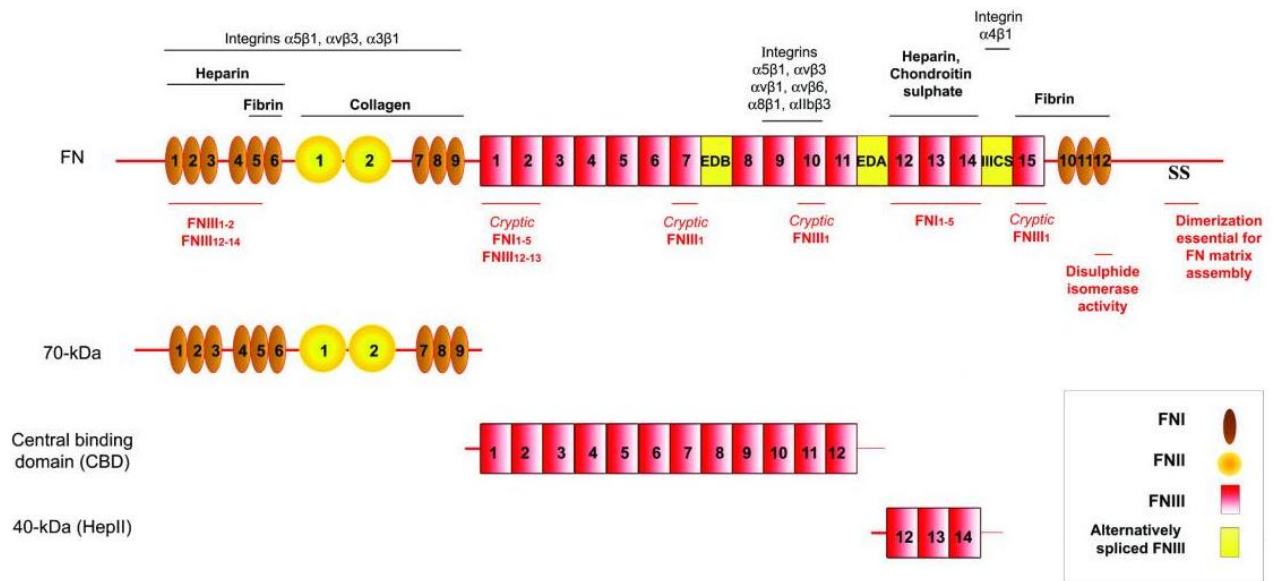


Figure 9 : Structure de la fibronectine (FN) et de ses fragments.

La FN est composée de modules conservés : 12 modules FN de type I (ovales bruns), 2 de type II (ronds jaunes) et 15 de type III (carrés rouges), ainsi que de 3 modules de type III soumis à l'épissage alternatif (carrés jaunes). Ces modules interagissent avec divers protéines et récepteurs cellulaires (légendes noires) et présentent certains sites (accessibles ou cryptiques) d'interactions entre molécules de fibronectine (légendes rouges). Enfin, ces modules forment les 3 domaines de la FN : le domaine N-terminal de 70kDa, le domaine central de liaison (CBD) et le domaine C-terminal de 40kDa (HepII) (To and Midwood, 2011).

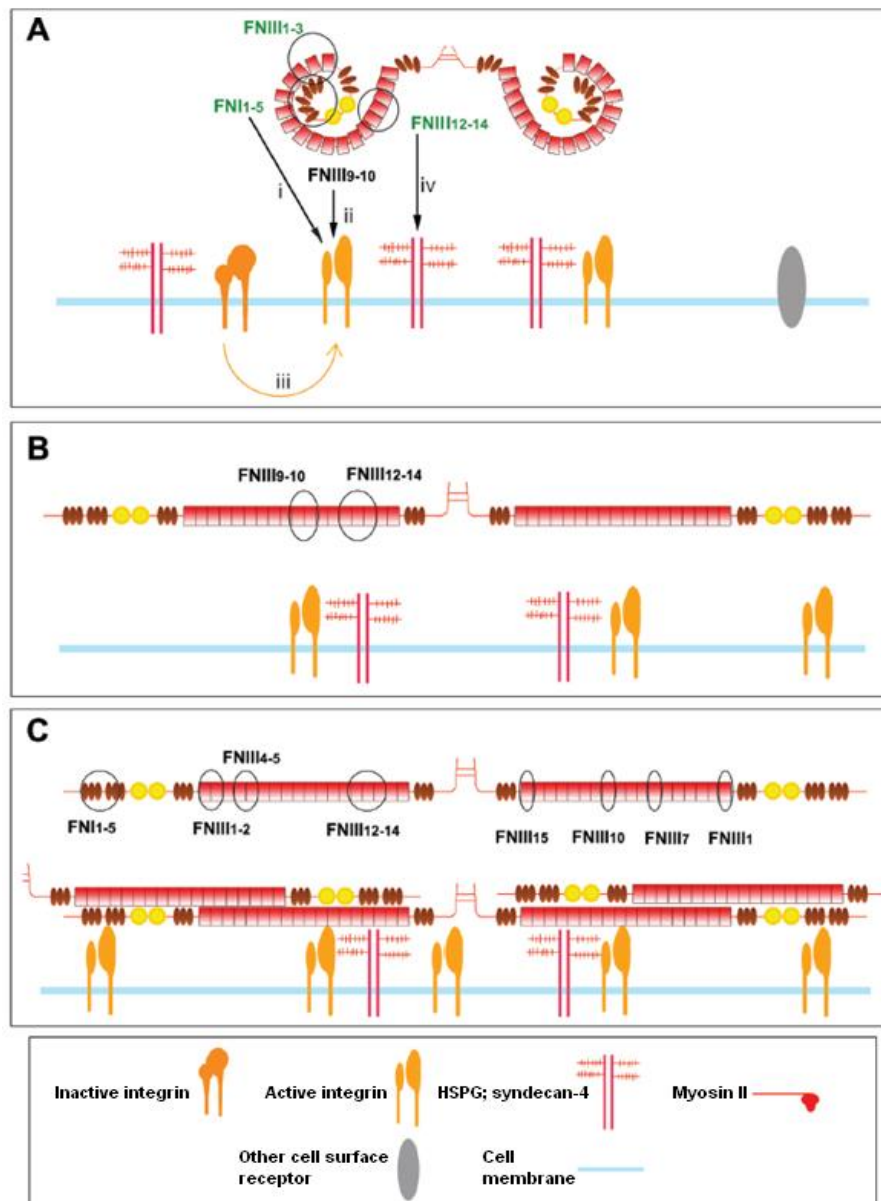


Figure 10 : Etapes de la fibrillogenèse de la fibronectine (FN): initiation (A), déploiement (B) et assemblage fibrillaire (C).

A. L'initiation de la fibrillogenèse de la FN nécessite des interactions entre le domaine N-terminal 70kDa de la FN et des récepteurs cellulaires incluant des intégrines (i), ainsi que des domaines FNIII₉₋₁₀ avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (ii). Ces interactions induisent l'activation des intégrines impliquées et leur passage à un état de haute affinité (iii), permettant la liaison de la FN à des HSPG (iv). **B.** Ces interactions alliées aux tensions exercées par la cellule induisent un déploiement des molécules de FN. **C.** L'exposition de sites cryptiques en plus de ceux déjà accessibles favorise les interactions intermoléculaires FN-FN et mène à la formation de fibrilles de FN. Les modules les plus importants sont entourés d'un cercle (To and Midwood, 2011).

1.1.2.2. Les laminines

Les laminines constituent une famille de glycoprotéines hétérotrimériques principalement retrouvées dans les membranes basales et dans certains compartiments mésenchymateux. Chacune d'elles est constituée d'une chaîne α , d'une chaîne β et d'une chaîne γ qui s'assemblent via des interactions hautement spécifiques entre leur domaine C-terminal, résultant en des structures cruciformes (à 4 bras), en forme de Y (à 3 bras), ou en forme de tige (1 seul bras) (**Figure 11**)

(Domogatskaya et al., 2012). A ce jour, 5 chaînes α , 4 chaînes β et 3 chaînes γ ont été recensées (Mouw et al., 2014). Elles se combinent pour former 16 laminines en raison de distributions tissulaires différentes des chaînes qui les composent et d'interactions limitées entre elles (Theocharis et al., 2016). La nomenclature des laminines repose sur leur composition en différentes chaînes. Par exemple, la laminine-111 (LM-111) est composée des chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ alors que la LM-511 est composée des chaînes $\alpha 5$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ (Domogatskaya et al., 2012).

Les laminines possèdent de multiples fonctions et régulent notamment les interactions entre les cellules et la membrane basale / MEC en se liant à certains récepteurs cellulaires tels que des intégrines, à des composants matriciels comme le collagène IV, des protéoglycans,... (Domogatskaya et al., 2012; Durbeej, 2010). Elles jouent donc un rôle dans des mécanismes tels que l'adhésion et la migration cellulaires. Enfin, elles sont indispensables au développement embryonnaire précoce et à l'organogenèse (Durbeej, 2010).

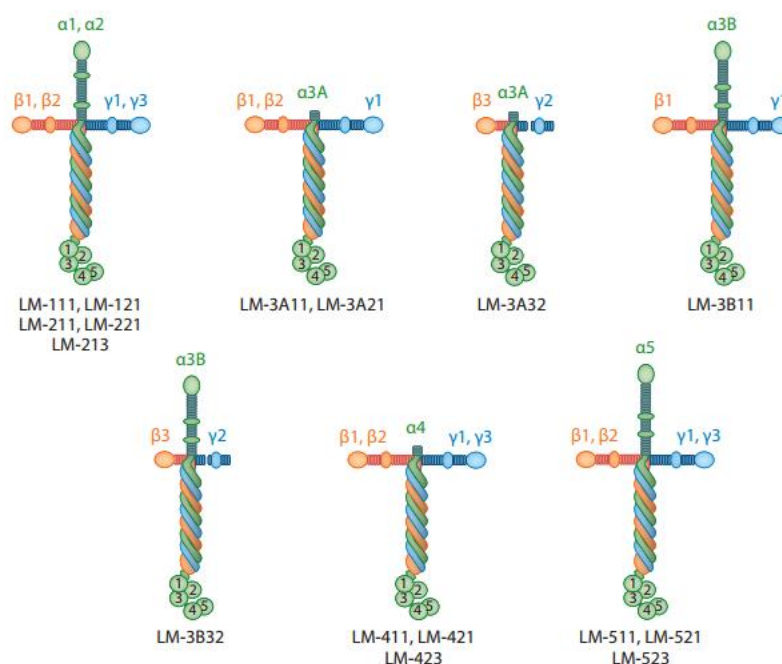


Figure 11 : Structure des laminines.

Les laminines sont composées d'une chaîne α , d'une β et d'une γ qui s'assemblent en 16 combinaisons (connues à ce jour) pour former des structures cruciformes, « en Y » ou cylindriques (Domogatskaya et al., 2012).

1.1.3. Protéoglycans

Les protéoglycans représentent un groupe particulier de glycoprotéines hautement glycosylées dont les fonctions dérivent à la fois de la protéine mais aussi des GAG qui les composent. Ils sont formés d'un axe protéique sur lequel des GAG sont liés de manière covalente à un résidu sérine (**Figure 12**). Ces GAG correspondent à des chaînes linéaires composées de répétitions de disaccharides comprenant un hexosamine, un N-acétyl galactosamine ou un acide glucuronique, plus ou moins sulfatés. Il existe quatre GAG principaux qui participent à la formation des protéoglycans : la chondroïtine sulfate, le dermatan sulfate, le kératan sulfate et l'héparan sulfate (Theocharis et al., 2016). Par ailleurs, les protéoglycans peuvent s'associer à l'acide hyaluronique pour former des complexes de plusieurs centaines, voire milliers, de molécules.

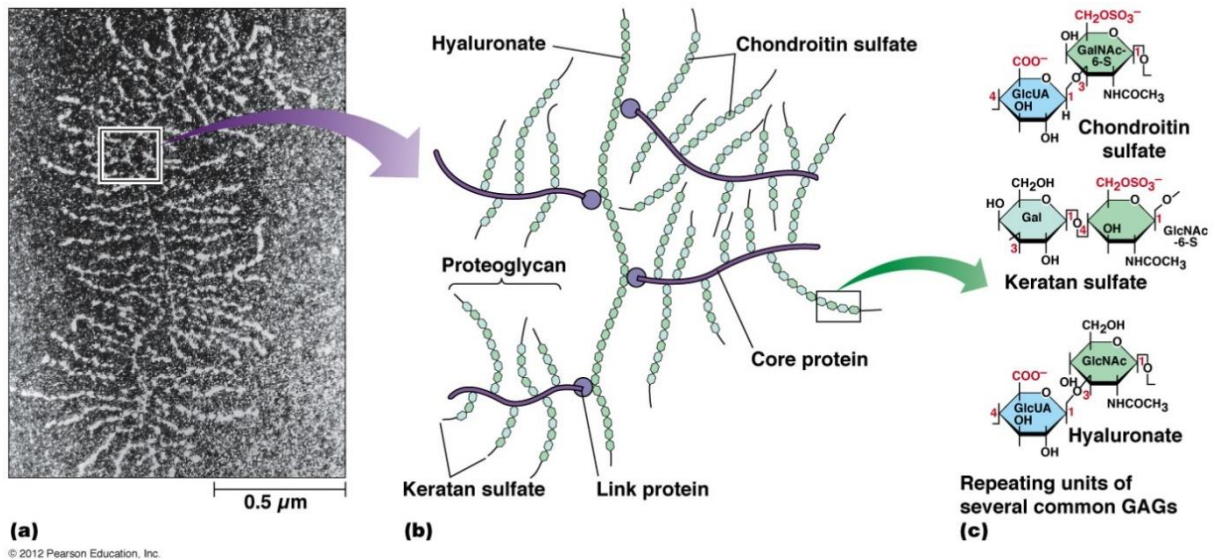


Figure 12 : Structure des protéoglycans.

(a) Les protéoglycans sont visibles en microscopie électronique. (b) Les protéoglycans, ici liés à l'hyaluronate par des protéines de liaison (cercles bleus), consistent en un axe protéique (mauve) sur lequel sont greffées une ou plusieurs chaînes de GAG (vert). (c) Les GAG sont des longues chaînes polysaccharidiques composées d'une répétition d'unités de disaccharides spécifiques, telles qu'illustrées pour le chondroïtine sulfate, le kératine sulfate et l'acide hyaluronique. Figure tirée de Pearson Education Inc. 2012.

Une part importante des fonctions biologiques des protéoglycans dérive des caractéristiques biochimiques et hydrodynamiques de leurs GAG, notamment via un nombre variable mais le plus souvent élevé de groupements sulfates et carboxyles. Ceux-ci, en raison de leur caractère hydrophile, sont largement responsables de l'hydratation et de la turgescence des tissus conjonctifs, favorisant ainsi la diffusion des ions et des petites molécules. Les protéoglycans confèrent également aux tissus conjonctifs leur résistance à la compression, en particulier dans le cartilage.

Les protéoglycans interagissent également avec de nombreux facteurs de croissance, des cytokines, des chémokines matricielles, des récepteurs de surface cellulaire et des composants de la MEC, par l'intermédiaire de leur cœur protéique ou via les chaînes latérales de leurs GAG (Theocharis et al., 2016). Ils participent ainsi à diverses propriétés cellulaires telles que l'adhésion, la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose. Par leurs diverses interactions avec d'autres composants de la MEC, les protéoglycans sont au centre des processus physio-pathologiques impliquant la formation et le remodelage des tissus conjonctifs (Theocharis et al., 2016). Les protéoglycans sont particulièrement abondants dans les MEC du système nerveux central et dans le cartilage.

Les protéoglycans peuvent être divisés en différentes classes et sous-classes sur base de leur localisation cellulaire, de leur taille, de la composition de leurs chaînes de GAG ou des propriétés de leur corps protéique (Edwards, 2012; Schaefer and Schaefer, 2010; Theocharis et al., 2010) (**Figure 13**).

A ce jour, le seul protéoglycane intracellulaire connu est la serglycine (Iozzo and Schaefer, 2015; Theocharis et al., 2016). Elle a été observée dans des granules de sécrétion de cellules inflammatoires, notamment des mastocytes, où elle participe au stockage de protéases jusqu'à leur relargage en cas d'inflammation. Elle est également un acteur clé de la réponse inflammatoire chez les

cellules endothéliales et son expression a été corrélée avec une agressivité accrue de certaines cellules cancéreuses.

Les protéoglycans de surface cellulaire comprennent des protéoglycans transmembranaires comme les syndécans et le bétaglycan, mais aussi des protéoglycans avec une ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) tels que les glypicans. Les syndécans sont impliqués dans une large gamme de processus biologiques grâce à leur capacité à lier de nombreux facteurs de croissance et à leur interaction avec des récepteurs de type « tyrosine kinase » (Iozzo and Schaefer, 2015). Suite à leur clivage par des « sheddases », certains syndécans se retrouvent également dans l'environnement péricellulaire où ils participent à divers processus physiopathologiques, dont la promotion de la croissance tumorale attribuée au syndécan-1 « soluble ». Le bétaglycan (ou récepteur de type III du TGF- β) est un protéoglycan transmembranaire exprimé ubiquitairement et qui agit comme co-récepteur des membres de la famille des TGF- β (Iozzo and Schaefer, 2015; Theocharis et al., 2016). Les glypicans sont liés à la membrane plasmique via une ancre GPI. Ils modulent l'activité de facteurs de croissance et de cytokines comme le FGF (Fibroblast Growth Factor) ou Wnt (Iozzo and Schaefer, 2015). Ils sont de plus impliqués dans le contrôle de la croissance tumorale et l'angiogénèse.

Les protéoglycans péricellulaires sont fréquemment associés à la surface cellulaire par l'intermédiaire d'intégrines ou d'autres récepteurs. Ils peuvent également être intégrés dans les membranes basales, tels le perlécan et l'agrine, ou les collagènes XVIII et XV (qui peuvent porter des chaînes d'héparan ou de chondroïtine sulfate). Il est intéressant de noter qu'en plus des fonctions remplies par les molécules intactes, des fragments de dégradation peuvent être doués d'activités spécifiques, telles les propriétés anti-angiogéniques et angiostatiques de l'endorepelline (fragment du perlécan) et de l'endostatine (fragment du collagène XVIII) (Iozzo and Schaefer, 2015).

Les protéoglycans extracellulaires représentent la classe de protéoglycans la plus conséquente puisqu'elle compte 25 gènes distincts (Theocharis et al., 2016), dont les hyalectans (protéoglycans se liant à l'acide hyaluronique et aux lectines). Parmi les protéoglycans extracellulaires figurent l'aggrécan, le versican, le neurocan et le brevican qui sont des composants structurels du cartilage, des vaisseaux sanguins et du système nerveux central. Dix-huit SLRP (Small Leucine-Rich Proteoglycans), exprimés de manière quasi-ubiquitaire dans les MEC, présentent des fonctions multiples et variées. Parmi ceux-ci figurent la décorine, le biglycan et le lumican. Les SLRP sont impliqués dans l'assemblage des fibrilles de collagènes (Kalamajski and Oldberg, 2010) car ils contiennent une région capable d'interagir avec les collagènes fibrillaires. A titre d'exemple, il a été montré que la décorine se lie de manière non covalente à la surface des fibrilles de collagènes et que ses chaînes latérales contribuent au contrôle de la formation et de l'alignement des fibrilles de collagène (Theocharis et al., 2016). Enfin, trois testicans aussi appelés protéines SPOCK complètent la classe des protéoglycans extracellulaires (Iozzo and Schaefer, 2015).

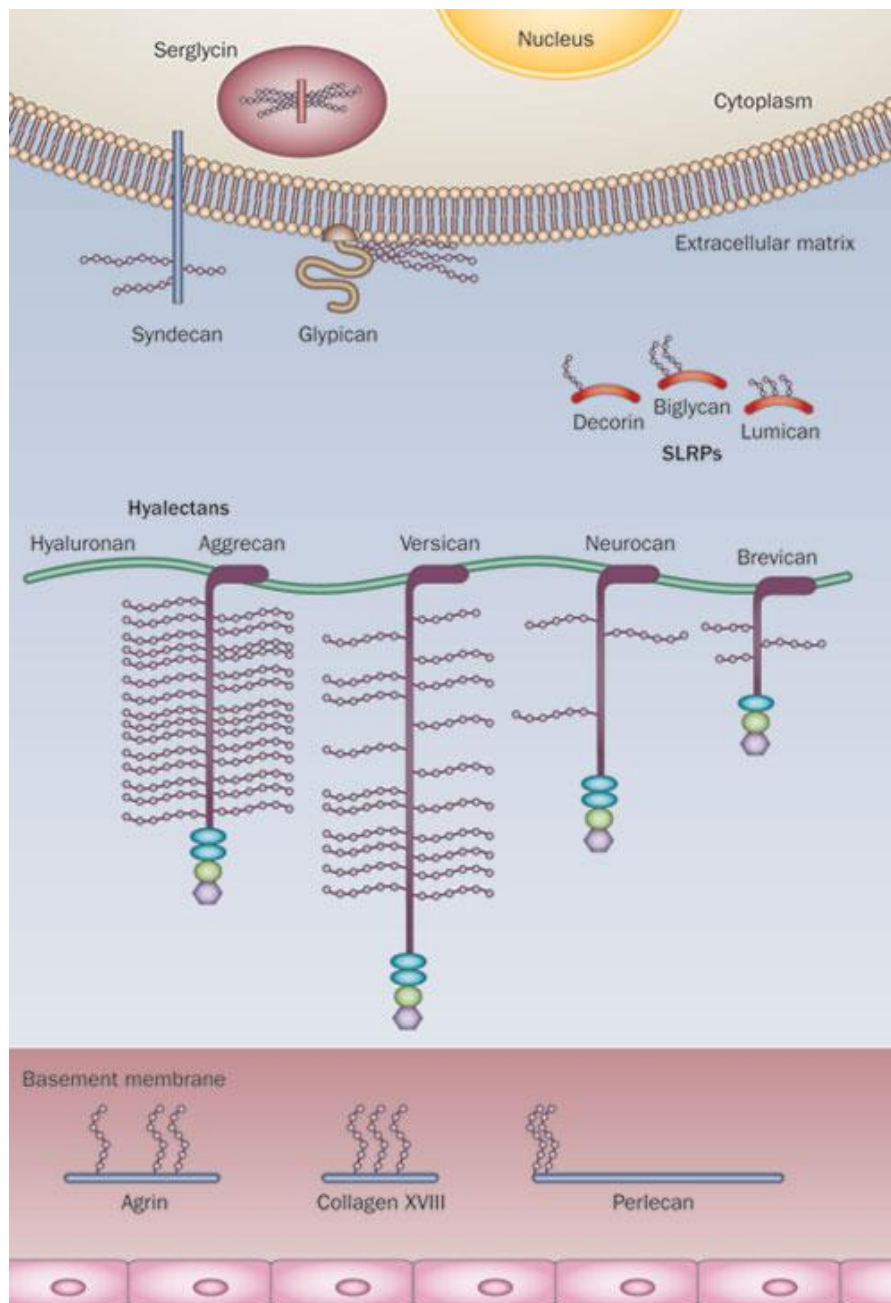


Figure 13: Classes de protéoglycans basées sur leur localisation.

Le seul protéoglycan intracellulaire connu à ce jour est la serglycine. Les protéoglycans extracellulaires incluent les hyalactans (aggrecan, versican, neurocan et brevican) qui s'associent avec l'acide hyaluronique dans la MEC, les SLRP (Small Leucin Rich Proteoglycan) (décorine, biglycan, lumican,...) et les membres de la famille SPOCK (non représentés). Les protéoglycans des membranes basales incluent, par exemple, le perlécan, l'agrin et le collagène XVIII. Enfin, les protéoglycans associés aux cellules comprennent les syndécans qui sont transmembranaires et les glypicans qui sont ancrés à la membrane plasmique via une ancre GPI (Edwards, 2012).

1.1.4. Cellules

Les tissus conjonctifs peuvent comporter différents types cellulaires issus de différentes origines embryonnaires, bien que généralement d'origine mésodermique. Ces cellules, qui sont résidentes ou circulantes, peuvent remplir diverses fonctions comme la sécrétion des composants de la MEC ou son remodelage. Elles peuvent aussi être impliquées dans la réponse nerveuse, inflammatoire ou immunitaire.

Les cellules circulantes voyagent entre les tissus conjonctifs et les vaisseaux sanguins afin de déclencher notamment les réponses immunitaire ou inflammatoire en cas de besoin. Ces cellules comptent notamment les lymphocytes, les neutrophiles, les éosinophiles,...

Les cellules résidentes passent quant à elles toute la durée de leur vie au sein des tissus conjonctifs. Les principales cellules résidentes sont :

- Les fibroblastes (et myofibroblastes qui sont des fibroblastes activés) sont des cellules mésenchymateuses non épithéliales et non immunes, noyées dans la MEC interstitielle (ou occasionnellement localisées en périphérie des capillaires) mais qui ne sont pas associées à une membrane basale (Kalluri, 2016). D'ordinaire quiescents, ils sont activés par diverses conditions (réparation tissulaire, fibrose, progression tumorale,... par exemples) et développent alors un phénotype sécrétoire. De ce fait, ils maintiennent (ou tentent de restaurer) l'homéostasie des tissus conjonctifs en synthétisant les composants structuraux des MEC mais également des cytokines, des enzymes de dégradation contribuant au renouvellement de ces matrices, ...
- Les cellules endothéliales sont impliquées dans la formation des vaisseaux sanguins et lymphatiques.
- Les adipocytes permettent le dépôt et la centralisation des graisses qui sont utilisées comme réserve énergétique et contribuent à l'isolation thermique.
- Les ostéoblastes et chondroblastes sont spécifiques des tissus osseux et cartilagineux, respectivement, et assurent leur formation via la sécrétion des éléments de leur MEC.
- Les mastocytes stimulent l'inflammation et la réponse aux allergènes via le relargage d'héparine et d'histamine. De plus, ils contribuent à la dégradation et au renouvellement de la MEC en activant des métalloprotéases (Krystel-Whittemore et al., 2015).
- Les macrophages sont des cellules dérivées des monocytes sanguins et sont impliqués dans l'élimination des cellules endommagées mais aussi de tout matériel étranger au corps.
- Les dendrites et les axones des cellules neuronales ainsi que les cellules de Schwann constituent quant à eux les éléments nerveux retrouvés dans les tissus conjonctifs et sont chargés de transmettre l'information.

1.1.5. Interactions cellules-MEC

Les mécanismes d'adhésion cellulaire permettent aux cellules de s'attacher entre-elles ou à la MEC, contribuant ainsi à l'organisation cohérente en différents tissus et organes (Geiger and Yamada, 2011). L'ancrage des cellules à leur environnement est également un facteur déterminant dans diverses voies de signalisation impliquées dans la régulation de la plupart des propriétés et fonctions cellulaires (prolifération, différenciation, migration, survie cellulaires, synthèse de macromolécules,...). La formation des adhésions cellulaires et leurs régulations sont en effet cruciales au cours de l'embryogenèse mais aussi pour les fonctions immunes, la réparation tissulaire,... Elles

sont par ailleurs impliquées dans des processus pathologiques tels que la progression tumorale et la formation de métastases. Ces interactions ne permettent pas uniquement l'organisation des cellules en tissus fonctionnels mais également la transmission aux cellules adhérentes des informations concernant leur environnement via la liaison de molécules diffusibles (facteurs de croissance, cytokines,...) à certains récepteurs cellulaires, informations issues d'autres cellules adjacentes (interactions cellule-cellule) ou provenant de la MEC (interaction cellule-ECM). Différents types d'adhésions cellulaires ont été identifiés, dont les adhésions focales (localisées aux extrémités des fibres d'actine), les adhésions fibrillaires (formées le long de fibrilles matricielles comme les fibrilles de FN), les podosomes (des adhésions circulaires formées autour d'un faisceau d'actine et l'ancrant à la membrane plasmique),... (Geiger and Yamada, 2011). La composition et la morphologie des adhésions peuvent évoluer de manière dynamique et varient selon le type cellulaire, la nature et la rigidité de la MEC, et les intégrines présentes. En réponse aux informations issues de leur environnement, les cellules peuvent remodeler la MEC en exprimant et sécrétant certains éléments structuraux ou des enzymes de dégradation. Les adhésions cellulaires permettent donc un dialogue réciproque et bidirectionnel entre les cellules et leur environnement.

Bon nombre de ces adhésions sont médiées par les intégrines qui jouent un rôle central dans leur formation, maturation et leur fonction étant donné que ces protéines forment la famille principale de récepteurs permettant l'attachement entre les cellules et leur environnement.

Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β associées de manière non-covalente. Chez les vertébrés, 18 sous-unités α et 8 β ont été recensées, et forment 24 intégrines différentes aux distributions tissulaires variables (Campbell and Humphries, 2011). Un ligand peut souvent se lier à plusieurs intégrines différentes et une intégrine spécifique peut généralement lier plusieurs ligands, mais avec une spécificité et une affinité définies par les sous-unités qui la compose. Les ligands matriciels principaux comprennent notamment des collagènes, des laminines, la fibronectine, la vitronectine et la fibrine. Chaque sous-unité des intégrines présente un large domaine extracellulaire, une séquence transmembranaire et un domaine intracellulaire de taille plus réduite. La liaison du domaine extracellulaire à son ligand est médiée par des séquences spécifiques telles que le triplet RGD dans la fibronectine ou encore la séquence GFOGER dans le collagène I (où O représente une hydroxyproline) (Campbell and Humphries, 2011). La signalisation initiée par l'interaction intégrine-ligand est alors transmise par le domaine intracellulaire vers le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de complexes protéiques structuraux ou d'effecteurs, tels que des kinases, capables d'initier une réponse cellulaire. Inversement, l'interaction de l'intégrine avec son ligand, la formation de l'adhésion et la signalisation en aval permettent aux cellules non seulement d'identifier et de reconnaître la composition de la MEC environnante, mais également de percevoir ses propriétés mécaniques et d'y réagir de manière dynamique (Chiquet et al., 2003; Deroanne et al., 2001; Lambert et al., 2001a; Lambert et al., 2001b).

Ces voies de régulation ne sont pas exclusivement dépendantes des intégrines mais sont interconnectées avec des voies dépendant d'autres récepteurs cellulaires, comme les récepteurs aux facteurs de croissance. (Carragher and Frame, 2004; Comoglio et al., 2003; Manso et al., 2006; Serini et al., 2006).

Les signaux chimiques et mécaniques de la MEC constituent donc des régulateurs importants de la plupart des processus cellulaires (prolifération, migration, survie, différenciation, synthèse protéique,...) qui permettent aux cellules de s'adapter à leur environnement et, éventuellement, de le remodeler.

2. Enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes qui hydrolysent et clivent une liaison établie entre deux acides aminés d'une chaîne peptidique. Ce clivage est réalisé avec une spécificité plus ou moins grande dépendant des acides aminés proches du site de clivage mais aussi de la structure 3D du substrat. Présentant une grande diversité structurale, ces enzymes protéolytiques sont impliquées dans de très nombreuses fonctions s'étendant de la dégradation de la nourriture en nutriments, jusqu'à des processus finement régulés comme la cascade de coagulation sanguine, la maturation et le recyclage protéiques en passant par le remodelage tissulaire. Par le clivage spécifique de certains substrats, elles peuvent également influencer le comportement et la survie cellulaires (Lopez-Otin and Matrisian, 2007). Il existe chez l'humain 5 groupes distincts de protéases qui sont caractérisés par la composition du site catalytique, et selon la présence d'un acide aminé particulier (les protéases à sérine, thréonine, cystéine, ou à acide aspartique/glutamique) ou d'un ion métallique (les métalloprotéases).

Les métalloprotéases auxquelles s'intéresse particulièrement le présent travail font partie de la superfamille des zincines qui sont caractérisées par la présence d'un atome de zinc dans leur site catalytique. Les metzincines, une sous-famille des zincines, sont d'une importance prépondérante pour l'homéostasie des tissus conjonctifs. Elles partagent une structure similaire caractérisée par une séquence commune de liaison au zinc HExxHxxGxxH dans leur site catalytique (Gomis-Ruth, 2009; Jones and Riley, 2005) et par la présence d'une méthionine cruciale pour la conformation tridimensionnelle du domaine catalytique. Les metzincines peuvent elles-mêmes être divisées en sous-familles (Gomis-Ruth, 2009):

- les astacines, qui participent à divers processus biologiques tels que la digestion, le développement, la différenciation et le remodelage tissulaire.
- les serralysines, qui sont des facteurs de virulence sécrétés par des bactéries qui causent notamment la méningite, l'endocardite, la peste, la pneumonie, certaines dermatites ou d'autres maladies des tissus mous.
- les snapalysines, des metzincines bactériennes capables d'hydrolyser le lait.
- Les pappalysines, des protéines plasmatiques associées à la grossesse.
- les leishmanolysines, des protéases de surface cellulaire présentes chez la plupart des protozoaires des genres trypanosome, plasmodium et sarcosytidié.
- les métalloprotéases matricielles (MMP), qui constituent la famille de métalloprotéases la plus étudiée et qui sera détaillée ci-après.
- les adamalysines, d'une importance particulière dans ce travail, seront également décrites plus en détails par la suite.

2.1. Les métalloprotéases matricielles (MMP)

Les MMP, également appelées matrixines, sont des endopeptidases sécrétées ou liées à la membrane plasmique. Elles partagent de nombreuses similarités en termes de structure, de régulation et de fonction. Elles représentent les principales enzymes responsables du clivage et de la

dégradation des composants de la MEC (Bonnans et al., 2014; Peng et al., 2012). Outre cet aspect primordial, il est maintenant clairement établi qu'elles sont essentielles dans divers processus biologiques tels que le développement embryonnaire ou la morphogenèse, notamment par l'activation de multiples cytokines et par la libération de matrikines (des peptides actifs générés par clivage de composants de la MEC). Elles sont également impliquées dans des processus pathologiques, dont la fibrose, l'arthrite ou le cancer. La première MMP à avoir été découverte (il y a plus de 50 ans) a été identifiée au cours d'une étude recherchant l'enzyme capable d'initier la dégradation du collagène (activité collagénase) lors de la résorption de la queue des têtards au cours de leur métamorphose (Gross and Lapiere, 1962). La famille des matrixines mammaliennes se compose aujourd'hui de 24 membres, dont 23 sont présents chez l'humain. Sur base de leur structure, les MMP sont divisées en 4 sous-groupes principaux (dont certains sont encore subdivisés) : les gélatinases, les MMP typiques (comprenant notamment les collagénases et stromélysines), les matrilysines et les MMP activables par la furine comprenant notamment les MMP transmembranaires (Membrane Type MMP, ou MT-MMP) et les MMP ancrées à la membrane (Brkic et al., 2015) (**Figure 14**). Du point de vue structurel, le peptide signal, un propeptide (ou prodomaine) et le domaine catalytiques sont présents dans toutes les MMP. Certains domaines, tel le site de liaison à la fibronectine ou le domaine hémopexine sont également présents dans de nombreuses MMP alors d'autres ont une distribution plus restreinte.

L'activité des MMP est régulée à plusieurs niveaux, probablement parce qu'une activation constitutive et insuffisamment contrôlée pourrait s'avérer délétère. Ces régulations s'opèrent au niveau de l'expression génique mais également par l'intermédiaire du prodomaine qui maintient les MMP sous une forme inactive (zymogène). En effet, un résidu cystéine, conservé au sein du propeptide, a la capacité de lier l'atome de zinc présent dans le domaine catalytique, ce qui rend l'enzyme inactive. Le clivage du prodomaine (ou la modification de cette cystéine) est donc nécessaire pour permettre l'activation de l'enzyme, selon un mécanisme connu sous le nom de « cystein switch » (Peng et al., 2012). Un autre niveau de régulation dépend d'interactions s'établissant entre les MMP et des inhibiteurs spécifiques tels que les TIMP (Tissue Inhibitor MetalloProteinase) qui s'y lient de manière non covalente (Brkic et al., 2015; Peng et al., 2012). L'équilibre dynamique entre MMP actives et inactives liées aux TIMP est ainsi crucial pour la régulation de la dégradation et du remodelage de la MEC, mais aussi pour de nombreux processus cellulaires comprenant la prolifération, la migration, l'adhésion et l'apoptose.

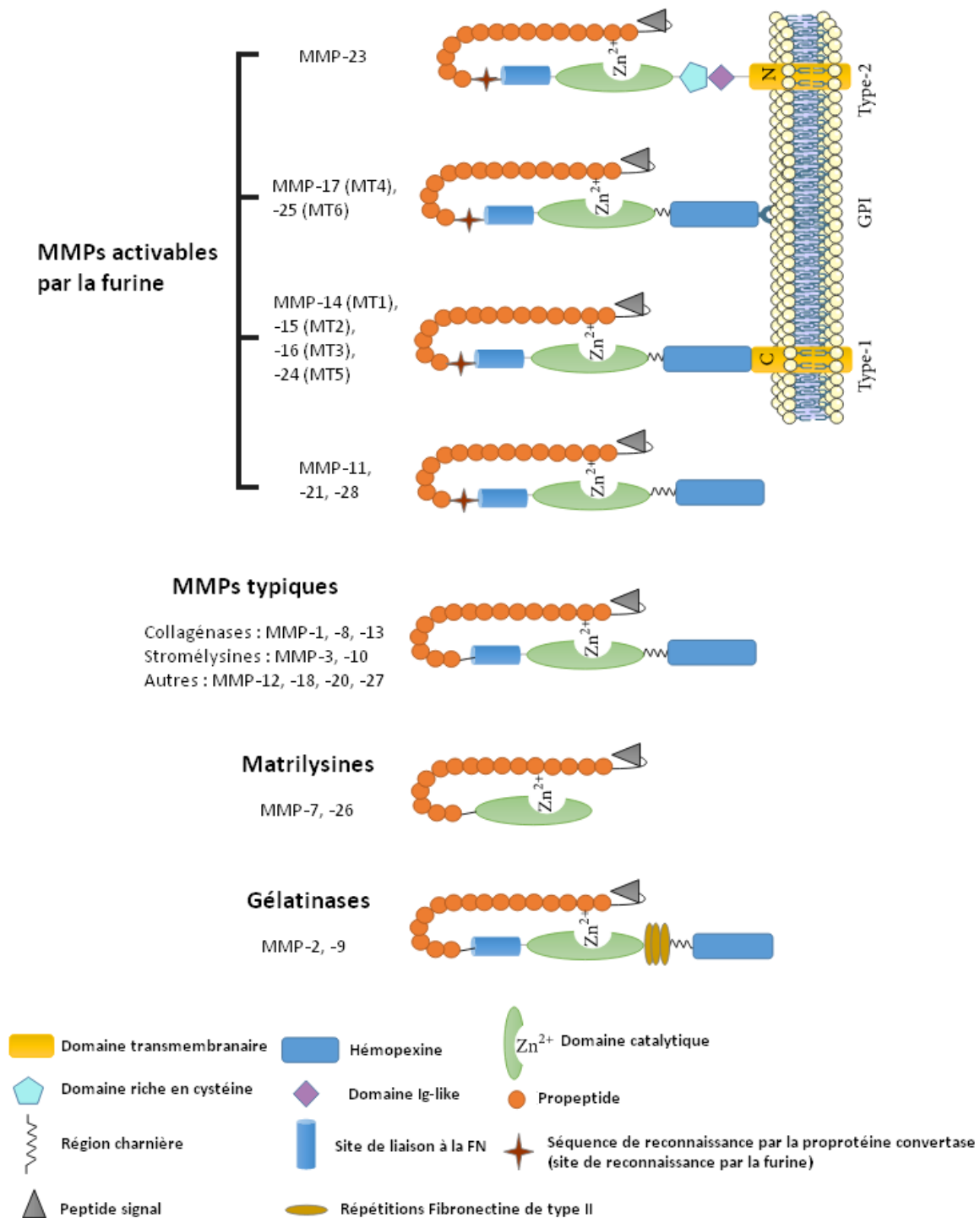


Figure 14: Classification des MMP basée sur l'organisation de leurs domaines.

Les MMP sont constituées de 4 sous-groupes principaux : les gélatinases, les matrilysines, les MMP typiques et les MMP activables par la furine. La structure prototypique des MMP consiste en un peptide signal, un propeptide, un domaine catalytique. Hormis les MMP7, 23 et 26, toutes les MMP contiennent également un site de liaison à la FN, un domaine charnière et un domaine de type hémopexine. Les gélatinases se caractérisent par la présence de motifs répétés de type fibronectine type II alors que d'autres MMP partagent la particularité d'être activables par un clivage opéré par des proprotéines convertases telle la furine. Modifié d'après (Brkic et al., 2015).

2.2. Les adamalysines

La famille des adamalysines comprend trois sous-groupes de protéases (Giebeler and Zigrino, 2016; Gomis-Ruth, 2009; Takeda, 2016):

- les métalloprotéases issues du venin de serpent, responsables des hémorragies et de la nécrose faisant suite à une morsure.
- les ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinases)
- les ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin repeat)

2.2.1. Les ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinases)

A ce jour, 40 gènes codant pour des ADAM ont été identifiés, dont une vingtaine chez l'humain (Takeda, 2016; van Goor et al., 2009). Ces protéases présentent une structure conservée comprenant un prodomaine, un domaine métalloprotéase, un domaine riche en cystéine, un domaine de répétitions EGF-like (Epidermal Growth Factor), un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (**Figure 15**) (Giebeler and Zigrino, 2016). Un domaine disintegrin-like est également présent, en référence à la séquence xCD, similaire à la séquence RGD des protéines capables d'adhérer aux intégrines (excepté pour l'ADAM-15 qui possède bien la séquence RGD). Malgré leur classement au sein des metzincines, il faut noter que plusieurs ADAM ne contiennent pas la séquence consensus HExGHxxGxxHD responsable de la liaison du zinc et ne possèdent donc probablement aucune activité protéolytique (Giebeler and Zigrino, 2016; Takeda, 2016; van der Vorst et al., 2012). Des variations d'épissage produisent des protéines aux localisations différentes, tantôt transmembranaire tantôt extracellulaire, et modifieraient leur fonction.

Les ADAM sont impliquées dans de multiples processus tels que la migration, la fécondation de l'œuf par les spermatozoïdes, certaines voies de signalisation et les interactions entre cellules ou avec la MEC via leur séquence xCD (ou RGD) et leur domaine riche en cystéine, capables d'interagir avec les intégrines et certains protéoglycans (Giebeler and Zigrino, 2016; Takeda, 2016; van Goor et al., 2009). Elles ont aussi été mises en cause dans divers processus physio-pathologiques comprenant l'inflammation, la fibrose, la dégénérescence neuronale et le cancer (van Goor et al., 2009). Outre le clivage de composants matriciels, cette activité protéolytique s'illustre aussi par le clivage de domaines extracellulaires de protéines transmembranaires et de surface, dont des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion, des cytokines et leurs récepteurs. Comme pour les MMP, l'activité des ADAM est réprimée par la présence du prodomaine (Giebeler and Zigrino, 2016) et inhibée par des membres de la famille des TIMP. La fonction des ADAM catalytiquement inactives reste quant à elle largement inconnue, avec des rôles possibles dans le développement, l'adhésion et les interactions cellulaires, et la régulation de signalisations cellulaires (Takeda, 2016; van Goor et al., 2009).

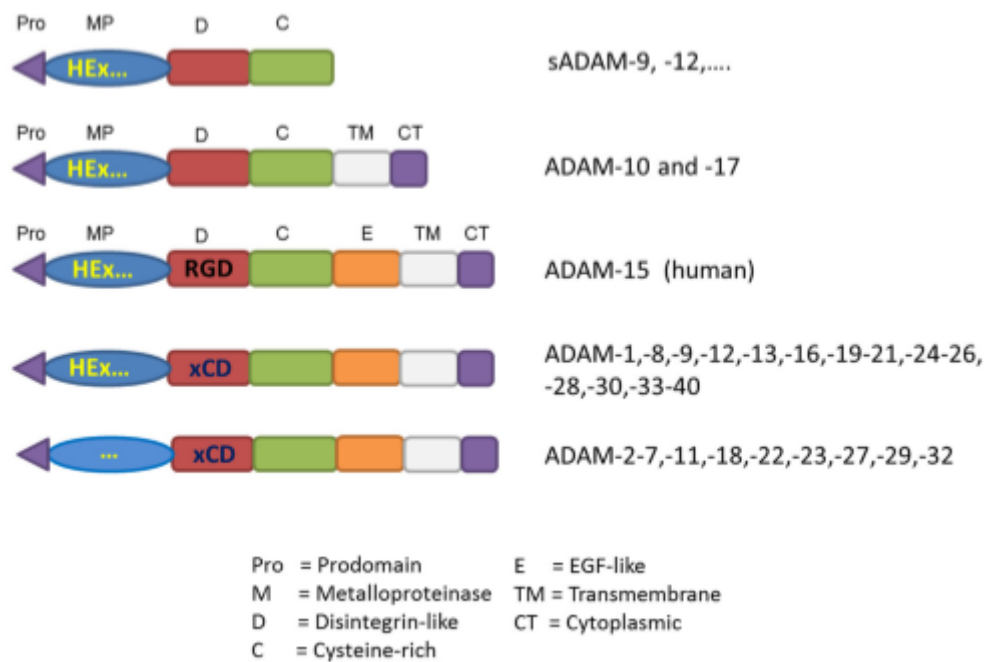


Figure 15: Structure des ADAM

La présence d'un domaine métalloprotéase possédant la séquence consensus HExGHxxGxxHD (HEX ...) permet une activité protéolytique, alors que les enzymes qui en sont dépourvues (« ... ») sont probablement catalytiquement inactives. La plupart des ADAM présentent un motif de liaison xCD dans leur domaine disintegrin-like (un motif RGD dans le cas de l'ADAM-15). sADAM : ADAM soluble. Tiré de (Giebelier and Zigrino, 2016).

2.2.2. Les ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 repeat)

La « superfamille » des ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 repeat) fut découverte en 1997 lorsque ses deux premiers membres, les ADAMTS1 et ADAMTS2, furent respectivement identifiés par une équipe japonaise (Kuno et al., 1997) et par le LBTC, notre laboratoire (Colige et al., 1997), de manière quasi simultanée. Depuis, deux homologues de l'ADAMTS2, les ADAMTS3 et 14 furent identifiées et caractérisées au sein du LBTC (Bekhouche et al., 2016; Colige et al., 2005; Colige et al., 2002; Janssen et al., 2016).

Aujourd'hui, les ADAMTS comptent 19 membres chez les mammifères (**Figure 16**), nommées ADAMTS1 à 20, les ADAMTS5 et 11 faisant référence à la même protéine (Kelwick et al., 2015a). Ces enzymes sont, au même titre que les MMP et les ADAM, des membres de la superfamille des metzincines et sont donc caractérisées par la présence d'un résidu méthionine conservé proche du site de liaison d'un atome de zinc dans le domaine catalytique. Il s'agit d'enzymes sécrétées qui se retrouvent chez tous les animaux multicellulaires mais qui n'ont pas encore été découvertes chez les plantes ou les organismes unicellulaires.

La superfamille des ADAMTS comprend également 7 protéines ADAMTS-like (ADAMTSL). Celles-ci résultent de l'expression de gènes spécifiques et non de l'épissage alternatif de gènes codants pour certaines ADAMTS. Elles ne présentent aucune activité catalytique car elles sont dépourvues des domaines aminoterminaux comprenant le domaine catalytique présent dans les ADAMTS. Elles

contiennent en revanche les mêmes domaines auxiliaires C-terminaux, notamment les domaines TSR1 (Apte, 2009; Le Goff and Cormier-Daire, 2011).

2.2.2.1. Structure

Au-delà du peptide signal qui leur est commun, les ADAMTS sont organisées en deux régions principales. L'organisation de la « moitié » aminotermine, constituée d'un prodomaine, d'un domaine catalytique caractéristique des métalloprotéases et d'un domaine disintégrine-like, est identique dans toutes les ADAMTS. En revanche, leur partie C-terminale, appelée également « domaine auxiliaire » recèle plus de variations en termes de domaines de structures et de séquence, ce qui explique l'hypothèse selon laquelle cette région serait largement impliquée dans les mécanismes régulant la spécificité de substrat et le positionnement correct du domaine catalytique sur sa séquence cible (**Figure 16**) (Apte, 2009; Kelwick et al., 2015a; Stanton et al., 2011). Cette variabilité structurelle, bien que conservant certaines similitudes, a permis la distinction de 8 groupes d'ADAMTS aux fonctions spécialisées et qui représentent des sous-familles issue d'une évolution différente de leurs membres (**Figure 16**) (Kelwick et al., 2015a; Stanton et al., 2011).

La spécificité au sein d'une sous-famille est notamment illustrée par les ADAMTS2, 3 et 14 qui présentent une organisation identique et unique de leur domaine auxiliaire qui explique probablement pourquoi elles sont les seules à posséder une activité aminoprotéase. A l'inverse, de nombreuses ADAMTS clivent des protéoglycans alors qu'elles présentent toutefois une grande diversité au niveau des domaines auxiliaires, ce qui démontre que les connaissances actuelles de leur mode d'actions demeurent largement insuffisantes (**Figure 16**).

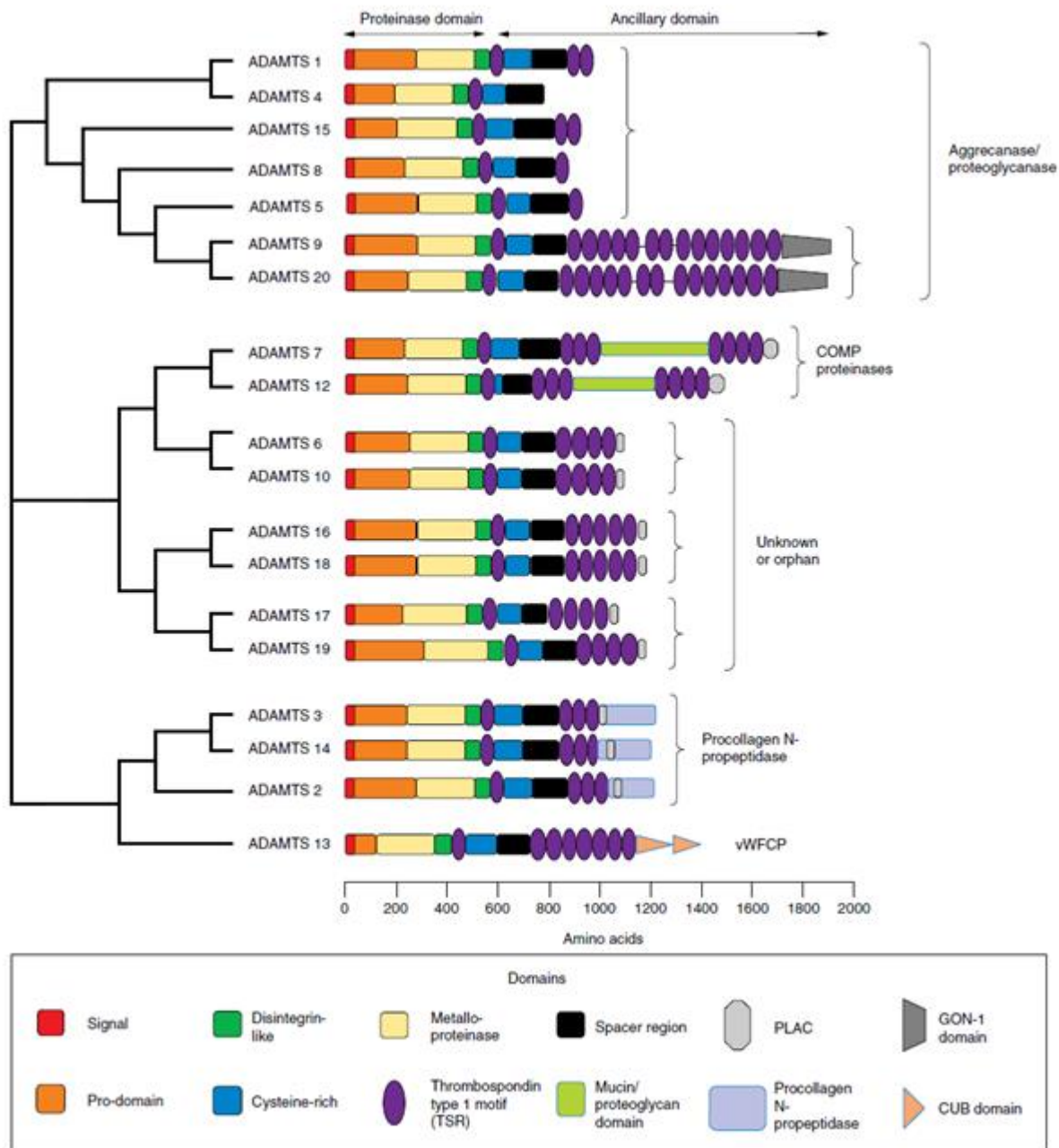


Figure 16 : Organisation phylogénique et structure de la famille des ADAMTS

En plus d'un peptide signal commun, toutes les ADAMTS présentent une organisation identique de leur domaine protéase N-terminal qui comprend le prodomaine, le domaine catalytique caractéristique des métalloprotéases et un domaine disintégrine-like. En revanche, les ADAMTS peuvent être différenciées et caractérisées sur base de leurs activités et substrats spécifiques (s'ils sont connus) qui dépendent notamment de l'organisation variable de leur domaine auxiliaire C-terminal. Ce domaine C-terminal comprend au minimum une répétition de type thrombospondine de type 1 (TSR) (excepté pour l'ADAMTS4), un domaine riche en cystéines et un spacer, éventuellement agrémentés d'autres domaines. Les protéoglycanases (ou aggrécanases) constituent un sous-groupe des ADAMTS capable de cliver des protéoglycans, notamment l'aggrécan, malgré une composition variable de leur domaine auxiliaire. L'ADAMTS13 est à ce jour la seule ADAMTS connue pour cliver le facteur de von Willebrand. Les ADAMTS2, 3 et 14 partagent une organisation identique avec une forte homologie de séquence. Elles sont caractérisées par la présence de 3 TSR dans leur région C-terminale, d'un domaine procollagène N-peptidase et d'un domaine PLAC (Protease and Lacunin). Ce sont les seules ADAMTS connues pour avoir une activité aminoprocollagène peptidase. Un autre groupe d'ADAMTS caractérisé par la présence d'un domaine mucine comprend les ADAMTS7 et 12. Ce domaine particulier

leur confère le statut de protéoglycan. Selon des données toujours soumises à discussion, ces deux ADAMTS seraient capables de cliver la protéine COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein). 6 ADAMTS réparties en 3 groupes sur base de leur structure doivent encore être caractérisées afin de définir leurs familles de substrats potentiels. Représentation des enzymes faite à l'échelle. PLAC: Protease and Lacunin; CUB: Complément C1r/C1s, Uegf et BMP1; vWFCP: von Willebrand factor-cleaving protease; GON-1: domaine similaire à celui retrouvé dans la protéine GON-1 chez *C. elegans*. Adapté de (Kelwick et al., 2015a; Stanton et al., 2011).

2.2.2.1.1. Domaine protéase N-terminal

Faisant suite au peptide signal, on considère que le domaine protéase N-terminal est constitué du propeptide, du domaine catalytique métalloprotéase et d'un domaine disintégrine-like (**Figure 16**).

- Le propeptide ou prodomaine, d'une longueur variable, maintient la plupart des ADAMTS sous forme de zymogène inactif. Leur activation résulte du clivage de ce propeptide par des enzymes de la famille des proprotéine convertases comprenant notamment la furine (Malfait et al., 2008; Stanton et al., 2011; Wang et al., 2004). Ce clivage intervient sur une séquence consensus riche en acides aminés basiques qui marque ainsi la limite entre le prodomaine et le domaine catalytique. Même si aucune preuve directe de « cysteine switch » n'a été apportée à ce jour, le clivage de ce domaine est requis pour l'activation des ADAMTS (à l'exception de l'ADAMTS13).
- Le domaine catalytique métalloprotéase de toutes les ADAMTS présente une forte homologie et contient la séquence consensus HExxHxxGxxH commune aux metzincines. Contrairement aux ADAM, cette séquence est intacte dans toutes les ADAMTS qui ont donc toutes potentiellement une activité catalytique (Barrett et al., 2012). Les trois résidus histidine (H) de cette séquence permettent de coordonner l'atome de zinc essentiel à la bonne conformation du site actif, alors que le résidu G autorise le repliement de la poche catalytique et que le résidu E est responsable de l'activité catalytique (Jones and Riley, 2005). Une méthionine conservée est présente en aval du site actif, ce qui permet une boucle « met-turn » similaire à celle décrite pour les MMP et cruciale pour la conformation correcte du site catalytique (Barrett et al., 2012).
- Le domaine disintégrine-like qui fait suite au domaine métalloprotéase est homologue au domaine disintégrine des ADAM mais présente une signature différente en cystéines. Il n'y a cependant à ce jour aucune preuve de l'interaction directe des ADAMTS avec des intégrines par l'intermédiaire de ce domaine, alors que cela a été référencé pour certaines ADAM (Przemyslaw et al., 2013). Le domaine disintégrine-like semblerait plutôt faire fonctionnellement partie du domaine protéase et serait impliqué dans la fonction catalytique (Gerhardt et al., 2007).

2.2.2.1.2. Domaine auxiliaire C-terminal

Le nombre et la nature des domaines qui composent le domaine auxiliaire des ADAMTS sont variables, ce qui a permis leur classification en sous-familles (**Figure 16**). On retrouve notamment, de sa région la plus N-terminale vers son extrémité C-terminale :

- Un ou plusieurs motif(s) TSR (Thrombospondin type 1 repeat), ce qui différencie les ADAMTS des autres métalloprotéases. Les domaines TSR sont répartis sur deux régions. Toutes les ADAMTS comprennent un unique domaine TSR (dit TSR central) dans la partie N-terminale du domaine auxiliaire. En revanche, le nombre de TSR varie dans la région C-terminale, allant de 0 pour l'ADAMTS4 à 13 pour les ADAMTS9 et 20 (**Figure 16**). Ces TSR sont organisés de manière ininterrompue, ou sont séparés en blocs par des séquences peptidiques non structurées (ADAMTS9 et 20), voire même par un domaine mucine-like (ADAMTS7 et 12). Contrairement au

TSR central, les TSR C-terminaux présentent une forte variabilité de séquence même s'ils conservent leur signature en Trp et Cys (Barrett et al., 2012). Certaines TSR contiennent des sites de liaison aux protéoglycans ou des sites d'attachement cellulaire (via le CD36 par exemple) (Tortorella et al., 2000a). Ceci suggère des interactions préférentielles avec les GAG ou une localisation en périphérie cellulaire pour les ADAMTS qui les possèdent, participant ainsi à la détermination de substrats et de fonctions spécifiques. Ce type de domaine est présent dans différentes familles de protéines (Tucker, 2004) et permet des interactions moléculaires ainsi que certains mécanismes tels que la liaison à l'héparine, l'activation de la forme latente du TGF- β , l'adhésion cellulaire et l'inhibition de l'angiogenèse (Sipes et al., 1993).

- Un domaine riche en cystéines suit le TSR central et présente une forte homologie au sein des ADAMTS. Dans les ADAMTS2 et 13, ce domaine comprend une séquence RGD qui permettrait à ces enzymes d'interagir avec des intégrines (Colige et al., 1997).
- Un « spacer » de longueur variable suit le domaine riche en cystéines. Ses fonctions, à l'instar de celles du domaine riche en cystéines, restent relativement peu définies mais il pourrait jouer un rôle dans l'interaction entre l'ADAMTS et son substrat (Colige et al., 2004; Fushimi et al., 2008; Majerus et al., 2005) puisque l'activité enzymatique diminue drastiquement en son absence, au même titre que ce qui a été montré pour le domaine riche en cystéines (Ai et al., 2005; De Maeyer et al., 2010; Soejima et al., 2003).
- Différents domaines additionnels sont également présents en fonction du groupe d'ADAMTS concerné. Leur présence ou absence permet notamment la distinction entre les différents groupes d'ADAMTS :
 - o GON-1 est un domaine présent dans les ADAMTS9 et 20 (sauf dans le variant principal d'épissage de l'ADAMTS20). Son nom est tiré de la protéine GON-1, une ADAMTS orthologue chez *C. elegans* où elle est nécessaire au développement des gonades. Elle semblerait impliquée dans la dégradation des membranes basales et dans certaines étapes de la morphogenèse (Blelloch and Kimble, 1999; Somerville et al., 2003).
 - o Le domaine PLAC (Protease and Lacunin) est présent dans la partie C-terminale des ADAMTS 2, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 17, 18, et 19, ainsi que dans certaines ADAMTSL et proprotéine convertases. Ce domaine fut initialement découvert dans l'extrémité C-terminale de la protéine matricielle lacunine (Nardi et al., 1999). Il est notamment caractérisé par une séquence consensus comprenant 6 cystéines. Sa fonction et sa structure tridimensionnelle restent inconnues à ce jour (Barrett et al., 2012).
 - o Le domaine PNP (Procollagène N-Propeptidase) est présent dans les ADAMTS2, 3 et 14 à leur extrémité C-terminale et englobe leur domaine PLAC (Colige et al., 2005).
 - o L'ADAMTS13 est la seule à comporter deux domaines CUB (pour Complement C1r/C1s, UEGF, BMP1) (Zheng et al., 2001). Ce type de domaine, relativement fréquent dans certaines familles de protéases, est retrouvé quasi exclusivement dans des protéines extracellulaires (ou associées à la membrane plasmique), dont la majorité sont associées au développement (Bork and Beckmann, 1993). Dans le cas de l'ADAMTS13, ils ne semblent pas être impliqués dans l'activité catalytique car un variant sans domaine CUB présente une activité enzymatique normale (Zheng, 2013). En revanche ils sont nécessaires à la liaison de l'ADAMTS13 au facteur de von Willebrand (Zander et al., 2015).
 - o Un domaine mucine-like (domaine protéoglycan) est également présent entre les domaines TSR4 et 5 chez les ADAMTS7 et 12. Ce domaine permet l'attachement de chaînes chondroïtine sulfate, ce qui confère à ces ADAMTS le statut de protéoglycan (Somerville et al., 2004b).

2.2.2.2. Maturation et régulations de l'activité enzymatique

Tout comme les MMP et les ADAM, les ADAMTS sont exprimées sous forme de zymogène inactif (pour la plupart d'entre elles). Le prodomaine est excisé au cours du processus de sécrétion, notamment par des enzymes de la famille des proprotéines convertases, générant ainsi une forme active de l'enzyme. Certaines pro-enzymes, comme l'ADAMTS9, peuvent néanmoins être résistantes à ce type de maturation intracellulaire et sont activées en surface cellulaire (Koo et al., 2006, 2007).

Bien que le clivage du propeptide résulte généralement en l'activation des ADAMTS, il arrive qu'il induise au contraire une diminution de l'activité de la proprotéine déjà active. Par exemple, le clivage du propeptide de l'ADAMTS13 n'est pas nécessaire pour le clivage du facteur de von Willebrand (Majerus et al., 2003). De même, l'excision du prodomaine de l'ADAMTS9 par la furine réduit son activité protéolytique sur le versican (Koo et al., 2006, 2007).

L'activité des ADAMTS peut aussi être modulée par protéolyse de leur extrémité C-terminale. Une activité catalytique accrue a ainsi été observée lors du clivage de domaines auxiliaires des ADAMTS4 (Kashiwagi et al., 2004), ADAMTS13 (Zheng et al., 2003) et ADAMTS2 (Colige et al., 2005). Il est également possible que des clivages protéolytiques similaires réduisent ou inhibent l'activité d'autres ADAMTS, même si cette hypothèse doit encore être confirmée expérimentalement. Que la protéolyse active ou inhibe les ADAMTS, elle peut être soit autocatalytique (Colige et al., 2005; Flannery et al., 2002) ou résulter de l'activité d'autres enzymes (Gao et al., 2004). A noter que ce type de protéolyse modifie probablement la spécificité des enzymes dans la reconnaissance de leurs substrats et dans la localisation des enzymes ou leurs interactions puisque le domaine auxiliaire est impliqué dans ces processus (Kuno and Matsushima, 1998).

A ce jour, peu d'inhibiteurs endogènes des ADAMTS ont été recensés, à l'image de TIMP3 et de l' α 2-Macroglobuline (Lin and Liu, 2010; Luan et al., 2008; Tortorella et al., 2004; Wang et al., 2006). La papiline, une ADAMTSL, s'est montrée efficace pour inhiber l'ADAMTS2 *in vitro* (Kramerova et al., 2000). De manière analogue, il a été suggéré que les ADAMTSL en général pourraient aussi jouer un rôle inhibiteur / régulateur des ADAMTS en raison de l'homologie structurelle de leurs domaines auxiliaires et de leur capacité à interagir avec des composants matriciels (Apte, 2009; Kelwick et al., 2015a). Récemment, la recherche dans la lutte contre l'ostéoarthrite rhumatoïde s'est intéressée à l'inhibition des aggrecanases ADAMTS4 et 5 par utilisation de molécules naturelles ou synthétiques tels que l'acide hyaluronique, le polysulfate de pentosan de calcium (un composé de synthèse) ou la nobiletine (un composé présent dans l'écorce de certains fruits de la famille des citrus) (Lin and Liu, 2010).

2.2.2.3. Fonctions physio-pathologiques des ADAMTS et ADAMTSL

Bien que certaines fonctions et substrats des ADAMTS aient été identifiés (**Tableau 5**), il est vraisemblable que cette liste va s'allonger considérablement compte tenu de la récente découverte de cette famille d'enzymes et des nouveaux progrès technologiques dans le cadre de la caractérisation des interactions entre protéines et de la recherche de substrats de protéases.

ADAMTS	Substrat(s) identifié(s)
ADAMTS1 (Kuno et al., 1997)	Aggrécan (Rodriguez-Manzaneque et al., 2002), Versican (Sandy et al., 2001), Tissue Factor Pathway Inhibitory 2 (Torres-Collado et al., 2006), Nidogènes 1 et 2 (Canals et al., 2006), TSP1 et 2 (Lee et al., 2006), Syndécan-4 (Rodriguez-Manzaneque et al., 2009)
ADAMTS2 (Colige et al., 1997)	Procollagènes de types I-II-III-V (Colige et al., 2005)
ADAMTS3 (Fernandes et al., 2001)	Procollagènes de types I-II (Fernandes et al., 2001; Le Goff et al., 2006), proVEGF-C (Jeltsch et al., 2014); Janssen et al., 2016)
ADAMTS4 (Tortorella et al., 1999)	Aggrécan (Tortorella et al., 2000b), Brévican (Nakamura et al., 2000), Versican (Sandy et al., 2001), Décorine (Kashiwagi et al., 2004), Biglycan (Melching et al., 2006), Fibromoduline (Kashiwagi et al., 2004), COMP (Dickinson et al., 2003), Transferrine carboxyméthylée (Kashiwagi et al., 2004), α 2-macroglobuline (Tortorella et al., 2004), matriline 3 (Hills et al., 2007)
ADAMTS5 (Abbaszade et al., 1999; Hurskainen et al., 1999)	Aggrécan (Tortorella et al., 2002), Versican (Longpre et al., 2009), Brévican (Held-Feindt et al., 2006), Décorine (Gendron et al., 2007), Biglycan (Melching et al., 2006), Fibromoduline (Gendron et al., 2007), α 2-macroglobuline (Tortorella et al., 2004)
ADAMTS6 (Hurskainen et al., 1999)	Inconnu
ADAMTS7 (Somerville et al., 2004b)	α 2-macroglobuline (Somerville et al., 2004b), Granulin epithelin precursor (Bai et al., 2009a), COMP (Liu et al., 2006a),
ADAMTS8 (Vazquez et al., 1999)	Aggrécan (Collins-Racie et al., 2004)
ADAMTS9 (Somerville et al., 2003)	Aggrécan (Somerville et al., 2003), Versican (Somerville et al., 2003)
ADAMTS10 (Somerville et al., 2004a)	Inconnu
ADAMTS12 (Cal et al., 2001)	COMP (Liu et al., 2006b)
ADAMTS13 (Zheng et al., 2001)	Facteur de von Willebrand (Zheng et al., 2001)
ADAMTS14 (Colige et al., 2002)	Procollagènes de types I-III (Colige et al., 2002)
ADAMTS15 (Cal et al., 2002)	Aggrécan (Kevorkian et al., 2004)
ADAMTS16 (Cal et al., 2002)	Aggrécan (Zeng et al., 2006), α 2-macroglobuline (Gao et al., 2007)
ADAMTS17 (Cal et al., 2002)	Endothelial protein C receptor shedding (Kutz et al., 2011)
ADAMTS18 (Cal et al., 2002)	Aggrécan (Zeng et al., 2006)
ADAMTS19 (Cal et al., 2002)	Inconnu
ADAMTS20 (Somerville et al., 2003)	Versican (Silver et al., 2008)

Tableau 5: Substrats identifiés des ADAMTS

Génotype	Phénotype
<i>Adamts1^{-/-}</i> (Mittaz et al., 2004; Shindo et al., 2000)	- Retard de croissance - Environ 50% de létalité postnatale - Anomalies urologiques et des surrénales - Diminution de la fertilité des femelles
<i>Adamts1^{-/-}/4^{-/-}</i>	- Anomalies urologiques associées à 95% de létalité postnatale
<i>Adamts2^{-/-}</i> (Li et al., 2001)	- Fragilité cutanée - Stérilité masculine
<i>Adamts2^{-/-}/14^{-/-}</i> (Dupont et al., 2018)	- Phénotype de l' <i>Adamts2^{-/-}</i> aggravé par le développement de lésions épidermiques
<i>Adamts3^{-/-}</i> (Janssen et al., 2016)	- Létal au jour embryonnaire 14.5 (description détaillée en Annexe 1 de ce manuscrit)
<i>Adamts4^{-/-}</i> (Glasson et al., 2004)	- Pas de phénotype apparent - Diminution du clivage du versican lors de lésions de la moelle épinière
<i>Adamts5^{-/-}</i> (Dupuis et al., 2011; Glasson et al., 2005; McCulloch et al., 2009)	- Syndactylie à faible pénétrance - Valve cardiaque myxomateuse - Diminution des lésions d'ostéoarthrite après induction d'une instabilité articulaire (modèle d'ostéoarthrite) - Diminution du clivage du versican lors de la myogenèse - Accumulation d'aggrécane et fonction des tendons altérée - Altération du dépôt de collagène dans des modèles de cicatrisation de la peau
<i>Adamts4^{-/-}/5^{-/-}</i> (Majumdar et al., 2007)	- Diminution des lésions d'ostéoarthrite après induction d'une instabilité articulaire (modèle d'ostéoarthrite)
<i>Adamts7^{-/-}</i>	- Réponse altérée en cas de lésions vasculaires
<i>Adamts9^{-/-}</i> (Enomoto et al., 2010)	- Létal au jour embryonnaire 7.5
<i>Adamts9^{+/-}</i> (Kern et al., 2010; Koo et al., 2010)	- Anomalies cardiaque et aortique - Néovascularisation spontanée de la cornée
<i>Adamts9^{+/-}/5^{-/-}</i> (McCulloch et al., 2009)	- Syndactylie à haute pénétrance
<i>Adamts9^{+/-}/20^{-/-}</i> (Enomoto et al., 2010; McCulloch et al., 2009; Silver et al., 2008)	- Taches blanches dans le pelage plus étendues que pour l' <i>Adamts20^{-/-}</i> - Syndactylie à pénétrance complète - Fente labio-palatine
<i>Adamts9^{+/-}/20^{+/-}</i> (Enomoto et al., 2010)	- Fermeture du palais retardée
<i>Adamts12^{-/-}</i> (El Hour et al., 2010)	- Sensibilité élevée à la croissance tumorale et à l'angiogenèse - Augmentation de l'inflammation et retard de guérison après induction de colite, de sepsis endotoxique et de pancréatite - Augmentation de l'inflammation bronchique et hypersensibilité allergique dans des modèles de pathologies des voies respiratoires
<i>Adamts13^{-/-}</i> (Motto et al., 2005)	- Thrombocytopénie chez les souches de souris avec un taux élevé de vWF plasmatique - Syndrome ressemblant à un purpura thrombocytopénique thrombotique - Infarctus plus large après une occlusion partielle de l'artère coronaire gauche
<i>Adamts14^{-/-}</i> (Dupont et al., 2018)	- Pas de phénotype évident
<i>Adamts16^{-/-}</i> (rat) (Kelwick et al., 2015a)	- Pression systolique réduite - Infertilité et cryptorchidie des mâles
<i>Adamts18^{-/-}</i>	- Cataracte - Masse graisseuse corporelle réduite
<i>Adamts20^{-/-}</i> (Enomoto et al., 2010;)	- Taches blanches dans le pelage - Syndactylie à faible pénétrance

McCulloch et al., 2009; Silver et al., 2008)	- Retard de fermeture du palais
<i>Adamts5^{-/-}/20^{-/-}</i> (McCulloch et al., 2009)	- Syndactylie à pénétrance complète

Tableau 6 : Modèles de souris déficientes en ADAMTS et phénotypes associés (Dubail and Apte, 2015; Kelwick et al., 2015a)

Sur base des modèles murins existants (**Tableau 6**) et de l'étude de certaines pathologies héréditaires chez l'humain (**Tableau 7**), il est clair que les ADAMTS sont impliquées dans une multitude de processus physiopathologiques qui comprennent l'homéostasie des tissus conjonctifs, la coagulation, l'arthrite, l'angiogenèse ou encore la migration cellulaire. L'établissement d'un inventaire de leurs substrats permettrait donc d'appréhender plus aisément leurs diverses fonctions.

Enzyme	Fonction	Maladie humaine	Principales manifestations cliniques	Gène associé à un phénotype similaire
ADAMTS2	Procollagène N propeptidase	Syndrome d'Ehlers-Danlos de type dermatosparactique (VII C)	Peau fragile, hernie ombilicale, ecchymoses fréquentes	
ADAMTS10	Inconnue	Syndrome de Weill-Marchesani (WMS)	Stature et membres courts, peau épaisse, ankylose articulaire, dislocation du cristallin	FBN1
ADAMTS17	Inconnue	WMS-like	Petite taille, dislocation du cristallin	FBN1
ADAMTS13	Clivage du facteur de von Willebrand	Purpura Thrombocytopénique thrombotique	Thrombose des capillaires et artérioles (coeur, cerveau, rein)	
ADAMTSL2	Inconnue	Dysplasie géleophysique	Stature et membres courts, peau épaisse, ankylose articulaire, maladie des valves cardiaques	FBN1
ADAMTSL4	Inconnue	Ectopie du cristallin	Dislocation du cristallin	FBN1

Tableau 7 : Implication des ADAMTS et ADAMTSL dans des maladies génétiques humaines. Tiré de (Le Goff and Cormier-Daire, 2011).

2.2.2.3.1.

Les ADAMTS2, 3 et 14 : aminoprocollagène peptidases

Le groupe des aminoprocollagène peptidases comprend les ADAMTS2, 3 et 14. Il revêt une attention particulière pour notre laboratoire et constitue le thème principal de ce travail. Historiquement, l'intérêt pour l'ADAMTS2 remonte au début des années 1970, dans le cadre de l'étude d'une maladie génétique rare apparue chez le bovin en Belgique au cours d'un programme de croisement visant à générer une race caractérisée par une masse musculaire élevée. Les animaux touchés par la maladie baptisée dermatosparaxie présentaient une peau extrêmement fragile (Lapiere et al., 1971; Lenaers et al., 1971). Des analyses du derme en microscopie électronique démontrèrent la

présence de fibrilles de collagène anormales et désorganisées résultant de l'accumulation de collagène de type I et III ayant conservé leur aminopropeptide. L'incubation du collagène extrait du derme d'animaux dermatosparactiques avec un extrait de peau normale résultant en un clivage de l'aminopropeptide du collagène, il fut suggéré que la pathologie résultait de l'absence d'une activité « aminoprocollagène peptidase ». Une avancée importante fut la détermination d'une partie de la séquence en acides aminés de l'enzyme responsable de cette activité (Colige et al., 1995), ce qui permit la création de sondes et d'amorces utilisées pour cloner le cDNA bovin puis humain (Colige et al., 1999). Conformément à une nouvelle nomenclature établie à cette époque (Kuno et al., 1997), cette aminoprocollagène peptidase fut baptisée ADAMTS2.

Deux autres enzymes démontrant une activité aminoprocollagène peptidase furent ensuite décrites : les ADAMTS3 et 14. La première référence indirecte à l'ADAMTS3 résulte du clonage d'un cDNA humain (KIAA0366) qui présentait de fortes similarités de séquence avec l'ADAMTS2 (Nagase et al., 1997), bien que l'activité N-endopeptidase de la protéine codée ne fût démontrée que quelques années plus tard (Fernandes et al., 2001). L'ADAMTS14 fut quant à elle clonée par trois équipes différentes (Bolz et al., 2001; Cal et al., 2002; Colige et al., 2002). Son activité et son profil d'expression furent caractérisés, démontrant une faible mais réelle activité N-procollagène peptidase *in vitro* (Colige et al., 2002).

L'ADAMTS2 est impliquée dans le clivage de l'aminopropeptide du collagène de type I dans la peau (Colige et al., 2004; Colige et al., 1999) mais elle est également capable d'exciser le propeptide aminoterminal des procollagènes de types II, III et V (Colige et al., 2005; Fernandes et al., 2001; Le Goff et al., 2006; Wang et al., 2003). Les ADAMTS3 et 14 présentent quant à elles une activité *in vitro* sur les procollagènes de types I, II et III pour l'ADAMTS3 (Fernandes et al., 2001; Le Goff et al., 2006), et de type I pour l'ADAMTS14 (Colige et al., 2002). De plus, l'ADAMTS3 est co-exprimée avec le collagène de type II dans le cartilage et avec le collagène de type I dans les os et les tissus musculo-tendineux au cours du développement chez la souris (Le Goff et al., 2006), suggérant une action spécifique *in vivo* sur ces collagènes. L'ADAMTS14 ne présente pas une expression spécifique de certains tissus au cours du développement mais est co-exprimée avec l'ADAMTS2 dans le derme mature. Enfin, l'ADAMTS2 est co-exprimée dans de nombreux tissus avec le collagène de type III.

Outre la mutation entraînant une perte d'activité de l'ADAMTS2 à l'origine de la dermatosparaxie bovine, plusieurs altérations (délétions, codons stop prématurés) du gène humain ont été identifiées et sont à l'origine du syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS) de type dermatosparactique chez l'homme (précédemment connu sous le nom d'EDS de type VIIC) (Colige et al., 1999; Nusgens et al., 1992). Cette maladie rare est caractérisée par une fragilité extrême de la peau, des ecchymoses fréquentes, une hernie ombilicale et un faciès caractéristique (micrognathie, œdème des paupières, fontanelle large, sclérotique bleue) (Colige et al., 2004; Malfait et al., 2004). Comme chez le bovin, elle résulte d'un déficit de clivage de l'aminopropeptide des procollagènes de types I et III, dont la persistance perturbe l'assemblage correct des fibrilles et fibres de collagène dans le derme.

Les souris homozygotes ADAMTS2 knockout (*Adamts2*^{-/-}) présentent les mêmes caractéristiques phénotypiques que la dermatosparaxie chez l'humain et le bovin, en particulier une extrême fragilité de la peau alors que les autres tissus riches en collagènes, tel que l'os et les tendons, semblent normaux (Li et al., 2001). A la naissance, les nouveau-nés *Adamts2*^{-/-} sont normaux. Leur peau n'est pas particulièrement fragile et les fibres de collagènes ont une morphologie normale suggérant que d'autres ADAMTS, peut-être l'ADAMTS3 et/ou l'ADAMTS14, pourraient être responsables du clivage du procollagène de type I durant la vie embryonnaire et au cours des premiers jours après la naissance. En appui de cette hypothèse, notre laboratoire a montré que les

ADAMTS2, 3 et 14 possèdent une expression tissulaire spécifique durant l'embryogenèse chez la souris (Le Goff et al., 2006). Seule l'ADAMTS3 a été identifiée comme étant significativement exprimée dans les tissus riches en collagènes de type I et de type II, alors que l'expression de l'ADAMTS2 est plus particulièrement associée avec l'expression du collagène de type III, comme dans le poumon ou l'aorte par exemple. En revanche, l'ADAMTS14 n'est pas significativement détectée par hybridation *in situ* chez l'embryon. Un autre phénotype notable des souris *Adamts2^{-/-}* est la stérilité des mâles. Celle-ci résulte d'évènements toujours inexpliqués mais dont on sait qu'ils surviennent quelques semaines après la naissance puisque les testicules semblent normaux à l'âge de 2 semaines mais sont fortement altérés 2 semaines plus tard ((Li et al., 2001) et observations personnelles).

Du polymorphisme dans le gène de l'ADAMTS2 est par ailleurs associée à un facteur de risque de lésion du tendon d'Achille (El Khoury et al., 2013) et d'accidents vasculaires cérébraux pédiatriques (Arning et al., 2012) et chez l'adulte (Arning et al., 2016). L'expression de l'ADAMTS2 participerait également à l'établissement de la cirrhose du foie chez l'humain via sa participation à la formation des fibres de collagène et la régulation de la voie du TGF- β (Dong et al., 2013). Il a d'ailleurs été démontré au sein du LBTC que la fibrose hépatique était significativement réduite chez les souris *Adamts2^{-/-}* (Kesteloot et al., 2007). Enfin, notre laboratoire a aussi mis en évidence un rôle anti-angiogène et anti-tumoral de l'ADAMTS2 *in vitro* et *in vivo* via un mécanisme indépendant de son activité catalytique (Dubail et al., 2010).

A l'aide d'un modèle de souris déficientes, notre laboratoire a récemment identifié l'ADAMTS3 comme acteur indispensable de la lymphangiogenèse. Les souris hétérozygotes (*Adamts3^{+/-}*) sont viables et fertiles alors que les embryons homozygotes *Adamts3^{-/-}* meurent au jour 15 de gestation. Ils présentent un lymphœdème cutané important (et particulièrement au niveau dorsal), des vaisseaux sanguins anormaux dans le placenta et une dégénérescence progressive du foie alors que la maturation des collagènes fibrillaires semble normale. Le LBTC a montré que ce phénotype spécifique chez les embryons *Adamts3^{-/-}* résulte de l'absence de maturation par l'ADAMTS3 du pro-VEGF-C en VEGF-C actif capable d'interagir avec ses récepteurs. Ces résultats sont détaillés dans la publication en annexe 1 : « ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis ».

Peu de données concernant l'ADAMTS14 sont actuellement disponibles. Des études d'association génétique semblent l'impliquer dans l'ostéoarthrite du genou (Poonpet et al., 2013; Rodriguez-Lopez et al., 2009) et dans la sclérose en plaque (Goertsches et al., 2005). Un polymorphisme particulier a également été corrélé à une susceptibilité accrue à développer divers cancers, notamment du foie (Sheu et al., 2017) et de la cavité orale (Su et al., 2016). Il faut cependant préciser qu'aucune étude fonctionnelle n'a encore confirmé ces corrélations. Les souris homozygotes déficientes en ADAMTS14 (*Adamts14^{-/-}*) créées par notre laboratoire ne présentent cependant aucun phénotype particulier évident (Dupont et al., 2018). La double délétion de l'ADAMTS2 et de l'ADAMTS14 cause cependant, outre la fragilité cutanée liée à l'absence de l'ADAMTS2, le développement vers l'âge de 3 mois de lésions épidermiques réminiscentes de la dermatite atopique et résultant de dysfonctions immunitaires (Dupont et al., 2018).

2.2.2.3.2. Les ADAMTS 1, 4, 5, 8 et 15 : agrécanases

Les ADAMTS 1, 4, 5, 8 et 15 doivent leur nom initial d'« agrécanases », puis plus tard, de « hyalectanases » et de « protéoglycanases » à leur capacité à cliver divers protéoglycans tels

l'aggrécane, le versican, le brevican, des SLRP, des syndécans, la décorine et le biglycan, mais aussi la fibromoduline et la protéine COMP (**Tableau 5**) (Dancevic et al., 2013; Longpre et al., 2009; Rodriguez-Manzaneque et al., 2002; Sandy et al., 1991).

Les souris déficientes en ADAMTS1 présentent une mortalité périnatale d'environ 50% et les souris survivantes présentent de nombreuses anomalies telles qu'un retard de croissance, des atteintes uro-génitales et une stérilité des femelles (Mittaz et al., 2004; Shindo et al., 2000; Shozu et al., 2005). Les propriétés anti-angiogéniques attribuées à l'ADAMTS1 ont été mises en lien avec la présence de ses domaines TSR mais aussi avec son activité catalytique (Rodriguez-Manzaneque et al., 2015). L'ADAMTS1 a également été référencée comme inhibitrice de la lymphangiogenèse *in vitro* (Inagaki et al., 2014). Elle semble aussi essentielle au renouvellement du versican durant le développement cardiaque chez l'embryon (Stankunas et al., 2008). Enfin, notre laboratoire a également montré une implication de l'ADAMTS1 dans le contrôle de l'accumulation du versican dans les valves mitrales en cas de dégénérescence myxoïde (Hulin et al., 2012).

L'absence d'ADAMTS5, dans un modèle de souris déficientes, mène également à une réduction de la protéolyse du versican et à une dégénérescence myxoïde des valves cardiaques (Dupuis et al., 2011). Il a également été démontré que l'absence d'activité ADAMTS5 protège contre le développement de l'ostéoarthrite, alors que des souris déficientes en ADAMTS4 sont phénotypiquement normales et ne présentent aucune protection contre la dégradation (induite ou inflammatoire) de l'aggrécane et des cartilages, démontrant ainsi que l'ADAMTS4 n'est pas l'aggrécanease principale, du moins chez les souris (Glasson et al., 2005; Glasson et al., 2004; Majumdar et al., 2007). L'ADAMTS4 est de surcroît impliquée dans d'autres processus tels que l'ovulation (Richards et al., 2005) et la modulation de la plasticité neuronale (Tauchi et al., 2012).

Il a été attribué un rôle suppresseur de tumeur à l'ADAMTS8 dont la répression de l'expression via l'hyperméthylation de son promoteur est avérée dans différents types de carcinomes (Choi et al., 2014). Un autre mécanisme, dont la nature demeure cependant inconnue, est aussi suggéré dans d'autres types de cancers tels que les cancers du cerveau ou du poumon dans lesquels l'expression de l'ADAMTS8 est réprimée (Dunn et al., 2006). Une activité anti-angiogénique puissante, similaire à celle de l'ADAMTS1, a également été rapportée (Vazquez et al., 1999).

L'ADAMTS15 est capable d'inhiber la migration de cellules cancéreuses mammaires indépendamment de son activité catalytique, via une augmentation du taux de syndécane-4 en surface cellulaire (Kelwick et al., 2015b). D'autres études ont montré que son expression réprime la croissance tumorale et l'invasion de cellules de cancer colorectal *in vitro*, alors que des mutations résultant en son inactivation fonctionnelle sont observées dans les cancers colorectaux, pulmonaires et pancréatiques (Viloria et al., 2009).

2.2.2.3.3.

L'ADAMTS 13 : protéase clivant le facteur de von Willebrand (vWFPC)

L'ADAMTS13, aussi appelée vWFPC pour von Willebrand Factor Cleaving Protease, est la seule ADAMTS qui comporte deux domaines CUB à son extrémité C-terminale (Zander et al., 2015). C'est aussi la seule connue à ce jour pour cliver le facteur de von Willebrand, une glycoprotéine polymérique plasmatique impliquée dans la cascade de coagulation sanguine, et le réduire en fragments de tailles optimales afin de permettre une bonne coagulation (Zheng, 2013). Des mutations induisant une déficience en activité plasmatique de l'ADAMTS13 causent le « purpura

thrombocytopénique thrombotique », une maladie autosomale récessive caractérisée par une thrombocytopénie, une anémie hémolytique et des thromboses microvasculaires (Zheng, 2013).

2.2.2.3.4. Les ADAMTS7 et 12 : COMP protéases

Les ADAMTS7 et 12 se caractérisent par la présence d'un domaine mucine-like (ou domaine protéoglycan) hautement glycosylé au niveau duquel peut être greffé une chaîne chondroïtine sulfate, ce qui leur confère le statut de protéoglycans (Somerville et al., 2004b). Ces deux ADAMTS sont aussi connues pour cliver la protéine COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), ce qui leur vaut aussi le nom de COMP protéases (Liu et al., 2006a; Liu et al., 2006b). Cette interaction avec COMP provient des 4 TSP C-terminaux qui ont aussi été rapportés pour avoir un effet inhibiteur de la différenciation des chondrocytes (Liu et al., 2006a; Wei et al., 2014b). Les ADAMTS7 et 12 ont été identifiées comme d'importants régulateurs négatifs du développement des cartilages au niveau de la plaque cartilagineuse intervertébrale (Zhang et al., 2012). L'ADAMTS12 est d'ailleurs considérée comme un inhibiteur de la chondrogenèse (Bai et al., 2009b) alors que l'ADAMTS7 est fortement exprimée lors de la différenciation terminale des chondrocytes et que sa surexpression inhibe leur différenciation (Bai et al., 2009b).

L'ADAMTS12 a été mise en cause dans l'initiation et la progression de l'ostéoarthrite même si les données nécessitent d'être confirmées *in vivo* (Wei et al., 2014b). Des données *in vivo* ont par contre confirmé l'implication de l'ADAMTS7 dans l'initiation et la progression de cette pathologie (Lai et al., 2014). De plus, les peptides issus de la dégradation de COMP identifiés en cas d'arthrite rhumatoïde et d'ostéoarthrite correspondent à ceux générés par la digestion de COMP par l'ADAMTS7 qui est surexprimée dans ces maladies (Luan et al., 2008) L'ADAMTS12 a de plus été caractérisée comme médiateur de l'inflammation physiologique, mais aussi particulièrement de l'inflammation en cas d'allergie, y compris dans l'asthme (Moncada-Pazos et al., 2012; Paulissen et al., 2012; Wei et al., 2014b). Enfin, elle a été rapportée comme exerçant un effet anti-tumoral et anti-angiogénique *in vivo* et *in vitro* (Blacher et al., 2008; El Hour et al., 2010; Fontanil et al., 2014).

L'ADAMTS7 a, quant à elle, été associée au développement de l'athérosclérose et de pathologies vasculaires mais son rôle précis reste toujours à déterminer, bien qu'il puisse faire intervenir la dégradation de COMP par l'ADAMTS7 et l'interaction de celle-ci avec la thrombospondine 1 (Zhang et al., 2015). Son rôle a aussi été évoqué dans la croissance et l'invasion tumorales dans les cancers de la prostate et de la vessie compte tenu de sa présence dans l'urine de patients touchés par ce type de cancer (Roy et al., 2008).

2.2.2.3.5. Les ADAMTS 9 et 20

Les ADAMTS9 et 20 sont les enzymes les plus longues et les plus conservées de la famille des ADAMTS, avec des orthologues présents chez les nématodes (Dubail and Apte, 2015; Somerville et al., 2003).

L'ADAMTS9 est une métalloprotéase physiologiquement cruciale au vu de la létalité des embryons déficients en ADAMTS9 dès le stade de gastrulation (Dubail et al., 2014; Kern et al., 2010). Ceci serait associée à l'absence de clivage du versican par l'ADAMTS9 puisque ce protéoglycan est un des composants essentiels de la matrice extracellulaire embryonnaire et que son clivage par des ADAMTS (et notamment les ADAMTS9 et 20 (Somerville et al., 2003)) est nécessaire au bon

déroulement du développement, potentiellement en raison de la genèse de fragments cryptiques capables de réguler des propriétés cellulaires (Nandadasa et al., 2014).

L'haploinsuffisance en ADAMTS9 provoque des défauts cardiovasculaires et des problèmes oculaires avec une forte pénétrance. Chez la souris, la combinaison de cette haploinsuffisance et de l'inactivation de l'ADAMTS20 suite à une mutation se traduit par la mortalité des souriceaux (*Adamts9^{+/-}/20^{-/-}*) à la naissance, en raison d'une fente palatine importante, alors que l'inactivation seule de l'ADAMTS20 ne présente qu'une faible pénétrance du phénotype (Enomoto et al., 2010), suggérant une redondance de fonction entre les deux enzymes. Les souris *Adamts9^{+/-}/20^{-/-}* présentent par ailleurs une zone cutanée caractérisée par l'absence de pigmentation (« belted ») qui est plus étendue que dans le cas des souris *Adamts20^{-/-}*. Ces travaux ont ainsi permis de démontrer l'importance de ces enzymes pour la survie des mélanoblastes (Silver et al., 2008).

Des redondances de fonction ont également été mises en évidence pour d'autres ADAMTS. C'est ainsi que des souris doublement déficientes en ADAMTS20 et 5 (*Adamts20^{-/-}/5^{-/-}*) présentent une syndactylie à pénétrance complète résultant de l'absence de résorption des membranes cutanées interdigitales, qui est bien plus marquée que chez les souris « simple mutantes » (McCulloch et al., 2009). C'est aussi le cas pour les souris doublement déficientes en ADAMTS9 et 5, ou en ADAMTS9 et 20 (via un système d'inactivation conditionnelle de l'ADAMTS9 permettant d'éviter la létalité embryonnaire) (Dubail et al., 2014).

Enfin, l'ADAMTS9 a été identifiée comme un gène suppresseur de tumeur dans les cas des cancers nasopharyngiens et de l'œsophage via ses propriétés anti-angiogènes (Koo et al., 2010; Lo et al., 2010).

2.2.2.3.6.

Les ADAMTS 6, 10, 16, 17, 18 et 19

Les derniers groupes sont définis sur base de la structure des enzymes et chacun d'eux comprend une paire d'ADAMTS : les ADAMTS6 et 10, les ADAMTS 16 et 18, et enfin les ADAMTS17 et 19. Peu d'informations concernant les substrats et fonctions de ces enzymes sont aujourd'hui disponibles, leur valant le nom d'ADAMTS « orphelines » (Kelwick et al., 2015a). Bien que ces enzymes ne soient pas encore bien caractérisées, certaines sont impliquées dans des maladies génétiques (ADAMTS10, 17 et 18) et il ne fait donc aucun doute qu'elles sont impliquées dans des processus physiologiques importants.

Des mutations dans le gène codant pour l'ADAMTS10 causent le syndrome de Weill-Marchesani (WMS) dont les manifestations comprennent une petite stature, un épaissement de la peau et de la cornée, une fibrose progressive des valves aortiques et des défauts du cristallin (Cain et al., 2016). Puisque ce syndrome est également causé par des mutations de la fibrilline1 provoquant un défaut de l'organisation des microfibrilles des fibres élastiques, et que l'ADAMTS10 se lie à cette protéine, tout semble indiquer une implication de l'ADAMTS10 dans la fibrillogenèse, même si la nature de ce lien reste actuellement floue (Hubmacher and Apte, 2015). Alors que l'ADAMTS10 semble résistante à un clivage de son prodomaine par la furine, l'ADAMTS6 (qui lui est fortement homologue) est efficacement clivée (Cain et al., 2016). Un autre aspect qui distingue ces enzymes « sœurs » est que l'ADAMTS10 participe à la formation des adhésions focales, des jonctions intercellulaires et au dépôt de fibrilline alors que l'ADAMTS6 inhibe ces processus (Cain et al., 2016). Peu de données concernant l'ADAMTS6 sont disponibles mais une récente étude lui confère des propriétés antitumorales dans le cadre de cancer mammaires. Celles-ci seraient liées à l'inhibition de

la migration et de l'invasion de cellules cancéreuses, ainsi qu'à une réduction de la croissance tumorale, suggérant que l'expression de l'ADAMTS6 puisse servir de marqueur pronostic du cancer du sein (Xie et al., 2016).

Les ADAMTS16 et 18 présentent une homologie de séquence de 57%, allant même jusqu'à 85% pour leur domaine catalytique (Cal et al., 2002). Leur activité catalytique n'a que peu été étudiée mais ces enzymes possèdent une faible activité aggrécanease (Zeng et al., 2006). Il a été suggéré que l'ADAMTS18 joue un rôle dans l'hémostase via une interaction et son clivage par la thrombine (Wei et al., 2014a). L'ADAMTS18 aurait également un rôle anti-tumoral car des mutations ont été associées à divers cancers. Une forte méthylation de son promoteur menant à une répression de son expression a par ailleurs été observée dans diverses lignées cancéreuses (Wei et al., 2014a). Bien que son implication dans des pathologies génétiques humaines n'ait pas encore été rapportée, l'inactivation de l'ADAMTS16 chez des rongeurs a mené à de l'hypertension, de la cryptorchidie et de l'infertilité masculine, ainsi que des anomalies de développement rénal (Kelwick et al., 2015a).

Des mutations de l'ADAMTS17 ont été mises en lien avec un syndrome similaire à celui de Weill-Marchesani avec des défauts du cristallin associés à une petite stature chez l'humain, et les mêmes défauts oculaires chez le chien (Hubmacher and Apte, 2015). Ceci suggère un lien avec la fibrilline, comme pour l'ADAMTS10 avec laquelle elle présente une structure similaire, mais sans preuve fonctionnelle à ce jour (Hubmacher et al., 2017). L'ADAMTS19 est un des membres de la famille les moins étudiés actuellement. Sa répression via la méthylation de son promoteur a été associée au cancer colorectal et à un type muqueux de cancer des ovaires, élevant cette enzyme au statut de biomarqueur potentiel pour le diagnostic de ces types de cancers (Alonso et al., 2015). De récentes études ont montré un lien entre des polymorphismes dans le gène codant pour l'ADAMTS19 et le développement d'une insuffisance ovarienne prématurée, liée à un dysfonctionnement précoce des ovaires (Christin-Maitre and Tachdjian, 2010; Knauff et al., 2009). Cela semble indiquer que l'enzyme jouerait un rôle dans la folliculogénèse, même si ceci reste à démontrer de manière formelle.

2.2.2.3.7. Les protéines ADAMTSL

Les protéines ADAMTSL présentent des domaines C-terminaux similaires à ceux présents dans le domaine auxiliaire des ADAMTS. Elles s'en différencient néanmoins par l'absence de domaine protéase formant la partie N-terminale des ADAMTS (Apte, 2009; Le Goff and Cormier-Daire, 2011). Elles ne sont donc pas catalytiquement actives, mais pourraient agir en tant qu'inhibiteurs compétitifs des ADAMTS (Apte, 2009; Kelwick et al., 2015a) ou avoir une fonction directe dans l'architecture de la MEC et de son remodelage en raison d'interactions avec les divers composants de celle-ci. Cette théorie est notamment étayée par le fait que plusieurs ADAMTSL telles que les ADAMTSL5 et 6 soient impliquées dans l'assemblage de la fibrilline pour former les microfibrilles (Bader et al., 2012; Tsutsui et al., 2010).

L'ADAMTSL2 est connue pour se lier à la fibrilline 1 mais aussi au LTBP1 (Latent TGF- β -binding protein 1), un ligand de la fibrilline 1 et du TGF- β . De plus, des mutations au sein de sa séquence provoquent la dysplasie géléophysique, une maladie génétique autosomale récessive similaire à la WMS. Le mécanisme sous-jacent consisterait en une diminution de la sécrétion de l'ADAMTSL2, probablement en raison d'une altération de sa structure, ce qui résulterait en une modification de la biodisponibilité du TGF- β et en une activation de sa voie de signalisation (Le Goff et al., 2008). Par ailleurs, un séquençage d'exomes de patients touchés par cette maladie mais ne présentant pas de mutation pour l'ADAMTSL2 a mis en évidence des mutations hétérozygotes dans le

gène codant pour la fibrilline1. Comme une interaction directe a été démontrée entre l'ADAMTSL2 et la fibrilline1, il est vraisemblable qu'une dérégulation des interactions fibrilline-ADAMTSL2-TGF- β soit bien à l'origine de la petite stature des individus touchés (Le Goff et al., 2011).

Un autre exemple concerne l'ADAMTSL4, également connue pour se lier à la fibrilline1 (Gabriel et al., 2012). Les mutations dans son gène ont été rapportées pour induire des pathologies oculaires résultant d'une perturbation des structures microfibrillaires soutenant le cristallin (Ahram et al., 2009), un défaut également été observé dans le cas de mutations dans le gène codant pour la fibrilline1 dans le syndrome de Marfan (Lonnqvist et al., 1994). Des mutations dans le gène codant pour la protéine LTBP2 induisent elles aussi un syndrome oculaire similaire (Desir et al., 2010), suggérant un lien entre l'ADAMTSL4 et LTBP2 de manière analogue à celui entre l'ADAMTSL2 et LTBP1.

En conclusion, il semble donc que les ADAMTS(L) remplissent des fonctions dans des processus importants tels que l'angiogenèse et la lymphangiogenèse, la fertilité ou le développement. Des liens avec des pathologies incluant différentes formes d'arthrites, une série de syndromes spécifiques et certains cancers semblent également avérés. Une identification plus complète de leurs substrats et de leurs fonctions est toutefois requise afin de mieux définir si les ADAMTS(L) peuvent être considérées comme des outils diagnostiques et des cibles thérapeutiques d'intérêt.

3. Protéolyse et « dégradomique »

Environ 2% des gènes humains codent pour des protéases, ce qui en fait la seconde classe d'enzymes la plus importante en terme de nombre (Puente et al., 2003). Elles furent initialement considérées comme de simples enzymes de dégradation aspécifiques et furent donc principalement associées au catabolisme protéique. Il est cependant apparu progressivement que la protéolyse est un mécanisme permettant un contrôle précis d'une multitude de processus et ce dans tous les organismes vivants. Ce contrôle s'effectue au travers de l'hydrolyse spécifique des liens peptidiques au sein des protéines cibles, ce qui résulte en la formation de fragments présentant potentiellement des propriétés différentes de celles du substrat d'origine (Lopez-Otin and Overall, 2002; Marino et al., 2015). A titre d'exemples, les protéases peuvent ainsi :

- Activer ou inhiber d'autres facteurs (autres protéases, facteurs de croissance, cytokines,...),
- Modifier la localisation et/ou les fonctions de leurs substrats (récepteurs transmembranaires ou solubles par clivage juxta-membranaire),
- Exposer des sites cryptiques fonctionnels ou libérer des matrikines ou autres fragments bioactifs.

Les protéases permettent donc d'initier, de moduler et de terminer une large gamme de fonctions cellulaires via le clivage de leurs substrats. Elle contrôlent donc (in)directement de nombreux processus biologiques capitaux comprenant la réplication de l'ADN, la progression dans le cycle cellulaire, la différenciation et la migration cellulaires, la morphogenèse et le remodelage tissulaire, l'homéostasie, la réparation tissulaire, l'immunité, l'angiogenèse, l'apoptose,... (Barrett et al., 2012; Sternlicht and Werb, 2001).

En considérant l'importance des protéases pour l'ensemble de ces processus, il est aisé de comprendre que des altérations de leur synthèse ou de leur activité puissent être au centre de multiples processus pathologiques (cancers, arthrite, maladies neurodégénératives ou cardiovasculaires ...). Par ailleurs, les protéases sont aussi utilisées comme facteurs de virulence par de nombreux microorganismes, virus et parasites, et le venin de certains animaux comprend fréquemment des protéases responsables de la destruction tissulaire. Les protéases et leurs substrats sont donc des acteurs clés pour l'industrie pharmaceutique car ils représentent des cibles thérapeutiques potentielles.

La dégradomique est un terme qui désigne l'étude et la caractérisation de l'activité des protéases à l'échelle du protéome. Cette approche comprend les interactions avec leurs substrats et inhibiteurs par l'utilisation de toute approche génomique et protéomique (Lopez-Otin and Overall, 2002; McQuibban et al., 2000). En mettant l'accent sur la façon dont la protéolyse permet aux cellules de contrôler certains processus biologiques, les premières études dans le domaine ont souligné la nécessité d'étudier les protéases et leur pertinence fonctionnelle. Depuis, la notion de dégradome a ainsi été élargie à deux concepts. Le premier fait référence à l'ensemble des protéases exprimées par une population cellulaire, un tissu ou un organisme dans des circonstances définies, alors que le second s'applique au répertoire complet de substrats d'une protéase particulière dans une cellule, un tissu ou un organisme (Lopez-Otin and Overall, 2002).

Au vu de la complexité des réseaux protéolytiques, le développement des outils spécifiques à son étude se sont avérés nécessaires. Les avancées technologiques, notamment en spectrométrie de masse, ont mené au développement de techniques puissantes et quantitatives permettant l'identification ciblée des substrats potentiels de protéases. Une des approches initiales consista à marquer puis analyser en spectrométrie de masse l'ensemble des protéines et des peptides générés par protéolyse, afin de déterminer leur identité et leur abondance relative (Huesgen and Overall, 2012). La principale limitation de ce type d'approche provient du fait que les protéines et fragments de faible abondance ne sont que difficilement détectables car le plus souvent masqués par les peptides les plus abondants dans les échantillons ou tissus d'intérêt (Anderson and Anderson, 2002; Eckhard et al., 2016c; Huesgen and Overall, 2012). Les données obtenues par ce type d'approche sont donc limitées et incomplètes. Cette limitation peut être contournée en se focalisant sur l'étude des peptides N- et C-terminaux générés au cours du clivage protéolytique. Ces peptides sont en effet hautement informatifs car ils permettent simultanément l'identification des substrats potentiels de la protéase étudiée mais aussi la détermination précise des sites de clivage (Overall and Blobel, 2007). Ce type d'approche a permis la création d'un nouveau champ de protéomique positionnelle à haut débit appelé « terminomique », dont le but est l'étude de peptides situés aux extrémités N- et C-terminales générés par la protéase d'intérêt (directement et indirectement) (Eckhard et al., 2016c).

Comme dans toute approche de protéomique par spectrométrie de masse, les protéines de grande taille doivent être clivées en peptides de tailles adaptées pour une analyse efficace (Huesgen and Overall, 2012). Une digestion par une endoprotéase hautement spécifique, telle la trypsine, est ainsi souvent utilisée (**Figure 17**) (Vogtle et al., 2009). Cette digestion augmente cependant la complexité de l'échantillon et pourrait résulter en la perte d'informations car les peptides terminaux initiaux sont relativement peu abondants et se retrouvent alors noyés dans la masse de peptides tryptiques, prévenant (ou réduisant) les chances d'identifier les peptides d'intérêt (Huesgen and Overall, 2012). Pour contrer cette difficulté, un enrichissement en peptides terminaux avant analyse est réalisé par sélection positive ou par la déplétion des peptides tryptiques. Cette étape supplémentaire permet de simplifier le protéome et d'augmenter sa couverture de lecture. En conséquence, elle améliore grandement les chances d'identifier les peptides de faible abondance (Gevaert et al., 2007). Malgré ces avantages, se focaliser sur les peptides N- et C-terminaux présente des limitations. Selon la séquence protéique, les peptides terminaux générés par la digestion avec l'endoprotéase spécifique peuvent ne pas être adéquats pour l'identification par spectrométrie de masse (trop petits, trop longs, présentant une ionisation faible,...), ce qui risque de compromettre l'identification de certains peptides et de la protéine cible correspondante (Huesgen and Overall, 2012). Cet inconvénient peut être évité en effectuant les expériences en réplicats, en ayant recours à des endoprotéases aux spécificités complémentaires telles que la trypsine (clivage en aval d'une arginine ou d'une lysine) et la GluC (clivage après un acide glutamique ou, dans une moindre mesure, après un aspartate).

Un autre défi auquel doit faire face ce type d'approche de terminomique est que l'identification de la plupart des protéines ne résulte que de l'analyse d'un peptide unique (Wang et al., 2010), ce qui est souvent difficilement accepté par la communauté scientifique car source d'erreurs (Veenstra et al., 2004). Des conditions très stringentes sont dès lors utilisées pour l'assignement d'une séquence à un spectre identifié par le spectromètre de masse. Par exemple une validation statistique du peptide via le logiciel PeptideProphet (Keller et al., 2002) est couramment appliquée, de même que l'identification par deux spectres indépendants (Kleifeld et al., 2010).

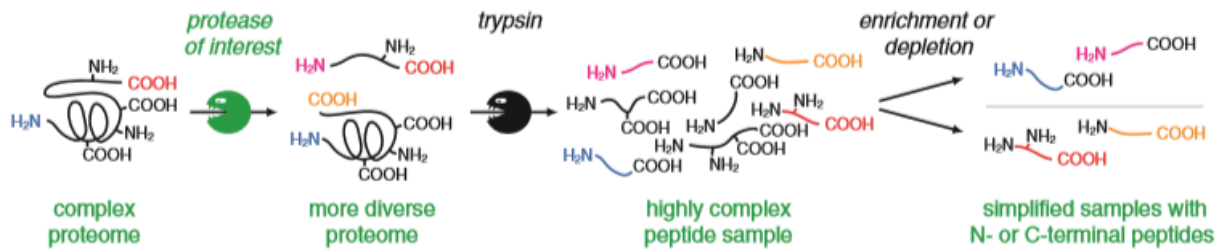


Figure 17 : Principe d'analyses en N- et C-terminomique par spectrométrie de masse

Une protéase clive son substrat en minimum deux fragments plus petits. La plupart des techniques actuelles de protéomique nécessitent une digestion des échantillons par une endoprotéase spécifique telle que la trypsine pour permettre l'identification des protéines par spectrométrie de masse. Cette digestion augmente cependant la complexité de l'échantillon. Une sélection positive ou négative des peptides N- ou C-terminaux d'intérêt permet de simplifier les échantillons à analyser (Huesgen and Overall, 2012).

Parmi les techniques de terminomique basées sur de la spectrométrie de masse en tandem figurent notamment la C-terminomique pour l'étude des extrémités C-terminales alors que le N-TAILS (Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates) et la COFRADIC (Combined FRActional Diagonal Chromatography) sont les techniques les plus utilisées en N-terminomique. Toutes ces stratégies d'analyses des N- et C-terminomes ont recours à un marquage isotopique ou à un blocage chimique des protéines avant leur digestion par une endoprotéase spécifique telle que la trypsine, ce qui préserve les informations des extrémités protéiques et permet la quantification relative des protéines (Huesgen and Overall, 2012; Mallick and Kuster, 2010).

Les analyses en C-terminomique ont toujours été compliquées compte tenu de la nature chimique de leur cible, à savoir les groupements carboxyles situés à l'extrémité C-terminales des protéines et peptides (Eckhard et al., 2016c; Marino et al., 2015). En effet, ces groupes carboxyles sont moins réactifs que les amines primaires ciblées en N-terminomique, ce qui rend les techniques de C-terminomique bien plus complexes et difficiles. Des techniques ont toutefois été développées et adaptées spécifiquement pour la C-terminomique (Schilling et al., 2010; Van Damme et al., 2010) en utilisant un polymère pour enrichir les peptides C-terminaux.

La COFRADIC et le N-TAILS constituent les techniques de N-terminomique les plus utilisées et se basent sur une sélection négative pour enrichir l'échantillon en peptides informatifs avant l'analyse en spectrométrie de masse (Marino et al., 2015).

Dans le cas de la COFRADIC, qui fut la première technique de N-terminomique de ce type (Gevaert et al., 2003), l'enrichissement en peptides N-terminaux se base sur une séparation des peptides via des cycles de chromatographies échangeuses d'ions et en phase inverse, après un traitement biochimique complexe (Chen et al., 2013; Marino et al., 2015; Van Damme et al., 2010). Lors du N-TAILS, les amines libres, dont les extrémités N-terminales initiales, natives ou générées par l'enzyme étudiée, sont d'abord marquées et bloquées par des composés chimiques spécifiques. Les échantillons sont ensuite digérés par la trypsine (ou tout autre protéase hautement spécifique) qui génère des peptides avec une extrémité aminoterminal possédant une amine libre, à l'exception du peptide situé le plus en amont puisque son amine terminale avait initialement été bloquée par le marqueur. L'utilisation d'un polymère fixant les amines libres permet ensuite une sélection négative aboutissant à un enrichissement en peptides N-terminaux d'intérêt (Kleifeld et al., 2010; Kleifeld et al., 2011; Marino et al., 2015; Prudova et al., 2010).

La dégradomique permet donc de découvrir le répertoire de substrats des protéases, ce qui constitue une étape essentielle pour une identification plus complète de leur fonctions en physiopathologie (Lopez-Otin and Overall, 2002).

3.1. La spectrométrie de masse au service de la protéomique

La spectrométrie de masse est une technique particulièrement sensible utilisée pour détecter et identifier des molécules dans des échantillons plus ou moins complexes. Elle se base sur la séparation en phase gazeuse de molécules préalablement ionisées en analysant le rapport entre leur masse et leur charge (ratio m/z). Suite à l'amélioration constante des instruments de mesure, la spectrométrie de masse a trouvé de nombreuses applications y compris en protéomique (Mallick and Kuster, 2010). Dans ce cadre, elle permet notamment d'identifier les protéines d'un échantillon à partir du m/z de leurs fragments peptidiques, de détecter les modifications post-traductionnelles ou encore de séquencer certains peptides. Ce type d'analyse permet ainsi l'identification de biomarqueurs dans le cadre de pathologies, la comparaison du niveau d'expression protéique entre diverses conditions expérimentales ou l'étude de la métabolisation de médicaments ou drogues par l'organisme (Finehout and Lee, 2004).

Tous les spectromètres de masse sont composés d'une source d'ionisation, d'un ou plusieurs analyseurs de masse, d'un détecteur assorti d'un amplificateur, et d'un système informatique dont la nature varie selon le type de spectromètre de masse, le type de données désirées et les propriétés des échantillons (Finehout and Lee, 2004; Hoffmann and Stroobant, 2007). La source d'ionisation permet le passage des échantillons (sous forme de gaz, de liquide ou de solide) à l'état gazeux ainsi que leur ionisation. La charge que les molécules reçoivent permet au spectromètre d'accélérer les ions. Ceux-ci passent alors à travers le champ électrique ou magnétique de l'analyseur, qui les dévie individuellement de leur trajectoire en fonction de leur masse et de leur charge (m/z). Cette déviation individuelle de trajectoire permet de séparer les analytes d'un échantillon pour une analyse globale ou, à l'inverse, d'utiliser l'analyseur de masse comme un filtre qui ne déviara vers le détecteur que des ions possédant un m/z spécifique. Les ions qui ont été déviés correctement frappent alors le détecteur. Celui-ci est généralement couplé à un amplificateur qui émet une multitude d'électrons lorsqu'un ion atteint le détecteur, produisant une amplification de chaque signal qui permet d'améliorer la sensibilité (Finehout and Lee, 2004). L'ensemble du processus est effectué sous un vide extrême afin d'éviter toute contamination par des molécules de gaz neutre, avec lesquelles les ions de l'échantillon peuvent entrer en collision, ce qui modifierait leur trajectoire et produirait des produits non spécifiques (Bakhtiar and Tse, 2000; Hoffmann and Stroobant, 2007). L'amplificateur permet la transformation d'un courant ionique en un courant électrique envoyé à un système informatique qui analyse les données provenant du détecteur. Il représente alors ces données sous forme d'un graphique appelé spectre de masse qui reprend en abscisse les rapports m/z individuels des ions et en ordonnée leur abondance relative ou intensité relative. Les m/z des ions détectés peuvent finalement être comparés à ceux de bases de données afin d'identifier les molécules de l'échantillon analysé (Finehout and Lee, 2004).

Les analyseurs peuvent être couplés pour réaliser des analyses en tandem (MS/MS) qui fournissent des informations supplémentaires à propos de la structure ou de la séquence en acides

aminés d'une protéine (Finehout and Lee, 2004). Dans ce type d'approche, un premier analyseur sépare les ions (appelés ions précurseurs) qui sont ensuite détectés, amplifiés et analysés au cours de la première dimension (MS). Une cellule de fragmentation permet ensuite de fragmenter un ion spécifique après sa sélection. Cette fragmentation s'effectue par collision avec un gaz inerte et neutre qui ne réagit pas chimiquement avec les ions précurseurs. Dans le cas d'analyse MS/MS d'échantillons protéiques, ces cassures se produisent préférentiellement au niveau des liaisons peptidiques. Dans le cas d'identification de l'ensemble des protéines d'un protéome, les ions précurseurs (les peptides) seront sélectionnés et fragmentés individuellement. Cette fragmentation génère des ions secondaires qui sont ensuite accélérés et envoyés vers un second analyseur pour la seconde dimension de la MS/MS. Au cours de celle-ci, les fragments générés sont séparés sur base de leur m/z individuel avant leur détection et analyse. L'analyse s'opère de la même manière que pour la première dimension via les différents m/z et en considérant aussi les fragments de séquence obtenus dans cette seconde dimension. L'identification des molécules composant l'échantillon initial est alors obtenue via la comparaison à une base de données (par exemple les bases de données Mascot et X!Tandem pour l'identification de protéines). La MS/MS est aussi couramment utilisée pour obtenir la séquence en acides aminés des protéines permettant la reconstruction directe de la séquence et l'identification de nouvelles protéines (Wang et al., 2010). Il est important de noter que la spectrométrie de masse ne permet pas une quantification absolue directe compte tenu des différences en termes de détection et d'efficacité d'ionisation de différents peptides (Doucet and Overall, 2008; Nikolov et al., 2012). Deux peptides différents de même abondance n'ont en effet pas la même intensité de pic après analyse. Par contre, les différences d'intensité d'un même analyte entre différentes conditions reflètent précisément les différences d'abondance. On parlera alors de quantification relative qui consiste donc en un rapport d'abondance de l'analyte entre les conditions considérées, mais non d'une quantification absolue. Différentes stratégies ont été mises au point telles que le recours à des marqueurs isotopiques (iTRAQ, SILAC, ICAT par exemples) qui permettent l'analyse par le spectromètre de masse d'un même peptide présent dans différentes conditions ou échantillons au cours d'une même expérience, pour ensuite comparer son abondance entre ces conditions. Ce type de quantification permettra de dire que le peptide d'intérêt est n fois plus présent dans la condition a que dans la condition b , par exemple. Ce type d'approche permet un « profilage » quantitatif de milliers de peptides en une expérience unique.

3.2. L'iTRAQ-TAILS (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification - Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates)

Au vu de son caractère central dans le présent travail, l'iTRAQ-TAILS sera plus amplement détaillée dans cette section afin d'en faciliter la compréhension.

L'iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation) est un marqueur isotopique et isobarique. Il est constitué de trois parties (**Figure 18, A**) : un groupement fonctionnel réactif qui réagit spécifiquement avec les amines primaires (-NH₂) ; un groupement rapporteur, dont la masse varie de 114.1 à 117.1 Da et qui permet l'identification du peptide marqué via la spectrométrie de masse en tandem ; et un groupement « balance » dont la masse varie inversement à celle du rapporteur afin de conserver une masse totale identique de 145 Da au marqueur, peu importe celle du rapporteur (Ross et al., 2004). Les variations de masse du rapporteur et du groupement «balance » proviennent de la présence de certains isotopes ¹³C, ¹⁵N et ¹⁸O (**Figure 18, B**). L'avantage principal de l'iTRAQ est qu'il existe sous forme de multiplexes (de 4 ou 8 marqueurs différents selon le kit) permettant l'analyse en parallèle de 2 et jusqu'à 4 ou 8 conditions indépendantes selon le kit (Beck et al., 2012). Ces différents marqueurs sont dits isobariques parce qu'ils possèdent tous une masse moléculaire de 145 Da (pour le 4-plex) ou 305 Da (pour le 8-plex). Le réactif iTRAQ n'augmente donc pas la complexité peptidique des échantillons issus de multiples protéomes car il ne modifie pas différentiellement la masse des peptides. Il permet cependant de distinguer la condition de laquelle sont issus les peptides, et de déterminer leur abondance relative en comparant l'intensité des rapporteurs au sein des différentes conditions pour un peptide donné. Des peptides identiques marqués par des marqueurs iTRAQ différents ne sont donc pas discernables lors de la première dimension de spectrométrie de masse et seront détectés avec leur masse intrinsèque accrue de 145 Da (ou 305 Da), quel que soit l'échantillon dont ils sont issus. Ce n'est que lors de la seconde dimension MS/MS, après la fragmentation des peptides et des marqueurs iTRAQ, que les identifications pourront être effectuées (**Figure 18, C**) (Ross et al., 2004; Zieske, 2006). L'abondance relative de chacun des ions rapporteurs permettra donc de déterminer de manière directe quelle proportion de chaque peptide identifié est issue des différentes conditions expérimentales. Les produits de fragmentation des peptides permettront quant à eux à identifier la séquence des peptides et leur origine protéique. Cependant, aucune quantification absolue des peptides n'est effectuée.

Développée en 2010, l'iTRAQ-TAILS (Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates) est une technique de quantification relative à haut débit (Kleifeld et al., 2010; Kleifeld et al., 2011; Prudova et al., 2010). Elle se base sur des analyses en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et vise à mettre en évidence une différence d'abondance relative de peptides N-terminaux présents dans des échantillons contenant ou non une protéase d'intérêt. Dans ces conditions, tout peptide dont l'abondance relative est modifiée permet d'identifier la protéine dont il dérive qui, *de facto*, est un substrat potentiel de l'enzyme étudiée.

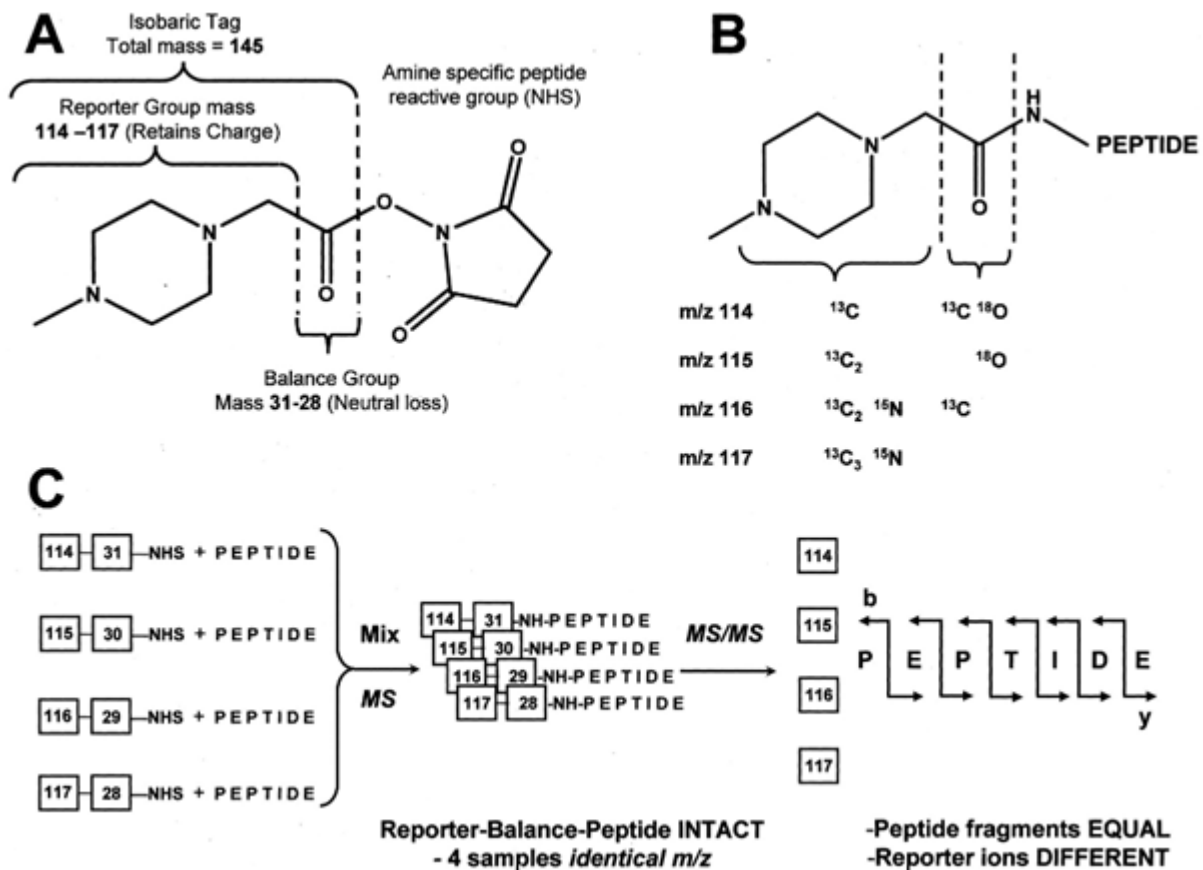


Figure 18: Représentation schématique du marqueur iTRAQ, de ses composants et de sa fragmentation en MS/MS (dans le cas de marqueurs composant le kit 4-plex)

(A) Diagramme représentant un marqueur iTRAQ, ses divers composants et leurs masses respectives. La molécule complète consiste en un groupement rapporteur, un groupe « balance » et un groupement réactif (N-hydroxy succinimide ou NHS) qui permet la liaison aux amines primaires des peptides. La masse globale du marqueur iTRAQ est gardée constante (145 Da) grâce à un enrichissement différentiel en isotopes ^{13}C , ^{15}N et ^{18}O des groupes rapporteur et balance, ce qui n'apporte aucune différence de masse au cours de la première dimension en MS de l'analyse (B). (C) Illustration du marquage isotopique utilisé pour obtenir quatre combinaisons isobariques de l'iTRAQ. Un mélange de quatre peptides identiques marqués séparément par chacun des quatre membres du multiplex est identifié comme un seul ion précurseur en MS car ils présentent un m/z identique. Lors de la fragmentation subséquente à la MS, la liaison établie entre le marqueur et le peptide se brise de manière similaire aux liaisons peptidiques. Suite à leur fragmentation, les quatre marqueurs présentent une masse distincte (de 114 à 117 Da) correspondant à celles des groupements rapporteurs en raison de la perte neutre du groupement balance. Cela permet l'identification de la condition expérimentale d'origine et une quantification relative du peptide considéré à partir des intensités relatives des ions rapporteurs. Les signaux provenant de fragments peptidiques ionisés restent quant à eux isobariques et sont utilisés pour identifier les protéines d'origine à l'aide de bases de données (Ross et al., 2004).

Au cours de la procédure d'iTRAQ-TAILS, les échantillons à analyser, contenant ou non la protéase d'intérêt, sont incubés dans des conditions (température, pH, salinité,...) favorables à son activité. Les échantillons sont ensuite réduits puis alkylés afin d'éviter la formation de complexes polypeptidiques. Les amines primaires (présentes aux extrémités N-terminales et sur les chaînes latérales des lysines) sont alors marquées spécifiquement, et dès lors bloquées, par des marqueurs isobariques iTRAQ spécifiques à chacune des conditions comparées (Figure 19) (Kleifeld et al., 2010; Kleifeld et al., 2011; Prudova et al., 2010). Les échantillons sont ensuite mélangés à proportions égales et digérés par une endopeptidase spécifique (la trypsine généralement) ce qui résulte en la formation de deux types de peptides : les peptides N-terminaux dont l'amine primaire est bloquée par l'iTRAQ, et les peptides internes comportant une amine primaire N-terminale libre nouvellement formée par

l'endopeptidase. Les peptides N-terminaux peuvent soit être des néo-N-termini générés par la protéase étudiée, soit être des peptides N-terminaux correspondant à l'extrémité N-terminale de la protéine native mature. Un enrichissement en peptides N-terminaux est ensuite réalisé par sélection négative au moyen d'un polymère spécifique HPG-ALD (hyperbranched polyglycerol-aldehyde) qui réagit avec les amines primaires libres et forme avec elles des liaisons covalentes. Ce polymère ne retiendra donc que les peptides tryptiques puisque les extrémités N-terminales initialement libres ont été marquées et bloquées par l'iTRAQ. Les échantillons enrichis en peptides d'intérêt sont alors analysés par MS/MS. Un rapport d'abondance est ainsi calculé pour chaque peptide identifié et reflète l'abondance relative de ce peptide dans la condition avec protéase par rapport à la condition non traitée (**Figure 20**). Un rapport avoisinant 1 traduit une abondance du peptide d'intérêt globalement similaire dans les deux conditions, avec et sans protéase. C'est notamment le cas pour les peptides N-terminaux matures ou issus d'une protéolyse indépendante de la protéase étudiée. Un rapport « protéase / contrôle » supérieur à 1 indique que la protéine dont il est issu pourrait être un substrat de la protéase d'intérêt puisque le peptide est plus abondant en présence de la protéase étudiée. Par ailleurs, l'extrémité N-terminale du peptide identifié marque le site de clivage. Enfin, un rapport « protéase / contrôle » inférieur à 1 traduit une disparition du peptide d'intérêt en présence de la protéase. Ceci peut résulter d'un clivage par la protéase d'intérêt au sein du peptide concerné, constituant ainsi un indice indirect de l'activité enzymatique. En théorie, à tout peptide caractérisé par un rapport supérieur ou inférieur à 1 devrait correspondre un autre peptide de la même protéine avec un rapport inverse. Bien que ce soit parfois le cas, il est rare que les analyses MS/MS permettent leur détection simultanée en raison des limitations (taille, ionisation, masquage par d'autres peptides plus abondants ...) déjà évoquées ci-dessus.

L'iTRAQ-TAILS a permis l'identification de nombreux substrats de diverses enzymes incluant plusieurs MMP (Prudova et al., 2010; Schlage et al., 2015) ou cathepsines (Prudova et al., 2016) *in vitro* mais a également été utilisée sur des fluides biologiques *in vivo* (Sabino et al., 2015). Elle a été employée au cours de ce travail pour tenter de mettre en évidence de nouveaux substrats des ADAMTS2, 3 et 14, et ainsi de mieux définir leurs diverses fonctions.

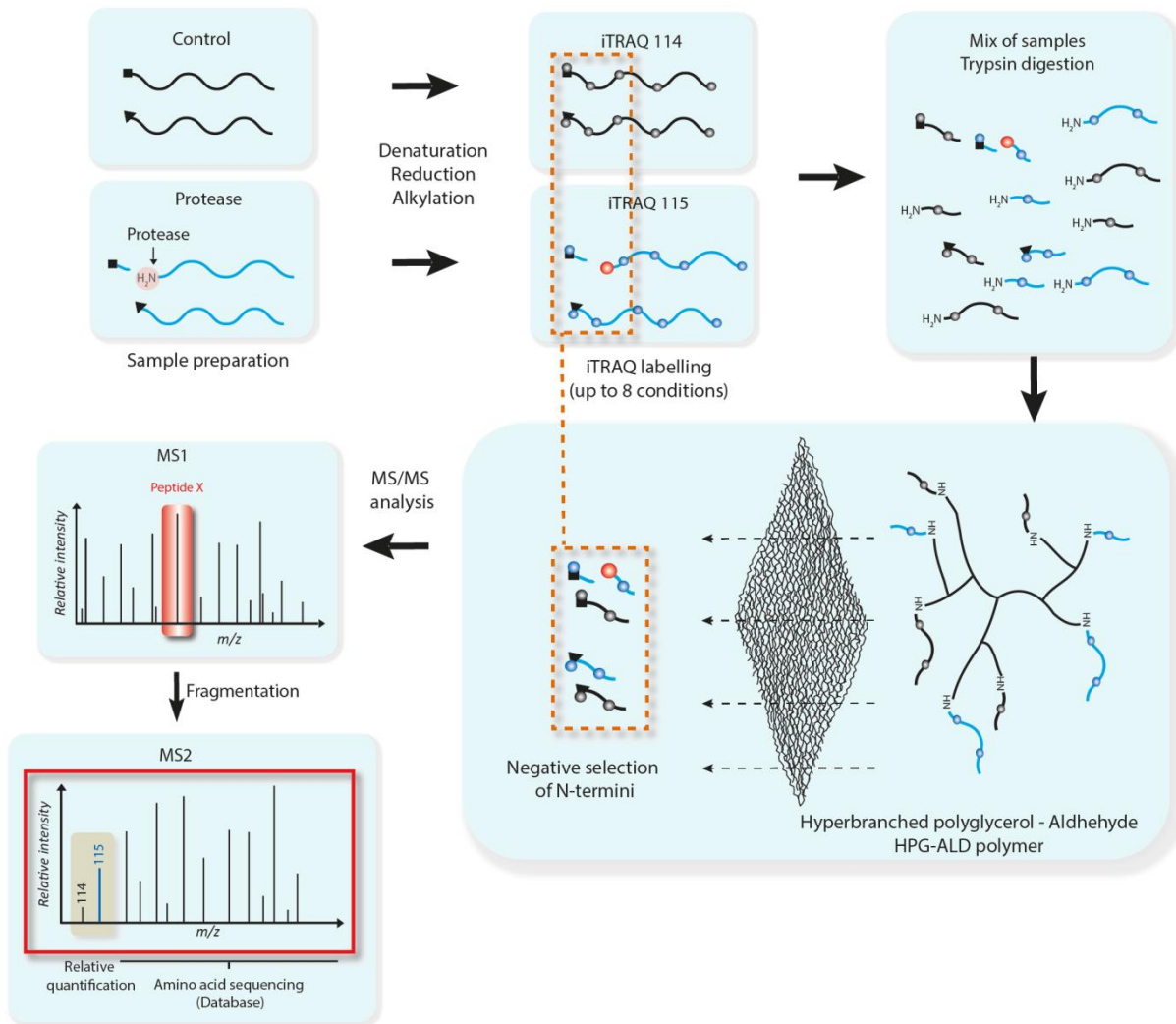


Figure 19 : Représentation schématique du protocole expérimental d'iTRAQ-TAILS.

Les protéines des échantillons contrôle et traité par la protéase d'intérêt subissent séparément un traitement consistant en leur dénaturation, réduction et alkylation. Chacun d'eux est alors marqué par un marqueur iTRAQ spécifique qui réagit avec les amines primaires localisées sur la chaîne latérale des lysines ainsi qu'aux extrémités N-terminales matures ou générées par la protéase (néo-N-termini). Dans cet exemple, les marqueurs iTRAQ 114 (cercles gris) et 115 (cercles bleus) ont été respectivement utilisés pour la condition contrôle et pour la condition « protéase ». Les néo-N-termini marquées par l'iTRAQ 115 sont illustrés par un cercle rouge. Après marquage des échantillons, ceux-ci sont mélangés en proportions équivalentes et digérés à la trypsine. Les échantillons sont ensuite mis en présence d'un polymère HPG-ALD (Hyperbranched polyglycerol – aldehyde). Celui-ci réagit avec les amines primaires et retient donc les peptides générés par la trypsine. A l'inverse, les N-termini (marqués par iTRAQ) ne réagissent pas et sont négativement sélectionnés. Ce mélange enrichi en peptides N-terminaux est finalement analysé par MS/MS, ce qui permet à la fois l'identification et la quantification relative des peptides marqués.

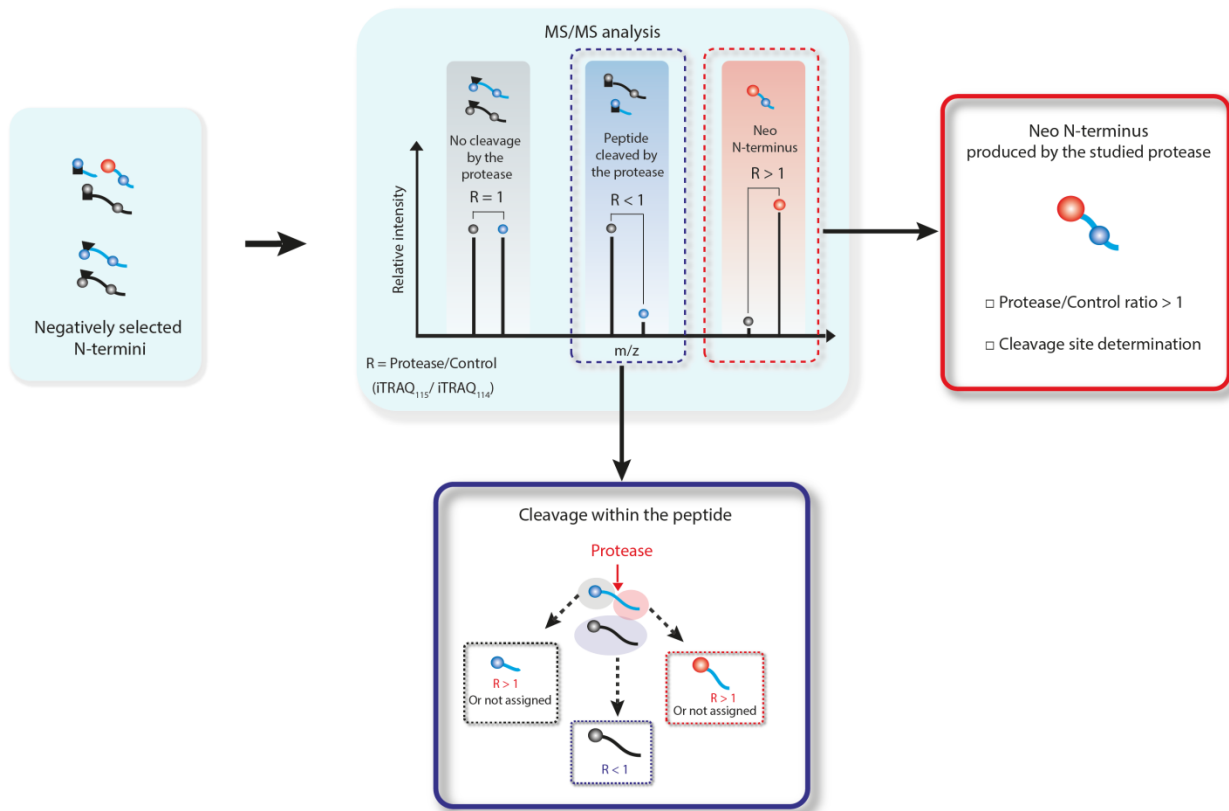


Figure 20: Représentation schématique et explication des différents types de rapport « protéase/contrôle » obtenus au cours d'une expérience d'iTRAQ-TAILS.

L'analyse MS/MS des peptides N-terminaux résultant de la préparation des échantillons en iTRAQ-TAILS aboutit à la détermination de l'abondance relative, en présence et en absence de la protéase étudiée, de chaque peptide identifié. Un rapport proche de 1 signifie qu'il n'y a aucun effet de la protéase sur la protéine identifiée. Un rapport « protéase/contrôle » significativement supérieur à 1 suggère que le peptide identifié est probablement généré par la protéase. Dans ce cas, l'extrémité N-terminale du peptide marque le site de clivage. Un rapport inférieur à 1 peut s'expliquer par un clivage au sein du peptide identifié par la protéase mais également par un clivage à distance entraînant une dégradation plus complète du substrat par d'autres protéases. Dans ce cas, l'identification précise du site de clivage est impossible. Théoriquement, à tout peptide avec un rapport inférieur à 1 devraient correspondre deux peptides avec un rapport supérieur à 1, provenant de la genèse des deux peptides par le clivage de la protéine initiale. Dans la pratique, ce n'est que très rarement le cas en raison de limitations intrinsèques de la technique (taille des peptides adéquate, marquage iTRAQ, résolution insuffisante ...).

PARTIE 2 :
CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET
OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les ADAMTS2, 3 et 14 sont trois métalloprotéases partageant des séquences homologues et une structure identique. Au début de ce travail, elles étaient principalement connues pour leur activité aminoprocollagène peptidase. L'ADAMTS2 est l'enzyme principalement responsable du clivage de l'aminopropeptide des procollagènes de type I et III dans la peau, mais elle présente également une activité envers les collagènes de types II et V. L'Ehlers-Danlos de type dermatosparactique, une maladie génétique causée par des mutations au sein du gène de l'ADAMTS2, est caractérisée par la présence dans le derme de fibres de collagènes extrêmement désorganisées menant à une fragilité cutanée sévère. L'étude de souris déficientes en Adamts2 a par la suite confirmé que la peau est l'organe le plus fortement altéré, même si d'autres tissus, dont la vessie et l'aorte, sont également affectés. A l'inverse, le tendon et l'os, pourtant riches en collagène, ne présentent pas de défauts majeurs. De manière totalement inattendue, il s'est avéré que les mâles déficients en ADAMTS2 sont également stériles. Ces diverses observations suggéraient une compensation partielle et variable de l'absence d'ADAMTS2 par l'ADAMTS3 et/ou l'ADAMTS14, mais indiquaient également l'existence de fonctions de l'ADAMTS2 indépendantes de son activité aminoprocollagène peptidase. Les connaissances concernant ces deux autres ADAMTS demeuraient toutefois relativement sommaires. Il avait notamment été suggéré que l'ADAMTS3 était l'enzyme responsable du clivage du propeptide aminoterminal du procollagène de type II dans le cartilage et du procollagène de type I au cours du développement embryonnaire, avec une légère activité sur le collagène de type III. De même l'ADAMTS14 présente une faible activité aminoprocollagène peptidase sur le collagène de type I, mais son expression est très faible au cours du développement et elle est le plus souvent co-exprimée avec l'ADAMTS2 chez l'adulte.

Au vu des données de la littérature, il semblait clair que les ADAMTS2, 3 et 14 sont impliquées dans des processus autres que le clivage des procollagènes fibrillaires. A titre d'exemples, des données issues du laboratoire ou de la littérature avaient établi des liens entre l'ADAMTS2 et la survenue d'accidents vasculaires cérébraux ou le développement d'une fibrose hépatique. Ses rôles anti-angiogènes et anti-tumoraux avaient également été démontrés. Les fonctions de l'ADAMTS3 demeuraient quant à elles peu connues à l'entame de ce travail puisque ce n'est que contemporanément à notre étude qu'a été démontrée sa capacité à réguler la lymphangiogenèse par clivage du pro-VEGF-C en VEGF-C actif. Concernant l'ADAMTS14, des études d'association génétique avaient indiqué sa possible implication dans la sclérose en plaque, l'ostéoarthrite chez la femme et divers cancers. Compte tenu de son profil d'expression, il avait également été suggéré que son activité soit partiellement redondante à celle de l'ADAMTS2.

Ce travail avait donc pour **objectif principal d'identifier le répertoire de substrats des ADAMTS2, 3 et 14 au moyen de la technique d'iTRAQ-TAILS**, puis de vérifier l'impact biologique du clivage de ces substrats afin **de déterminer l'ensemble de leurs fonctions spécifiques ou communes**.

Les résultats de notre étude ont été divisés en trois sections :

La première partie de ce travail a consisté en l'analyse des répertoires de substrats des ADAMTS2, 3 et 14 *in vitro*, en se basant sur des échantillons de milieux conditionnés par des fibroblastes co-cultivés avec des cellules sur-exprimant l'une des trois ADAMTS d'intérêt. Il est à noter que c'était la première fois que la technique d'iTRAQ-TAILS était utilisée au laboratoire et que de multiples mises au point et validations ont donc été nécessaires.

La seconde partie de ce travail a porté sur les fonctions des ADAMTS2 et 14 *in vivo*, plus particulièrement dans la peau. Elle est basée sur des analyses comparatives par N-TAILS

d'échantillons de peaux de souris de type sauvage, déficientes en ADAMTS2, déficientes en ADAMTS14 ou doublement déficientes en ADAMTS2 et ADAMTS14.

Enfin, la dernière partie de ce travail porte sur les multiples collaborations en cours et qui concernent l'étude des répertoires de substrats d'autres métalloprotéases (MT4-MMP, ADAM28, ADAMTS7 et 12) à l'aide de l'iTRAQ-TAILS.

PARTIE 3 : RESULTATS

Chapitre 1 : détermination des nouvelles fonctions des aminoprocollagène peptidases par élargissement de leur répertoire de substrats

Les aminoprocollagène peptidases (ADAMTS2, 3 et 14) doivent leur nom à leur capacité à cliver l'aminopropeptide des procollagènes fibrillaires, une étape essentielle pour la formation des fibres de collagènes. La littérature les concernant indique toutefois qu'elles pourraient être impliquées dans des processus biologiques indépendant des collagènes, ce qui suggère qu'elles seraient capables de cliver un répertoire de substrats plus large qu'initialement escompté.

Cette partie de nos travaux, qui se fonde sur des analyses protéomiques par iTRAQ-TAILS, avait pour but d'identifier d'autres substrats des ADAMTS2, 3 et 14, à partir d'échantillons de milieux conditionnés par des cultures cellulaires.

A. Résumé des résultats

- **Analyse des sécrétomes par iTRAQ-TAILS et mise en évidence des substrats potentiels des aminoprocollagène peptidases.**

Cette étude s'est principalement basée sur l'analyse N-TAILS de milieux conditionnés par des co-cultures entre des fibroblastes dermatosparactiques et des cellules humaines embryonnaires de rein 293 (HEK293) surexprimant l'ADAMTS2, 3 ou 14 de manière inductible par la doxycycline. Ce modèle a été choisi pour deux raisons principales :

- Les fibroblastes comptent parmi les cellules qui expriment le plus d'ADAMTS2. Ils présentent donc une haute probabilité de produire également certains de ses substrats. De plus, les fibroblastes dermatosparactiques ne produisent pas d'ADAMTS2 active (en raison d'une mutation) et ne secrètent pas de quantité significative d'ADAMTS3 ou 14, ce qui devrait favoriser la présence de substrats endogènes non clivés.
- Un système d'expression inductible a été préféré car il permet d'utiliser une même lignée cellulaire pour le contrôle négatif (absence de protéase recombinante) et l'échantillon contenant la protéase (en présence d'inducteur), ce qui prévient toute différence qui aurait pu être liée à l'utilisation de lignées cellulaires différentes, contrôle ou exprimant l'enzyme de manière constitutive.

Après la procédure de préparation des sécrétomes et leur marquage par iTRAQ, l'analyse des différents peptides identifiés par MS/MS a généré une liste de substrats potentiels identifiés pour chacune des ADAMTS étudiées. Ces substrats potentiels présentaient un rapport « protéase / contrôle » (P/C) supérieur à une valeur seuil fixée à 3 sigmas à partir de la distribution normale des peptides N-terminaux naturels (issus des protéines matures). Ces listes comprennent respectivement 8, 17 et 22 substrats potentiels pour les ADAMTS2, 3 et 14 (**Tableau 8**). On y retrouve les sites de clivage déjà connus des propeptides aminoterminaux des procollagènes $\alpha 1(I)$ et $\alpha 2(I)$ (Bekhouche and Colige, 2015), ce qui démontre la validité de l'approche méthodologique. Les sites de clivage des aminopropetides des procollagènes $\alpha 1(V)$ et $\alpha 2(V)$ n'avaient jamais été décrits précisément et ont pu être identifiés au cours de cette analyse. En plus de ces sites connus ou attendus, nous avons

également identifié un site de clivage au niveau du propeptide carboxyterminal du procollagène $\alpha 1(III)$ et au sein d'autres protéines jouant un rôle dans l'architecture et le remodelage de la MEC (fibronectine, CTGF (Connective Tissue Growth Factor), lysyl oxidase, lysyl oxidase-like 1, décorine, versican, perlécan) ou en lien avec des voies de signalisation (DKK3 (Dickkopf Related Protein 3), LTBP1 (Latent TGF- β Binding Protein 1) et TGF- β RIII). Bien que l'identification de ces substrats candidats ait été effectuée sur base de critères stricts, des validations attestant de leur clivage ont été réalisées. Cinq de ces substrats en lien avec la structure de la MEC et avec la régulation de voies de signalisation ont donc été validés dans un premier temps.

ADAMTS2		ADAMTS3		ADAMTS14	
Name	P:C (PSMs)	Name	P:C (PSMs)	Name	P:C (PSMs)
<i>Collagen α-1(I) chain</i>	20.1 (1)	<i>ADAM10</i>	5.7 (3)	<i>C3a-R</i>	2.5 (1)
<i>Collagen α-2(I) chain</i>	35.0 (1)	<i>ADAMTS1</i>	35.0 (3)	<i>Calsyntenin-1</i>	6.4 (1)
<i>Collagen α-1(III) chain</i>	1.7 (3)	<i>Clusterin</i>	35.0 (1)	<i>Collagen α-1(I) chain</i>	9.1 (2)
<i>Collagen α-2(V) chain</i>	35.0 (3)	<i>Collagen α-1(I) chain</i>	35.0 (8)	<i>Collagen α-2(I) chain</i>	35.0 (3)
<i>Collagen α-2(VI) chain</i>	2.0 (1)	<i>Collagen α-2(I) chain</i>	35.0 (6)	<i>Collagen α-1(II) chain</i>	4.4 (1)
<i>Collagen α-3(VI) chain</i>	2.0 (3)	<i>Collagen α-1(III) chain</i>	2.0 (3)	<i>Collagen α-1(III) chain</i>	2.7 (2)
<i>Decorin</i>	35.0 (1)	<i>Collagen α-1(V) chain</i>	4.4 (1)	<i>Collagen α-2(IV) chain</i>	3.6 (1)
<i>DKK3</i>	4.7 (3)	<i>CTGF</i>	7.9 (1)	<i>Collagen α-1(V) chain</i>	5.4 (4)
		<i>Fibronectin</i>	35.0 (1)	<i>Collagen α-2(V) chain</i>	2.7 (4)
		<i>Fibulin-3</i>	35.0 (1)	<i>Collagen α-1(XVIII) chain</i>	7.2 (2)
		<i>Granulins</i>	35.0 (3)	<i>Decorin</i>	3.7 (1)
		<i>HLA-A</i>	35.0 (1)	<i>DKK3</i>	7.0 (1)
		<i>LTBP1</i>	18.7 (2)	<i>Fibronectin</i>	4.6 (1)
		<i>POTEJ</i>	22.7 (3)	<i>Fibulin-2</i>	3.6 (1)
		<i>Prosaposin</i>	5.1 (6)	<i>HLA-A</i>	6.5 (1)
		<i>TGF-β RIII</i>	35.0 (2)	<i>IGFBP5</i>	5.5 (8)
		<i>Thrombospondin-1</i>	3.1 (2)	<i>LTBP1</i>	3.5 (1)
				<i>LTBP2</i>	2.5 (1)
				<i>Lysyl oxidase</i>	2.8 (2)
				<i>Lysyl oxidase homolog 1</i>	5.7 (2)
				<i>Perlecan</i>	6.3 (4)
				<i>Versican core protein</i>	8.5 (2)

Tableau 8 : Substrats potentiels des ADAMTS2, 3 et 14 révélés par iTRAQ-TAILS et présentant les plus hauts rapports Protéase / Contrôle (P/C).

Ces rapports P/C sont indiqués pour chacun des substrats identifiés ainsi que le nombre de spectres (PSMs) observés par MS/MS.

- **Validation de protéines structurelles de la MEC comme substrats des aminoprocollagène peptidases**

C-propeptide du collagène de type III

A ce jour, seules la bone morphogenetic protein-1 (BMP-1), les tolloid-like proteinases et les méprines - α et - β étaient connues pour cliver le propeptide carboxyterminal du procollagène de type III (Greenspan, 2005; Vadon-Le Goff et al., 2015). Si le clivage identifié par iTRAQ-TAILS au début du carboxypropeptide (Gly1221-Asp1222) du collagène III était avéré, il signifierait que les aminoprocollagènes peptidases sont capables d'opérer le clivage des deux propeptides du procollagène de type III sans le concours d'autres enzymes. Afin de confirmer le clivage identifié, un « mini » procollagène de type III recombinant formé par la fin de la triple hélice et le domaine carboxyterminal (PCIII) a été incubé avec l'ADAMTS2 ou l'ADAMTS14, en absence ou présence d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), un inhibiteur des métalloprotéases (**Figure 21, A-B**). En

SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, l'apparition d'une bande protéique aux alentours de 33kDa correspondant au CP-III traduit un clivage en présence d'ADAMTS2, confirmant le clivage identifié par iTRAQ-TAILS. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'ADAMTS14 (résultats non présentés).

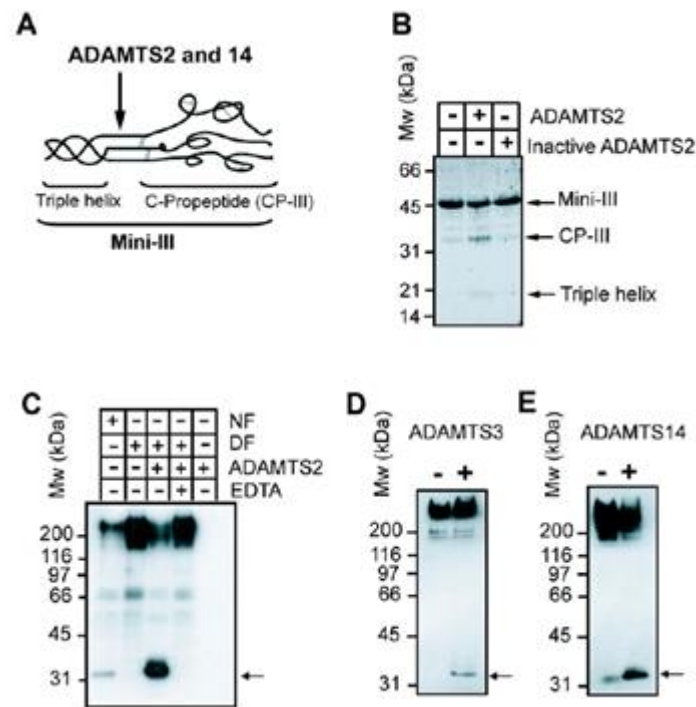


Figure 21: Validation des clivages de substrats potentiels impliqués dans la structure de la MEC: C-propeptide du collagène de type III (A-B) et fibronectine (C-E).

(A) Représentation schématique du « mini » procollagène de type III utilisé. (B) SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie illustrant le clivage *in vitro* du mini-III recombinant par l'ADAMTS2. (C-E) Immunoblots montrant les profils électrophorétiques de la fibronectine en présence ou en absence d'ADAMTS2 (C), d'ADAMTS3 (D) ou d'ADAMTS14 (E). (C) Analyses de la fibronectine présente dans les sécrétomes de fibroblastes normaux (NF) ou dermatosparactiques (DF) incubés avec de l'ADAMTS2 purifiée recombinante active ou inhibée par l'EDTA. Analyses de la fibronectine présente dans les sécrétomes de cellules HEK exprimant l'ADAMTS3 (D) ou l'ADAMTS14 (E) de manière dépendante de la doxycycline. Le clivage se traduit par une diminution de l'intensité de la protéine de haut poids moléculaire (>200 kDa) (C) et par l'apparition d'un peptide de plus petite taille (C-E).

Fibronectine

La fibronectine est un composant essentiel de la MEC et est également présente dans le sang où elle participe au processus de coagulation. Les validations de clivage ont été notamment effectuées par western blottings sur des milieux conditionnés par des fibroblastes humains normaux ou dermatosparactiques, ou produits par des co-cultures entre fibroblastes et cellules HEK293 capables de sécréter les ADAMTS2, 3 ou 14 de manière inductible. L'apparition d'une bande protéique à environ 33 kDa en présence de ces ADAMTS confirme les résultats d'iTRAQ-TAILS et démontre que la fibronectine est un substrat de ces trois ADAMTS (**Figure 21, C-E**).

- **Validation de substrats en lien avec des voies de signalisation**

Nous nous sommes également intéressés aux substrats candidats impliqués dans des voies de signalisation, et particulièrement la voie du TGF- β . Le clivage potentiel de trois protéines intervenant dans cet axe a été étudié (**Figure 22**): **DKK3 (A)**, **LTBP1 (B-C)**, et **TGF- β RIII (D)**.

DKK3

La protéine DKK3 recombinante humaine a été incubée, en présence ou en absence d'EDTA, avec l'ADAMTS2 ou 14 purifiée. L'analyse sur gel indique clairement la présence d'un clivage par les enzymes actives (en absence d'EDTA) (**Figure 22, A**). Les produits clivés ont ensuite été caractérisés par iTRAQ-ATOMS, une autre technique de spectrométrie de masse. Le site de clivage identifié (Met126-Val127) correspond à celui identifié par iTRAQ-TAILS.

LTBP1

Les analyses iTRAQ-TAILS concernant la protéine LTBP1 avaient révélé des sites potentiels de clivage de LTBP1 différents pour les ADAMTS3 et 14, et aucun pour l'ADAMTS2. La confirmation de ces résultats par western blotting est délicate car elle doit se réaliser en conditions non réductrices, afin de conserver le complexe LLC (large latent complex) de haut poids moléculaire formé par la protéine LTBP1 et le pro-TGF- β (TGF- β associé à son propeptide) (**Figure 22, B-C**). Ces analyses démontrent que l'ADAMTS3 et de l'ADAMTS14 clivent le complexe LLC, mais génèrent des profils électrophorétiques différents qui traduisent l'existence de sites de clivage propres à chaque enzyme.

TGF- β RIII

Le clivage du récepteur de type III du TGF- β (TGF- β RIII) a été vérifié par western blotting sur des milieux conditionnés de HEK293 exprimant les ADAMTS2, 3 ou 14 de manière inductible (**Figure 22, D**). Le TGF- β RIII est une protéine transmembranaire qui ne peut être identifiée dans le sécrétome qu'après clivage protéolytique. Un fragment d'environ 50 kDa est visible en présence de chacune des trois ADAMTS, démontrant que le TGF- β RIII est un substrat de ces trois ADAMTS. Une analyse plus précise par « Liquid chromatography-tandem mass spectrometry » a ensuite confirmé le site de clivage entre le domaine « Endogline-like » et le domaine « Zona Pelucida » (Pro383-Ala384) préalablement déterminé par iTAQ-TAILS.

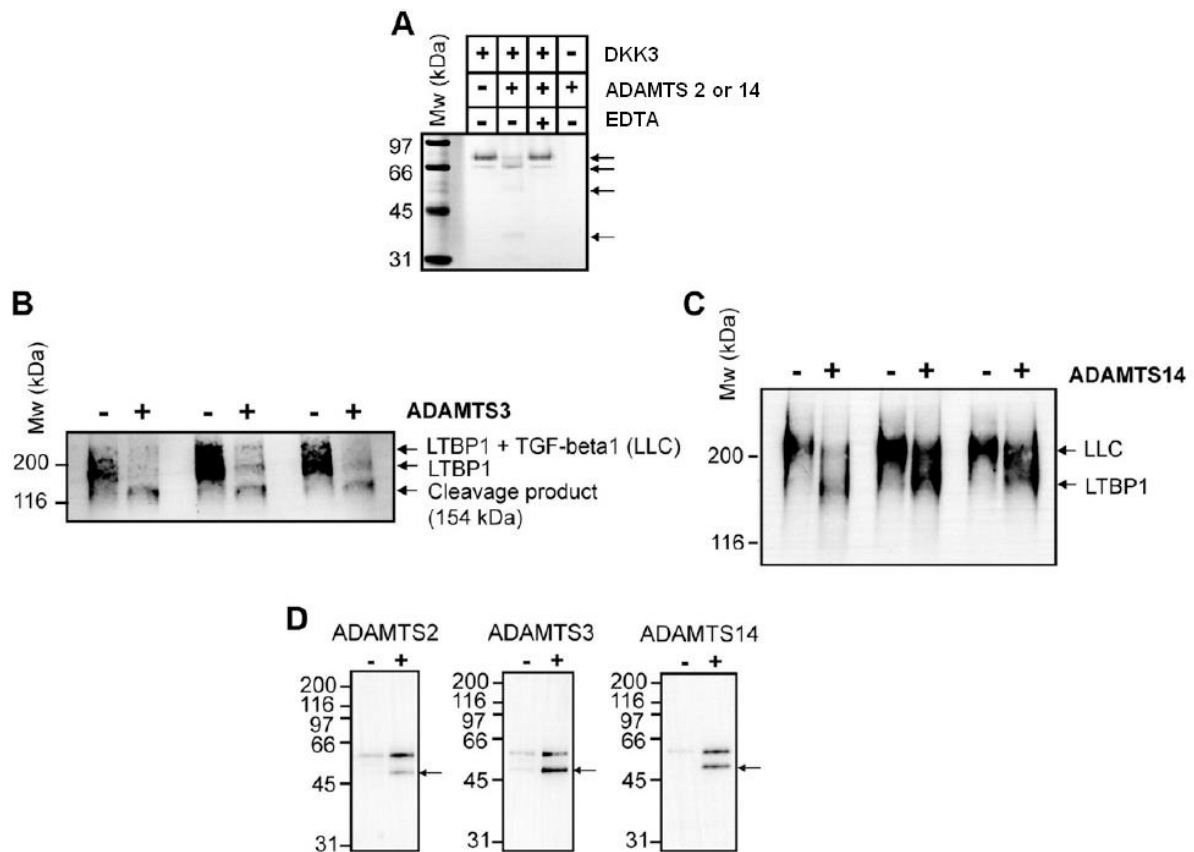


Figure 22: Validation des clivages par les ADAMTS2, 3 ou 14 de substrats potentiels impliqués dans des voies de signalisation.

(A) Digestion *in vitro* de DKK3 recombinant humain par les ADAMTS2 ou 14 recombinantes purifiées, illustrée par des modifications des profils électrophorétiques (voir flèches). Les protéines sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie d'un SDS-PAGE. (B-C) Western blotting utilisant un anticorps anti-LTBP1 humain sur du sécrétome de cellules HEK293 exprimant l'ADAMTS3 (B) ou l'ADAMTS14 (C) de manière dépendante de la doxycycline. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et les expériences ont été réalisées en conditions non réductrices afin de mettre en évidence le Large Latent Complex (LLC) comprenant la protéine LTBP1 associée au pro-TGF- β . (D) Western blotting mettant en évidence le TGF- β RIII humain présent dans le sécrétome de cellules HEK exprimant l'ADAMTS2, 3 ou 14 de manière dépendante de la doxycycline. Les flèches indiquent les formes clivées du TGF- β RIII par les ADAMTS respectives.

- **Implication de l'ADAMTS2 (et potentiellement des ADAMTS3 et 14) dans la voie du TGF- β**

En raison de la nature des substrats identifiés et afin de vérifier l'effet biologique de leur clivage, nous avons déterminé l'impact de l'ADAMTS2 sur les régulations opérées par les TGF- β 1 et - β 2. Des fibroblastes normaux, préalablement transfectés par des siRNA contrôles (SCR) ou ciblant l'ADAMTS2 (siTS2) (**Figure 23, A**), ont été cultivés en présence de TGF- β 1 ou - β 2. Les expressions de deux gènes cibles reconnus de la voie des TGF- β , le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) et l' α -SMA (α -Smooth Muscle Actin), ont ensuite été mesurées par RT-PCR. L'effet des TGF- β 1 et 2 sur ces deux marqueurs était réduit en absence d'ADAMTS2 (**Figure 23, B-C**). Au cours d'une expérience complémentaire, les fibres de stress formées par l' α -SMA ont été visualisées par immunofluorescence après un traitement identique à celui décrit ci-avant. Les fibres de stress étaient moins présentes et moins marquées lorsque l'expression de l'ADAMTS2 était réprimée (**Figure 23, D**). L'ensemble de ces

données indiquent donc que l'absence d'expression de l'ADAMTS2 réduit la réponse au TGF- β et qu'elle pourrait donc, ainsi que l'ADAMTS3 et 14 par analogie, avoir un effet positif sur cette voie de signalisation.

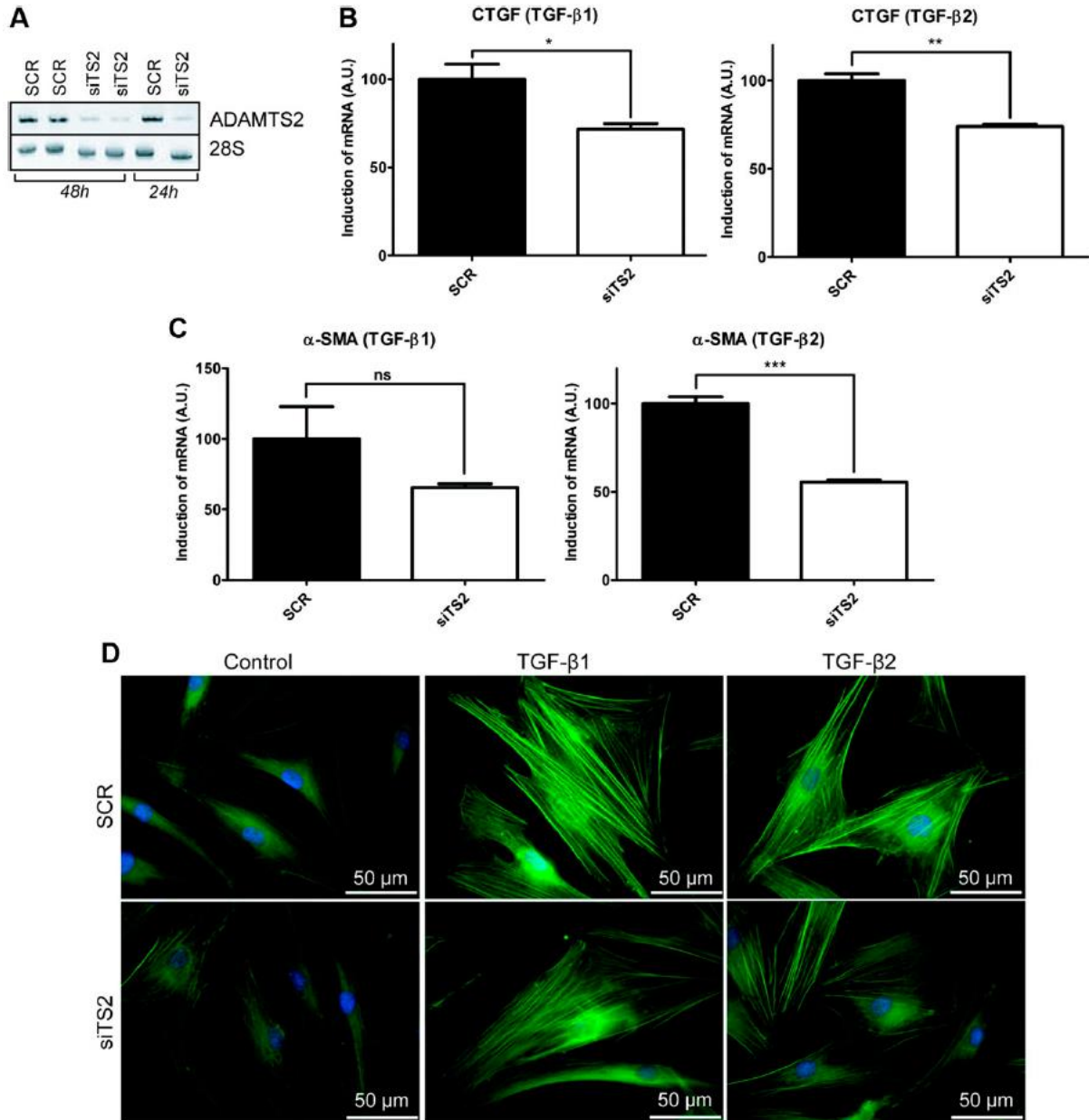


Figure 23: Stimulation de la réponse au TGF- β de fibroblastes humains par l'ADAMTS2.

(A) Réduction de l'expression de l'ADAMTS2 par des fibroblastes humains normaux mesurée par RT-PCR 24 et 48h après transfection par des siARN spécifiques (siTS2). Des fibroblastes transfectés par des siARN contrôles (SCR) ont servi de référence. (B-C) Evaluation, par RT-PCR, de la réponse de fibroblastes humains au TGF- β 1 ou TGF- β 2 par mesure de l'expression de deux gènes cibles de la voie des TGF- β : le CTGF (B) et l' α -smooth muscle actin (α -SMA, C). Les fibroblastes humains ont été transfectés avec un siRNA contrôle (SCR) ou un siRNA ciblant l'ADAMTS2 (siTS2) et ont ensuite été traités pendant 48 heures avec 1ng/ml de TGF- β 1 (graphiques de gauche) ou de TGF- β 2 (graphiques de droite). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SD (n=3, test de Student, différences relatives au contrôle SCR : * p< 0.05 ; ** p< 0.01 ; *** p< 0.001) (D). Mise en évidence par immunofluorescence de l' α -SMA présente (FITC, vert) dans des fibroblastes humains ayant subi le même traitement qu'en (C). Les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu).

- **Conclusions**

Au début de ce travail, les ADAMTS2, 3 et 14 étaient considérées comme des enzymes ne possédant comme substrats que les procollagènes fibrillaires. Notre étude a permis d'infirmier ce dogme en prouvant qu'elles sont également des acteurs-clés de l'organisation et du remodelage de la matrice extracellulaire par leur capacité à cliver des macromolécules de structure, telle la FN, mais également des molécules impliquées dans des voies de signalisation telles que DKK3, LTBP1 et TGF- β RIII. Les résultats démontrent également que l'ADAMTS2, et par analogie potentiellement les ADAMTS3 et 14, participent à la régulation de la voie du TGF- β et pourraient donc être impliquées à de multiples niveaux dans les mécanismes de réparation tissulaire, tant physiologiques que pathologiques. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication reprise ci-après.

B. Publication des résultats

The FASEB Journal article fj.15-279869. Published online January 6, 2016.

The FASEB Journal • Research Communication

Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets

Mourad Bekhouche,^{*,1,2} Cedric Leduc,^{*,1} Laura Dupont,^{*} Lauriane Janssen,^{*} Frederic Delolme,^{†,‡} Sandrine Vadon-Le Goff,[†] Nicolas Smargiasso,[§] Dominique Baiwir,[‡] Gabriel Mazzucchelli,[§] Isabelle Zanella-Cleon,[‡] Johanne Dubail,^{*,3} Edwin De Pauw,[§] Betty Nusgens,^{*} David J. S. Hulmes,[†] Catherine Moali,^{†,4} and Alain Colige^{*,2,4}

^{*}Laboratory of Connective Tissues Biology, [§]Mass Spectrometry Laboratory, GIGA Proteomics, and [‡]GIGA Proteomic Facility, GIGA-Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics, University of Liège, Liège, Belgium; [†]Tissue Biology and Therapeutic Engineering, Centre National de la Recherche Scientifique/ University of Lyon Unité Mixte de Recherche 5305, Lyon, France; and [‡]Protein Science Facility, Institute for the Biology and Chemistry of Proteins, Unité Mixte de Service 3444, Lyon, France

ABSTRACT A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif (ADAMTS)2, 3, and 14 are collectively named procollagen N-proteinases (pNPs) because of their specific ability to cleave the aminopropeptide of fibrillar procollagens. Several reports also indicate that they could be involved in other biological processes, such as blood coagulation, development, and male fertility, but the potential substrates associated with these activities remain unknown. Using the recently described N-terminal amine isotopic labeling of substrate approach, we analyzed the secretomes of human fibroblasts and identified 8, 17, and 22 candidate substrates for ADAMTS2, 3, and 14, respectively. Among these newly identified substrates, many are components of the extracellular matrix and/ or proteins related to cell signaling such as latent TGF- β binding protein 1, TGF- β RIII, and dickkopf-related protein 3. Candidate substrates for the 3 ADAMTS have been biochemically validated in different contexts, and the implication of ADAMTS2 in the control of TGF- β activity has been further demonstrated in human fibroblasts. Finally, the cleavage site specificity was assessed showing a clear and unique preference for non-polar or slightly hydrophobic amino acids. This work shows that the activities of the pNPs extend far beyond the classically reported processing of the aminopropeptide of fibrillar collagens and that they should now be considered as multi-level regulators of matrix deposition and remodeling.—Bekhouche, M., Leduc, C., Dupont, L., Janssen, L., Delolme, F., Vadon-Le Goff, S., Smargiasso, N., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., Zanella-Cleon, I., Dubail, J., De Pauw, E., Nusgens,

B., Hulmes, D. J. S., Moali, C., Colige, A. Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets. *FASEB J.* 30, 000-000 (2016). www.fasebj.org

Key Words N-TAILS · β taglycan · LTBP1 · DKK3

Extracellular matrix (ECM) remodeling is a crucial step in many pathophysiological events such as development, wound healing, fibrosis, and cancer. This complex and well-orchestrated process is constantly regulated through a dynamic crosstalk between cells and their environment. Extracellular proteinases and their respective networks are essential to this process through the degradation of matrix components, release of trapped cytokines and growth factors, generation of cryptic bioactive peptides from larger molecules, and maturation of procollagens. Fibrillar collagens are the most abundant proteins in connective tissues. They are synthesized as trimeric procollagen molecules encompassing the typical central triple-helical domain and terminal propeptides at each extremity. The cleavage of these N- and C-terminal propeptides is required to allow the spontaneous assembly of mature trimers into perfectly organized collagen fibrils and fibers. The procollagen N-proteinases (pNPs), a disintegrin and

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: Laboratory of Connective Tissues Biology, Tour de Pathologie B23/3, Avenue de l'Hôpital, 3, 4000 Sart Tilman, Belgium. E-mail: mouradbekhouche2@gmail.com (M.B.); acolige@ulg.ac.be (A.C.)

³ Current affiliation: Department of Biomedical Engineering, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA.

⁴ These authors contributed equally to this work.

doi: 10.1096/fj.15-279869

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

Abbreviations: ADAMTS, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif; ATOMS, amino-terminal-oriented mass spectrometry of substrate; BiNGO, Biological Networks Gene Ontology; BMP, bone morphogenetic protein; CP-III, C-propeptide of procollagen III; CTGF, connective tissue growth factor; DF, dermatosparactic fibroblast; (continued on next page)

metalloproteinase with thrombospondin type I motif (ADAMTS) 2, 3, and 14, are principally known for their ability to cleave the aminopropeptide of fibrillar collagen precursors (types I, II, III, and V) (1). The critical role of ADAMTS2 in this process is illustrated in the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome, a genetic disease caused by mutations in the *Adants2* gene. In the absence of ADAMTS2 activity, pN-procollagen (collagen still retaining its N-terminal extension) accumulates, leads to the formation of highly disorganized collagen fibers, and ultimately, causes the extreme skin fragility that is the hallmark of the disease (2).

Additional reports showing the sterility of *Adants2*-deficient male mice (3), expression of ADAMTS2 by macrophages (4), and recently described genetic association between the *Adants2* gene and pediatric stroke (5) indicate that the functions and substrate repertoire of ADAMTS2 are probably not limited to fibrillar procollagens. Other genetic studies have linked the *Adants14* gene to a predisposition to multiple sclerosis (6) or female knee osteoarthritis (7, 8), and the expression of ADAMTS2 and 3 was also shown to be increased in culprit plaques from patients presenting with acute myocardial infarction vs. stable angina (9). Finally, it was recently shown that ADAMTS3 is capable of cleaving and activating pro-VEGF-C in experimental models (10). Taken together, these reports suggest that this subfamily of ADAMTS enzymes has functions that are not related to collagen biology, and this prompted us to search additional potential substrates. We used a proteome-wide strategy, named terminal amine isotopic labeling of substrates (TAILS), which specifically identifies the natural N termini of proteins together with the N termini of their cleavage products (11). This approach was successfully used to identify novel substrates of matrix metalloproteinases (MMPs) (12), mepriinsa and b (13), but has not yet been applied so far to ADAMTS proteinases.

This study aimed at the identification of new substrates of ADAMTS2, 3, and 14. The rationale for studying these 3 ADAMTS in parallel was to increase the likelihood of identifying new substrates of these highly similar enzymes and to better evaluate the extent to which they have overlapping functions. Tens of new substrates were identified, many of them being ECM components and/or regulators of the Wnt or TGF- β pathways, such as latent TGF- β binding protein (LTBP)1 and TGF- β RIII. Additional characterizations confirmed the reliability of the TAILS approach to identify new substrates and demonstrated the functional significance of ADAMTS2 for TGF- β signaling.

(continued from previous page)

DKK, dickkopf-related protein; dpc, days postconception; ECM, extracellular matrix; HEK, human embryonic kidney; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HLA, human leukocyte antigen; iTRAQ, isobaric tag for relative and absolute quantitation; LAP, latency-associated peptide; LLC, large latent complex; LTBP, latent TGF- β binding protein; MEF, mouse embryonic fibroblast; mini-III, miniprocollagen III; MMP, matrix metalloproteinase; MS/MS, tandem mass spectrometry; P-C, proteinase:control; PCPE, procollagen C-proteinase enhancer; pNP, procollagen N-proteinase; siRNA, small interfering RNA; SMA, smooth muscle actin; TAILS, terminal amine isotopic labeling of substrates; TMT, tandem mass tag; TPP, Trans-Proteomic Pipeline; WT, wild-type

All these data completely modify the current paradigm about ADAMTS2, 3, and 14 by considerably extending their substrate repertoire.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies

The LF-69 rabbit antiserum for the human pro α 1(III) C-propeptide has been described elsewhere (14) and was kindly provided by Dr. Larry Fisher (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Mouse anti-human fibronectin N-terminal antibody was purchased from Merck Millipore (MAB1936; Darmstadt, Germany). The antibody directed against human LTBP1 was from R&D Systems (MAB388; Minneapolis, MN, USA). The goat antibody against the extracellular domain of human TGF- β RIII was from R&D Systems (AF-242-PB).

Cell lines

For inducible cell lines, human embryonic kidney (HEK) 293 cells were transfected (Novagen GeneJuice Transfection Reagent; EMD Millipore, Billerica, MA, USA) with the pcDNA 6/ tetracycline repressor expression vector (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and selected using blasticidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Clones expressing a high level of the tetracycline repressor protein were identified by Western blotting (rabbit polyclonal #ET01; MoBiTec, Antwerpen, Belgium) and further transfected by the pcDNA4/TO expression vector (TetOn System; Invitrogen-Life Technologies) containing the complete coding sequence of ADAMTS2, ADAMTS3, or ADAMTS14 inserted in the multiple cloning site (NdeI-XbaI sites for ADAMTS2 and ADAMTS14, and PmeI-PmeI sites for ADAMTS3). After selection (Zeocin, 300 mg/ml; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), subcloning was performed to identify clones producing ADAMTS2, ADAMTS3, or ADAMTS14 only in the presence of doxycycline (1 nM; Sigma-Aldrich).

For cell lines expressing constitutively the enzymes, HEK293 cells were transfected (Novagen GeneJuice Transfection Reagent) with the pcDNA4/TO expression vector containing the complete coding sequence of ADAMTS2, ADAMTS3, or ADAMTS14, which were inserted in the multiple cloning site (NdeI-XbaI sites for ADAMTS2 and ADAMTS14, or PmeI-PmeI sites for ADAMTS3). Stably transfected cell populations were selected using Zeocin (500 mg/ml).

Recombinant proteins

Production and purification of bone morphogenetic protein (BMP)1, procollagen C-proteinase enhancer (PCPE)1, and recombinant miniprocollagen III (mini-III) were described elsewhere (15). Human plasma fibronectin was purchased from Sigma-Aldrich (#F0895). Recombinant human dickkopf-related protein (DKK)3 and TGF- β RIII were purchased from R&D Systems (#1118-DK and #242-R3, respectively). Recombinant ADAMTS2, its inactive mutant, or ADAMTS14 was produced in HEK cells and purified according to the reported procedure (16). Recombinant human TGF- β 1 and TGF- β 2 were from PeproTech (#100-21; PeproTech France, Neuilly-Sur-Seine, France) and Sigma-Aldrich (#T2815), respectively.

Reagents

The hyperbranched polyglycerol-aldehyde polymer was purchased from Flintbox (University of British Columbia, Vancouver,

BC, Canada). Isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) labels are from AB Sciex (Concord, ON, Canada). Porcine trypsin was purchased from Promega (#V511A; Madison, WI, USA). Ultrafiltration devices were purchased from Merck Millipore. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich. The procollagen C-proteinase-specific inhibitor (UK-383,367) was from Sigma-Aldrich.

Secretome preparation

Dermatoparactic fibroblasts (DFs) from a patient suffering from the dermatoparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (17) and HEK cells constitutively or conditionally (in a doxycycline-dependent manner) expressing ADAMTS2, ADAMTS3, or ADAMTS14 were cocultured in a 4:1 ratio (DF:HEK) (Fig. 1). The ADAMTS2 analysis is the sum of 2 experiments. In a first experiment, DFs were cocultured with HEK cells constitutively expressing the inactive (labeled iTRAQ115) or the active ADAMTS2 (labeled iTRAQ117), named TS2_A in proteomeX change. In this experiment, collagen synthesis was stimulated by the addition of ascorbic acid to the culture medium (25 nM). The sample before negative selection was also analyzed (named TS2_B in proteomeX change). In a second experiment, the HEK cells expressed ADAMTS2 in a doxycycline-dependent manner (labeled iTRAQ114 and iTRAQ115, respectively, without and with doxycycline). A third condition was made by the addition of recombinant ADAMTS2 to the control secretome obtained in the absence of doxycycline (labeled iTRAQ116). There were 2 proteinase:control (P:C) ratios calculated from the latter experiment: iTRAQ115/iTRAQ114 and iTRAQ116/iTRAQ114 (named TS2_C in proteomeX change).

The ADAMTS3 secretome was collected from HEK cells that over-express the proteinase in a doxycycline-dependent manner alone (iTRAQ115/iTRAQ114) or cocultured with DFs (iTRAQ117/iTRAQ116; named TS3_A). A second experiment was done using HEK cells alone (iTRAQ117/iTRAQ116; named TS3_B). A single experiment was performed for ADAMTS14 using the secretome of DFs cocultured with HEK cells over-expressing the proteinase in a doxycycline-dependent manner (iTRAQ117:iTRAQ116; named TS14 in proteomeX change).

Proteinase expression was induced by adding 1 nM doxycycline 24 h before and during the 48 h of conditioned medium preparation. The secreted medium was collected after 48 h according to the reported procedure (11). Protein concentration was estimated using the optical density at 280 nm and the Bradford assay and was adjusted to 2 mg/ml. A total of 500 mg protein was processed for TAILS in each condition. When present, recombinant ADAMTS2 (23 nM) was added overnight at 37°C to the concentrated secretome.

Sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry

As a general guideline, iTRAQ-TAILS sample preparation was done according to the reported procedure (18). For the first N-terminomics analysis of ADAMTS2 (TS2_A), the sample was fractionated on a strong cation exchange column. A linear gradient of KCl in 10 mM KH_2PO_4 was applied to elute the peptides in 10 fractions. Each fraction was injected in the mass spectrometer QStar ESI-T of (AB Sciex) at the Protein Science Facility of the Structure Fédérative de Recherche Biosciences (Lyon, France). The sample before negative selection was also analyzed on the ESI-Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer (TS2_B). For all the other samples, peptides were injected into the ESI-Q Exactive mass spectrometer at the GIGA Proteomic Facility of the University of Liège. The mass spectrometer was coupled to a 2D-RP/ RP NanoAcquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) for the peptide fractionation in 3 fractions. The mass spectrometry

proteomic data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (19) via the PRotomics IDentifications partner repository with the data set identifier PXD002354 and digital object identifier 10.6019/PXD002354.

Analysis of mass spectrometry results

In a first step, peptides were identified using Mascot (version 2.2.06; Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) and allowing semitryptic cleavages and 2 missed cleavages/peptide. Carbamidomethyl cysteine was set as a fixed modification, and other modifications were set as variable: N-terminal acetyl, deamidation (NQ), Pyro-glu (N-term E), Pyro-Gln (N-term Q), Oxidation (M), iTRAQ (K), iTRAQ (Y) and iTRAQ (N-term). Peptide tolerance was set at 0.02 Da.

The tandem mass spectrometry (MS/MS) data were analyzed using the TransProteomic Pipeline (TPP) and Proteome Discoverer software (Thermo Fisher Scientific). For the TPP analyses, the PeptideProphet and ProteinProphet software programs, embedded into TPP, used to validate protein and peptide assignment. The nontryptic model was omitted in the PeptideProphet parameters. The error rate to validate proteins or peptides was respectively set at 2 and 5%. Then, Clipper software was used to determine the upper and lower cutoffs corresponding to 3 s calculated from the normal distribution of the $\log_2(\text{P:C ratio})$ from natural mature N termini. A Gaussian error function was used to calculate a P value that reflects the probability of a peptide to be a false-positive. A peptide with a P:C ratio above or below the 3 s cutoff has a 99.8% chance to be dependent on the studied protease (20). For data analyses with the Proteome Discoverer software, peptide assignment was validated using Percolator (embedded in the Proteome Discoverer package). Only high-confidence peptides were considered (. 95% confidence). The intensity of the reporter ions was integrated using a window of 20 ppm. Clipper results were manually complemented by Proteome Discoverer data by adding missing peptides above or below the 3 s cutoff.

Biological process analysis

The proteins showing P:C ratios above or below the cutoffs were submitted to Biological Networks Gene Ontology (BiNGO), an add-on of Cytoscape (version 2.8.2), for Gene Ontology search (21). The significance level was set at 0.005. The categories visualized are overrepresented after the Benjamini and Hochberg false discovery rate correction using the whole annotation for *Homo sapiens* in the Gene Ontology database as reference set.

Biochemical validation of the C-propeptide cleavage of type III collagen

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were extracted from wild-type (WT) or ADAMTS2 null embryos at 14.5 d postconception (dpc) and cultured under hypoxic conditions (3% O_2), and collagen expression was stimulated as described above. The secretome was collected according to the reported procedure (11). For Western blot analysis with the LF-69 antibody (against the C-propeptide of type III procollagen), 2.5 mg protein was loaded in each lane. Analyses of mini-III cleavage *in vitro* were all performed in 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 10 mM CaCl_2 (HEPES buffer). ADAMTS2 or BMP1 was incubated for 16 h in the presence of 2.5 mg mini-III at 37°C in the presence or absence of 200 nM PCPE or of 250 nM UK-383,367. For N-terminal Edman sequencing (L-ProBE; Ghent University, Ghent, Belgium) of the band corresponding to the C-propeptide, proteins were electrotransferred onto a PVDF membrane and stained with Coomassie blue.

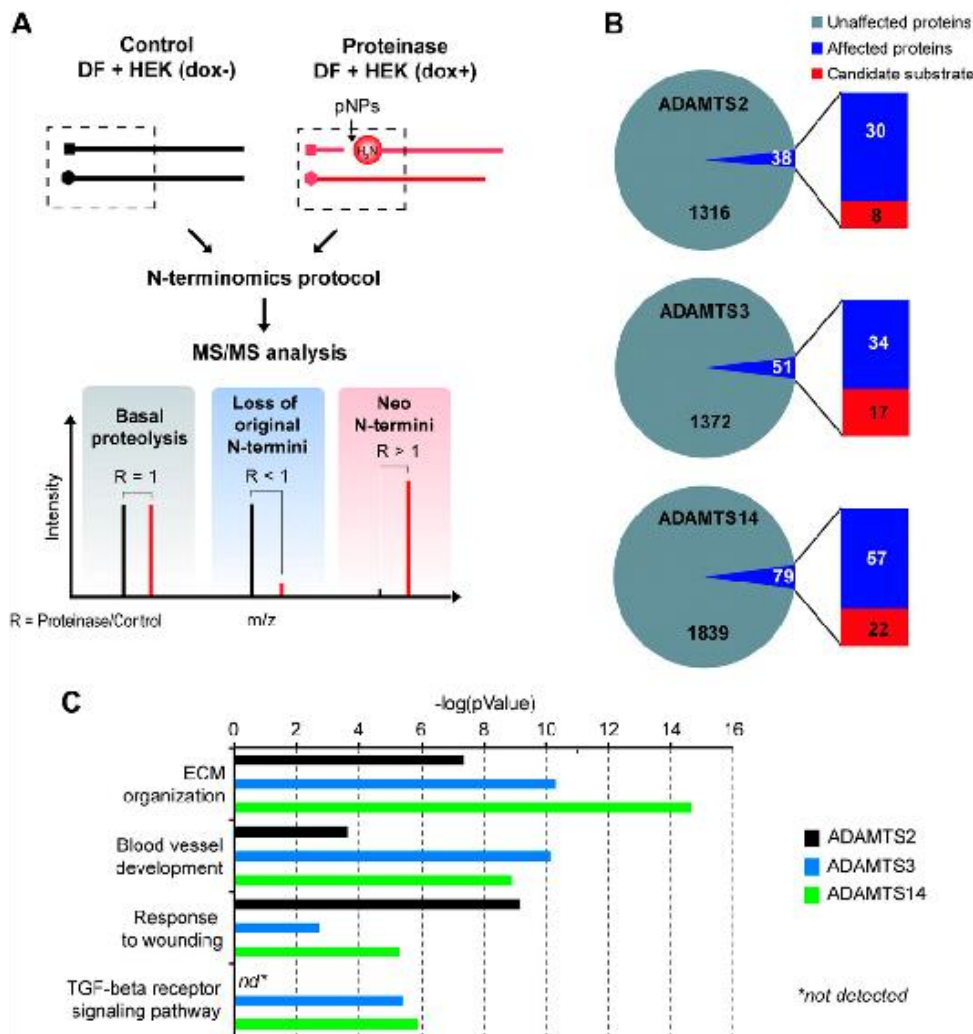


Figure 1. N-terminomics networks and biological processes related to ADAMTS2, 3, and 14. A) Schematic view of the N-terminomics workflow used for the analysis of the pNPs. Dashed lines show the N-terminal peptides analyzed. DFs were cocultured with HEK cells over-expressing the pNPs in a doxycycline-dependent manner (dox^{2/2}). B) Numbers of proteins observed after data analysis and affected cell surface or extracellular proteins showing at least a peptide with a ratio above or below the 3 s cutoff of the experiment. Direct candidate substrates were defined by internal nontryptic-like peptides. C) Biological processes related to the pNP networks using BiNGO (21).

ADAMTS2 cleavage of fibronectin

The conditioned media of human fibroblasts were collected as described above and were then incubated with recombinant ADAMTS2 (200 nM for 16 h at 37°C) in the presence or absence of 20 mM EDTA in HEPES buffer. Western blotting was performed using the mouse anti-human fibronectin N-terminal antibody using these media or on the secretome of HEK cells expressing ADAMTS3 or 14 in a doxycycline-dependent manner. For the in vitro digestion, 2 mg human plasma fibronectin was incubated with recombinant ADAMTS2 (200 nM) for 16 h at 37°C in HEPES buffer. Proteins were separated using SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The 33 kDa cleavage product was extracted from the gel and analyzed by MS/MS. The cleavage site was determined by amino-terminal-oriented mass spectrometry of substrate (ATOMS) according to the reported procedure (22) with slight modifications developed at the GIGA Proteomic Facility: the tryptic digestion being replaced by a multienzymatic digestion based on a

mix of trypsin, chymotrypsin and GluC, and peptides being labeled with tandem mass tags [(TMTs); #90065; Life Technologies].

Analysis of DKK3 cleavage

DKK3 (2.5 mg) was incubated in the presence of ADAMTS2 (50 nM) or ADAMTS14 (100 nM), with or without 20 mM EDTA in HEPES buffer for 16 h at 37°C. Proteins were separated using SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The cleavage site was determined by iTRAQ-ATOMS according to the reported procedure (23). Investigation of testis morphology of WT or Adamts^{2/2} males was performed by hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded transversal sections.

Analysis of LTBP1 cleavage

LTBP1 cleavage was investigated in the secretome of HEK293 cells in the presence or absence of doxycycline for the induction

of ADAMTS expression. Proteins (2.5 mg) were separated using SDS-PAGE under nonreducing conditions to preserve the complex formed by LTBP1, latency-associated peptide (LAP), and TGF- β .

Analysis of TGF- β RIII cleavage

TGF- β RIII cleavage was assessed by Western blotting on the secretome of HEK293 cells, expressing the proteinases in a doxycycline-dependent manner, or on the secretome of human skin fibroblasts. For *in vitro* digestion, recombinant TGF- β RIII (2.5 mg) was incubated with recombinant-purified ADAMTS2 or 14 (50 nM), in the presence or absence of 20 mM EDTA, in HEPES buffer for 16 h at 37°C. TGF- β RIII cleavage pattern was analyzed by Western blotting. For the MS/MS analysis of the cleavage products, the gel was stained with Coomassie blue, and the 50 kDa protein band observed after cleavage was extracted, digested with trypsin, and submitted to MS/MS using the ESI-Q Exactive mass spectrometer. Nontryptic peptides were also evaluated in the analysis.

Evaluation of the TGF- β response in dermal skin fibroblasts

The response to TGF- β was assessed after treatment of human normal fibroblasts with 1 ng/ml TGF- β 1 or TGF- β 2 for 48 h in complete medium. RNA was extracted using the RNA Isolation Kit from Roche Diagnostics (#11828665001; Meylan, France). There were 2 TGF- β target genes evaluated by RT-PCR, α -smooth muscle actin (SMA) and connective tissue growth factor (CTGF), using the RNA oligos 59CTAGAGACAGAGAGGAGCAGGAAA-39 and 59GGCATTGCCGACCGAATGCAGAA-39 or 59CCTCGCCGTCAGGGCACTTGAA-39 and 59TCCACCCGGGTTACCAATGACAA-39 respectively. The RT-PCR-amplified products were quantified with GelQuant (biochemabsolutions.com) and

corrected by the 28S housekeeping gene signal. Experiments were done in triplicate, errors bars are the SEMs, and the P values were determined using the 1-tailed unpaired Student's t test and GraphPad Prism (version 5.00; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Silencing of ADAMTS2 was done using a small interfering (si)RNA (siRNA) designed between the exons 13 and 14 of ADAMTS2 mRNA (NM_014244.4; National Center for Biotechnology Information; Bethesda, MD, USA) using the RNA oligos 59GAAGCAUGGUUACAUCAAGTT-39 and 59CUUGAUGUAACCAUGCUUCTT-39. Cells were transfected with siRNA (20 nM), either control (scrambled, 59UUGCAUA-CAGGACUCGUUATT-39 and 59UAACGAGUCCUGUAUGC-AATT-39 or specific to ADAMTS2, using the calcium phosphate precipitation procedure. After 18 h, cells were trypsinized, replated for 6 h, and treated with TGF- β 1 or TGF- β 2 (1 ng/ml) in complete medium. The siRNA efficiency was controlled by RT-PCR after 24 or 48 h after trypsinization using the RNA oligos 59GGATCTCAAACATCTTGATGTAACCA-39 and 59CTACAA-GGACGCCTTCAGCCTCT-39.

α -SMA levels were also evaluated by immunofluorescence. Cells were treated with TGF- β 1 or TGF- β 2 as described above. α -SMA was stained with an antibody coupled to FITC 488 (green), and nuclei were stained with DAPI (blue) (both from Sigma-Aldrich). Photographs were taken using an inverted microscope (Eclipse TI-S; Nikon, Tokyo, Japan).

Determination of cleavage site specificity

Heat maps and amino acid sequence logos, corrected by the natural abundance of amino acids in the human proteome, were generated using the iceLogo software package (24). Analyses were based on the cleavage sites determined by proteomics for the candidate substrates (Table 1 and Supplemental Table 1).

TABLE 1. Candidate substrates of ADAMTS2, 3, and 14 revealed by N-terminomics

ADAMTS2		ADAMTS3		ADAMTS14	
Name	P:C (PSMs)	Name	P:C (PSMs)	Name	P:C (PSMs)
Collagen a-1(I) chain	20.1 (1)	ADAM10	5.7 (3)	C3a-R	2.5 (1)
Collagen a-2(I) chain	35.0 (1)	ADAMTS1	35.0 (3)	Calsyntenin-1	6.4 (1)
Collagen a-1(III) chain	1.7 (3)	Clusterin	35.0 (1)	Collagen a-1(I) chain	9.1 (2)
Collagen a-2(V) chain	35.0 (3)	Collagen a-1(I) chain	35.0 (8)	Collagen a-2(I) chain	35.0 (3)
Collagen a-2(VI) chain	2.0 (1)	Collagen a-2(I) chain	35.0 (6)	Collagen a-1(II) chain	4.4 (1)
Collagen a-3(V) chain	2.0 (3)	Collagen a-1(III) chain	2.0 (3)	Collagen a-1(III) chain	2.7 (2)
Decorin	35.0 (1)	Collagen a-1(V) chain	4.4 (1)	Collagen a-2(IV) chain	3.6 (1)
DKK3	4.7 (3)	CTGF	7.9 (1)	Collagen a-1(V) chain	5.4 (4)
		Fibronectin	35.0 (1)	Collagen a-2(V) chain	2.7 (4)
		Fibulin-3	35.0 (1)	Collagen a-1(XVIII) chain	7.2 (2)
		Granulins	35.0 (3)	Decorin	3.7 (1)
		HLA-A	35.0 (1)	DKK3	7.0 (1)
		LTBP1	18.7 (2)	Fibronectin	4.6 (1)
		POTEJ	22.7 (3)	Fibulin-2	3.6 (1)
		Prosaposin	5.1 (6)	HLA-A	6.5 (1)
		TGF- β RIII	35.0 (2)	IGFBP5	5.5 (8)
		Thrombospondin-1	3.1 (2)	LTBP1	3.5 (1)
				LTBP2	2.5 (1)
				Lysyl oxidase	2.8 (2)
				Lysyl oxidase homolog 1	5.7 (2)
				Perlecan	6.3 (4)
				Versican core protein	8.5 (2)

Candidate substrates regarding the highest P:C ratios are shown. The highest P:C ratio of the peptides corresponding to the substrates is reported together with the number of spectra [peptide-spectrum matches (PSMs)] observed by MS/MS. The complete peptide lists for each substrate are reported in Supplemental Table 1.

RESULTS

N-terminomics analysis of ADAMTS2, 3, and 14

Investigation of the proteinase networks related to the ADAMTS2, 3, and 14

Identifications of new substrates were performed using human dermosparactic skin fibroblasts, which lack active ADAMTS2 and only express low amounts of ADAMTS3 and 14. These cells were cocultured in a 4:1 ratio with HEK293 cells expressing or not recombinant ADAMTS2, 3, or 14. The serum-free conditioned medium of the different culture conditions was collected, and each ADAMTS-positive condition and its specific controls were labeled with different iTRAQs, pooled, and processed for TAILS analysis. In these conditions, the ratios between the intensities of the different reporter ions allow the relative quantification of peptides. Although natural N-terminal peptides and peptides corresponding to basal proteolysis lead to P:C ratios of ≈ 1 , peptides with P:C ratios significantly > 1 are likely to be generated by the ADAMTS under study (Fig. 1A). In addition, the amino-terminal extremities of the protease-generated N termini (neo-N termini) correspond to the P19 position of the cleavage sites, thereby allowing direct identification of cleavage sites. Finally, peptides with P:C ratios > 1 (reflecting degradation or cell uptake of neo-N termini) are assumed to encompass the cleavage site but do not allow its precise localization. The cutoffs to discriminate neo-N termini from other N termini were determined from the normal distribution of natural N-terminal peptides, which are not expected to be modified by the proteinase. Very strict 3σ cutoff values were used to increase the probability of identifying relevant substrates cleaved with high efficacy.

Analyses of the different culture conditions revealed the presence of 1354, 1423, and 1918 different proteins in the secretomes used for ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14, respectively. The P:C ratios were calculated for all the identified peptides, and this indicated that 38, 51, and 79 extracellular or cell surface proteins were affected by the expression of ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14, respectively (Fig. 1B and Supplemental Table 1). These proteins were considered to be a part of their respective protease networks (defined as the subproteome affected by the proteinase, which includes its direct substrates and secondary events linked to its expression and activity) and used to give a better insight into the biological processes related to one specific ADAMTS. BiNGO analysis (21) showed that the major processes influenced by ADAMTS2, 3, and 14 are ECM organization, blood vessel development, response to wounding, and TGF- β receptor signaling pathway (Fig. 1C). The most significant biological process was "ECM organization," with a corrected P value between 4.63×10^8 for ADAMTS2 and 2.23×10^{15} for ADAMTS14, principally thanks to the presence of several fibril-forming collagens and fibronectin (Fig. 1C and Supplemental Table 1). "Blood vessel development" is mostly related to ADAMTS3 and ADAMTS14, with P values of 7.53×10^{11} and 1.23×10^9 , respectively (Fig. 1C), whereas the P value of ADAMTS2 was lower (2.43×10^4). ADAMTS2 and 14 are highly relevant to response to

wounding (Fig. 1C). More unexpectedly, ADAMTS3 and 14 networks were related to the TGF- β receptor signaling pathway. This pathway was not identified for ADAMTS2 using BiNGO, although some of the proteins in the ADAMTS2 network (eg, LTBP1) are clearly related to this pathway according to the literature (Supplemental Table 1). Among the proteins involved in this pathway, which were affected by at least 1 of the 3 ADAMTS, were TGF- β 1 and TGF- β 2, the coreceptors endoglin (CD105) and TGF- β RIII, interacting and trapping molecules present in elastic fibers (LTBP1, 2, and 3; fibulins 1, 2, and 3), and other ECM macromolecules that either modulate and/or are transcriptionally regulated by the TGF- β pathway (decorin, CTGF, and collagens) (Table 1 and Supplemental Table 1).

Candidate substrates of ADAMTS2, 3, and 14

Particular attention was paid to the nontryptic-like internal peptides (no "K" or "R" in P1) having a P:C ratio > 1 because these are likely to result from direct cleavage by ADAMTS, whereas tryptic peptides are more ambiguous and can also reflect changes in protein expression. This analysis yielded 8, 17, and 22 potential direct substrates for ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14 (Table 1). Besides fibrillar collagens, ADAMTS2 was found to be likely able to process 1) the beaded filament-forming type VI collagen, outside the triple-helical domains; 2) decorin, a proteoglycan interacting with the surface of collagen fibrils; and 3) DKK3, a factor implicated in the regulation of Wnt/ β -catenin and TGF- β signaling (25, 26). The potential direct substrates of ADAMTS3 were more numerous and included fibril-forming collagens, other proteins of the ECM, and proteins regulating cell behavior (apoptosis and proliferation) or lipid metabolism, such as clusterin, granulins, or prosaposin (Table 1). There were 2 cell surface receptors, human leukocyte antigen (HLA)-A and TGF- β RIII, also identified as potential substrates with high P:C ratios, suggesting that they were present as soluble forms in the conditioned medium. ADAMTS14 shares many substrates with ADAMTS2 and/or ADAMTS3, such as fibrillar collagens, fibronectin, DKK3, HLA-A, and LTBP1. Some substrates were however identified only for ADAMTS14, including 1) lysyl oxidase and lysyl oxidase-like-1, 2 enzymes that crosslink collagen and elastin; 2) versican and perlecan, 2 secreted proteoglycans with multiple functions; and 3) type XVIII collagen at a site close to that involved in the release of endostatin, a potent antiangiogenic cryptic C-terminal fragment of collagen XVIII.

Although substrate identification was performed using very strict cutoff values, validation assays have to be performed. As a first step toward the validation of candidate substrates, we decided to focus on 5 of them belonging to the 2 main identified categories (ECM and signaling regulation). The potential cleavages were systematically evaluated for the 3 ADAMTS in order to get information about their substrate specificity.

Biochemical validation

Structural molecules implicated in ECM architecture and remodeling

Cleavage of the C-propeptide of type III collagen—Although ADAMTS2 can process the aminopropeptide of type III procollagen, its activity on the C-propeptide of procollagen III (CP-III) was never previously reported. Surprisingly, also, the potential cleavage site identified by N-terminomics (G¹²²¹↓¹²²²D; P:C, 1.7) is the same as for BMP1 (27). This prompted us to characterize this new potential activity of ADAMTS2 in more detail.

In order to verify the release of CP-III by ADAMTS2 (Supplemental Table 1), we used the purified enzyme and recombinant mini-III, which is composed of a short triple-helical domain, the telopeptide, and entire C-propeptide (Fig. 2A) (15). ADAMTS2, but not an inactive enzyme purified in the same conditions, was able to release the CP-III (Fig. 2B). A similar activity was observed with ADAMTS14 (Fig. 2C). To further validate this *in vitro* cleavage and to confirm that this effect was not due to the copurification of a tiny amount of BMP1, the assay was also performed in the presence of a BMP1 synthetic inhibitor and/or in the presence of a specific enhancer of BMP1 activity on procollagen (PCPE) (29). ADAMTS2 cleaved the C-propeptide of type III collagen to the same extent regardless of the presence of the inhibitor or the enhancer (Fig. 2D). These results demonstrate that the C-propeptide of type III collagen is directly cleaved by ADAMTS2.

The ADAMTS2 cleavage site within mini-III was determined by N-terminal Edman sequencing and yielded the following cleavage site: G-F-A-P¹²¹⁸↓¹²¹⁹Y-Y-G-D (Fig. 2A). The Proline in the P1 position was also previously found in the N-propeptide cleavage site (1), but it is located 3 residues N terminal to the site identified by N-terminomics. The discrepancy between the 2 approaches could be related to the presence of BMP1 in the conditioned culture medium, the activity of which is possibly increased when there is prior cleavage by ADAMTS.

To explore the biological significance of this cleavage, type III collagen processing was assessed in MEFs from 6 different embryos (3 WT and 3 *Adamts2*^{2/2}) at 14.5 dpc. An antibody specific to the C-propeptide (LF-69) was used and showed a reduction in the amount of “free” C-propeptide together with the accumulation of pC forms when ADAMTS2 was absent (Fig. 2E).

Cleavage of cellular and plasma fibronectin—Fibronectin is another important component of the ECM. It is also abundant in plasma under a form lacking type III-A and type III-B domains (Fig. 2F). TAILS analyses indicate a possible cleavage site in the N-terminal domain (P:C, 0.12; Supplemental Table 1). Validation studies were performed by Western blotting using an antibody specific to the 30 kDa N-terminal domain (Fig. 2G). Media conditioned by normal human skin fibroblasts contained a fragment migrating ; 33 kDa by SDS-PAGE. In contrast, accumulation of full-length fibronectin and absence of this 33 kDa product were observed in the medium of DFs (Fig. 2G). When recombinant-purified ADAMTS2 was added *in vitro* into the DF-conditioned medium, the 33 kDa product was also generated at the expense of the full-length fibronectin (Fig. 2G), and this processing was abolished in the

presence of EDTA. Noteworthy, the release of the 33 kDa fibronectin fragment was also specifically observed in the conditioned medium of HEK293 cells expressing ADAMTS3 or ADAMTS14 compared to nontransfected cells (Fig. 2H), suggesting that this activity is shared by all 3 enzymes.

In a second step, plasma fibronectin was also incubated *in vitro* with recombinant-purified ADAMTS2, resulting in a similar product of ; 33 kDa (Fig. 2I). The full-length fibronectin and its C-terminal fragment after cleavage by ADAMTS cannot be easily separated using SDS-PAGE, making classic (Edman) N-terminal sequencing difficult to implement. Therefore, the 33 kDa fragment from plasma fibronectin was analyzed by mass spectrometry. In agreement with the specificity of the antibody used in Western blotting, the peptides observed by mass spectrometry cover the N-terminal assembly domain of fibronectin. The precise cleavage site was then determined using a new approach called ATOMS (22, 23) coupled to TMT labeling and to a multienzymatic digestion. The 5 peptides with the highest P:C ratios resulted from a unique and unambiguous cleavage site: V-R-A-A²⁹²↓²⁹³V-Y-Q-P (Fig. 2J). This cleavage site was not seen using a classic tryptic digestion such as in N-terminomics. This is likely due to the size of the tryptic peptide resulting from this cleavage site, which is too long (32 amino acids, 3.6 kDa) to be properly assigned by MS/MS.

Cell signaling molecules

Cleavage of DKK3 by ADAMTS2 and 14—DKK3 is a member of the DKK family, which comprises 4 members characterized by 2 conserved cysteine-rich domains (Fig. 3A). N-terminomics analyses indicated cleavage of DKK3 by ADAMTS2 and ADAMTS14 (Supplemental Table 1), a result that was confirmed *in vitro* using recombinant human DKK3 in the presence of recombinant ADAMTS2 or 14 (Fig. 3B). DKK3 is a highly glycosylated molecule migrating at 75–80 kDa by SDS-PAGE despite a predicted mass of 37.5 kDa. In the presence of ADAMTS2 or 14, the intensity of the corresponding band decreased, whereas 3 cleavage products migrating at 38, 55, and 70 kDa were observed (Fig. 3B). According to the N-terminomics analyses, DKK3 was cleaved at positions ¹²⁶M↓¹²⁷, ¹²⁸F↓¹²⁹, and ¹³⁰E↓¹³¹. To determine the precise cleavage site of ADAMTS2 within DKK3, we used iTRAQ-ATOMS on recombinant proteins *in vitro*, which led to the identification of a single cleavage site at position ¹²⁶M↓¹²⁷ (Fig. 3A). This suggests the existence of sequential secondary processing by other proteinases after initial ADAMTS2 cleavage or that the cleavage site is perhaps less strictly defined in conditions encountered in cell culture. The generation of 3 degradation products of DKK3 (38, 55, and 70 kDa) by ADAMTS2 or ADAMTS14 suggests the presence of at least 2 cleavage sites. This second site might be the ²⁵²I↓²⁵³ identified for ADAMTS14 during the N-TAILS analysis. The reason why this site was not identified by iTRAQ-ATOMS on recombinant proteins was not investigated further.

DKK3 has been shown to be implicated in seminiferous tubule development (30). Therefore, the histology of testes from adult WT or *Adamts2*^{2/2} mice was examined by

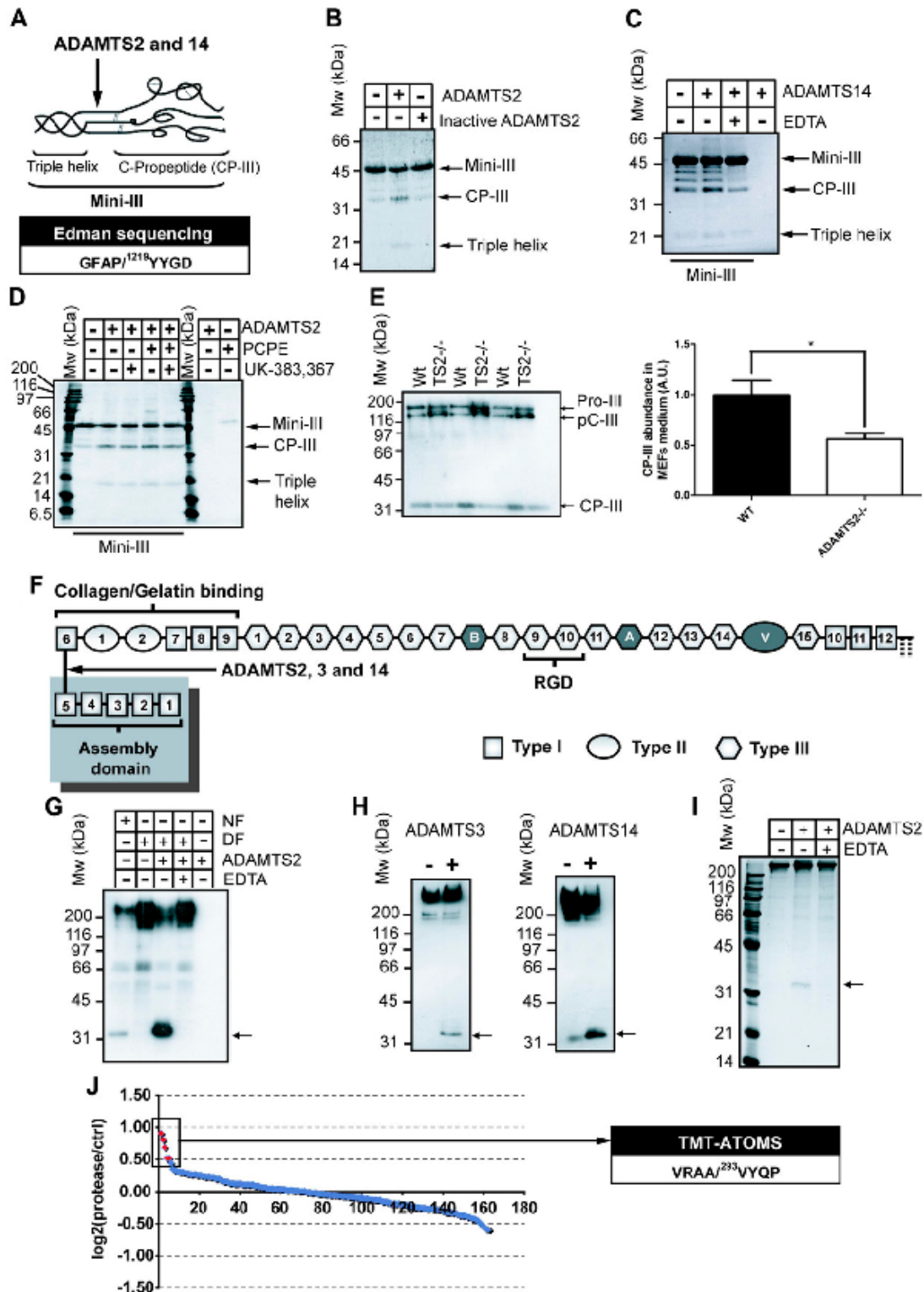


Figure 2. Novel proteolytic events of the pNPs related to structural molecules of the ECM: CP-III and fibronectin. A) Schematic view of the recombinant procollagen III model substrate (mini-III). The cleavage site determined by N-terminal Edman sequencing is reported below. B and C) SDS-PAGE (10% acrylamide, reducing conditions) stained with Coomassie blue shows the in vitro digestion of recombinant mini-III (850 nM) by recombinant-purified ADAMTS2 (50 nM) or its inactive mutant (B) or (continued on next page)

hematoxylin and eosin staining. The seminiferous tubules were altered in *Adams2^{2/2}* mice with an increase in lumen space and a reduction in thickness of the tubules (Fig. 3C), which complemented previous findings showing a decrease of mature sperm in *Adams2^{2/2}* testes (3). ADAMTS2 cleaves DKK3 upstream of the 2 conserved cysteine-rich domains known to be responsible for the inhibition of the Wnt pathway. Therefore, DKK3 processing by ADAMTS could activate, rather than abolish, its inhibitory function on the Wnt pathways. Because DKK3 is involved in seminiferous tubule development (30), it is tempting to speculate that the infertility of *Adams2^{2/2}* male mice could be related to dysregulation of DKK3 function in testis.

LTBP1 processing—LTBP1 sequesters pro-TGF- β within the ECM to allow its rapid release when needed. The association of LTBP1 with pro-TGF- β by disulfide links is known as the large latent complex (LLC) (Fig. 4A). N-terminomics analyses revealed the cleavage of LTBP1 by ADAMTS3 at ³¹⁵P I A³¹⁶ and ⁷⁷⁵P I A⁷⁷⁶ positions (Fig. 4A). LTBP1 processing by ADAMTS3 was first confirmed by Western blotting in the medium of HEK293 cells expressing the proteinase (Fig. 4B). In the absence of ADAMTS3, 2 bands of 250 and 185 kDa were observed, which corresponded, respectively, to the LLC (LTBP1 associated with pro-TGF- β 1) and to LTBP1 alone (Fig. 4B). When ADAMTS3 was expressed, the relative intensity of LLC decreased, whereas a cleavage product of 150 kDa, corresponding to the expected size after cleavage of LTBP1 at the ³¹⁵P I A³¹⁶ site, was markedly increased (Fig. 4A, B). No band of 104 kDa that would have resulted from the cleavage at the ⁷⁷⁵P I A⁷⁷⁶ site could be observed.

Proteomic analyses identified LTBP1 cleavage by ADAMTS14 at the ³⁶P I G³⁷ position (Fig. 4A and Supplemental Table 1). This should generate a cleavage product differing by only 1.5 kDa from the uncleaved LTBP1, which does not allow their discrimination by SDS-PAGE. When ADAMTS14 was expressed in HEK293 cells, LLC abundance decreased, whereas the band corresponding to LTBP1 alone increased (Fig. 4C), leading to a different electrophoretic pattern from that obtained with ADAMTS3. Because dissociation of LAP/ TGF- β from LTBP1 should not result from a cleavage at the ³⁶P I G³⁷ site, it must be caused by a cleavage within the LAP domain (see Fig. 4A).

This hypothesis is further supported by the existence of a cleavage site in the LAP domain of TGF- β 1, as suggested by the proteomic analysis (P:C, 0.28; Supplemental Table 1).

For ADAMTS2, a well-defined band corresponding to a degradation/ maturation product was never detected. However, a slight decrease of the LLC intensity was consistently observed, suggesting that a cleavage that modifies or destroys the epitope recognized by the LTBP1 antibody may occur (Fig. 4D). In summary, it seems that whereas all the studied ADAMTSs are susceptible to cleave the LLC, there are significant differences in their cleavage specificity.

Cleavage of TGF- β RIII by ADAMTS2, 3, and 14—N-terminomics analyses identified a cleavage of TGF- β RIII (b-glycan) by ADAMTS3 between the endoglin-like and the zona pellucida domains (Fig. 5A) at the ³⁸³P I D³⁸⁴ site. TGF- β RIII cleavage was first assessed by Western blotting in the conditioned medium of inducible HEK cells. Because TGF- β RIII is a transmembrane receptor, only shed fragments could be identified in these conditions. The same pattern was observed in the presence of the 3 ADAMTS, with an increased abundance of 2 cleavage products of 50 and 60 kDa (Fig. 5B). To get further insight into the physiological relevance of this cleavage, Western blots were performed on the conditioned medium of normal and DFs. Although some intact shed ectodomain of TGF- β RIII could be seen with DFs, only the cleaved forms were present in the media of normal fibroblasts (Fig. 5C).

To assess the direct cleavage of TGF- β RIII, *in vitro* assays were performed using purified recombinant TGF- β RIII and ADAMTS2 or ADAMTS14. A band migrating ; 120 kDa (Fig. 5D), accompanied by a higher molecular mass smear typical of proteoglycans, was observed in the presence of EDTA (Fig. 5D). In the presence of active ADAMTS2 or ADAMTS14, however, the intact soluble TGF- β RIII disappeared, and a single cleavage product was observed ; 50 kDa (Fig. 5D). No other cleavage product was seen using either Western blotting (Fig. 5D) or Coomassie blue staining. The 60 kDa band observed in Fig. 5B could therefore be due to glycosylation or to an additional cleavage, occurring only in a cellular context, by ADAMTS2, 3, or 14 or other proteases. The 50 kDa band was analyzed by MS/ MS and shown to correspond to the N-terminal endoglin-like domain resulting from a cleavage at the

ADAMTS14 (200 nM) with or without EDTA (20 mM, C). Mw, molecular weight. D) Digestion of mini-III by ADAMTS2 (50 nM) in the presence or absence of PCPE-1 (200 nM) with or without the specific BMP1 inhibitor (UK-383,367; 250 nM) (28). E) Type III collagen processing in the conditioned medium of MEFs extracted from 6 different embryos (WT or *Adams2^{2/2}*) at 14.5 dpc. The Western blot was performed using an antibody specific to the C-propeptide of type III collagen (LF-69, left). Estimation of C-propeptide release in the MEF secretome (WT or *Adams2^{2/2}*) is shown. Error bars represent 6 SEM. *P = 0.0235, determined using the 1-tailed unpaired Student's t test. F) Schematic view of the fibronectin molecule. Type I, II, and III fibronectin domains are represented by gray squares, circles, or hexagons, respectively. The alternatively spliced extra fibronectin type III domains (A, B) and the variable region are shown in dark gray. The binding site to the integrins [encompassing the tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) motif] is underlined. The ADAMTS2, 3, and 14 cleavage site is indicated with an arrow. G) Immunoblots of the secretome of human normal fibroblasts (NF) or DFs using an antibody specific to the N-terminal (30 kDa) part of human fibronectin. Recombinant-purified ADAMTS2 (75 nM) was added *in vitro* to the secretome of DFs with or without EDTA (20 mM). H) Western blots of the secretome of HEK cells expressing ADAMTS3 or 14 in a doxycycline-dependent manner, using the anti-N-terminal domain of fibronectin antibody. I) *In vitro* digestion of human plasma fibronectin by recombinant ADAMTS2 shown by SDS-PAGE (12.5% acrylamide, reducing conditions) stained with Coomassie blue. The cleavage product of ; 33 kDa corresponding to the N-terminal domain was identified by MS/ MS using the protein band extracted from the gel. J) Fibronectin cleavage site in the presence of ADAMTS2 was determined using TMT-ATOMS. The samples were digested with a mix of proteases before analysis. A total of 163 peptides labeled with TMTs at their N termini were observed, most of them having TMT ratios of ; 1 and derived from partial degradation of the commercial fibronectin preparation. The P:C ratios of those peptides are shown with a graphic representation of log₂[protease/ control (ctrl)]. The 5 peptides with the highest P:C ratio (red dots) originate from the same cleavage site and unambiguously define the preferential ADAMTS2 cleavage site within fibronectin. This cleavage site is reported on the right.

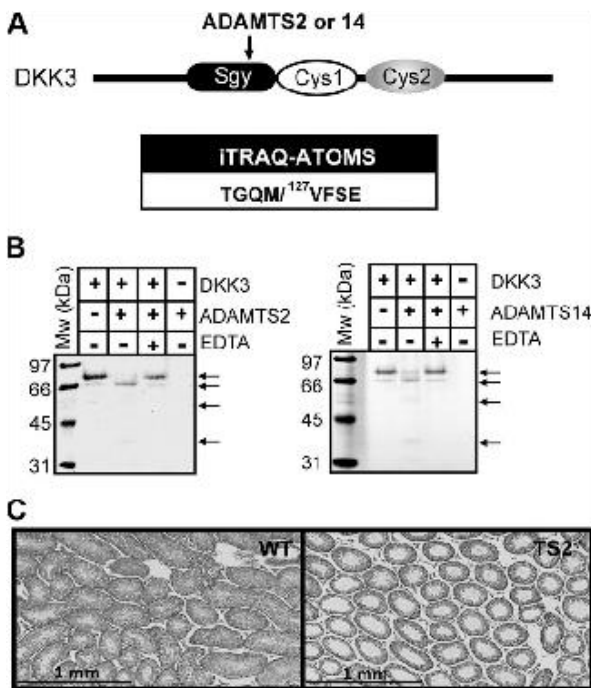


Figure 3. ADAMTS2 or 14 cleavage of DKK3 and potential implication in testis development. A) Schematic view shows the domain composition of DKK3. One of the cleavage sites observed by N-terminomics in complex media was confirmed by ITRAQ-ATOMS using recombinant proteins *in vitro*. The cleavage site determined by ITRAQ-ATOMS is reported below [P.C, 11.96; peptide-spectrum matches (PSMs), 8]. B) *In vitro* digestion of recombinant human DKK3 by recombinant-purified ADAMTS2 (left) or ADAMTS14 (right). Proteins were visualized by SDS-PAGE (10% acrylamide, reducing conditions) stained with Coomassie blue. Mw, molecular weight. C) Hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded sections of testes of 8-wk-old WT or *Adams2^{2/2}* (*TS2^{2/2}*) mice (n = 2).

³⁸³PJA³⁸⁴ cleavage identified by N-terminomics for ADAMTS3 (Fig. 5E).

Implication of ADAMTS2 in the TGF- β response of skin fibroblasts Many substrates identified in this study indicated that ADAMTS2, 3, and 14 play a major role in the regulation of TGF- β signaling. Using ADAMTS2 as a model proteinase, the response of human skin fibroblasts to TGF- β 1 or - β 2 was evaluated by RT-PCR (Fig. 6A) using α -SMA and CTGF as reporter genes. The specific contribution of ADAMTS2 was assessed using an siRNA directed against this protease (Fig. 6A). After treatment with TGF- β 1 or TGF- β 2, the induction of α -SMA or CTGF was attenuated in fibroblasts deficient in ADAMTS2 (Fig. 6B, C). Similar data were obtained when the response of normal and DFs was compared (data not shown). This reduction of TGF- β response was slightly more potent in the presence of TGF- β 2 compared to TGF- β 1 treatment (Fig. 6B, C), suggesting a contribution from TGF- β RIII, which is known to have a higher affinity for TGF- β 2. The response of human fibroblasts to TGF- β in the absence of ADAMTS2 was also verified by immunofluorescence (Fig. 6D). When fibroblasts were treated with TGF- β 1 or 2, a clear induction of α -SMA was seen. In agreement with the RT-PCR data, after TGF- β

treatment, the α -SMA level was reduced when ADAMTS2 is silenced, confirming the specific contribution of ADAMTS2 to the TGF- β response.

Cleavage site specificity of ADAMTS2, 3, and 14

Cleavage site specificities were analyzed based on cleavage events related to the candidate substrates (Table 1 and Supplemental Table 1) complemented with the cleavage sites determined by Edman or ATOMS. To take into account the contribution of the particular nature of fibrillar collagens (rich in Glycine and Proline), the analysis was performed with and without the cleavage sites of type I collagen (α -1 and α -2 chains) (Fig. 7). When collagen I was excluded, the cleavage sites of all 3 ADAMTS shared a common and specific enrichment in small nonpolar or slightly hydrophobic amino acids (G, P, A, M, F, and V) in the P1 and P19 positions (Fig. 7, right panels). According to this analysis, the preferential cleavage site for the pNPs is P/AJG/V. Including collagen I cleavage sites in the analysis does not modify the deduced ADAMTS3 specificity but affects slightly the consensus cleavage site for ADAMTS2 and 14, notably by increasing the contribution of the Glycine residue in P19 (Fig. 7).

DISCUSSION

Recent data indicated that ADAMTS2, 3, and 14 could be involved in biological functions that are not related to collagen processing (31) and may thus have other physiological substrates (32). This hypothesis was evaluated using an N-terminomics approach that allows the identification of new substrates in complex samples, as already demonstrated with several metalloproteinases such as MMPs and meprins (12, 13). Using this approach, we identified several new extracellular and cell surface potential substrates of ADAMTS2, 3, and 14, of which some were validated by Western blotting, N-terminal sequencing, and/or mass spectrometry analysis. In this work, the proteins identified by N-terminomics on cell cultures constitute a subproteome (or protease network) related to the expression of ADAMTS2, 3, or 14. Under these experimental conditions, the protease network includes the primary direct substrates of the studied enzymes. It contains also proteins that are indirectly affected as a result of activation or inhibition of other actors such as other proteinases, inhibitors of proteinases, or cytokines. As a whole, the protease networks determined here in well-characterized models are therefore fully relevant to the biological functions of ADAMTS2, 3, or 14. Altogether, the N-terminomics and validation data have led to the identification of preferential cleavage sites. For the 3 ADAMTSs, the P1 and P19 positions were enriched in nonpolar or slightly hydrophobic amino acids (mainly G, P, A, M, F, and V), a very unique specificity that strongly differs from that reported for BMP1 (D in P19, MMP2 and 9 (L in P19, or ADAMTS1 or 4 (E in P1). It is worth mentioning that the previously identified cleavage site allowing the release of the aminopropeptide of type I, II, and III procollagens (A/PJQ) could not be identified here because the

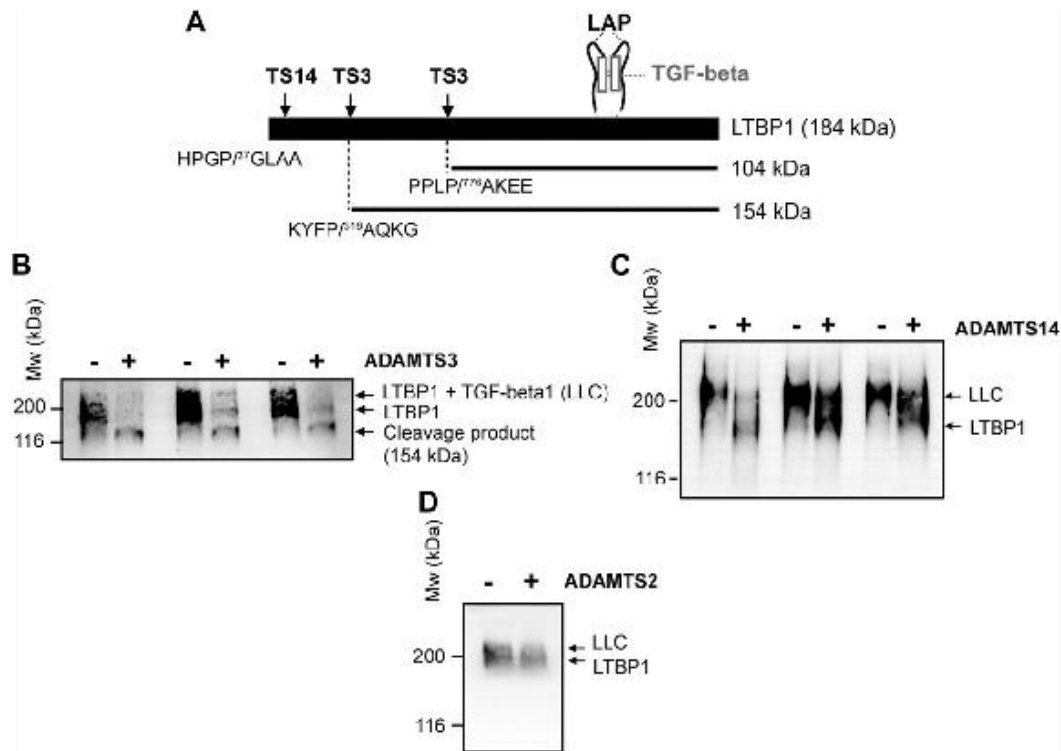


Figure 4. LTBP1 cleavage by the pNPs. A) Schematic view of the LLC composed of LTBP1 associated with pro-TGF- β 1, the latter being secreted as a noncovalent complex between TGF- β and the LAP. ADAMTS3 and 14 cleavage sites within human LTBP1, observed by N-terminomics, are shown by black arrows. Cleavage site sequences are reported below. B-D) Western blots using an anti-human LTBP1 antibody on the secretome of HEK cells expressing ADAMTS3 (B), ADAMTS14 (C), or ADAMTS2 (D) in a doxycycline-dependent manner. Proteins were separated by SDS-PAGE (7.5% acrylamide). Experiments were performed under nonreducing conditions to see the LLC. Mw, molecular weight.

proteins in the secretome were not treated to remove the blocked terminal pyroglutamate. The previously published "PJA" processing of α -1 type V procollagen was however identified and confirmed the reliability of our experimental procedure (Supplemental Table 1). Similarly, several "AJA" sites were identified, which fully correspond to the newly identified cleavage of VEGF-C by ADAMTS3 (10). Several different cleavage sites were also identified in the triple-helical domain of type I collagens (Supplemental Table 1). This was not anticipated but is not surprising based on the identification here of the preference of these ADAMTSs for proline- and glycine-rich sequences and knowing that the high expression of collagens by fibroblasts in culture leads to the secretion of a significant percentage of abnormally folded collagen molecules, which increases the possibility to identify true, although rare, cleaved sequences.

The similarity between the preferential cleavage sites for ADAMTS2, 3, and 14 certainly explains why they share several common substrates (such as fibronectin or TGF- β RIII). However, it is clear that substrate specificity is also governed by structural interactions between the substrate and the protease ancillary domains that are less conserved than the catalytic domain. This is probably the case for LTBP1 because the 3 studied ADAMTSs did not generate the same products.

The cleavage of the N-terminal domain of fibronectin by ADAMTS2 was confirmed using normal and DFs.

Interestingly, fibronectin has been reported to be implicated in platelet thrombus formation and diseases associated with thrombosis (33), and this could be correlated to previous results showing that ADAMTS2 is potentially involved in pediatric stroke and that its expression is increased in atherosclerotic plaques causing acute myocardial infarction (9). Fibronectin is also known to be involved in inflammation by recruiting and activating leukocytes, notably through its 29 kDa N-terminal fragment that can be released by thrombin (34). Moreover, the ADAMTS2 proteinase network shows other links with proteins involved in inflammation (see Supplemental Table 1: collagen α -2(VI) and α -3(VI) chains, IL-8, macrophage migration inhibitory factor, or the complement C1s subcomponent), which supports the role of ADAMTS2 in the immune system (4).

This study reports the unexpected cleavage of cell signaling molecules such as DKK3, which is implicated in prostate morphogenesis (26, 35) and testis development (30) probably through the regulation of TGF- β or Wnt/ β -catenin signaling. Investigation of testis morphology in *Adamts2*^{2/2} male mice shows the alteration of the seminiferous tubules leading to the interesting hypothesis that processing of DKK3 by ADAMTS2 could play a role during testis development. However, the exact mechanism needs to be studied more precisely.

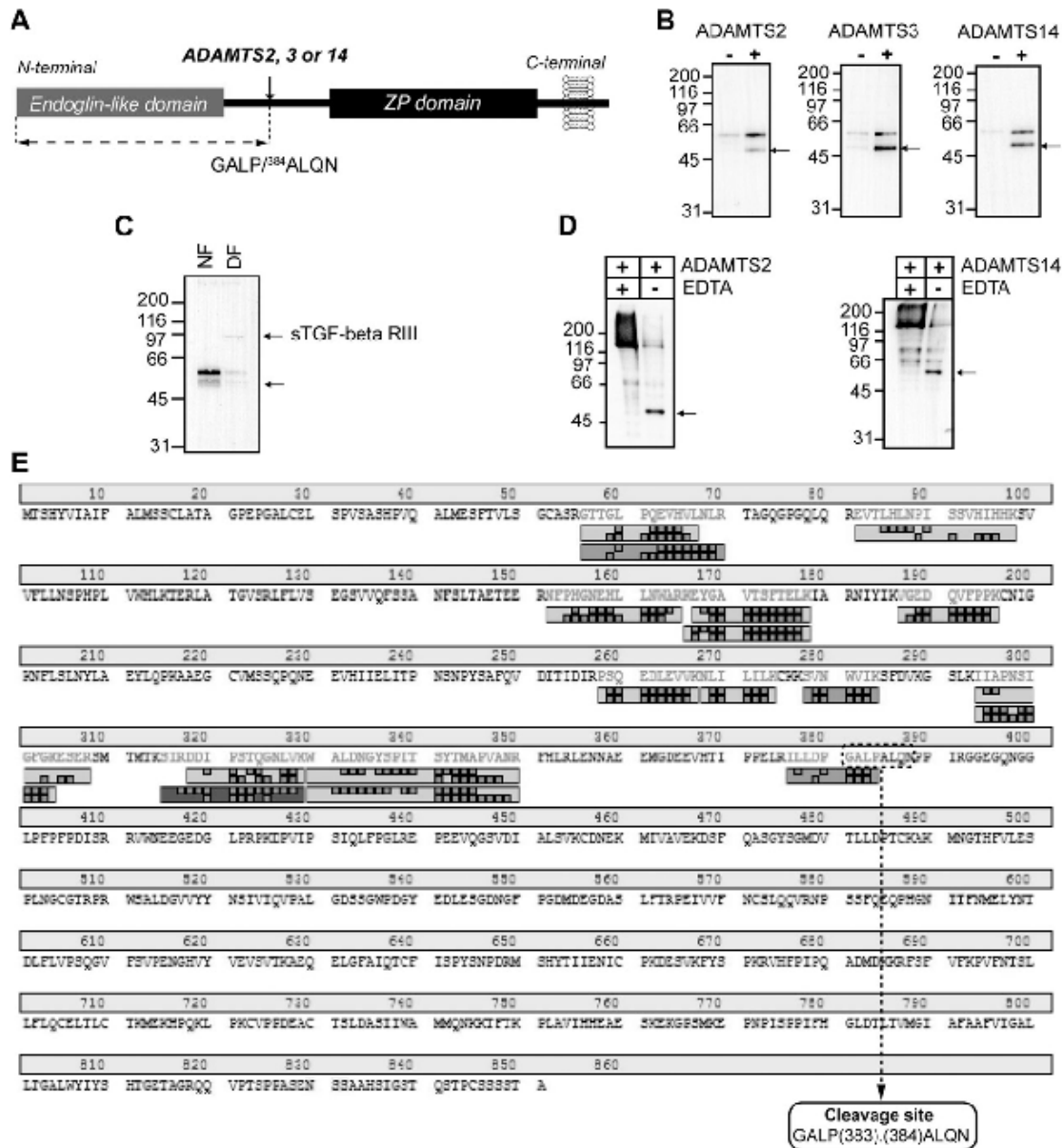


Figure 5. TGF- β RIII cleavage by ADAMTS2, 3, and 14. A) Schematic view of TGF- β RIII shows the cleavage site observed by N-terminomics and confirmed by MS/MS identification of the cleavage product in gel (Supplemental Table 1; see below). B) Western blot for TGF- β RIII in the medium of HEK cells over-expressing ADAMTS2, 3, or 14. The direct cleavage product is indicated by arrows. C) Western blot analysis of TGF- β RIII present in the medium of human normal fibroblasts (NF) or DFs. The shed form (sTGF- β RIII) is indicated by an arrow. D) Western blot shows the digestion of recombinant-purified TGF- β RIII (2.5 ng) by recombinant ADAMTS2 (left) or 14 (right) *in vitro*. The only cleavage product, observed using Coomassie staining and identified by MS/MS, is the endoglin-like domain (arrow). E) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry identification of the 50 kDa TGF- β RIII product generated by ADAMTS2 cleavage. Semitrypsin digestion was set as parameter for the identification of the peptide sequences. The cleavage product ends at the cleavage site determined by N-TAILS.

Analyses of the proteinase networks reveal a strong link between pNPs and TGF- β signaling. This is in line with previous data showing that 1) mutations affecting ADAMTS10, ADAMTS17, ADAMTSL2, or ADAMTSL4 proteins are involved in genetic diseases related to elastic fibers and TGF- β (36, 37); 2) the absence of ADAMTS2 reduces liver fibrosis (38); and 3) ADAMTS enzymes are

characterized by the presence of one or several domains similar to the “thrombospondin type I repeat” domain known to activate pro-TGF- β 1 (39, 40).

This study reports new mechanisms by which ADAMTS2, 3, and 14 can collectively modulate TGF- β signaling, through the cleavage of LTBP1, TGF- β RIII, and probably, pro-TGF- β . The direct cleavage of LTBP1 was

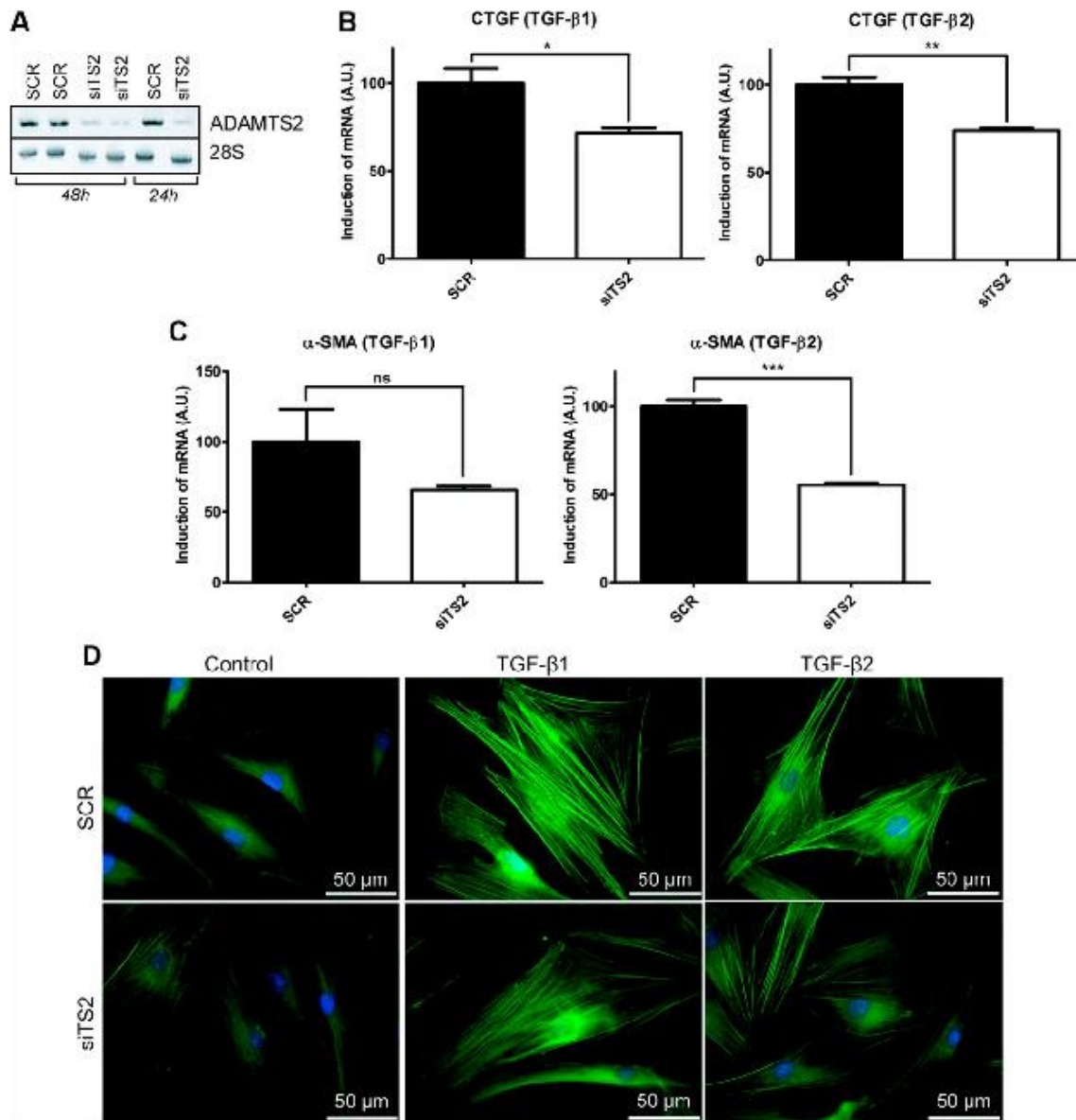


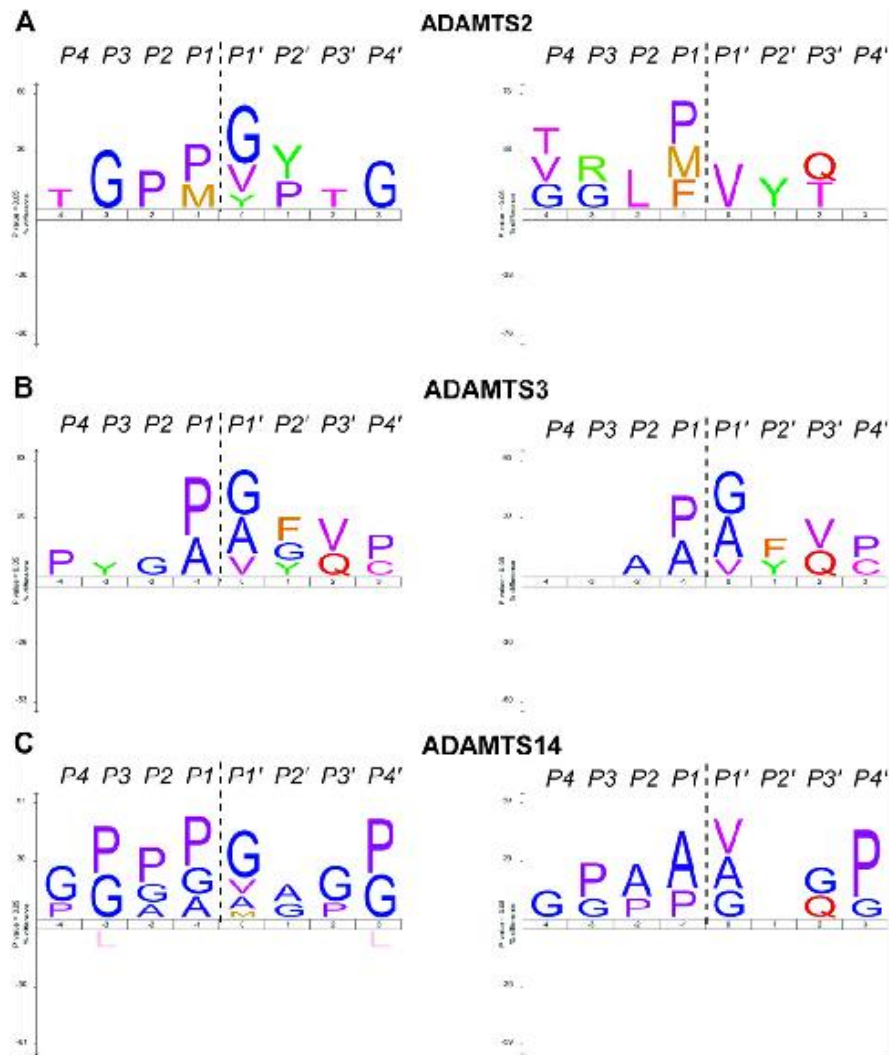
Figure 6. Biological implication of ADAMTS2 in TGF- β signaling in human fibroblasts. A) Assessment of ADAMTS2 silencing by RT-PCR after 24 or 48 h. Human normal dermal fibroblasts were transfected with a scrambled siRNA or an siRNA directed against ADAMTS2. B and C) Investigation of TGF- β response in human fibroblasts by RT-PCR using 2 TGF- β target genes: CTGF (B) and α -SMA (C). Human normal fibroblasts were transfected with a scrambled (SCR) or a specific siRNA (siTS2) for ADAMTS2 and were treated with 1 ng/ml TGF- β 1 (left panel) or TGF- β 2 (right panel) for 48 h. A.U., arbitrary units. Experiments were done in triplicate. Error bars are 6 SEM. ns, 0.1046; *P = 0.0178, **P = 0.0017, and ***P = 0.0002, determined using the 1-tailed unpaired t test. D) Investigation of α -SMA level in human fibroblasts by immunofluorescence (FITC, green). Nuclei were stained with DAPI. Cells were treated as described above.

clearly demonstrated for ADAMTS3, which induces the release of TGF- β immobilized in the ECM. In the case of ADAMTS2 or 14, a specific cleavage site in LTBP1 inducing such release could not be identified. However, Western blot analyses showed that the LLC (formed by LTBP1, LAP, and TGF- β) is less abundant in the presence of ADAMTS2 or ADAMTS14. This suggests either that LTBP1 is cleaved at a site that is different from the ADAMTS3 cleavage site and could not be identified in our experimental conditions

or that cleavage occurs in the LAP or in TGF- β itself (see Fig. 4A). In favor of the latter hypothesis, N-terminomics data showed that ADAMTS14 cleaves the pro-TGF- β molecule between the LAP domain and C-terminal sequence corresponding to mature TGF- β (Supplemental Table 1).

The cell surface receptor TGF- β RIII is known to act as a coreceptor for TGF- β signaling and notably for TGF- β 2 (41, 42). TGF- β RIII can also be shed from the cell surface to release a soluble form that acts as an inhibitor of TGF- β

Figure 7. Analysis of the cleavage site specificities of ADAMTS2, 3, and 14. Data are shown for ADAMTS2 (A), ADAMTS3 (B), and ADAMTS14 (C) with (left) or without (right) type I collagen cleavages. The analyses were based on 18, 31, and 45 cleavage events (left) or 8, 26, and 23 cleavage events (right) respectively for ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14. Cleavage sites determined by N-terminal Edman sequencing or ATOMS were used to complement the proteomic analysis. Amino acid sequence logos were generated using the iceLogo software package (24). The height of 1 amino acid reflects its frequency; the color represents its physicochemical properties.



signaling (43-45). Cleavage of the soluble TGF- β RIII within the nonstructured linker between the N-terminal endoglin-like domain and the zona p \acute{a} lucida domain hampers its ability to inhibit TGF- β signaling because both domains are required for the recognition of the growth factors of the TGF- β superfamily (23, 45, 46). Therefore, cleavage of the soluble TGF- β RIII by the pNPs within the nonstructured linker will also contribute to increase TGF- β availability.

Cleavage of LTBP1 and soluble TGF- β RIII by the pNPs should both lead to activation of TGF- β signaling. This hypothesis was evaluated in human skin fibroblasts using ADAMTS2 as a model. Our data clearly show that the response to TGF- β 1 and - β 2 is down-regulated in the absence of endogenous ADAMTS2. Additional characterizations will be required to identify more precisely the relative contribution of the different cleavages (LTBP1, pro-TGF- β , and/ or TGF- β RIII). Because ADAMTS2 expression is induced by TGF- β (47), its role in TGF- β signaling reported here constitutes a positive feedback loop that could be involved in processes

such as fibrosis or wound healing (48, 49). We have reported that tetrachloride-induced liver fibrosis is reduced in *Adamts2*^{2/2} mice, implying the involvement of ADAMTS2 in fibrosis (38). This function was initially assumed to be due only to alterations in amino procollagen processing, but the involvement of ADAMTS2 in the cell response to TGF- β reported here could be an important additional mechanism.

In conclusion, this original analysis of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 shed a new light on the dogmatic idea that ADAMTS2, 3, and 14 are only involved in amino procollagen processing. Because they are able to cleave many ECM macromolecules but also proteins directly regulating cell phenotype such as factors involved in Wnt and TGF- β pathways, they should now be considered as multilevel regulators of ECM deposition and remodeling. [7]

The authors are grateful for support by the Incoming Postdoctoral-Marie Curie (COFUND) fellowship (Brussels, Belgium), the Télévie (7.4602.14), Fonds de la Recherche

Scientifique-Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS; T.0183.13), Centre National de la Recherche Scientifique, and University of Lyon. The authors thank Ulrich auf dem Keller (Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Zurich, Switzerland) for his help in running the analysis of N-terminomics data, Bart Devreese and Isabel Vandenberghe (Ghent University, Ghent, Belgium) for N-terminal Edman sequencing, Larry Fisher (U.S. National Institutes of Health) for the LF-69 rabbit antiserum, Antoine Heyes and Lola Vanooerschot for their technical support, and Christophe Deroanne for his advice in running the small interfering RNA experiments (all from the Laboratory of Connective Tissues Biology, University of Liège). M.B. performed the analysis of the terminal amine isotopic labeling of substrate data and the biochemical validations of new substrates; C.L. performed the biochemical validations and preparation of proteomic samples for a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif 3 and 14 experiments; L.D., L.J., and J.D. provided mouse samples; L.D. provided the conditional human embryonic kidney cells expressing the different procollagen N-proteinases; J.D. provided the human embryonic kidney cells expressing active or inactive disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif 2; S.V.-L.G., D.J.S.H., and C.M. provided recombinant bone morphogenetic protein 1, procollagen C-proteinase enhancer, and miniprocollagen III; F.D. and I.Z.-C. performed the mass spectrometric analysis for a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif 2 (experiment A); F.D. performed the analyses with the Trans-Proteomic Pipeline; N.S., D.B., G.M., and E.D.P. performed the mass spectrometry analyses on the Q Exactive; S.V.-L.G., D.J.S.H., and B.N. gave advice during the experiments as well as critical reading of the manuscript; and M.B., C.M., and A.C. conceived and designed the experiments and wrote the paper. M.B. and C.L. are co-first authors. Mass spectrometry proteomic data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRotomics IDentifications partner repository with the data set identifier PXD002354 and digital object identifier 10.6019/PXD002354. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Bekhouche, M., and Colige, A. (2015) The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biol.* 44-46, 46-53
2. Nussgens, B. V., Verellen-Dumoulin, C., Hermanns-Lê, T., DePaeppe, A., Nuytinc, L., Piérard, G. E., and Lapière, C. M. (1992) Evidence for a relationship between Ehlers-Danlos type VII C in humans and bovine dermatosparaxis. *Nat. Genet.* 1, 214-217
3. Li, S. W., Arita, M., Fertala, A., Bao, Y., Kopen, G. C., Långsjö, T. K., Hytinen, M. M., Helminen, H. J., and Prockop, D. J. (2001) Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS2) develop fragile skin and male sterility. *Biochem J.* 355, 271-278
4. Hofer, T. P., Frankenberger, M., Mages, J., Lang, R., Meyer, P., Hoffmann, R., Colige, A., and Ziegler-Heitbrock, L. (2008) Tissue-specific induction of ADAMTS2 in monocytes and macrophages by glucocorticoids. *J. Mol. Med. (Berl.)* 86, 323-332
5. Arning, A., Hiersche, M., Witten, A., Kurlmann, G., Kurnik, K., Manner, D., Stoll, M., and Nowak-Göttl, U. (2012) A genome-wide association study identifies a gene network of ADAMTS genes in the predisposition to pediatric stroke. *Blood* 120, 5231-5236
6. Goertsches, R., Comabella, M., Navarro, A., Perkal, H., and Montalban, X. (2005) Genetic association between polymorphisms in the ADAMTS14 gene and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 164, 140-147
7. Poonpet, T., Honsawek, S., Tammachote, N., Kanitnabe, S., and Tammachote, R. (2013) ADAMTS14 gene polymorphism associated with knee osteoarthritis in Thai women. *Genet. Mol. Res.* 12, 5301-5309
8. Rodriguez-Lopez, J., Pombo-Suarez, M., Loughlin, J., Tsezou, A., Blanco, F. J., Meulenbelt, I., Slaugboom, P. E., Valdes, A. M., Spector,

- T. D., Gomez-Reino, J. J., and Gonzalez, A. (2009) Association of a nsSNP in ADAMTS14 to some osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 321-327
9. Lee, C. W., Hwang, I., Park, C. S., Lee, H., Park, D. W., Kang, S. J., Lee, S. W., Kim, Y. H., Park, S. W., and Park, S. J. (2012) Expression of ADAMTS-2, -3, -13, and -14 in culprit coronary lesions in patients with acute myocardial infarction or stable angina. *J. Thromb. Thrombolysis* 33, 362-370
10. Jeltsch, M., Jha, S. K., Tvorogov, D., Anisimov, A., Leppänen, V. M., Holopainen, T., Kivela, R., Ortega, S., Karpanen, T., and Alitalo, K. (2014) CCBE1 enhances lymphangiogenesis via A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-3-mediated vascular endothelial growth factor-C activation. *Circulation* 129, 1962-1971
11. Kleifeld, O., Doucet, A., auf dem Keller, U., Prudova, A., Schilling, O., Kainthan, R. K., Starr, A. E., Foster, L. J., Kizhakkedathu, J. N., and Overall, C. M. (2010) Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat. Biotechnol.* 28, 281-288
12. Prudova, A., auf dem Keller, U., Butler, G. S., and Overall, C. M. (2010) Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 894-911
13. Jefferson, T., Auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V. V., Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A., Maier, W., Magdolen, V., Sterchi, E., Bond, J. S., Jayakumar, A., Traupe, H., Chalaris, A., Rosejohn, S., Pietrzik, C. U., Postina, R., Overall, C. M., and Becker-Pauly, C. (2013) The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin b and ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 309-333
14. Fisher, L. W., Stubbs III, J. T., and Young, M. F. (1995) Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* 266, 61-65
15. Moali, C., Font, B., Ruggiero, F., Eichenberger, D., Rousselle, P., François, V., Oldberg, A., Bruckner-Tuderman, L., and Hulmes, D. J. (2005) Substrate-specific modulation of a multisubstrate proteinase. C-terminal processing of fibrillar procollagens is the only BMP-1-dependent activity to be enhanced by PCPE-1. *J. Biol. Chem.* 280, 24188-24194
16. Colige, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Dubail, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapière, C. M., and Nussgens, B. (2005) Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the amino-propeptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *J. Biol. Chem.* 280, 34397-34408
17. Colige, A., Sieron, A. L., Li, S. W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilcox, W., Krakow, D., Cohn, D. H., Reardon, W., Byers, P. H., Lapière, C. M., Prockop, D. J., and Nussgens, B. V. (1999) Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 308-317
18. Kleifeld, O., Doucet, A., Prudova, A., auf dem Keller, U., Gioia, M., Kizhakkedathu, J. N., and Overall, C. M. (2011) Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. *Nat. Protoc.* 6, 1578-1611
19. Vizcaíno, J. A., Deutsch, E. W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Ríos, D., Dianes, J. A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P. A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., Gatto, L., Campos, A., Chalkley, R. J., Kraus, H. J., Albar, J. P., Martínez-Bartolomé, S., Apweiler, R., Omenn, G. S., Martens, L., Jones, A. R., and Hermjakob, H. (2014) ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat. Biotechnol.* 32, 223-226
20. Auf dem Keller, U., and Overall, C. M. (2012) CLIPPER: an add-on to the Trans-Proteomic Pipeline for the automated analysis of TAILS N-terminomics data. *Biol. Chem.* 393, 1477-1483
21. Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 21, 3448-3449
22. Doucet, A., and Overall, C. M. (2011) Broad coverage identification of multiple proteolytic cleavage site sequences in complex high molecular weight proteins using quantitative proteomics as a complement to edman sequencing. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.003533
23. Delolme, F., Anastasi, C., Alcaraz, L. B., Mendoza, V., Vadon-Le Goff, S., Talantikite, M., Capomaccio, R., Mevaere, J., Fortin, L., Mazzocut, D., Damour, O., Zanella-Cléon, I., Hulmes, D. J., Overall, C. M.,

- Valcourt, U., Lopez-Casillas, F., and Moali, C. (2015) Proteolytic control of TGF- β co-receptor activity by BMP-1/ tolloid-like proteases revealed by quantitative ITRAQ proteomics. *Cdl. Md. LifeSci.* 72, 1009-1027
24. Colaert, N., Helsens, K., Martens, L., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2009) Improved visualization of protein consensus sequences by cyclLogo. *Nat. Methods* 6, 786-787
25. Lee, E. J., Jo, M., Rho, S. B., Park, K., Yoo, Y. N., Park, J., Chae, M., Zhang, W., and Lee, J. H. (2009) Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of beta-catenin. *Int. J. Cancer* 124, 287-297
26. Romero, D., Kawano, Y., Bengoa, N., Walker, M. M., Maltry, N., Niehrs, C., Waxman, J., and Kypta, R. (2013) Downregulation of Dickkopf-3 disrupts prostate acinar morphogenesis through TGF- β / Smad signalling. *J. Cdl Sci.* 126, 1858-1867
27. Ge, G., and Greenspan, D. S. (2006) Developmental roles of the BMP1/ TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 78, 47-68
28. Fish, P. V., Allan, G. A., Bailey, S., Blagg, J., Butt, R., Collis, M. G., Greiling, D., James, K., Kendall, J., McElroy, A., McCleverty, D., Reed, C., Webster, R., and Whitlock, G. A. (2007) Potent and selective nonpeptidic inhibitors of procollagen C-proteinase. *J. Med. Chem* 50, 3442-3456
29. Hulmes, D. J., Mould, A. P., and Kesler, E. (1997) The CUB domains of procollagen C-proteinase enhancer control collagen assembly solely by their effect on procollagen C-proteinase/ bone morphogenetic protein-1. *Matrix Biol.* 16, 41-45
30. Das, D. S., Wadhwa, N., Kunj, N., Sarda, K., Pradhan, B. S., and Majumdar, S. S. (2013) Dickkopf homolog 3 (DKK3) plays a crucial role upstream of WNT/ β -CATENIN signaling for Sertoli cell mediated regulation of spermatogenesis. *PLoS One* 8, e63603
31. Dubail, J., Kesteloot, F., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J. M., Lapière, C., Nusgens, B., and Colige, A. (2010) ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. *Cdl. Md. LifeSci.* 67, 4213-4232
32. Jansen, L., Dupont, L., Bekhouche, M., Noel, A., Leduc, C., Voz, M., Peers, B., Cataldo, D., Apte, S. S., Dubail, J., and Colige, A. (2015) ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. [E-pub ahead of print] *Angiogenesis*
33. Maurer, L. M., Tomasini-Johansson, B. R., and Mosher, D. F. (2010) Emerging roles of fibronectin in thrombosis. *Thromb. Res.* 125, 287-291
34. Lohr, K. M., Kurth, C. A., Xie, D. L., Seyer, J. M., and Homandberg, G. A. (1990) The amino-terminal 29- and 72-Kd fragments of fibronectin mediate selective monocyte recruitment. *Blood* 76, 2117-2124
35. Kawano, Y., Kitaoka, M., Hamada, Y., Walker, M. M., Waxman, J., and Kypta, R. M. (2006) Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3. *Oncogene* 25, 6528-6537
36. Sengle, G., Tsutsui, K., Keene, D. R., Tufa, S. F., Carlson, E. J., Charbonneau, N. L., Ono, R. N., Sasaki, T., Wirtz, M. K., Samples, J. R., Fessler, L. I., Fessler, J. H., Sekiguchi, K., Hayflick, S. J., and Sakai, L. Y. (2012) Microenvironmental regulation by fibrillin-1. *PLoS Genet.* 8, e1002425
37. Bourd-Boittin, K., Bonnier, D., Leyme, A., Mari, B., Tuffery, P., Samson, M., Ezan, F., Baffet, G., and Theret, N. (2011) Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta. *Hepatology* 54, 2173-2184
38. Kesteloot, F., Desmoulière, A., Leclercq, I., Thiry, M., Arrese, J. E., Prockop, D. J., Lapière, C. M., Nusgens, B. V., and Colige, A. (2007) ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 2 inactivation reduces the extent and stability of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 46, 1620-1631
39. Crawford, S. E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J. E., Ribeiro, S. M., Lawler, J., Hynes, R. O., Boivin, G. P., and Bouck, N. (1998) Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cdl* 93, 1159-1170
40. Murphy-Ullrich, J. E., and Poczatek, M. (2000) Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 59-69
41. Esparza-Lopez, J., Montiel, J. L., Vilchis-Landeros, M. M., Okadome, T., Miyazono, K., and López-Casillas, F. (2001) Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J. Biol. Chem* 276, 14588-14596
42. López-Casillas, F., Wrana, J. L., and Massagué, J. (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cdl* 73, 1435-1444
43. Velasco-Loyden, G., Arribas, J., and López-Casillas, F. (2004) The shedding of betaglycan is regulated by pernanadate and mediated by membrane type matrix metalloproteinase-1. *J. Biol. Chem* 279, 7721-7733
44. Boivin, W. A., Shackelford, M., Vanden Hoek, A., Zhao, H., Hackett, T. L., Knight, D. A., and Granville, D. J. (2012) Granzyme B cleaves decorin, biglycan and soluble betaglycan, releasing active transforming growth factor- β 1. *PLoS One* 7, e33163
45. Mendoza, V., Vilchis-Landeros, M. M., Mendoza-Hernández, G., Huang, T., Villarreal, M. M., Hinck, A. P., López-Casillas, F., and Montiel, J. L. (2009) Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF- β binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry* 48, 11755-11765
46. Kirkbride, K. C., Townsend, T. A., Bruinsma, M. W., Barnett, J. V., and Blobe, G. C. (2008) Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor- β type III receptor. *J. Biol. Chem* 283, 7628-7637
47. Wang, W. M., Lee, S., Steigltz, B. M., Scott, I. C., Lebares, C. C., Allen, M. L., Brenner, M. C., Takahara, K., and Greenspan, D. S. (2003) Transforming growth factor- β induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. *J. Biol. Chem* 278, 19549-19557
48. Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2002) Transforming growth factor- β signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.* 118, 211-215
49. Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2007) Transforming growth factor- β and fibrosis. *World J. Gastroenterol.* 13, 3056-3062

Received for publication September 29, 2015.
Accepted for publication December 17, 2015.

C. Analyses complémentaires

Les travaux décrits ci-avant ont permis la mise en évidence de nouveaux substrats des ADAMTS2, 3 et 14 qui sont impliqués dans la formation et le remodelage de la MEC mais également dans la réponse au TGF- β . Ces nouvelles connaissances indiquent donc que ces ADAMTS devraient dorénavant être considérées comme des acteurs clés dans les mécanismes de l'homéostasie de la MEC puisque leur activité se manifeste à d'autres niveaux que la seule maturation protéolytique des collagènes fibrillaires.

Afin de renforcer ces hypothèses, des analyses complémentaires ont été réalisées. Elles avaient notamment pour but d'identifier l'impact fonctionnel de ces ADAMTS sur base de leurs effets sur le phénotype cellulaire et des rôles exercés par leurs substrats.

- **Impact de l'ADAMTS2 sur la migration cellulaire**

Compte tenu des rôles connus de la fibronectine matricielle et notamment dans la migration cellulaire, des tests de migration cellulaires (« scratch assays») ont été réalisés sur des fibroblastes humains de derme exprimant ou non l'ADAMTS2.

Des fibroblastes dermatosparactiques ou des fibroblastes normaux, non transfectés ou transfectés avec un siRNA contrôle ou avec un siRNA ciblant l'ADAMTS2 (voir protocole décrit dans la publication) ont étéensemencés (30×10^3 cellules par puits) dans des dispositifs de culture (Ibidi, #80209) formés de deux puits rectangulaires séparés de $500 \mu\text{m}$. Après 18h, le dispositif de culture est retiré (temps 0h) laissant un espace de $500 \mu\text{m}$ dépourvu de cellules. Des photos en contraste de phase sont ensuite prises à intervalles de temps réguliers et à des positions fixes jusqu'à ce que les cellules aient migré et rempli entièrement l'espace entre les puits. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope Nikon TiS équipé une caméra CCD haute résolution (Andor), d'un régulateur d'intensité halogène Fiber Illuminator Intensilight et de l'objectif CFI Plan Fluor DL 10X 0.30 (Nikon), le tout contrôlé par le logiciel NIC-Elements (Nikon). Les quantifications de la surface non occupée par les fibroblastes au cours du temps (logiciel NIS-Elements (Nikon)) permettent d'évaluer la vitesse de migration.

La vitesse de migration des fibroblastes normaux (NF et NF + siRNA SCR) est plus rapide que celle des fibroblastes dermatosparactiques (DF) (**Figure 24**). De manière remarquable, la répression de l'expression de l'ADAMTS2 au sein des fibroblastes normaux (NF + siRNA TS2) se traduit par une réduction de leur vitesse de migration qui devient semblable à celles des fibroblastes dermatosparactiques, démontrant ainsi le rôle de l'ADAMTS2 dans le processus migratoire.

Les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas encore été identifiés mais pourraient impliquer le clivage de protéines membranaires ou l'activation de voies de signalisation.

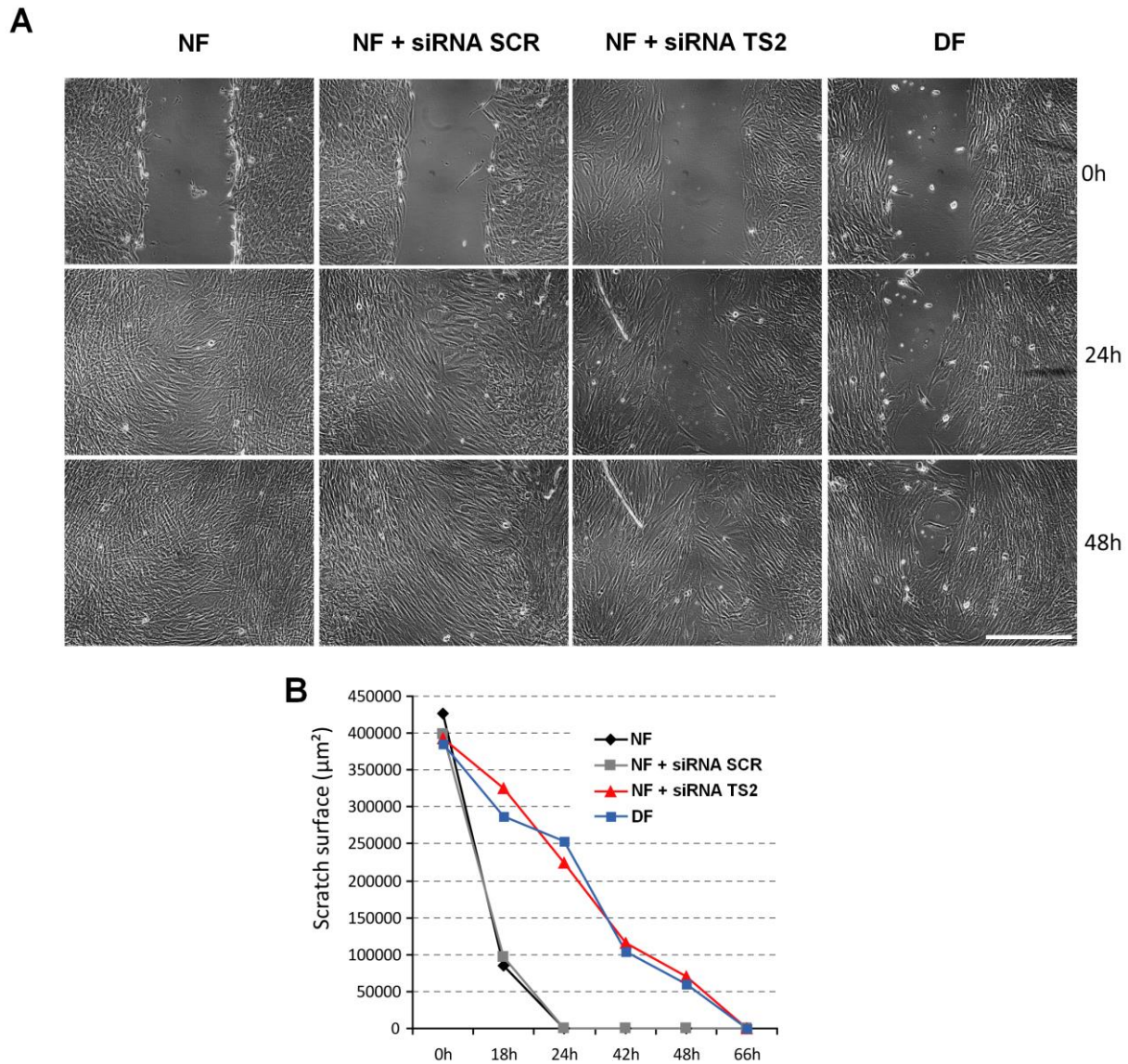


Figure 24: L'expression d'ADAMTS2 stimule la migration cellulaire.

La vitesse de migration de fibroblastes dermatosparactiques (DF) ou de fibroblastes normaux (NF) transfectés par un siRNA contrôle (NF + siRNA SCR) ou ciblant l'ADAMTS2 (NF + siRNA TS2) a été mesurée dans le modèle de « scratch wound healing ». Des photos représentatives ont été prises au début du test (0h), puis après 24 et 48 heures (A). L'espace non occupé par les cellules a été mesuré au cours du temps (Scratch surface, μm^2 ; siRNA SCR : siRNA scramble ; siRNA TS2 : siRNA ADAMTS2) (B) et permet une évaluation de la vitesse de migration.

- **Rôle potentiel de l'ADAMTS2 dans la coagulation sanguine**

Notre étude par iTRAQ N-TAILS a mis en évidence un clivage de la fibronectine plasmatique humaine par les ADAMTS2 et 14. Compte tenu du rôle de la fibronectine plasmatique dans l'hémostase et en raison d'une publication associant le gène de l'ADAMTS2 aux accidents vasculaires cérébraux chez l'enfant (Arning et al., 2012) et chez l'adulte (Arning et al., 2016), nous avons voulu évaluer l'éventuel impact de l'ADAMTS2 dans des tests de coagulation sanguine où du sang de donneurs est incubé en présence ou non d'ADAMTS2 purifiée (en collaboration avec Céline Delierneux du Laboratoire de Thrombose et d'Hémostase du GIGA).

Le sang de volontaires sains (n=3) a été récolté dans un tampon citrate (3,2%) qui évite la coagulation (selon un rapport sang/tampon citrate 9/1). Le sang est ensuite fractionné par centrifugation à 180g pendant 15 minutes à température ambiante. La fraction enrichie en plaquettes est alors ajustée à une concentration de 3.10^5 plaquettes/ml à l'aide de la fraction pauvre en plaquettes. 250µl de plaquettes sont mélangés à 5µl de globules rouges permettant la visualisation du caillot. De l'ADAMTS2 (25 ou 50nM) ou le volume correspondant de son tampon (Tris HCl 50mM, NaCl 150mM CaCl₂ 2mM), ou du tirofiban (1,25µg/ml) est ensuite ajouté, mélangé et incubé avec les échantillons (30 minutes à 37°C). De la thrombine (0,1 U/ml) et du CaCl₂ (20mM) sont finalement ajoutés pour initier la coagulation sanguine et la formation du caillot. Dès ce moment (t=0 min), des photos ont été prises à intervalles de temps réguliers à l'aide d'un Nikon 3200D.

Lorsque les plaquettes sont incubées seules avant l'ajout de thrombine et de CaCl₂ (condition basale, **A**), une très faible coagulation est observée (**Figure 25**). Celle-ci n'est pas modifiée par la présence du tampon dans lequel se trouve l'ADAMTS2 (**E, F**) alors que la présence du tirofiban (un inhibiteur de la fonction plaquettaire) empêche toute coagulation (**B**). En revanche, en présence d'ADAMTS2 (25 et 50 nm), la formation du caillot est stimulée (**C, D**). Des résultats similaires ont été observés pour les 2 autres donneurs (non illustrés). Ces données, qui restent préliminaires, sont à confirmer sur un plus grand nombre de donneurs. Elles semblent néanmoins indiquer que l'ADAMTS2 favoriserait la coagulation sanguine, suggérant ainsi un nouveau rôle indépendant de sa fonction aminoprocollagène peptidase.

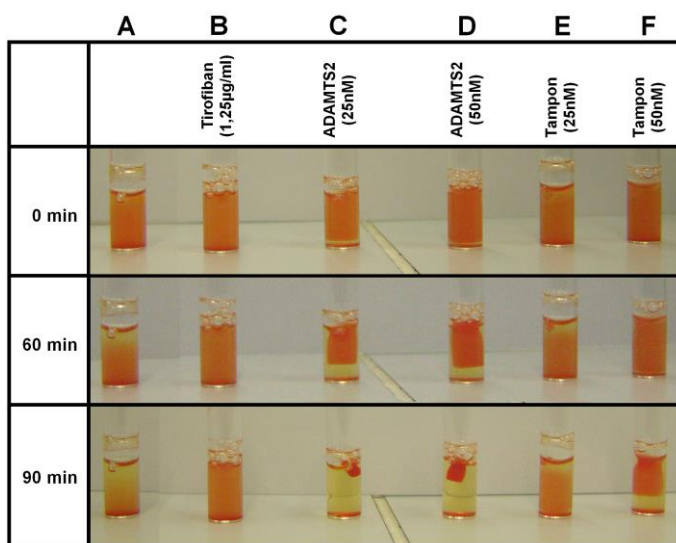


Figure 25 : Effet de l'ADAMTS2 sur la vitesse de coagulation sanguine.

3.10^5 plaquettes colorées par 5µl de globules rouges ont été incubées seules (A), en présence de tirofiban (un inhibiteur de la fonction plaquettaire) (B), d'ADAMTS2 (25nM ou 50nM) (C, D) ou de la quantité correspondante de tampon (E, F) avant d'initier la coagulation par ajout de thrombine et de CaCl₂. (n=3 donneurs).

- **Clivage du CTGF par les ADAMTS2 et 3**

Le CTGF (également connu sous le nom de CCN2) est une protéine « matricellaire capable d'interagir avec de nombreux constituants matriciels et avec diverses intégrines. Son expression est stimulée par le TGFβ et il est considéré comme un médiateur extracellulaire de certains des effets du TGFβ. Son identification comme substrat potentiel dans nos analyses par iTRAQ-TAILS était donc tout à fait pertinente par rapport à nos observations montrant le rôle de l'ADAMTS2 dans la réponse cellulaire au TGF-β.

Des analyses par Western blotting ont été réalisées sur différents sécrétomes de fibroblastes. Le CTGF est détecté sous forme d'un doublet (38 et 42 kDa) dans le sécrétome de fibroblastes

dermatosparactiques (**Figure 26, A**). Il est également présent dans le sécrétome de fibroblastes normaux exprimant l'ADAMTS2, mais de manière moins intense.

Des co-cultures entre fibroblastes dermatosparactiques et HEK293 exprimant les ADAMTS2 ou 3 ou 14 en présence de doxycycline ont également été réalisées (**Figure 26, B - C**). Une disparition totale du CTGF détecté par l'anticorps est observée lorsque les ADAMTS2 ou 3 sont exprimées alors que l'ADAMTS14 est sans effet (données non présentées). Ceci ne signifie toutefois pas que les ADAMTS2 et 3 dégradent complètement le CTGF. Il se pourrait par exemple que l'épitope reconnu par l'anticorps soit situé à l'extrémité de la protéine et que son excision résulte donc en la disparition de l'immunoréactivité du CTGF. Par ailleurs, il est également possible que le CTGF, une fois clivé, s'associe préférentiellement à la couche cellulaire et ne soit plus présent dans le milieu conditionné. Il est également possible que le clivage se produise au sein de l'épitope reconnu par l'anticorps, ce qui empêcherait la reconnaissance par l'anticorps des fragments générés. De futures expériences utilisant d'autres anticorps et évaluant à la fois la couche cellulaire et le milieu conditionné devront donc être entreprises.

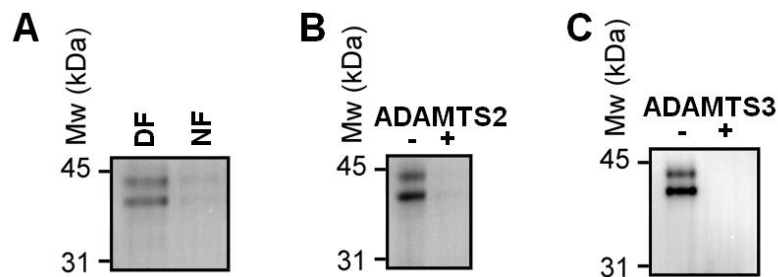


Figure 26: Clivage du CTGF par les ADAMTS2 et 3.

Visualisation par Western blotting du CTGF présent dans les sécrétomes de fibroblastes dermatosparactiques (DF) ou normaux (NF) (A), ou dans les sécrétomes de fibroblastes dermatosparactiques co-cultivés avec des HEK293 capables de surexprimer l'ADAMTS2 (B) ou l'ADAMTS3 (C) de manière dépendante de la doxycycline (- : absence de doxycycline ; + : présence de doxycycline). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et le CTGF mis en évidence par un anticorps (Santa-Cruz Biotechnology).

D. Discussion, conclusions et perspectives du chapitre 1

Avant l'entame de ce travail, des résultats expérimentaux, parfois indirects mais concordants, suggéraient que les ADAMTS2, 3 et 14 puissent cliver d'autres substrats que les collagènes fibrillaires. Cette hypothèse a été étudiée par une approche protéomique permettant d'identifier des substrats de protéases sans qu'aucune connaissance préalable des sites préférentiels de clivage ou de la nature de ces substrats ne soit requise. Cette technique relativement récente et implantée dans un nombre restreint de laboratoires dans le monde avait ainsi permis de déterminer de nouveaux substrats de protéases incluant notamment des MMP (Prudova et al., 2010; Schlage et al., 2015) et des cathepsines (Prudova et al., 2016). Dans ce travail, cette approche expérimentale a été adaptée à l'étude des ADAMTS, et en particulier des ADAMTS2, 3 et 14 dont les seuls substrats connus étaient certains procollagènes fibrillaires (Bekhouche and Colige, 2015) alors que, pourtant, diverses données expérimentales suggéraient d'autres fonctions indépendantes de la biologie des collagènes (Arning et al., 2012; Arning et al., 2016; Dong et al., 2013; Dubail et al., 2010; El Houry et al., 2013; Goertsches et al., 2005; Kesteloot et al., 2007; Poonpet et al., 2013; Rodriguez-Lopez et al., 2009).

La plupart des modèles expérimentaux de N-terminomique consistent à comparer le sécrétome de clones de cellules transformées surexprimant l'enzyme étudiée sous forme recombinante avec le sécrétome de clones contrôles. Ce modèle simple ne nous a pas semblé optimal pour notre étude car les ADAMTS2, 3 et 14 sont principalement exprimées par les cellules d'origine mésenchymateuse. Par ailleurs, il est vraisemblable qu'une partie significative de leurs substrats soient également produits par ce type cellulaire. Une de nos priorités était donc d'utiliser des cellules fibroblastiques. Notre choix s'est porté sur des fibroblastes issus de patients souffrant d'un syndrome d'Ehlers-Danlos de type dermatosparactique. En effet, en raison d'une mutation « non-sens », ceux-ci sont dépourvus d'activité ADAMTS2 alors qu'ils n'expriment pas d'ADAMTS3 et très peu d'ADAMTS14. Toutefois, des fibroblastes humains primaires sont difficilement transfectables et ne peuvent être maintenus en culture à long terme. Afin de disposer d'une source d'ADAMTS et de bénéficier de conditions expérimentales robustes, nous avons développé des clones de cellules HEK293 inductibles n'exprimant l'ADAMTS2, l'ADAMTS3 ou l'ADAMTS14 qu'en présence de doxycycline. L'avantage de ce modèle expérimental est que les comparaisons sont effectuées entre des cellules identiques cultivées en absence (témoin négatif) ou en présence d'inducteur (échantillon « protéase »), ce qui réduit substantiellement les risques d'observer des différences ne reflétant que la variabilité entre deux clones et non la conséquence de l'activité de l'enzyme. Des co-cultures associant des fibroblastes dermatosparactiques et des clones de HEK293 ont été incubées en absence (cultures contrôles) ou en présence (échantillon « protéase ») de doxycycline. Les différents sécrétomes ont ensuite été comparés par l'iTRAQ-TAILS. De très nombreux substrats ont été identifiés, dont les collagènes fibrillaires, les seuls substrats précédemment connus des ADAMTS2, 3 et 14, ce qui témoigne de la validité de notre approche expérimentale. Différents types d'analyses et d'expériences complémentaires ont ensuite été réalisés concernant notamment :

- La confirmation, par d'autres techniques, des clivages des nouveaux substrats, choisis sur base de leur intérêt biologique et/ou de leur probabilité élevée d'être des substrats réels (protéase/contrôle >1) ;
- L'évaluation de l'impact biologique des clivages observés ;
- L'identification des sites préférentiels de clivage par analyses bio-informatiques.

Pour les 3 ADAMTS étudiées, les positions de part et d'autre du site de clivage (P1 et P1') étaient « enrichies » en acides aminés non polaires ou légèrement hydrophobes (principalement en Gly, Pro, Ala, Meth, Val et Phe). Ces analyses ont été répétées sans prendre en compte les collagènes, très riches en Gly et Pro, afin d'éviter tout biais d'interprétation des données. Des résultats similaires ont été obtenus. La base de données MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops>) qui recense diverses informations connues sur les protéases a permis de comparer cette spécificité de clivage à celle d'autres métalloprotéases (Rawlings, 2016). La spécificité de clivage des ADAMTS2, 3 et 14 présente des similitudes avec celle d'autres protéases présentant une activité de collagénase (sur les collagènes fibrillaires), dont la BMP1 et les MMP2 et MMP9. Un enrichissement en Gly en position P1 est en effet au milieu du site de clivage de ces MMP, ce qui n'est pas surprenant compte tenu de la richesse en Gly des domaines en triple hélice des collagènes fibrillaires. Les substrats des ADAMTS2, 3 et 14 présentent également un enrichissement en Ala en P1, qui est également observé pour des protéases de la famille des ADAM telles que les ADAM10, ADAM17 et ADAM8. La spécificité des ADAMTS2, 3 et 14 est plus manifeste pour la position P1' du site puisque la BMP1 a une préférence pour une Asp, les MMP2 et MMP9 pour une Leu et l'ADAM8 pour une Gln. Une majorité des membres des MMP semble aussi avoir une prépondérance pour les Leu en position P1' de leur site de clivage (Eckhard et al., 2016a; Eckhard et al., 2016b). Concernant d'autres ADAMTS (ADAMTS1, ADAMTS4 et ADAMTS5), on note une préférence marquée pour un Glu en P1 (bien que peu de clivages aient été référencés en

comparaison des MMP) ce qui les différencie des ADAMTS2, 3 et 14 alors que l'acide aminé en P1' (Ala, Val, Phe, Gly) est moins discriminant.

Nos analyses démontrent donc que les sites de clivage par les ADAMTS2, 3 et 14 sont hautement similaires et qu'ils diffèrent parfois de manière substantielle des sites préférentiels de clivage par d'autres métalloprotéases. Ceci ne signifie toutefois pas pour autant que les répertoires de substrats de nos trois ADAMTS étudiées soient identiques. C'est ainsi, par exemple, que des sites de clivage entre deux Ala sont observés pour les ADAMTS2, 3 et 14. Toutefois, seule l'ADAMTS3 clive efficacement entre deux Ala le Pro-VEGF en VEGF actif, ce qui suggère que la spécificité de clivage ne dépend pas uniquement du domaine catalytique (qui est quasiment à 100% identique pour les ADAMTS2, 3 et 14) mais également de domaines C-terminaux au niveau desquels on observe de plus grandes divergences de séquence.

Un autre exemple est fourni par le LTPB1 qui ne semble pas être un substrat de l'ADAMTS2 alors qu'il est clivé par les ADAMTS3 et 14 mais avec des sites distincts et des efficacités différentes. A l'inverse, de nombreux substrats sont clivés par nos 3 ADAMTS d'intérêt ou, au moins, par deux d'entre-elles. C'est le cas de la fibronectine, de DKK3 ou de TGF- β RIII.

L'implication potentielle du clivage de certains substrats plus pertinents, pour leurs fonctions biologiques ou l'efficacité avec laquelle ils sont clivés, est brièvement discutée ci-après.

Voie du TGF- β

Une des contributions majeures de ce travail est la mise en évidence d'une interaction fonctionnelle étroite entre les ADAMTS2, 3 et 14, et les voies de signalisation sous la dépendance de facteurs de la famille du TGF- β . Les premiers indices de ces interactions ont été mis en évidence par les études iTRAQ-TAILS, puis ont été confirmés par des analyses complémentaires qui montrent que la LTBP1, le pro-TGF- β et le TGF- β RIII sont des cibles de nos ADAMTS. Le clivage du LTBP1 et du « Latency Associated Peptide » (LAP) du pro-TGF- β 1 devrait stimuler la voie du TGF- β en favorisant sa biodisponibilité. Les conséquences du clivage du TGF- β RIII sont plus difficiles à prévoir, notamment parce qu'il stimule la réponse au TGF- β lorsqu'il est sous sa forme transmembranaire alors qu'il est essentiellement inhibiteur lorsqu'il est présent sous forme soluble dans le milieu extracellulaire après son clivage « juxta-membranaire » par des « sheddases » (Boivin et al., 2012; Mendoza et al., 2009).

La fixation du TGF- β sur le TGF- β RIII requiert la présence conjointe du domaine endogline et du domaine ZP (Delolme et al., 2015; Kirkbride et al., 2008; Mendoza et al., 2009). Dans ce contexte, le clivage par les ADAMTS2, 3 et 14 au niveau d'un site (GALP/ALQN) situé entre ces deux domaines devrait entraîner une perte d'interaction avec, en corollaire, une diminution ou une augmentation de la voie TGF- β selon la nature, respectivement, membranaire ou soluble du TGF- β RIII.

Le CTGF (également appelé CCN2) est une protéine matricellulaire composée de 4 domaines, dont un domaine « répétition thrombospondine de type 1 (TSP1) » (Sanchez-Lopez et al., 2009), similaire à ceux présents notamment dans les ADAMTS. Le CTGF participe à de nombreux processus pathophysiologiques parmi lesquels la régénération des tissus conjonctifs et l'évolution des maladies fibrotiques (Kok et al., 2014; Sanchez-Lopez et al., 2009). Son expression est un marqueur précoce d'une stimulation de la voie TGF- β . De manière remarquable, le CTGF est à l'origine d'une boucle de rétrocontrôle positif en stimulant la voie TGF- β lorsqu'il interagit avec des intégrines et via l'inactivation de certains inhibiteurs du TGF- β (Kok et al., 2014). Notre étude a mis en évidence un

clivage du CTGF (en position RELD(186).(187)TGFP) en aval du domaine TSP1. Des clivages du CTGF par des MMP (1, 2, 3, 7, 9, 13) avaient déjà été rapportés dans cette région, mais pas à ce site précis. Des clivages aux sites Asp186 et Ala197 avaient également été identifiés (utérus de laies gestantes) mais la protéase n'avait pu être identifiée (Ball et al., 2003; Ball et al., 1998). Celle-ci pourrait être l'ADAMTS3 puisqu'elle est exprimée dans l'utérus et le placenta (Janssen et al., 2016).

L'impact du clivage du CTGF et le rôle de chacun des domaines qui le composent ne sont que peu documentés (Cicha and Goppelt-Strube, 2009). De nombreuses études rapportent une stimulation de la prolifération cellulaire par le CTGF. Toutefois, cet effet semble dépendre de la présence d'autres facteurs. Il a ainsi été montré que la présence d'EGF est un élément essentiel pour l'activité pro-proliférative du CTGF ou de son fragment aminoterminal. Un effet du CTGF sur la migration cellulaire a également été rapporté. Par ailleurs, le CTGF et son fragment C-terminal stimule la synthèse du collagène mais aussi de la fibronectine et de la MMP2. Dans ce contexte, l'impact du clivage du CTGF par les ADAMTS 2 et 3 ne peut être prédit et devra être évalué de manière expérimentale, dans différents modèles, à l'aide de CTGF recombinant mis ou non en présence de nos différentes ADAMTS.

Afin d'évaluer la pertinence biologique de nos observations, des tests fonctionnels ont été réalisés en culture cellulaire. Ils démontrent clairement qu'en absence d'ADAMTS2 (fibroblastes dermosparactiques ou traitement de fibroblastes normaux par des siARN spécifiques) la réponse cellulaire au TGF- β 1 et TGF- β 2 est réduite de manière significative. Cette observation est à mettre en relation avec une publication plus ancienne de notre laboratoire utilisant un modèle de fibrose hépatique induite par injection de CCl₄ (Kesteloot et al., 2007). Nous avons alors montré que les expressions de TGF- β 1, de CTGF et d' α -SMA étaient inférieures dans les foies de souris TS2^{-/-} en comparaison des foies de souris de type sauvage. La fibrose hépatique était de plus faible ampleur et se résorbait plus rapidement chez les souris TS2^{-/-}. Il est probable qu'une part des mécanismes à l'origine de ces observations réside dans une sensibilité moindre envers le TGF- β qui est un facteur central dans l'évolution des maladies fibrotiques.

DKK3

DKK3 est un substrat totalement inattendu révélé par les analyses iTRAQ-TAILS puis confirmé par des techniques complémentaires. Cette protéine, qui demeure peu étudiée à ce jour, possède des homologies avec DKK1 et DKK2 qui sont connues pour être impliquées dans la régulation de la voie Wnt. Il semble toutefois qu'elle s'en distingue au niveau fonctionnel même si cela reste peu clair. DKK3 est impliqué dans le développement de la prostate (Kawano et al., 2006; Zhang et al., 2010), potentiellement par une interaction avec la voie du TGF- β (Romero et al., 2013; Romero and Kypta, 2013). Un rôle durant le développement testiculaire a également été rapporté, via une régulation de la voie Wnt/ β -caténine (Das et al., 2013). Des analyses histologiques ont montré que l'architecture tissulaire de la prostate des souris TS2^{-/-} est normale suggérant l'absence de relation fonctionnelle entre DKK3 et l'ADAMTS2 au sein de cet organe. En revanche, à l'instar des souris DKK3^{-/-}, les mâles TS2^{-/-} sont stériles.

Au cours de travaux antérieurs non publiés, nous avons pu montrer que les testicules sont normaux à la naissance et que les premiers signes pathologiques se manifestaient dès l'âge de deux semaines. Par la suite, on note un net déficit de différenciation des spermatogonies en spermatoocytes, qui aboutit à une absence quasi complète de formation de spermatozoïdes. Des expériences (immunohistologie, Western blotting) ont été réalisées afin d'établir l'existence d'un mécanisme commun menant à la stérilité des souris mâles DKK3^{-/-} et TS2^{-/-}. Elles se sont révélées peu informatives

et devront être poursuivies. Il faut toutefois noter que la stérilité des mâles TS2^{-/-} pourrait s'expliquer par d'autres mécanismes. Par exemple, il a été démontré que le GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), un membre éloigné de la famille du TGF- β qui est sécrété par les cellules de Sertoli, régule la différenciation des spermatogonies et que son activité est modifiée par des clivages protéolytiques (Piccinini et al., 2013; Singh et al., 2017). Une hypothèse de travail serait donc que le GDNF soit un substrat de l'ADAMTS2. Une autre régulation impliquée dans la fonction testiculaire est la voie de signalisation de l'axe SCF/c-kit (Cardoso et al., 2017). Tant le ligand (SCF) que le récepteur (c-kit) peuvent être clivés, ce qui module leur disponibilité. A nouveau, la possibilité qu'ils soient des substrats de l'ADAMTS2 devra être envisagée. C-kit est également un facteur crucial pour le renouvellement des mélanocytes. Cette observation est interpellante puisqu'un des traits phénotypiques des souris TS2^{-/-} est l'apparition de zones où le pelage est complètement blanc, ce qui pourrait donc supporter un rôle de l'ADAMTS2 dans certaines fonctions régulées par l'axe SCF/c-kit.

Fibronectine

La fibronectine est un constituant essentiel de la matrice extracellulaire et elle se retrouve également dans le sang où elle participe à la formation des thrombi et est impliquée dans certaines maladies thrombotiques (Cho and Mosher, 2006; Maurer et al., 2010; Wang et al., 2014b). Au cours de ce travail, nous avons montré que l'ADAMTS2, mais également dans une moindre mesure les ADAMTS3 et 14, clivent la fibronectine au site VRAA/VYQP, ce qui induit la libération d'un domaine N-terminal de 33 kDa (domaine d'assemblage). Celui-ci est impliqué dans l'auto-assemblage de molécules de fibronectine et les interactions avec la MEC. Il interagit également avec la fibrine, l'héparine et les chaînes d'héparansulfate. De manière remarquable, ce clivage est observé dans les cultures de fibroblastes dermiques normaux mais est absent dans les cultures de fibroblastes dermatosparactiques, ce qui démontre que ce clivage n'est pas un artefact lié à nos conditions expérimentales. En raison de l'implication de la fibronectine dans les mécanismes d'hémostase et suite à des publications démontrant une association entre l'ADAMTS2 et les accidents vasculaires cérébraux (Arning et al., 2012) ainsi que sa surexpression dans les plaques d'athérome impliquées dans l'infarctus du myocarde (Lee et al., 2012), nous avons entrepris une étude exploratoire de son rôle dans l'hémostase. Une augmentation de la vitesse de coagulation a été observée en présence de l'ADAMTS2. Il faut toutefois noter que les résultats devraient être validés sur base d'un plus grand nombre d'échantillons et de conditions expérimentales. Par ailleurs, cette première étude ne permet pas de déterminer si le clivage de la fibronectine par l'ADAMTS2 est impliqué dans les effets observés ou si ceux-ci résultent d'autres mécanismes à découvrir.

Le travail présenté dans ce manuscrit représente la première tentative de déterminer le répertoire de substrats d'ADAMTS et, de manière plus spécifique, d'évaluer si les aminoprocollagène peptidases pourraient avoir une palette de substrats bien plus large que leur nom initial laisserait supposer.

L'utilisation d'un modèle relativement simple de co-cultures entre cellules produisant les enzymes et des fibroblastes s'est révélée productive et informative. Nous avons en effet démontré que, collectivement, ces trois ADAMTS fortement homologues participent à un ensemble de fonctions impliquées dans la maturation et le renouvellement des composés structurels des tissus conjonctifs au cours de la réparation tissulaire, la réponse à des facteurs de croissance, la migration cellulaire et, probablement, la coagulation.

Ces résultats confortent les travaux antérieurs du laboratoire démontrant une réduction de l'ampleur des fibroses hépatiques chez les souris TS2^{-/-}. Ceci souligne par ailleurs l'importance de

déterminer de manière la plus exhaustive possible l'ensemble des substrats de ces trois ADAMTS afin d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre de situations cliniques liées à une cicatrisation déficiente (par exemple, les ulcères) ou excessive (fibroses, chéloïdes). Par ailleurs, au vu de l'importance du stroma conjonctif tumoral pour la progression des tumeurs, il est également possible que des applications cliniques puissent voir le jour dans le domaine de la cancérologie. Afin d'explorer de manière optimale l'ensemble des substrats des trois ADAMTS, de nouveaux modèles de culture devraient être développés, utilisant notamment des cellules tumorales et/ou des cellules endothéliales. Il nous a paru par ailleurs intéressant d'évaluer s'il est réaliste d'appliquer l'iTRAQ-TAILS à des échantillons complexes tels que des tissus ou organes. C'est ce type d'analyse exploratoire qui a été réalisé sur des échantillons de peaux provenant de souris de type sauvage, TS2^{-/-}, TS14^{-/-} et TS2^{-/-}/TS14^{-/-}, décrit dans le chapitre 2 des résultats de ce manuscrit.

Chapitre 2: Etude des substrats et de l'implication des ADAMTS2 et 14 *in vivo* dans la peau par iTRAQ-TAILS

Nous avons démontré, au cours du chapitre 1, l'utilisation fructueuse de l'iTRAQ-TAILS pour déterminer le répertoire de substrats des ADAMTS2, 3 et 14 *in vitro*. Cette étude a permis l'identification de nouveaux substrats tels que la FN, le CPIII, le TGF- β RIII, LTBP1, DKK3 et le CTGF. Notre étude a également permis de mettre en évidence l'implication des aminoprocollagènes peptidases dans l'architecture de la MEC et dans la régulation de la voie du TGF- β .

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons entrepris d'appliquer l'iTRAQ-TAILS à des échantillons de peau provenant de souris déficientes en ADAMTS2 et / ou en ADAMTS14 (Adamts2^{+/+}Adamts14^{+/+} ou wild type, Adamts2^{-/-}, Adamts14^{-/-} et Adamts2^{-/-}Adamts14^{-/-}) afin d'étendre nos recherches à des tissus pertinents et non plus uniquement à des modèles cellulaires. Les souris Adamts2^{-/-} présentent une fragilité cutanée sévère (Li et al., 2001), à l'image des veaux dermatosparactiques et des personnes souffrant du syndrome d'Ehlers-Danlos de type dermatosparactique (Colige et al., 1999). Les souris Adamts14^{-/-} ne présentent aucun phénotype particulièrement évident (observations effectuées au sein du laboratoire). Les souris doublement déficientes (Adamts2^{-/-}Adamts14^{-/-}) présentent un phénotype aggravé par le développement de lésions épidermiques spontanées comparé aux souris Adamts2^{-/-} (Dupont et al., 2018) (résultats présentés dans l'article repris en annexe 3).

Le but de cette étude était donc d'explorer *in vivo* les fonctions des aminoprocollagènes peptidases qui permettraient d'expliquer les phénotypes observés en se basant sur la même approche de N-terminomique que celle utilisée lors de l'étude *in vitro*. Il s'agit de la première étude de ce genre concernant des échantillons aussi complexes. Auf dem Keller U. et son équipe se sont intéressés à l'implication de la MMP2 dans un modèle murin d'inflammation cutanée mais se sont concentrés sur les protéines extracellulaires (auf dem Keller et al., 2013), alors que Sabino et al. ont utilisé l'approche de N-TAILS pour explorer l'action de protéases au cours de la cicatrisation cutanée, en récoltant l'exsudat durant la cicatrisation chez le porc (Sabino et al., 2015). Enfin, une équipe s'est intéressée à la pulpe dentaire pour la caractériser et identifier son protéome dans le cadre du projet « Human Proteome Project » mais dont le but n'était pas d'identifier l'action spécifique de protéases (Eckhard et al., 2015). Notre étude s'attèle donc à l'analyse d'échantillons plus complexes que ceux auxquels se sont intéressées les récentes études menées par N-TAILS.

A. Matériels et méthodes

- **Prélèvement, marquage et préparation des échantillons de peaux pour la spectrométrie de masse en tandem**

Un morceau de peau (1cm²) préalablement rasée a été prélevé sur la même localisation ventrale chez 3 souris (2 mâles et 1 femelle) de chaque génotype (WT, TS2^{-/-}, TS14^{-/-} et TS2^{-/-}/TS14^{-/-}). Les morceaux de peau ont été incubés dans 3 ml de tampon HEPES 50mM, CaCl₂ 2 mM and NaCl150 mM contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases MS-SAFE (Sigma, MSSAFE-1VL) pendant 1 heure sous agitation à 4°C. Les morceaux de peaux ont ensuite été récupérés et broyés à l'aide des billes MagNA Lyser Green Beads (Roche, n°03358941001) et du MagNA Lyser Instrument (Roche) dans un tampon contenant 90% de tampon d'extraction protéique (Tissue Protein

Extraction Reagent; Thermo Scientific #78510) et 10% de tampon HEPES 50mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 150 mM, avec les mêmes inhibiteurs de protéases et phosphatases que ci-avant. Les échantillons broyés ont été centrifugés 5 minutes à 8.000 rpm à 4°C et le surnageant a été récupéré. La concentration protéique a été déterminée à l'aide du test colorimétrique de Bradford, puis a été ajustée à 1.0 mg/ml. Un total de 500µg de protéines par échantillon a été utilisé pour la procédure d'iTRAQ-TAILS (Kleifeld et al., 2011). Les peptides ont été injectés dans un spectromètre de masse ESI-Q Exactive à la plateforme de protéomique du GIGA de l'Université de Liège. Le spectromètre de masse était couplé à une 2D-RP/RP NanoAcquity UPLC (Waters, Milford, USA).

- **Analyse des résultats de spectrométrie de masse et détermination des valeurs seuils**

Les analyses des résultats issus de la spectrométrie de masse en tandem ont été réalisées à l'aide du logiciel Trans Proteomic Pipeline (TPP) comme précédemment décrit (Bekhouche et al., 2016).

Pour les comparaisons d'abondances relatives des peptides, des seuils de significativité ont été calculés pour chaque comparaison effectuée. Un seuil de 3 sigmas a été retenu. Ceci signifie que, dans le cadre particulier de notre étude, les peptides considérés comme pertinents devaient présenter une *p-value* inférieure ou égale à 0,0027, et avaient donc moins de 3 chances sur 1000 d'être considérés comme pertinents « par hasard ». Afin de déterminer la valeur des 3 sigmas, le logiciel CLIPPER (repris dans la suite TPP) se base sur les N-termini naturels, c'est-à-dire les peptides correspondant aux extrémités N-terminales des protéines matures et qui ne sont donc *a priori* pas générés par la protéase d'intérêt (auf dem Keller and Overall, 2012). Il considère le rapport protéase/contrôle (P/C) de ces peptides (rapport entre les valeurs des quantifications iTRAQ dans les conditions avec et sans la protéase considérée). Le logiciel génère alors la courbe de la distribution normale de ces ratios P/C « naturels », fournissant ainsi la valeur de l'écart-type (sigma). Les 3 sigmas sont donc obtenus (+ 3 sigmas et - 3 sigmas) et par conséquent, les valeurs seuil permettant de discriminer les peptides au P/C significatif (*p-value* < à 0,0027) susceptibles d'être générés ou déplétés par la protéase.

- **Culture cellulaire, production et purification de collagène à partir de celles-ci ou à partir des peaux de veaux normaux ou dermatosparactiques**

Les fibroblastes utilisés au cours de cette étude ont été obtenus à partir de derme de donneurs sains (FNH), de patients souffrant du syndrome d'Ehlers-Danlos de type dermatosparactique (FDH) ou de patients souffrant d'ostéogenèse imparfaite (FOI). Ils ont été cultivés dans du DMEM (Lonza) supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin (Lonza). Pour les cultures destinées à la production de collagène, les cellules ont été cultivées dans du DMEM (Lonza) supplémenté avec 1% de sérum et de l'acide phospho-ascorbique (50µg/ml) (Sigma, N°49752). Après 48h de conditionnement, le milieu est récolté et centrifugé 15min à 4000rpm à 4°C, et le surnageant est conservé.

Pour purifier les collagènes produits par les fibroblastes en culture, un volume final de 33% d'éthanol est ajouté aux milieux conditionnés. Après une nuit à 4°C, une centrifugation est réalisée (7000rpm, 40minutes, 4°C). Les culots sont alors solubilisés dans une solution d'acide acétique 0,1M (pH 2.9) sous agitation à 4°C pendant 18h. Les solutions sont ensuite centrifugées (17.000rpm, 40 minutes, 4°C). Les surnageants contenant le collagène sont neutralisés extemporanément dans un tampon Tris HCl 50mM, NaCl 300mM, pH 7.5.

Les collagènes de peaux de veaux normaux ou dermatosparactiques ont été collectés et purifiés comme précédemment décrit (Colige et al., 1995; Nusgens and Lapierre, 1979).

- **Purification des ADAMTS2 et 14**

La production et la purification d'enzymes recombinantes ont été réalisées à l'aide de clones de cellules HEK293 exprimant les ADAMTS2 et 14 de manière stable (Colige et al., 2005). De manière générale, les purifications ont été réalisées à partir d'un litre de milieu conditionné (conditionnement de 48h, milieu sans sérum, 100 boîtes de pétri de 10 cm de diamètre). Après centrifugation pour se débarrasser des débris cellulaires, deux chromatographies d'affinité ont été réalisées. Les milieux conditionnés ont d'abord été chargés sur une colonne contenant 25 ml de Concanavalline A-Sépharose pré-équilibrée dans un tampon A (50mM Tris (pH 7.5), 1 M NaCl, 2mM CaCl₂). Après lavage avec le tampon A, l'élution est effectuée dans le même tampon contenant 500mM de méthyl-D-mannoside. Les fractions contenant l'enzyme ont été dialysées contre un tampon B (50mM Tris (pH 7.5), 0.2M NaCl, 2mM CaCl₂) et chargées sur une colonne Héparine-Sépharose. Après un lavage dans le tampon B, les enzymes sont éluées dans le tampon A.

- **Digestions enzymatiques des collagènes**

L'activité enzymatique des ADAMTS2 et 14 a été évaluée par le clivage de (pro)collagènes de différentes origines. Les produits de digestion enzymatique ont été séparés par électrophorèse (SDS-PAGE 6,25 ou 10%) pour être ensuite colorés au bleu de Coomassie.

Les différents collagènes ont été utilisés sous leur forme native ou après dénaturation thermique (95°C, 10 min). Les incubations en présence d'enzyme ont été réalisées à 37°C pendant 18h dans du tampon Tris 50mM (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 2mM CaCl₂. Pour les témoins négatifs, de l'EDTA (25 mM) a été ajouté avant le début de l'incubation, en tant qu'inhibiteur d'ADAMTS.

- **Liste des tableaux repris en suppléments**

L'ensemble des tableaux repris dans les suppléments sont disponibles sur la plateforme ORBi de l'ULiège (<https://orbi.uliege.be/handle/2268/226979>). Ils comprennent:

- Tableau T1. Liste des peptides identifiés dans l'expérience A.
- Tableau T2. Liste des peptides identifiés dans l'expérience B.
- Tableau T3. Liste des peptides identifiés dans l'expérience C.
- Tableau T4. Processus biologiques surreprésentés identifiés à partir de l'ensemble des peptides.
- Tableau T5. Compartiments cellulaires surreprésentés identifiés à partir de l'ensemble des peptides.
- Tableau T6. Peptides N-terminaux identifiés dans l'expérience A par iTRAQ-TAILS et rapports protéase/contrôle associés correspondants à l'activité de l'ADAMTS2.
- Tableau T7. Peptides N-terminaux identifiés dans l'expérience A par iTRAQ-TAILS et rapports protéase/contrôle associés correspondants à l'activité de l'ADAMTS14.
- Tableau T8. Peptides N-terminaux identifiés dans l'expérience B par iTRAQ-TAILS et rapports protéase/contrôle associés correspondants à l'activité de l'ADAMTS2.
- Tableau T9. Peptides N-terminaux identifiés dans l'expérience B par iTRAQ-TAILS et rapports protéase/contrôle associés correspondants à l'activité de l'ADAMTS14.
- Tableau T10. Peptides N-terminaux identifiés dans l'expérience C par iTRAQ-TAILS et rapports protéase/contrôle associés correspondants à l'activité de l'ADAMTS2.

- Tableau T11. Peptides N-terminaux identifiés dans l'expérience C par iTRAQ-TAILS et rapports protéase/contrôle associés correspondants à l'activité de l'ADAMTS14.
- Tableau T12. Réseau protéasique de l'ADAMTS2 dans les peaux de souris.
- Tableau T13. Réseau protéasique de l'ADAMTS14 dans les peaux de souris.
- Tableau T14. Substrats potentiels extracellulaires ou (trans)membranaires de l'ADAMTS2 dans les peaux de souris.
- Tableau T15. Substrats potentiels extracellulaires ou (trans)membranaires de l'ADAMTS14 dans les peaux de souris.
- Tableau T16. Substrats potentiels extracellulaires ou (trans)membranaires communs aux ADAMTS2 et 14 dans les peaux de souris.
- Tableau T17. Exemples de substrats potentiels intracellulaires des ADAMTS2 et/ou14 identifiés dans les peaux de souris.

B. Résultats

• Design expérimental

Pour investiguer les rôles des ADAMTS2 et 14, un morceau de peau (1 cm²) a été prélevé sur le ventre de 3 souris (2 mâles et 1 femelle) âgées de 8 semaines pour chacun des génotypes considérés (Adamts2^{+/+}Adamts14^{+/+}, Adamts2^{-/-}, Adamts14^{-/-} et Adamts2^{-/-}Adamts14^{-/-}). Après broyage, les échantillons ont été extraits dans un tampon adapté à la spectrométrie de masse et en présence d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les 12 échantillons ont été répartis en 3 groupes de 4 souris de même sexe (expériences A et C : mâles ; expérience B : femelles) et de chaque génotype. Les échantillons ont été marqués par iTRAQ et analysés par spectrométrie de masse en tandem comme décrit dans la section « Matériels et méthodes » de ce chapitre.

• Description des échantillons

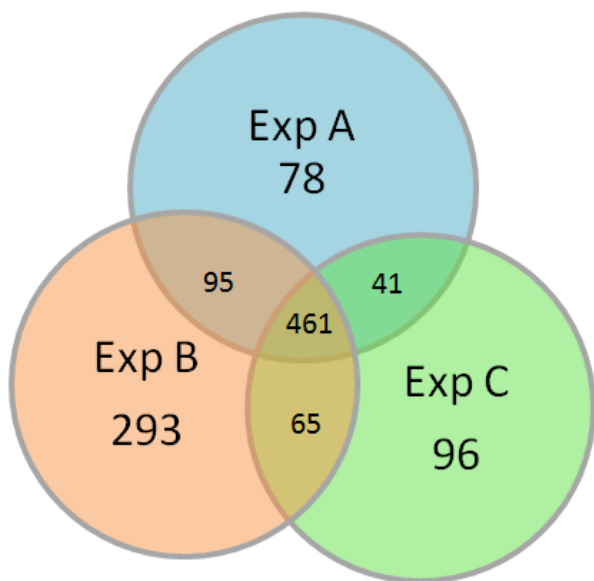
Globalement, les analyses MS/MS des échantillons de peaux marqués iTRAQ et enrichis en peptides N-terminaux ont permis l'identification de 1123, 1779 et 1086 peptides correspondant à 675, 914 et 663 protéines individuelles, respectivement pour les expériences indépendantes A, B et C (**Tableau 9** et **Tableaux T1-T3 en suppléments**). Sur l'ensemble des peptides identifiés, environ 80% ont été marqués par iTRAQ dans chaque expérience. Ce sont environ 70% des protéines individuelles identifiées qui ont été marquées par iTRAQ, soit 470 pour l'expérience A, 721 pour la B et 452 pour la C (**Tableau 9**).

Parmi les 1118 protéines identifiées au cours des 3 expériences, 461 sont présentes dans les 3 expériences (41,23%) (**Figure 27**). 95 des protéines identifiées étaient communes aux expériences A et B uniquement, 41 aux expériences A et C, et 65 aux expériences B et C. Enfin, 78 protéines individuelles ont été identifiées dans l'expérience A uniquement, contre 293 dans l'expérience B et 96 dans l'expérience C. Cela signifie que 11,6% des protéines identifiées dans l'expérience A l'étaient uniquement dans cette expérience, contre 32,1% pour l'expérience B et 14,5% pour la C.

	Expérience A	Expérience B	Expérience C
Nombre de peptides identifiés	1123	1779	1086
Nombre de protéines identifiées	675	914	663
Nombre de peptides marqués iTRAQ (et pourcentage)	896 (79,78%)	1534 (86,22%)	854 (78,63%)
Nombre de protéines marquées iTRAQ (et pourcentage)	470 (69,63%)	721 (78,88%)	452 (68,07%)
Nombre de peptides correspondant à des collagènes fibrillaires marqués iTRAQ (et pourcentage relatif aux peptides totaux marqués iTRAQ)	162 (14,43%)	168 (9,44%)	166 (15,29%)

Tableau 9: Peptides et protéines identifiés et marqués par iTRAQ au cours des 3 expériences d'iTRAQ-TAILS réalisées sur les échantillons de peaux.

Pour les détails concernant les peptides identifiés, voir **Tableaux T1-T3 en suppléments.**



1118 protéines totales

Figure 27: Diagramme de Venn représentant le nombre de protéines identifiées séparément ou de manière commune à chaque expérience d'iTRAQ-TAILS.

Le nombre de protéines identifiées par expérience est d'environ la moitié de celui obtenu au cours des expériences d'iTRAQ-TAILS effectuées sur les échantillons obtenus à partir de cultures cellulaires, ce qui peut paraître surprenant alors que les échantillons de peau sont plus complexes. Il faut cependant remarquer que ce nombre est en accord avec les résultats par les autres équipes ayant réalisés de l'iTRAQ-TAILS sur des échantillons complexes (auf dem Keller et al., 2013; Sabino et al., 2015). Seule l'étude portant sur la pulpe dentaire a permis l'identification de 3485 protéines à partir des peptides N-terminaux mais le nombre d'échantillons était bien plus conséquent (n=38) (Eckhard et al., 2015) et ceux-ci étaient plus variables car issus de patients sains alors que nos fragments de peaux étaient prélevés sur des souris d'un même fond génique C57BL/6. Au vu de l'abondance très

importante de protéines telles que le collagène de type I dans la peau, il est vraisemblable que celles-ci aient masqué une partie de l'information en empêchant l'identification d'autres protéines peu abondantes. Il semble que notre expérience se soit bien déroulée d'un point de vue technique puisqu'environ 80% des peptides identifiés ont été marqués par iTRAQ alors qu'environ 70% des protéines identifiées ont été marquées iTRAQ (**Tableau 9**). A titre de comparaison, environ 89% des peptides N-terminaux identifiés ont été marqués iTRAQ (1156 sur les 1293 identifiés) et étaient donc quantifiables dans l'étude de Sabino et al.

Un premier constat concerne, sans surprise, la complexité des échantillons analysés puisqu'ils contiennent du matériel provenant de l'épiderme, du derme, de l'hypoderme, y compris les annexes et les vaisseaux sanguins. Chez la souris, on retrouve également le « panculus carnosus », un tissu musculaire strié sous-jacent à l'hypoderme. La présence de tissu musculaire dans les échantillons est illustrée par l'identification de protéines typiques telles que la muscle-type aldolase, la myosin heavy chain skeletal muscle, la skeletal muscle LIM-protein 2, la calsequestrine, la myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle isoform et la créatine kinase M-type (**Tableaux T1-T3 en suppléments**).

Une analyse de l'ensemble des peptides identifiés a été réalisée avec le logiciel BiNGO afin de mettre en évidence les processus biologiques statistiquement surreprésentés au sein des différents échantillons ($p\text{-value} < 0,05$) (**Tableau T4 en supplément**). Parmi ceux-ci figurent de nombreux processus en relation avec le métabolisme cellulaire, l'homéostasie cellulaire et tissulaire, le cytosquelette et sa dynamique, le cycle cellulaire et la prolifération de même que la mortalité cellulaire, l'organisation intracellulaire et sa dynamique. De manière analogue à ce qui a été observé *in vitro* pour les ADAMTS2 et 14 (publication personnelle ci-avant), la réponse aux blessures, la cicatrisation et le remodelage tissulaire, l'organisation la MEC, l'organisation des fibrilles de collagènes, l'adhésion cellulaire et le développement des vaisseaux sanguins sont quelques-uns des processus statistiquement surreprésentés au sein de nos échantillons de peaux. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents génotypes de souris, ce qui valide la qualité de nos échantillons de départ.

- **Tri des peptides et protéines identifiées**

Puisque les ADAMTS sont des enzymes sécrétées, l'analyse des substrats potentiels s'est focalisée dans un premier temps sur les protéines extracellulaires, transmembranaires ou associées à la membrane telles qu'identifiées par le logiciel BiNGO (**Tableau 10**). Il faut toutefois noter que des protéines retrouvées dans certaines catégories (adhésion focale, cell-cell junction, plasma membrane, ...) peuvent être exclusivement cytoplasmiques et qu'il convient donc, *in fine*, de considérer individuellement chaque protéine sélectionnée afin de s'assurer qu'elle est bien extracellulaire, (trans)membranaire ou associée à la membrane (du côté extracellulaire) avant de se consacrer à la validation des substrats extracellulaires des ADAMTS2 et 14.

Dans un second temps, des protéines uniquement associées à des compartiments intracellulaires pourraient également être considérées puisqu'il a été montré au sein de notre laboratoire que l'ADAMTS2 pouvait être internalisée et qu'il n'est donc pas totalement exclu qu'elle puisse cliver des substrats cytoplasmiques.

		Expérience A		Expérience B		Expérience C	
GO-ID	Description	Corr p-value	Cluster freq	Corr p-value	Cluster freq	Corr p-value	Cluster freq
5576	extracellular region	2,50E-06	57/498 11,4%	1,38E-06	74/704 10,5%	1,56E-10	68/500 13,6%
5578	proteinaceous extracellular matrix	1,85E-10	25/498 5,0%	4,65E-10	29/704 4,1%	9,66E-13	28/500 5,6%
5581	collagen	9,35E-11	9/498 1,8%	5,05E-08	8/704 1,1%	1,34E-07	7/500 1,4%
5583	fibrillar collagen	2,40E-07	5/498 1,0%	1,14E-06	5/704 0,7%	2,24E-07	5/500 1,0%
5604	basement membrane	2,67E-04	8/498 1,6%	1,49E-05	11/704 1,5%	2,42E-04	8/500 1,6%
5615	extracellular space	6,30E-04	23/498 4,6%	5,58E-05	32/704 4,5%	4,94E-06	28/500 5,6%
5624	membrane fraction	6,27E-04	28/498 5,6%	2,39E-04	37/704 5,2%	5,21E-05	31/500 6,2%
5886	plasma membrane	3,84E-03	71/498 14,2%	1,78E-05	108/704 15,3%	1,02E-04	79/500 15,8%
5911	cell-cell junction	3,74E-02	8/498 1,6%	6,12E-03	12/704 1,7%	/	/
5912	adherens jonction	3,92E-04	8/498 1,6%	1,32E-04	10/704 1,4%	3,70E-04	8/500 1,6%
5924	cell-substrate adherens junction	4,32E-04	6/498 1,2%	4,54E-05	8/704 1,1%	4,09E-04	6/500 1,2%
5925	focal adhesion	1,88E-03	5/498 1,0%	1,14E-03	6/704 0,8%	1,85E-03	5/500 1,0%
9986	cell surface	/	/	/	/	9,85E-03	13/500 2,6%
16020	membrane fraction	2,77E-04	164/498 32,9%	3,12E-04	222/704 31,5%	2,97E-05	170/500 34,0%
16323	basolateral plasma membrane	5,03E-03	9/498 1,8%	1,32E-04	14/704 1,9%	1,59E-02	8/500 1,6%
16327	apicolateral plasma membrane	/	/	3,40E-02	6/704 0,8%	/	/
30054	cell junction	3,35E-02	16/498 3,2%	9,63E-04	26/704 3,6%	1,71E-02	17/500 3,4%
30055	cell-substrate junction	1,10E-04	7/498 1,4%	1,51E-05	9/704 1,2%	1,02E-04	7/500 1,4%
30117	membrane coat	/	/	2,81E-02	5/704 0,7%	/	/
30133	transport vesicle	/	/	3,64E-03	5/704 0,7%	/	/
31012	extracellular matrix	2,69E-10	26/498 5,2%	2,38E-10	31/704 4,4%	3,10E-13	30/500 6,0%
44420	extracellular matrix part	1,34E-07	13/498 2,6%	2,11E-09	17/704 2,4%	1,31E-07	13/500 2,6%
44421	extracellular region part	1,70E-08	41/498 8,2%	2,32E-10	55/704 7,8%	1,04E-12	49/500 9,8%
44459	plasma membrane part	/	/	5,14E-03	53/704 7,5%	/	/
48475	coated membrane	/	/	2,81E-02	5/704 0,7%	/	/

Tableau 10 : Compartiments cellulaires extracellulaires, (trans)membranaires ou associés à la

membrane plasmique surreprésentés au sein de nos échantillons.

Ensemble des compartiments cellulaires statistiquement surreprésentés déterminés à l'aide du logiciel BINGO à partir des protéines identifiées par iTRAQ-TAILS. Les *p-value* corrigées (corr *p-value*) ainsi que le nombre de protéines (et le pourcentage relatif) (cluster freq) impliquées dans le processus considéré sont indiqués pour chaque expérience d'iTRAQ-TAILS réalisée. Ne sont repris que les processus biologiques pour lesquels au moins 5 protéines différentes ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les paramètres suivants ont été considérés : «hypergeometric test», «Benjamini & Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction», «significance level 0,05», «Use whole annotation as reference set». GO-ID : numéro d'identification dans la base de données Gene Ontology. Pour la liste complète des processus cellulaires comprenant ceux avec une *p-value* inférieure à 0,05, voir le Tableau T5 en supplément.

Sur base de ces considérations, d'autres tris successifs ont ensuite été appliqués aux peptides correspondant à ces protéines extracellulaires, (trans)membranaires ou associées à la membrane plasmique, afin de ne conserver que les substrats potentiels des ADAMTS2 et/ou 14. C'est ainsi que les peptides correspondant à l'extrémité aminoterminal « naturelle » des protéines (méthionine terminale, après clivage de la méthionine terminale ou après clivage du peptide signal) n'ont pas été pris en compte. De même, les peptides correspondants à un clivage après un résidu basique (K ou R) n'ont pas été considérés puisqu'ils résultent probablement de l'activité de la trypsine utilisée lors de la préparation de nos échantillons et d'une déplétion incomplète lors de la phase d'enrichissement. Par la suite, le tri s'est effectué sur la base de comparaison d'abondance relative mesurée au sein de nos échantillons contenant (P : protéase) ou non (C : contrôle) l'ADAMTS d'intérêt (**Tableaux T6-T11 en suppléments**).

N'ont été considérés comme pertinents au sein de chaque expérience que les peptides dont le rapport P/C était supérieur ou inférieur à la valeur seuil, et ce dans au moins 2 des 3 comparaisons effectuées séparément pour l'ADAMTS2 et pour l'ADAMTS14. La détermination de cette valeur seuil (décrite précisément dans le matériel et méthodes) a été réalisée de manière individuelle pour chacune des comparaisons considérées (**Tableau 11**). Les rapports P/C permettant la mise en évidence de l'action de l'ADAMTS2 émanent des comparaisons WT / TS2^{-/-} et TS14^{-/-} / TS2^{-/-}TS14^{-/-} alors que les comparaisons WT / TS14^{-/-} et TS2^{-/-} / TS2^{-/-}TS14^{-/-} renseignent sur les substrats de l'ADAMTS14 (**Figure 28**). A noter que les comparaisons WT / TS2^{-/-}TS14^{-/-} ne permettent pas la mise en évidence de l'action spécifique d'une des deux ADAMTS mais permettent plutôt de montrer leur caractère potentiellement additif, voire synergique. Il convient de préciser que la plupart des études utilisant l'iTRAQ-TAILS se basent sur des valeurs seuil déterminées arbitrairement (généralement fixées à 2 et 0,5) mais le recourt à des valeurs seuil correspondant aux 3 sigmas permet d'être plus rigoureux scientifiquement car il se base sur la détermination d'une *p-value* attribuée à chaque peptide individuellement qui correspond à la probabilité que le peptide soit affecté par la protéase d'intérêt. La *p-value* inférieure à 0,0027 considérée dans nos expériences signifie que le rapport P/C est au moins 3 fois supérieur ou moindre que l'écart-type, ce qui représente un seuil très strict et donc une très faible probabilité d'observer aléatoirement le peptide considéré avec un tel rapport P/C.

	WT / TS2 ^{-/-}	WT / TS14 ^{-/-}	WT / TS2 ^{-/-} / TS14 ^{-/-}	TS2 ^{-/-} / TS14 ^{-/-}	TS14 ^{-/-} / TS2 ^{-/-} / TS14 ^{-/-}
Expérience A					
Nombre de peptides avec P/C > ou < 3 sigmas	261	366	471	259	109
Nombre de peptides correspondants à des collagènes fibrillaires avec P/C > ou < 3 sigmas (et pourcentage relatif aux peptides totaux pertinents)	36 (13,79%)	20 (5,46%)	35 (7,43%)	8 (3,09%)	21 (19,27%)
Nombre de protéines dont au moins 1 peptide avec P/C > ou < 3 sigmas	136	253	271	198	77
Valeur des 3 sigmas (>1)	1,891	1,991	1,972	1,715	2,137
Nombre de peptides avec P/C > 3 sigmas (et pourcentage relatif)	247 (94,64%)	364 (99,45%)	462 (98,09%)	217 (83,78%)	57 (52,19%)
Valeur des 3 sigmas (<1)	0,52	0,49	0,45	0,595	0,476
Nombre de peptides avec P/C < 3 sigmas (et pourcentage relatif)	14 (5,36%)	2 (0,55%)	9 (1,91%)	42 (16,22%)	52 (47,71%)
Expérience B					
Nombre de peptides avec P/C > ou < 3 sigmas	1261	1101	1281	190	102
Nombre de peptides correspondants à des collagènes fibrillaires avec P/C > ou < 3 sigmas (et pourcentage relatif aux peptides totaux pertinents)	33 (2,62%)	23 (2,09%)	35 (2,73%)	15 (7,89%)	21 (20,59%)
Nombre de protéines dont au moins 1 peptide avec P/C > ou < 3 sigmas	677	611	636	129	73
Valeur des 3 sigmas (>1)	1,925	2,482	2,285	2,218	3,406
Nombre de peptides avec P/C > 3 sigmas (et pourcentage relatif)	1238 (98,18%)	1099 (99,82%)	1265 (98,75%)	176 (92,63%)	40 (39,22%)
Valeur des 3 sigmas (<1)	0,52	0,39	0,459	0,45	0,301
Nombre de peptides avec P/C < 3 sigmas (et pourcentage relatif)	23 (1,82%)	2 (0,18%)	16 (1,25%)	14 (7,37%)	62 (60,78%)
Expérience C					
Nombre de peptides avec P/C > ou < 3 sigmas	53	31	136	158	149
Nombre de peptides correspondant à des collagènes fibrillaires avec P/C > ou < 3 sigmas (et pourcentage relatif aux peptides totaux pertinents)	28 (52,83%)	14 (45,16%)	105 (77,21%)	102 (64,56%)	110 (73,83%)
Nombre de protéines dont au moins 1 peptide avec P/C > ou < 3 sigmas	28	20	35	62	41
Valeur des 3 sigmas (>1)	2,621	1,763	2,360	1,567	1,812
Nombre de peptides avec P/C > 3 sigmas (et pourcentage relatif)	13 (24,53%)	8 (25,81%)	112 (82,35%)	156 (98,73%)	124 (83,22%)
Valeur des 3 sigmas (<1)	0,398	0,564	0,427	0,628	0,539
Nombre de peptides avec P/C < 3 sigmas (et pourcentage relatif)	40 (75,47%)	23 (74,19%)	24 (17,65%)	2 (1,27%)	25 (16,78%)

Tableau 11: Description des échantillons protéiques en termes de nombre de peptides et de nombre de protéines (et pourcentages relatifs) dont les rapports P/C sont supérieurs ou inférieurs à la valeur seuil des 3 sigmas.

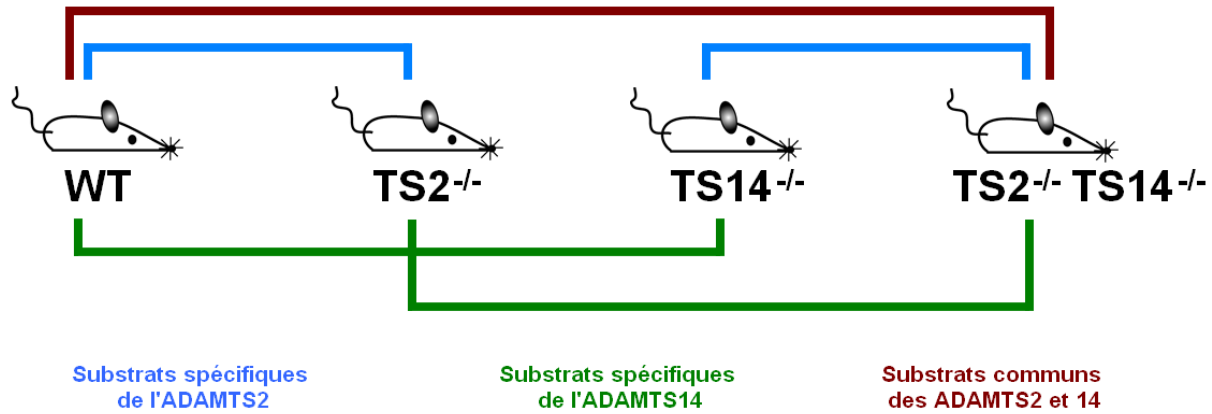


Figure 28: Comparaisons effectuées pour chaque expérience d'iTRAQ-TAILS.

Pour chaque expérience d'iTRAQ-TAILS (n=3) effectuée sur un échantillon de peau prélevé sur une souris de chaque génotype, de multiples comparaisons des peptides identifiés et quantifiés ont été effectuées. L'action spécifique de l'ADAMTS2 et la mise en évidence de ses substrats potentiels résultent de la comparaison des échantillons de souris sauvages (WT) et des souris TS2^{-/-} ainsi que de la comparaison des échantillons TS14^{-/-} à ceux TS2^{-/-} TS14^{-/-} (bleu). La mise en évidence des substrats potentiels de l'ADAMTS14 résulte de la comparaison des échantillons de souris sauvages (WT) et des souris TS14^{-/-} ainsi que de la comparaison des échantillons TS2^{-/-} aux échantillons TS2^{-/-} TS14^{-/-} (vert). La mise en évidence de l'action combinée des ADAMTS2 et ADAMTS14 et de l'ensemble de leurs substrats potentiels résultent de la comparaison des échantillons provenant des souris WT à ceux issus des souris TS2^{-/-}TS14^{-/-} (bordeaux).

Pour chaque expérience, tous les peptides ayant au moins un rapport P/C pertinent dans deux comparaisons (sur les 3 expériences mettant en évidence les substrats spécifiques à chaque enzyme et ceux résultant de l'action combinée des 2 ADAMTS) ont été compilés spécifiquement pour chaque protéase. Les protéines qui présentent au moins un peptide pertinent commun à minimum 2 expériences sur les 3 ont alors été considérées comme faisant partie du réseau protéasique « extracellulaire et (trans)membranaire » de l'ADAMTS2 ou de l'ADAMTS14 (**Tableaux T12 et T13 en suppléments**), qui est donc basé sur les compartiments cellulaires établis par le logiciel BiNGO. Dans le cas où des peptides différents semblaient indiquer des clivages proches (localisés à au plus 3 acides aminés de distance), nous avons considéré qu'ils résultaient probablement d'un clivage unique au site le plus en amont suivi d'une dégradation partielle par des aminopeptidases. Il est également possible qu'un clivage dans une séquence de prédilection et non un site précis au sein d'une séquence cible puisse être à l'origine de peptides différents par leur extrémité aminoterminal.

Parmi les enseignements de ces analyses (**Tableau 11**), on remarque que :

- L'expérience C est la moins informative compte tenu du plus faible nombre de protéines et de peptides présentant des rapports P/C supérieurs ou inférieurs aux valeurs seuil.
- Les valeurs seuil sont relativement homogènes au sein des différentes comparaisons pour une même expérience
- Le nombre de peptides avec un rapport P/C supérieur aux valeurs seuil est très largement supérieur à celui des peptides avec un rapport inférieur aux valeurs seuil.

Au total, ces résultats et leurs analyses à l'aide du logiciel Bingo ont mis en évidence respectivement 52, 65 et 43 protéines « extracellulaires ou (trans)membranaires » contribuant potentiellement aux réseaux protéasiques spécifiques, de l'ADAMTS2 (**Tableau T12 en supplément**), de l'ADAMTS14 (**Tableau T13 en supplément**) ou des deux enzymes. Comme déjà mentionné, des

protéines intracellulaires sont reprises par BiNGO dans la catégorie des protéines (trans)membranaires ou associées à la membrane plasmique. Dès lors, une analyse manuelle et individuelle de chacune de ces protéines a été nécessaire afin de constituer la liste finale des substrats potentiels des ADAMTS2 et/ou 14 qui sont effectivement extracellulaires ou (trans)membranaires.

En définitive, les divers tris successifs ont mené à la mise en évidence de 42 substrats potentiels transmembranaires ou extracellulaires de l'ADAMTS2 (**Tableau T14 en supplément**) et de 52 substrats potentiels de l'ADAMTS14 (**Tableau T15 en supplément**), parmi lesquels 34 communs aux deux enzymes (**Tableau T16 en supplément**). Le **Tableau 12** résume l'ensemble des protéines identifiées comme substrats potentiels spécifiques ou communs aux ADAMTS2 et 14.

- **Substrats potentiels extracellulaires et (trans)membranaires**

Collagènes fibrillaires

Parmi l'ensemble des substrats potentiels extracellulaires et (trans)membranaires des ADAMTS 2 et/ou 14 figurent de nombreux collagènes, et notamment ceux de types I, II, III et V (**Tableaux T14 - T16 en suppléments**). Afin de vérifier la pertinence et la fiabilité de notre approche expérimentale, nous nous sommes d'abord focalisés sur l'identification des sites de clivage connus des propeptides aminotermiaux des procollagènes fibrillaires de la peau. A cette fin, nous avons considéré les peptides avec un rapport P/C significatif, mais également d'autres peptides identifiés qui pourraient renseigner à la fois sur des régions préférentielles de clivage et sur un rapport P/C moyen représentatif d'un « bruit de fond » portant sur l'entièreté des molécules.

Le **Tableau 13** résume les principaux sites de clivage identifiés dans le propeptide aminoterminal des procollagènes de type I et de type V. Ces résultats sont fournis sous forme de moyennes et écarts-types des valeurs obtenues au cours des trois expériences (A, B, C) menées sur les peaux de souris, et pour trois types de comparaisons permettant d'évaluer l'activité de l'ADAMTS2 (WT/TS2^{-/-}), de l'ADAMTS14 (WT/TS14^{-/-}) et des deux enzymes combinées (WT/TS2^{-/-} TS14^{-/-}). N'ont été considérés que les peptides qui étaient pertinents dans l'ensemble des trois expériences afin d'éviter de biaiser les valeurs des moyennes et écarts-types en considérant des valeurs non pertinentes (comprises entre les valeurs de -3 sigmas et +3 sigmas). Il est à noter que le procollagène de type III n'apparaît pas dans cette analyse, probablement en raison d'une localisation trop proche d'une Lys ne permettant pas de générer un peptide tryptique identifiable par spectrométrie de masse.

Nom du gène	Accession UniProtKB	Nom de la protéine
A0A087WS16	A0A087WS16	Collagen alpha-3(VI) chain
ITIH4	A6X935	Inter alpha-trypsin inhibitor; heavy chain 4
I7HJ13	I7HJ13	Protein Serpinb6e
PTRF	O54724	Cavin-1
LEG7	O54974	Galectin-7
CO5A1	O88207	Collagen alpha-1(V) chain
TCO2	O88968	Transcobalamin II
IGG2B	P01867	Ig gamma-2B chain C region
CO3	P01027	Complement C3c alpha' chain fragment 2
CO4B	P01029	Complement C4-B
KV5A9	P01642	Ig kappa chain V-V region L7
CO4A1	P02463	Collagen alpha-1(IV) chain
ANXA2	P07356	p36 / Annexin A2
ALBU	P07724	Serum albumin
CO3A1	P08121	Collagen alpha-1(III) chain
APOA2	P09813	Proapolipoprotein A-II
ANXA1	P10107	p35 / Annexin A1
CO1A1	P11087	Alpha-1 type I collagen
GELS	P13020	Gelsolin
HA19	P14431	H-2 class I histocompatibility antigen; Q9 alpha chain
LEG1	P16045	Galectin-1
GRP78	P20029	Immunoglobulin heavy chain-binding protein
CYTC	P21460	Cystatin-3
MYP0	P27573	Myelin protein zero
CO2A1	P28481	Collagen alpha-1(II) chain
MIF	P34884	Macrophage migration inhibitory factor
MMP3	P28862	Stromelysin-1 / MMP3
FETUA	P29699	Fetuin-A
CAV1	P49817	Caveolin-1
CATH	P49935	Pro-cathepsin H
LUM	P51885	Keratan sulfate proteoglycan lumican
VATB2	P62814	Vacuolar proton pump subunit B 2
PEBP1	P70296	Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide
G3BP1	P97855	HDH-VIII
APOA1	Q00623	Truncated apolipoprotein A-I
A1AT4	Q00897	Serine protease inhibitor A1d
CO1A2	Q01149	Alpha-2 type I collagen
CO6A2	Q02788	Collagen alpha-2(VI) chain
CO6A1	Q04857	Collagen alpha-1(VI) chain
CO5A2	Q3U962	Collagen alpha-2(V) chain
TMED1	Q3V009	p24 family protein gamma-1
SPB6	Q60854	Serpin B6
PCPE1	Q61398	Procollagen C-proteinase enhancer 1
A2M	Q61838	Alpha-2-macroglobulin 35 kDa subunit
MIME	Q62000	Osteoglycin
AEBP1	Q640N1	Adipocyte enhancer-binding protein 1
POSTN	Q62009	Periostin
DMKN	Q6P253	Dermokine
PGRC2	Q80UU9	Membrane-associated progesterone receptor component 2
COEA1	Q80X19	Collagen alpha-1(XIV) chain
SUSD4	Q8BH32	Sushi domain-containing protein 4
F13A	Q8BH61	Coagulation factor XIII A chain
EHD2	Q8BH64	EH domain-containing protein 2

HEMO	Q91X72	Hemopexin
UNC80	Q8BLN6	Protein unc-80 homolog
TRFE	Q92111	Siderophilin
PDIA6	Q922R8	Thioredoxin domain-containing protein 7
TMEDA	Q9D1D4	p24 family protein delta-1
PRELP	Q9JK53	Proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein
Q9JLI2	Q9JLI2	Collagen alpha-3(V) chain

Tableau 12: Résumé des protéines identifiées comme substrats potentiels extracellulaires spécifiquement pour l'ADAMTS2 (en bleu), pour l'ADAMTS14 (en rouge) ou communs aux 2 enzymes (en blanc).

Afin de faciliter la lecture des résultats, les rapports P/C moyens inférieurs à 0,5 et supérieurs à 2,0 sont respectivement surlignés en orange et en vert. Concernant les chaînes alpha-1 et alpha-2 du collagène de type I, il est clair que la présence d'ADAMTS2 induit une sous-représentation des peptides localisés en amont de la petite triple hélice, ce qui était attendu puisque ce domaine est clivé et virtuellement absent dans une peau normale mais par contre très abondant en absence d'ADAMTS2 (TS2^{-/-}). On remarque également des rapports P/C moyens supérieurs à 2,0 dans le domaine situé entre la petite triple hélice et le domaine collagène central où se situe la séquence connue pour être clivée par l'ADAMTS2 (NFAS.QMSY pour l'alpha-1 de type I et NFAA.QYSY pour l'alpha-2 de type I (Bekhouche and Colige, 2015). Au sein de la chaîne alpha-1, la présence d'autres sites potentiels de clivage situés en aval du site NFAS.QMSY pourrait suggérer l'action d'une exopeptidase mais également le fait que le clivage par l'ADAMTS2 n'est pas précis et s'effectue au sein d'une séquence cible de quelques acides aminés. Lorsque l'activité de l'ADAMTS14 est évaluée (comparaison WT/TS14^{-/-}), on remarque peu d'influence sur le clivage des chaînes alpha-1 et alpha-2, bien que la plupart des valeurs moyennes soient supérieures à 1 et que l'effet combiné des ADAMTS2 et 14 (WT/TS2^{-/-}-TS14^{-/-}) semble légèrement supérieur au seul effet de l'ADAMTS2.

Concernant les procollagènes alpha-1 et alpha-2 de type V, les connaissances concernant le clivage des propeptides étaient plus controversées. C'est ainsi qu'une étude par le groupe de D. Greenspan avait montré un clivage par la BMP1 du domaine PARP qui constitue la partie la plus amont du propeptide aminoterminal du procollagène alpha-1(V) (Greenspan, 2005). Plus tard, des travaux de notre groupe avaient également mis en évidence par des essais *in vitro* un clivage plus en aval (PGMP.ANQD) situé à la jonction entre le domaine variable et la petite triple hélice, alors que des alignements de séquences entre différentes espèces montraient une conservation de sites A.Q entre la petite triple hélice et le domaine collagène central, à l'instar de ce qui est observé au sein des chaînes alpha-1 et alpha-2 de type I ou de la chaîne alpha-1 du collagène de type III (Bekhouche and Colige, 2015). De manière remarquable, les deux régions cibles potentielles ont pu être identifiées pour la première fois au cours de ce travail à partir d'échantillons *in vivo*, mais principalement dans les comparaisons WT/TS2^{-/-} TS14^{-/-} ce qui augure d'une redondance de fonction entre les ADAMTS2 et 14 pour la maturation du procollagène alpha-1(V). De manière similaire, notre étude a également permis de démontrer expérimentalement l'existence d'un clivage du propeptide aminoterminal du procollagène alpha-2(V).

L'ensemble de ces résultats concernant les collagènes a donc permis de valider notre approche expérimentale, de confirmer la faible activité aminoprocollagène peptidase de l'ADAMTS14 envers le procollagène de type I, de déterminer *in vivo* les sites de clivage par l'ADAMTS2 au sein des procollagènes alpha-1 et alpha-2(V) et de mettre en évidence une activité de l'ADAMTS14 envers les procollagènes de type V.

L'ensemble des peptides identifiés correspondant au domaine collagène central et au propeptide carboxyterminal a également été évalué. Pour le collagène de type I, de nombreux peptides avec un rapport P/C compris dans l'intervalle de valeurs entre « -3sigma » et « +3sigma » sont issus du domaine collagène central (**Tableaux T1 - T3 en suppléments**). Les rapports P/C de ces peptides sont proches de 1 pour les comparaisons WT/TS14^{-/-}. De manière intrigante, on note toutefois une tendance à l'augmentation des valeurs observées pour les comparaisons WT/TS2^{-/-} et plus encore pour les comparaisons WT/TS2^{-/-} TS14^{-/-} (données non présentées), qui se rapprochent ou dépassent parfois la valeur seuil +3sigma. En particulier, la région C-terminale de la triple hélice centrale (correspondant environ aux 20 derniers triplets) semble plus spécifiquement concernée avec des rapports P/C significatifs pour de nombreux peptides couvrant cette zone (**Tableaux T6 - T11 en suppléments**). Cette observation sous-entend des clivages potentiels dans cette région par les ADAMTS2 et 14, ce qui suggère une activité « collagénase » ou « gélatinase » jamais décrite à ce jour.

Des sites potentiels de clivage ont également été identifiés au sein des propeptides carboxyterminaux (**Tableaux T6 - T11 en suppléments**). Bien qu'ils n'aient pas été détectés au cours de l'expérience C, nous avons décidé de les prendre en considération en raison des valeurs élevées observées au cours des expériences A et B. Au sein de la chaîne alpha-1(I), un site de clivage a été identifié en amont du site de maturation par la BMP1. Cette séquence (GYDF.SFLP) est clivée par l'ADAMTS2 et l'ADAMTS14 avec un effet additif observé lors des comparaisons WT/TS2^{-/-} TS14^{-/-}. Un site identique a été recherché pour l'alpha-2(I) mais l'analyse de la séquence révèle qu'il ne peut être mis en évidence en raison de la trop grande proximité d'un site de clivage par la trypsine. D'autres sites, plus en aval, ont été identifiés pour les deux chaînes de type I. En revanche, aucun site n'a été mis en évidence pour les procollagènes de type III et de type V, sans qu'il soit possible de déterminer si cette information est révélatrice d'une absence de clivage ou d'un manque de résolution des peptides informatifs lors des analyses protéomiques.

L'ensemble de ces données concernant les collagènes démontre donc que l'ADAMTS2, seule ou en redondance avec l'ADAMTS14, serait non seulement capable de cliver le propeptide aminoterminal des collagènes fibrillaires mais posséderait également des activités carboxyprocollagène peptidase et collagénase/gélatinase, ce qui représente un ensemble de fonctions couvrant l'essentiel des activités protéolytiques gouvernant l'homéostasie des collagènes fibrillaires. Des expériences préliminaires ont été réalisées *in vitro* afin de vérifier cette hypothèse novatrice.

Sites de clivage	WT/TS2	WT/TS14	WT/TS2-TS14
Chaîne alpha-1(I)			
VQCN(67).(68)EELD	0,1 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,0
PEEY(90).(91)VSPN	0,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Petite triple hélice (G99 - F149)			
NFAS(151).(152)QMSY	3,9 ± 1,5	1,7 ± 0,4	6,0 ± 1,6
FASQ(152).(153)MSYG	2,1 ± 0,7	1,5 ± 0,3	2,8 ± 0,6
QMSY(155).(156)GYDE	3,0 ± 2,5	1,6 ± 0,8	3,3 ± 1,7
SYGY(157).(158)DEKS	3,5 ± 2,4	1,9 ± 0,7	5,2 ± 3,2
KSAG(163).(164)VSVP	3,6 ± 0,7	1,3 ± 0,2	5,1 ± 0,3
Triple hélice centrale (début en G168)			
Chaîne alpha-2(I)			
ATCQ(23).(24)YLQS	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,0
TCQY(24).(25)LQSG	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,0 ± 0,0
Petite triple hélice (G33 - P74)			
NFAA(85).(86)QYSD	3,0 ± 0,9	1,5 ± 0,4	4,6 ± 1,2
AAQY(87).(88)SDKG	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,2 ± 0,1
YSDK(90).(91)GVSS	1,7 ± 0,4	1,2 ± 0,1	2,8 ± 1,0
SDKG(91).(92)VSSG	1,7 ± 0,4	1,3 ± 0,2	2,6 ± 0,5
DKGV(92).(93)SSGP	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,2	2,8 ± 0,2
KGV(93).(94)SGPG	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,3	2,1 ± 0,3
SSGP(96).(97)GPMG	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,2	2,7 ± 0,8
Triple hélice centrale (début en G97)			
Chaîne alpha-1(V)			
Domaine thrombospondin N-terminal like (P39-N230)			
PGMP(435).(436)ANQD	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,2	9,3 ± 1,3
MPAN(437).(438)QDTI	3,5 ± 0,6 *	2,7 ± 0,5*	3,9 ± 0,5*
QDTI(441).(442)FEGI	2,7 ± 1,3	2,3 ± 1,0	3,4 ± 1,1
Triple hélice interrompue (G444 - P458 & G469 - M519)			
AGSK(535).(536)GPMV	1,9 ± 0,8	2,6 ± 1,1	3,0 ± 1,2
MVSA(541).(542)QESQ	1,4 ± 0,5	1,6 ± 0,3	2,7 ± 1,1
Triple hélice centrale (début en G559)			
Chaîne alpha-2(V)			
Petite triple hélice (G124 - P177)			
SRPF(189).(190)SAQM	2,1 ± 0,7	2,0 ± 0,6	2,8 ± 0,5
SGLG(203).(204)SQVG	1,4 ± 0,3	1,8 ± 0,4	2,0 ± 0,6
Triple hélice centrale (début en G211)			

Tableau 13 : Résumé des principaux sites de clivage identifiés dans le propeptide aminoterminal des procollagènes de type I et de type V.

Résultats exprimés en moyenne ± écarts-type des valeurs obtenues au cours des trois expériences (A, B, C), et pour trois types de comparaisons permettant d'évaluer l'activité de l'ADAMTS2 (WT/TS2^{-/-}), de l'ADAMTS14 (WT/TS14^{-/-}) et des deux enzymes combinées (WT/TS2^{-/-} TS14^{-/-}). N'ont été considérés que les peptides qui étaient pertinents dans chacune des trois expériences. Les sites de clivage précédemment connus sont indiqués en gras.

Dans le but d'évaluer l'existence d'une activité gélatinase, nous avons utilisé du collagène de type I purifié à partir de peau de veau dermatosparactique afin de bénéficier d'un substrat contenant à la fois des chaînes matures et des chaînes comprenant toujours l'aminopropeptide servant ainsi de témoin pour l'activité enzymatique. Ce collagène de veau, « natif » ou dénaturé par chauffage, a été incubé avec les ADAMTS2 et/ou 14. Les produits de digestion ont ensuite été séparés par SDS-PAGE 6,25% ou 10%, puis colorés au bleu de Coomassie (**Figure 30**).

Il est utile de noter que le profil électrophorétique du collagène de type I peut comporter jusqu'à 4 bandes protéiques distinctes pour chaque chaîne alpha (pro α , pC α , pN α , α) en fonction de son niveau de maturation (**Figure 29**) (Colige et al., 2004). Les pro-chaînes α sont les chaînes α ayant conservé leurs extrémités N- et C-terminales alors que les chaînes pC α et pN α ont conservé, respectivement, leur propeptide carboxy ou aminoterminal. Le clivage des deux propeptides génère les chaînes α matures ($\alpha 1$ ou $\alpha 2$). Les fibroblastes en culture secrètent les 4 formes de chaînes α alors que les tissus normaux ne contiennent que les chaînes α matures.

Collagène I (2 chaînes $\alpha 1$ et 1 $\alpha 2$)

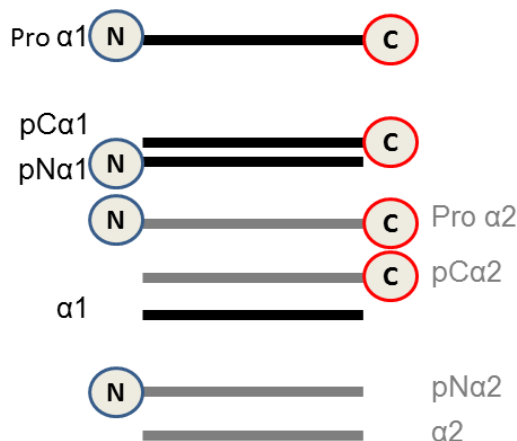


Figure 29: Représentation schématique du profil de migration du collagène de type I en SDS-PAGE en conditions réductrices.

Pro $\alpha 1$: pro-chaîne $\alpha 1$, pC $\alpha 1$: chaîne $\alpha 1$ ayant conservé son carboxypropeptide, pN $\alpha 1$: chaîne $\alpha 1$ ayant conservé son aminopropeptide, $\alpha 1$: chaîne $\alpha 1$ mature, Pro $\alpha 2$: pro-chaîne $\alpha 2$, pC $\alpha 2$: chaîne $\alpha 2$ ayant conservé son carboxypropeptide, pN $\alpha 2$: chaîne $\alpha 2$ ayant conservé son aminopropeptide, $\alpha 2$: chaîne $\alpha 2$ mature.

Le collagène de type I extrait de peau de veau dermatosparactique est sous forme de chaînes pN α et α . Lorsqu'il est utilisé sous sa forme native, on observe, comme attendu, une conversion par l'ADAMTS2 des chaînes pN α en chaînes α , alors que l'activité de l'ADAMTS14 est très faible, bien que réelle (**Figure 30, A, C, E**). Lorsque ce même collagène est dénaturé en gélatine (**Figure 30, B, D, F**), on observe toujours une activité aminoprocollagène peptidase, mais également l'apparition de bandes discrètes à environ 97 et 110 kDa (indiquées par des flèches) et d'une « trainée » illustrant une dégradation légère à de multiples sites. Cette activité gélatinase n'est pas observée en absence d'ADAMTS (puit 1) ou lorsque l'ADAMTS2 est inhibée par l'EDTA (puit 3). Ces observations sont également valables pour l'ADAMTS14 (puits 4 et 5). On remarque également que l'ADAMTS14 est plus active sur la gélatine que sur le collagène natif. Du collagène de type I de veau normal (VN) est utilisé comme témoin de migration permettant d'identifier les chaînes α matures.

Sur base de l'activité gélatinase identifiée dans ce travail, nous avons émis l'hypothèse que l'ADAMTS2 pourrait remplir un rôle de « contrôle-qualité » des collagènes fibrillaires en dégradant les triples hélices présentant une structure défectueuse. Dans un premier essai pour tester cette hypothèse, nous avons purifié du collagène à partir de fibroblastes de peau provenant de plusieurs patients souffrant d'une « ostéogenèse imparfaite », une maladie héréditaire causée par diverses mutations affectant localement le repliement en triple hélice ce qui rend le polypeptide muté sensible aux protéases. En dehors d'une activité aminoprocollagène peptidase attendue (conversion des

chaines pro- en chaines pC, et des chaines pN en chaines α), aucune activité gélatinase manifeste n'a pu être mesurée (**Figure 31**). Ces résultats, bien que négatifs, ne signifient pas nécessairement que notre hypothèse est erronée. Il se pourrait, par exemple, que les déformations très locales, telles qu'elles sont attendues dans les chaines mutées de l'ostéogenèse imparfaite, ne soient pas suffisantes pour permettre à l'ADAMTS2 de dégrader le collagène. Il est également possible que les triples hélices les plus altérées aient déjà été dégradées par l'ADAMTS2 produites par les fibroblastes, empêchant ainsi toute observation ultérieure de l'activité gélatinase dans nos tests enzymatiques.

Pour la mise en évidence d'une activité carboxyprocollagène peptidase potentielle des ADAMTS2 et 14, nous avons utilisé du collagène de type I purifié à partir de fibroblastes dermatosparactiques en culture car il possède la particularité d'être présent quasi uniquement sous la forme des chaînes pro- α 1 et pro- α 2 comprenant à la fois les propeptides amino et carboxyterminaux (**Figure 32**). En présence d'ADAMTS2 (puit 2), on observe une conversion du pro- α 1 I en une bande formée à la fois des chaînes pN α 1 et pC α 1, ce qui n'est donc pas réellement informatif d'une possible activité envers le propeptide carboxy-terminal. Une conversion du pro- α 2 en pC α 2 est également observée, illustrant comme attendu l'activité aminoprocollagène peptidase de l'ADAMTS2. De manière remarquable, on voit également l'apparition des polypeptides correspondant aux chaînes α 1 et α 2 matures, ce qui indique de manière claire que l'ADAMTS2 est capable d'opérer le clivage du propeptide carboxyterminal. Cette observation, qui n'avait jamais été réalisée auparavant, valide par ailleurs nos résultats obtenus par iTRAQ-TAILS sur les peaux de souris. Cette activité carboxyprocollagène peptidase n'a cependant pas été mise en évidence de manière évidente pour l'ADAMTS14, suggérant une activité nulle ou trop faible pour être observable (puit 3).

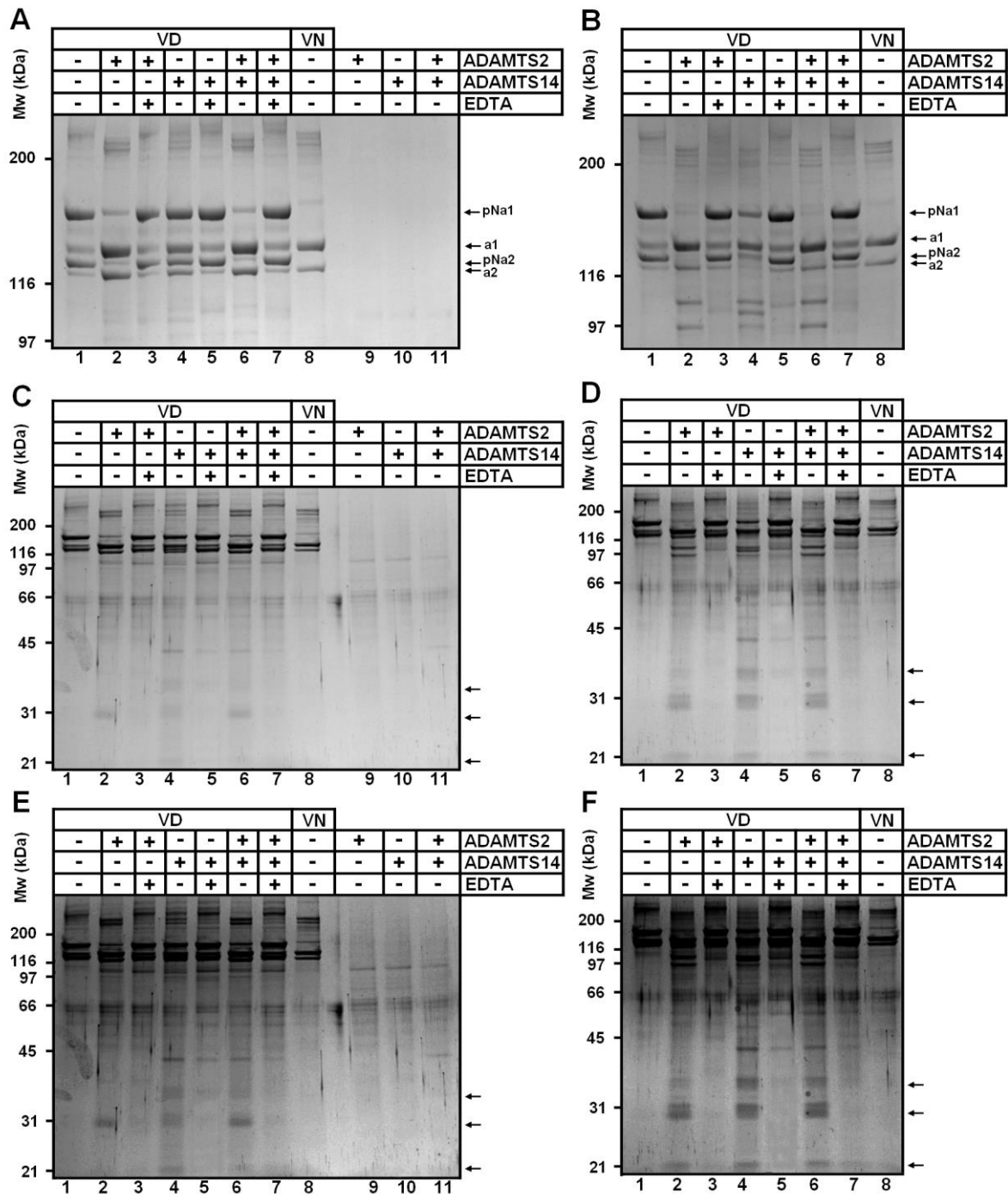


Figure 30: Digestion de collagène de peau de veau dermosparactique (VD) par les ADAMTS2 et/ou 14 humaines purifiées.

Le collagène VD a été dénaturé (B, D, F) (95°C pendant 10 minutes) ou non (A, C, E) avant d'être refroidi à température ambiante pendant 10 minutes. Le collagène a été incubé avec les ADAMTS2 et/ou 14 purifiées humaines durant 18h à 37°C. Les produits de digestion ont ensuite été séparés par SDS-PAGE (6,25% (A-B) ou 10% (C-F)) et colorés au bleu de Coomassie. Les figures E et F correspondent respectivement aux figures C et D mais pour lesquelles le contraste a été volontairement amplifié afin de mettre en évidence de manière plus évidente les « traînées » de dégradation. Du collagène de peau de veau normal (VN) a été utilisé comme contrôle positif de l'activité aminoprocollagène peptidase.

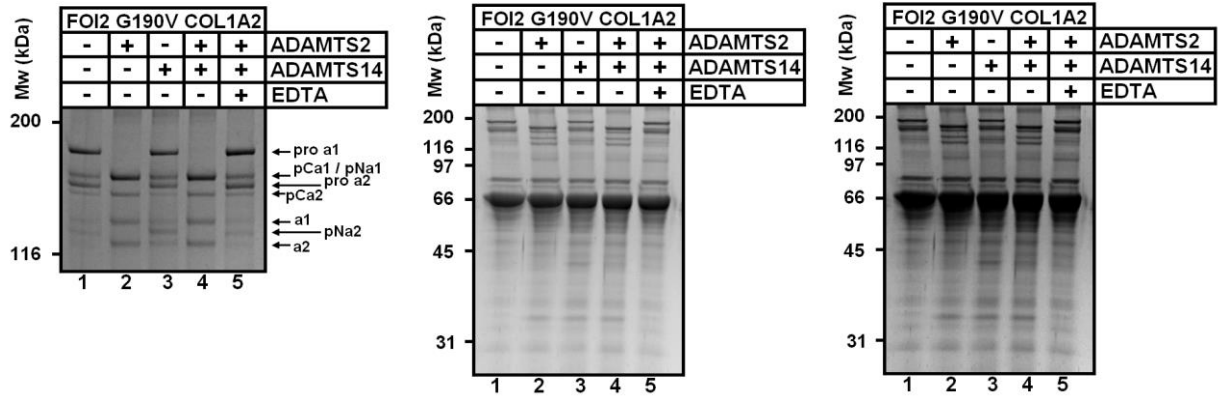


Figure 31: Produits de digestion, par les ADAMTS2 et/ou 14 humaines purifiées, du collagène produit par les fibroblastes d'un patient atteint d'ostéogenèse imparfaite (FOI).

Le collagène utilisé a été purifié à partir d'une lignée de fibroblastes établie à partir d'une biopsie de peau d'un patient souffrant d'ostéogenèse imparfaite en raison d'une mutation (G190V) affectant la chaîne alpha 2 de type I. Le collagène a été incubé avec les ADAMTS2 et/ou 14 purifiées humaines durant 18h à 37°C. Les produits de digestion ont ensuite été séparés par SDS-PAGE (6,25% (gel de gauche) ou 10% (gels du centre et de droite)) et colorés au bleu de Coomassie. Les gels de droite correspondent aux gels du centre, mais après amplification des contrastes. Le clivage des aminopropeptides des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ est mis en évidence par la conversion des chaînes pro- en chaînes pC et des chaînes pN en chaînes α matures. Toutefois aucun autre signe de clivage n'est mis en évidence. Des résultats similaires ont été observés avec d'autres lignées de fibroblastes provenant de patients avec des mutations différentes (données non présentées).

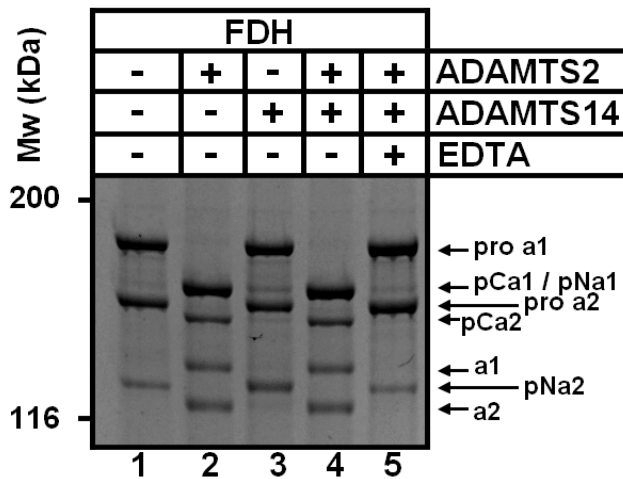


Figure 32: Digestion par les ADAMTS2 et/ou 14 humaines purifiées du collagène produit par des fibroblastes dermatosparactiques (FDH).

Le collagène utilisé a été purifié à partir d'une lignée de fibroblastes établie à partir d'une biopsie de peau d'un patient souffrant d'un Ehlers-Danlos de type dermatosparactique (FDH). Le collagène a été incubé avec les ADAMTS2 et/ou 14 purifiées humaines durant 18h à 37°C. Les produits de digestion ont ensuite été séparés par SDS-PAGE 6,25%, et colorés au bleu de Coomassie. La conversion de pro- $\alpha 2$ en pCa2 et en $\alpha 2$ mature démontre que l'ADAMTS2 possède une activité carboxyprocollagène peptidase en plus de son activité aminoprocollagène peptidase.

Autres substrats potentiels extracellulaires et (trans)membranaires

Bien que, par manque de temps, aucune vérification complémentaire n'ait été réalisée, nous voulons ici attirer l'attention sur quelques substrats potentiels extracellulaires et (trans)membranaires qui semblent plus particulièrement pertinents (**Tableaux T14-T16 en suppléments**).

a. Autres collagènes :

Ces substrats potentiels comprennent d'autres collagènes que les collagènes fibrillaires tels que les chaînes alpha-1, -2 et -3 du collagène de type VI ou les chaînes alpha-1 de type IV et de type XIV.

Le collagène de type VI est exprimé notamment dans le muscle, la peau et le tendon. Il se lie et interagit avec de nombreuses macromolécules extracellulaires, ce qui lui confère un rôle structural et organisationnel de la MEC (Bonaldo et al., 1998; Bonnemann, 2011). Il est également impliqué dans de multiples fonctions cellulaires (adhésion, prolifération, migration, survie) (Bonnemann, 2011). Si le clivage du collagène VI était avéré, ses différentes fonctions seraient probablement modifiées, ce qui apporterait un regard nouveau concernant la contribution des ADAMTS2 et 14 dans la régulation des propriétés des tissus conjonctifs et de leurs cellules résidentes.

Le collagène de type XIV est un régulateur de la fibrillogenèse en s'accumulant à la surface des fibrilles de collagène de type I et en modulant ainsi leurs interactions avec leur environnement (Ansorge et al., 2009). Son clivage par les ADAMTS2 et/ou 14 permettrait donc potentiellement d'apporter un niveau supplémentaire de régulation de la fibrillogenèse.

b. PCPE-1

La protéine PCPE-1 (Procollagen C-proteinase enhancer 1) est une glycoprotéine qui stimule le clivage du propeptide carboxyterminal des procollagènes fibrillaires (par la BMP-1 et ses homologues) (Hassoun et al., 2016; Vadon-Le Goff et al., 2011). La PCPE-1 comprend deux domaines CUB qui sont nécessaires pour la stimulation de l'activité carboxypeptidase par leurs interactions avec le carboxy-propeptide des procollagènes fibrillaires. Un domaine netrin-like constitue la partie C-terminale de la PCPE-1. Ce dernier interagit avec des composants matriciels tels que des protéoglycans (Bekhouche et al., 2010) et la fibronectine, et modulerait la biodisponibilité et l'activité de la PCPE-1. Son rôle en tant qu'inhibiteur de métalloprotéases a également été rapporté lorsqu'il est libéré dans le milieu extracellulaire (Mott et al., 2000). Le site de clivage potentiel identifié est commun pour l'ADAMTS2 et l'ADAMTS14 (KESA (282).(283)LSPG), avec des rapports P/C le plus souvent supérieurs au seuil +3 sigma. Si ce clivage est avéré, il se produirait à la fin du domaine CUB2, et libérerait donc le domaine netrin-like, ce qui aurait un impact sur la maturation des procollagènes fibrillaires, mais également sur l'activité des métalloprotéases dans leur ensemble (Mott et al., 2000). De plus, l'expression de PCPE est corrélée à celle du collagène de type I et est stimulée lors de la fibrose (Hassoun et al., 2016). PCPE-1 est donc considéré comme un important régulateur de l'accumulation de collagène lors de la cicatrisation et en cas de fibrose, et donc comme une cible potentielle pour réduire ce phénomène.

La confirmation du clivage de PCPE-1 par les ADAMTS2 et 14 permettrait donc d'apporter des détails supplémentaires sur leurs rôles joués dans la régulation du remodelage matriciel au cours de

processus physiologiques et pathologiques comprenant la cicatrisation, la fibrose et les mécanismes associés.

c. Protéoglycans

L'ostéoglycine est un SLRP identifié comme substrat potentiel des ADAMTS2 et 14, avec des sites de clivage localisés entre la Leu134 et l'Asp139. Elle est également clivée par la BMP-1 et ses homologues au site Lys137.138Asp, ce qui module sa capacité à réguler la fibrillogenèse (Ge et al., 2004). Si cette fonction des ADAMTS2 et/ou 14 se confirme, elle pourrait participer, en partie du moins, à la désorganisation des fibres de collagène chez les patients souffrant d'un Ehlers-Danlos de type dermatosparactique.

Un autre SLRP identifié comme substrat potentiel pour les ADAMTS2 et 14 est la protéine PRELP (Proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein), également appelé prolargin. Les rapports P/C des peptides correspondant à cette protéine sont importants dans les 3 expériences menées puisqu'ils sont supérieurs à 2,0 et 3,0 dans la plupart des comparaisons respectivement pour l'ADAMTS14 et pour l'ADAMTS2, et atteignent des valeurs supérieures à 7,0 dans les expériences A et B pour les comparaisons WT/TS2^{-/-} TS14^{-/-}. La PRELP joue un rôle structural d'ancrage des membranes basales à la MEC sous-jacente (Bengtsson et al., 2002). Elle permet également la liaison du collagène de type I aux lames basales et du collagène de type II au cartilage. En digérant du cartilage avec les ADAMTS4 ou 5, les sites de clivage observés (localisés en His 336, (Zhen et al., 2008)) étaient très proches de ceux observés lors de notre approche par N-TAILS pour les ADAMTS2 et 14 (Phe 335 et Phe 338), ce qui étaye un potentiel clivage par ces dernières. Dès lors, la vérification de son clivage par les ADAMTS2 et 14 permettrait de mieux caractériser l'impact de ces dernières sur l'architecture matricielle et sur l'ancrage des lames basales à leur support conjonctif.

d. Autres substrats potentiels extracellulaires

La fetuin-A (alpha-2-HS-glycoprotein) est une glycoprotéine sanguine synthétisée principalement par le foie et considérée comme transporteur sanguin, à l'image de l'albumine. Elle est aussi considérée comme une des protéines sériques impliquées dans l'adhésion cellulaire (Sakwe et al., 2010). Elle interagit avec la MMP9, ce qui protège cette dernière d'une dégradation autocatalytique sans pour autant interférer avec son activité enzymatique gélatinase (Ray et al., 2003). La fetuin-A est clivée par les MMP3 et MMP7 aux résidus 277 ou 294 (Kubler et al., 2007), qui sont relativement proches du site identifié dans notre expérience de N-TAILS (Leu318), ce qui renforce la possibilité de son clivage par l'ADAMTS2. Si tel est le cas, l'ADAMTS2 serait donc potentiellement capable de cliver la fetuin-A afin de préserver son activité autocatalytique.

- **Substrats potentiels intracellulaires**

Bien que nous nous soyons d'abord focalisés sur le clivage des collagènes et l'identification de nouveaux substrats extracellulaires, nous avons été intrigués par la présence de nombreux peptides suggérant l'activité des ADAMTS2 et 14 sur des protéines intracellulaires (**Tableaux T1-T3 en suppléments**). Le **Tableau T19 en supplément** reprend une liste non exhaustive mais représentative des peptides correspondant à des protéines intracellulaires pour lesquels des rapports P/C pertinents ont été observés dans au moins deux expériences sur les trois et pour un minimum de deux comparaisons sur les quatre réalisées (WT/TS2^{-/-}; TS14^{-/-}/TS2^{-/-}TS14^{-/-}; WT/TS14^{-/-}; TS2^{-/-}/TS2^{-/-}TS14^{-/-}). Comme des inhibiteurs de protéases ont été utilisés lors de la préparation des échantillons, il semble peu probable que ces clivages se soient produits après le prélèvement des fragments de peaux. Ces protéines représentent donc des substrats potentiels intracellulaires des ADAMTS2 et/ou 14, même s'il n'est pas exclu que leur clivage ait été réalisé après leur libération dans le compartiment extracellulaire (sécrétion, lyse cellulaire ...). Deux éléments nous ont toutefois incités à pousser plus en avant nos validations :

- Les valeurs P/C élevées retrouvées au sein de plusieurs comparaisons
- Une similitude entre de nombreux sites de clivage et les sites préférentiels de clivage identifiés *in vitro*, notamment la présence d'acides aminés non polaires ou aromatiques (voir également ci-après).

Des fibroblastes normaux ou dermatosparactiques de derme humain ont été lysés par sonication en présence d'EDTA afin d'inhiber les métalloprotéases. L'EDTA a ensuite été saturé par ajout de CaCl₂, puis la suspension ainsi obtenue a été centrifugée afin de récolter la fraction soluble contenant les protéines cytoplasmiques. Après incubation avec les ADAMTS2 et/ou 14, des Western blottings ont été réalisés afin de vérifier le profil électrophorétique de la vimentine et de l'actine, deux composants majeurs du cytosquelette identifiés de manière systématique lors de nos analyses iTRAQ-TAILS.

Concernant l'actine (**Figure 33**), l'activité de l'ADAMTS2 induit l'apparition d'un fragment de dégradation (à environ 42 kDa) suggérant l'excision d'une vingtaine d'acides aminés du côté amino ou carboxyterminal. Lorsque les incubations sont réalisées en présence d'ADAMTS14, un peptide additionnel d'environ 38 kDa est également observé. A noter que l'anticorps utilisé ne permet pas l'identification d'une actine particulière car il cible une région C-terminale communes aux actines alpha, bêta et gamma. Ces données confirment néanmoins le clivage d'actine(s) et la robustesse des analyses N-TAILS.

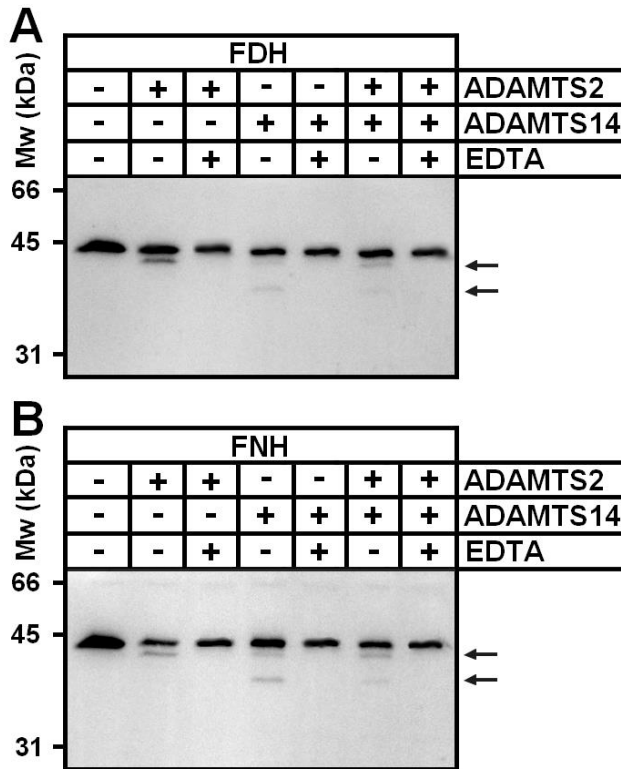


Figure 33: Clivage d'actine(s) par les ADAMTS2 et 14.

Western blotting utilisant un anticorps ciblant la région C-terminale des actines alpha, bêta et gamma. Les western blots ont été effectués sur des lysats de fibroblastes humains dermatosparactiques (FDH) (A) ou normaux (FNH) (B) incubés avec de l'ADAMTS2 et/ou 14, en présence ou en absence d'EDTA. L'anticorps reconnaît l'actine non clivée et des fragments résultant de leur clivage (indiqués par les flèches).

Concernant la vimentine (**Figure 34**), la présence des ADAMTS2 et/ou 14 durant l'incubation induit une diminution de l'intensité du signal correspondant à la forme de plus haut poids moléculaire et une augmentation de l'intensité du produit d'environ 48 kDa. Des fragments protéiques à environ 32 et 37 kDa (indiqués par les flèches) sont également générés. Il est intéressant de noter que le site de clivage identifié par notre approche d'iTRAQ-TAILS en Leu132 a aussi été identifié pour la méprine- α , une métalloprotéase de la famille des astacines (Becker-Pauly et al., 2011). Toutefois, les profils électrophorétiques des extraits de fibroblastes normaux et dermatosparactiques en absence des ADAMTS recombinantes sont identiques, ce qui ne plaide pas en faveur d'un rôle physiologique des ADAMTS2 et 14 dans la dégradation de la vimentine.

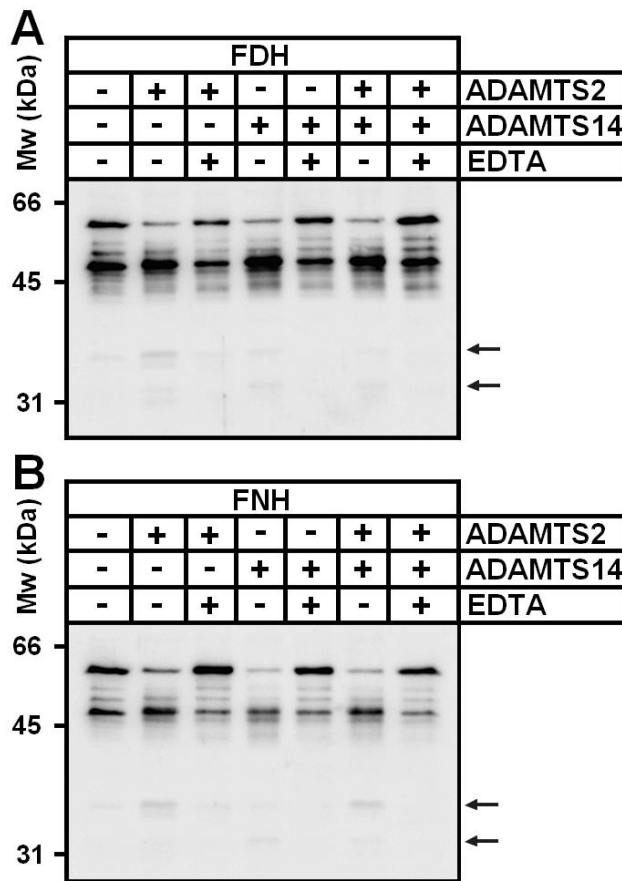


Figure 34: Clivage de la vimentine par les ADAMTS2 et 14.

Western blottings utilisant un anticorps anti-vimentine effectués sur des lysats de fibroblastes humains dermatosparactiques (FDH) (A) ou normaux (FNH) (B) après incubation en présence avec de l'ADAMTS2 et/ou 14 humaines, en présence ou en absence d'EDTA. La diminution de l'intensité du produit de plus haut poids moléculaire s'accompagne d'une augmentation de l'intensité du fragment de 48 kDa et de l'apparition de produits de plus petites tailles (flèches).

L'identification de substrats intracellulaires pour la méprine- α (Becker-Pauly et al., 2011) pourrait signifier qu'il s'agisse d'une activité partagée par d'autres (métallo)protéases. Des substrats intracellulaires potentiels ont également été identifiés par N-TAILS pour différentes cathepsines (Prudova et al., 2016) et pour la MMP2 *in vivo* (auf dem Keller et al., 2013). Ceci a également été rapporté dans un modèle d'exsudats de plaies chez le porc (Sabino et al., 2015). Différentes hypothèses pourraient expliquer ces clivages de protéines intracellulaires par des protéases extracellulaires, dont notamment une recapture des formes enzymatiques actives extracellulaires par les cellules. Cela signifie toutefois que les protéases devraient échapper à une dégradation lysosomale et demeurer active au sein du cytoplasme. L'existence de voies de sécrétion alternatives permettant des clivages intracellulaires par des protéases extracellulaires a également été évoquée (Prudova et al., 2016). L'explication la plus simple serait toutefois que les protéines cytoplasmiques comme l'actine et la vimentine puissent être libérées dans l'espace extracellulaire (sécrétion, nécrose, vésicules) où elles seraient alors la cible de protéases extracellulaires. Ces résultats confirment donc la capacité de l'approche iTRAQ-TAILS pour identifier de nouveaux substrats, mais illustrent également la nécessité de réaliser de multiples validations par des techniques complémentaires afin de s'assurer de la pertinence biologique des clivages observés.

- **Spécificité de clivage des ADAMTS2 et 14 *in vivo***

A titre exploratoire et en étant pleinement conscients des limites de notre démarche, nous avons décidé d'utiliser l'entièreté des sites de clivage identifiés dans les substrats potentiels extracellulaires et (trans)membranaires pour tenter de définir quelles sont les séquences cibles des ADAMTS2 et 14, à l'aide du logiciel IceLogo (**Figure 35**). Différentes analyses ont été effectuées sur base des substrats potentiels considérés : tous les substrats potentiels extracellulaires identifiés (**Figure 35, logos du haut**), tous ces substrats potentiels sans le collagène de type I (**Figure 35, logos du milieu**), ou tous ces substrats sans aucun collagène fibrillaire (**Figure 35, logos du bas**).

Comme pour les études en culture cellulaires (Bekhouche et al., 2016), on observe une surreprésentation d'acides aminés non polaires ou aromatiques en positions P1 et P1', même sans considérer le collagène I ou les autres collagènes fibrillaires riches en Gly et Pro. Une abondance relativement élevée d'acides aminés chargés négativement (Asp et Glu) est observée en P2' pour les substrats des deux enzymes, ce qui n'était pas observé *in vitro*. Ceci est aussi le cas pour les positions P3' et P4' en faisant abstraction des clivages au sein du collagène I. On remarque également une grande similitude des sites de clivage par les ADAMTS2 et 14, mais également avec les sites de clivages identifiés lors de nos études en cultures cellulaires.

A l'aide de la base de données MEROPS, nous avons évalué quelles étaient les protéases susceptibles de cliver ce type de séquences. Une homologie peut être effectuée avec les méprines $-\alpha$ et $-\beta$ qui sont des métalloprotéases sécrétées de la famille des astacines et qui présentent un attrait pour les résidus Asp et Glu mais en position P1' principalement, et dans une moindre mesure en positions P2' et P3' (Becker-Pauly et al., 2011). Il a également été observé à l'aide de la base de données MEROPS une homologie avec la MMP3 au vu de l'enrichissement en résidus Pro en position P3 des sites de clivage de cette enzyme, ce qui est probablement attribuable à son activité collagénase. A noter que le faible nombre d'études réalisées *in vivo* réduit la quantité de données disponibles mais que celles concernant des études *in vitro* sont plus nombreuses mais limitantes de par le choix du modèle utilisé.

Si l'on ne tient pas compte des clivages au sein du collagène de type I, l'enrichissement de résidus chargés négativement observés aux positions P2', P3' et P4' semble indiquer une certaine spécificité des aminoprocollagène peptidases puisque, à notre connaissance, une telle spécificité n'a, à ce jour été décrite que pour les méprines- α et $-\beta$ (Becker-Pauly et al., 2011). La présente étude se distingue donc une nouvelle fois des études réalisées sur d'autres protéases extracellulaires et élargit les informations relatives à la spécificité de clivage des aminoprocollagène peptidases, qui semblent être différente de la spécificité décrite d'autres métalloprotéases.

Ces données illustrent une forte similitude entre la spécificité de clivage des ADAMTS2 et 14, qui est probablement imputable à leur structure très similaire. Ceci a été illustré également par le fait que 34 protéines aient été identifiées comme substrats potentiels communs à ces deux ADAMTS, sur les 42 et 52 que comptent respectivement les ADAMTS2 et 14. Il est intéressant de noter les fortes similitudes entre la spécificité des analyses effectuées *in vitro* et ceux réalisés *in vivo* sur les échantillons de peaux de souris, ce qui conforte les résultats identifiés. L'analyse de la spécificité de clivage est cependant à confirmer au fur et à mesure que les validations de clivage des substrats potentiels auront été effectuées pour les ADAMTS2 et 14.

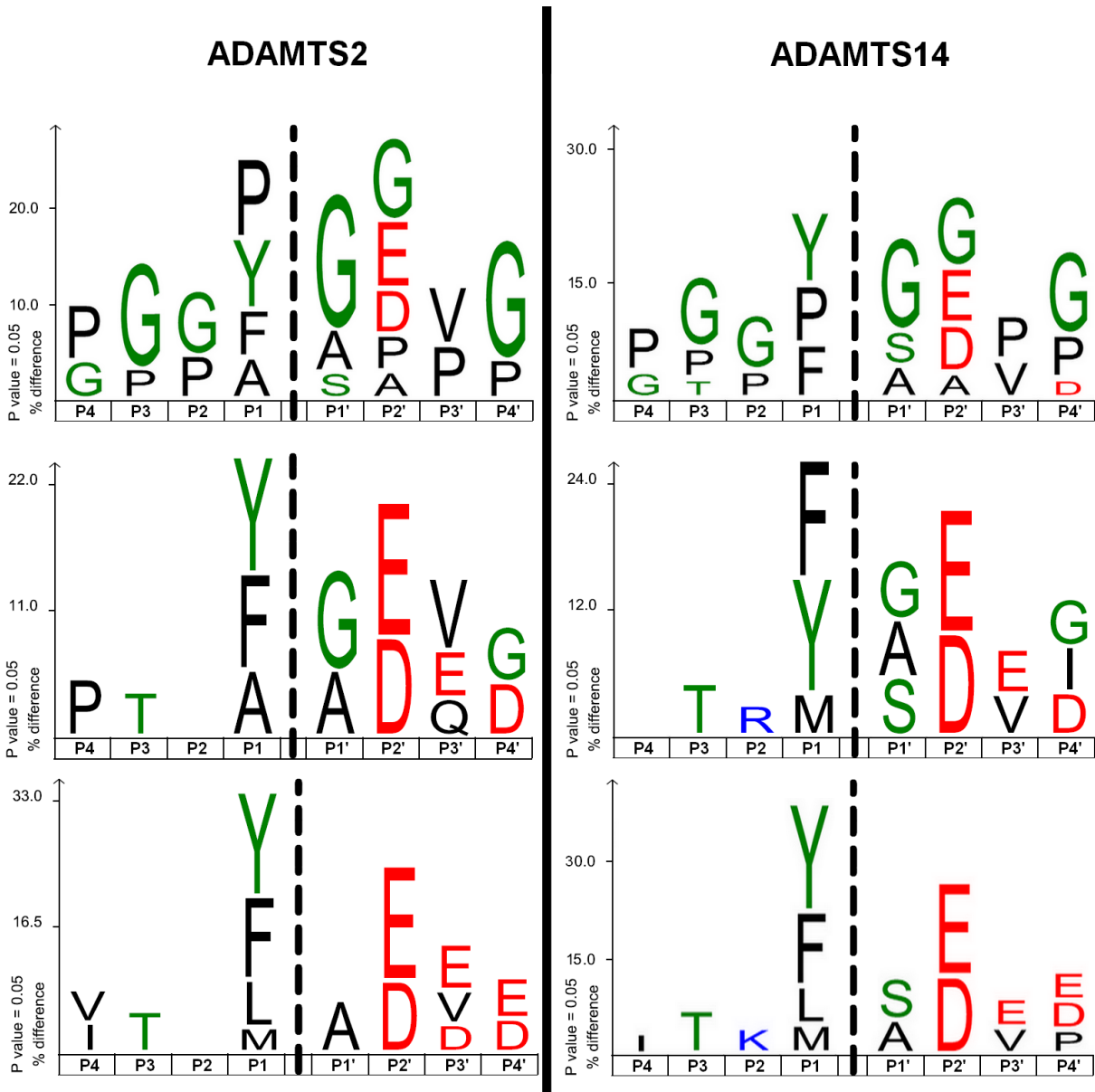


Figure 35: Spécificités de clivage des ADAMTS2 et 14 in vivo.

Spécificité de clivage de l'ADAMTS2 (panneaux de gauche) et de l'ADAMTS 14 (panneaux de droite) déterminée à partir des données sur tous les peptides identifiés comme substrats potentiels extracellulaires ou (trans)membranaires (logos du haut), tous ces substrats potentiels sans les peptides correspondants au collagène de type I (logos du milieu), et tous les substrats potentiels sans les peptides correspondants aux collagènes fibrillaires (logos du bas). Les graphiques ont été réalisés avec l'aide du logiciel IceLogo (Colaert et al., 2009). La hauteur de chaque acide aminé reflète le pourcentage de différence par rapport à sa fréquence normale, et sa couleur représente ses propriétés physico-chimiques.

C. Discussion, conclusions et perspectives du chapitre 2

Après avoir analysé le répertoire de substrats des aminoprocollagène peptidases dans des modèles de culture cellulaire, nous avons entrepris une étude similaire sur des échantillons de peau, plus pertinents d'un point de vue biologique mais d'une complexité protéique bien supérieure à celle rencontrée *in vitro*. Trois expériences identiques ont été réalisées en parallèle afin de comparer le N-terminome au sein de peaux de souris de quatre génotypes différents (type sauvage, Adamts2^{-/-}, Adamts14^{-/-} et Adamts2^{-/-}Adamts14^{-/-}), et ainsi d'identifier des substrats spécifiques ou commun à ces deux ADAMTS homologues.

Ce type d'approche *in vivo* est compliqué en raison de la nature dynamique et interactive des tissus où les évènements de clivage peuvent être masqués par l'absorption cellulaire ou la dégradation des peptides générés, par des modifications de niveau d'expression des substrats, par l'infiltration de cellules immunitaires plus ou moins abondantes et enfin par la présence des protéines et protéases sanguines (Prudova et al., 2016). De plus, l'absence d'une protéase *in vivo* est souvent compensée par l'action d'autres protéases qui partagent les mêmes substrats et les clivent à des sites proches, voire identiques (Fortelny et al., 2015). Dans ces conditions, il est souvent complexe d'identifier de nouveaux substrats à partir d'échantillons *in vivo*.

Cette étude ambitieuse est la première du genre à s'intéresser à des échantillons tissulaires aussi complexes. En effet, les échantillons de peaux comprennent plusieurs compartiments relativement distincts, à savoir l'épiderme, le derme, l'hypoderme, des structures musculaires, des vaisseaux sanguins et des éléments nerveux.

Bien que tous les fragments de peau aient été prélevés et analysés de manière rigoureusement identique, il est inévitable que l'abondance relative de certaines protéines puisse varier d'un échantillon à l'autre, induisant ainsi des variations des rapports P/C pour des peptides qui ne sont pourtant pas clivés par les protéases étudiées et constituent donc des « faux positifs ». Ces biais potentiels soulignent la nécessité de réaliser des expériences indépendantes en parallèle (ce que nous avons réalisé ici avec nos trois expériences A, B et C) et de confirmer par d'autres techniques les clivages identifiés par l'approche de N-terminomique. Un autre moyen pour réduire ces biais serait d'effectuer les analyses en se concentrant sur des structures bien définies ou sur les tissus au sein desquels les protéases d'intérêt sont les plus spécifiquement et les plus abondamment exprimées. En ce qui concerne nos échantillons, nous aurions pu, par exemple, traiter les fragments de peaux à la dispase afin d'enlever spécifiquement l'épiderme et ainsi de simplifier le protéome. Toutefois, puisque ces traitements supplémentaires ne sont pas anodins et pourraient induire d'autres biais expérimentaux, nous avons privilégié l'analyse de la peau dans son ensemble.

En plus de comprendre l'intégralité des échantillons cutanés, l'ensemble des protéines présentes a aussi été considéré. Celles-ci comprennent donc les protéines intracellulaires, extracellulaires et (trans)membranaires exprimées par l'ensemble des types cellulaires présents. Plutôt que de se consacrer à l'analyse de toutes ces protéines cutanées, un enrichissement en protéines extracellulaires aurait pu être privilégié, comme cela a été fait par auf dem Keller et son équipe en évitant l'utilisation de détergent pour la préparation de leurs échantillons tissulaires (auf dem Keller et al., 2013). Si une telle stratégie avait cependant été privilégiée, les protéines intracellulaires n'auraient pas été considérées et aucun substrat potentiel intracellulaire n'aurait été identifié. Par conséquent la vimentine et l'actine, dont les clivages ont été confirmés pour l'ADAMTS2

et 14, n'auraient pu être identifiées. Cette étude est donc la première du genre à s'intéresser à l'action potentielle d'enzymes extracellulaires dans des échantillons aussi complexes et à étudier les potentiels clivages intracellulaires exercés par ces protéases d'intérêt que sont les ADAMTS2 et 14.

Suite à l'analyse par spectrométrie de masse en tandem, l'ensemble des peptides identifiés par N-TAILS ont été triés (à l'aide du logiciel BiNGO dans un premier temps, puis manuellement) afin de ne prendre en considération que les protéines potentiellement extracellulaires, (trans)membranaires, ou associées à la membrane plasmique. Les valeurs seuil (+ et - 3sigmas) permettant de discriminer les peptides considérés comme pertinents ont été calculées, en se basant sur la distribution des peptides correspondant aux extrémités N-terminales des protéines natives, et qui ne résultent donc vraisemblablement pas de l'activité de la protéase d'intérêt (auf dem Keller and Overall, 2012; Prudova et al., 2016). Cela signifie que tout peptide présentant un rapport P/C supérieur la valeur seuil +3 sigmas ou inférieure à la valeur seuil -3sigmas est statistiquement susceptible d'être influencé par la protéase d'intérêt et a été considéré. N'ont été considérés comme pertinents au sein de chaque expérience que les peptides dont le rapport P/C était supérieur ou inférieur à la valeur seuil, et ce dans au moins 2 des 3 comparaisons effectuées séparément pour l'ADAMTS2 et pour l'ADAMTS14.

Au final, 42 substrats potentiels extracellulaires ou (trans)membranaires ont été déterminés pour l'ADAMTS2, 52 pour l'ADAMTS14 dont 34 qui leur étaient communs. Ces chiffres indiquent une forte redondance entre le répertoire des substrats potentiels identifiés pour l'ADAMTS2 et celui de l'ADAMTS14 qui provient manifestement de leur forte homologie. Il est cependant possible qu'elles présentent une activité plus ou moins importante sur leurs substrats communs, à l'image de l'activité aminoprocollagène peptidase qui est plus faible pour l'ADAMTS14 que pour l'ADAMTS2. Cette activité moindre sur certains substrats entre certainement dans les raisons pour lesquelles aucun phénotype évident n'est visible chez les souris déficientes en ADAMTS14, en raison d'une compensation effectuée par l'ADAMTS2 alors que l'activité dispensée par l'ADAMTS14 ne permet pas de compenser le déficit en ADAMTS2 chez les souris TS2^{-/-} qui présentent notamment une fragilité cutanée. Cette hypothèse est aussi étayée par le fait que les souris doublement déficientes en ces enzymes développent spontanément des lésions cutanées s'apparentant à celles de la dermatite atopique (Dupont et al., 2018).

Parmi les substrats potentiels identifiés, nous nous sommes prioritairement focalisés sur les collagènes fibrillaires qui constituent les premiers substrats identifiés des ADAMTS2 et 14. Les sites de clivage connus de l'aminoprotéase des chaînes alpha-1 et alpha-2 du collagène de type I ont pu être clairement identifiés au cours de nos analyses, ce qui validait notre approche expérimentale. De manière remarquable, d'autres sites de clivage situés à proximité immédiate des sites connus ont été identifiés de manière répétée et significative. Ceci suggérerait que les ADAMTS ne clivent pas une liaison peptidique précise mais clivent au sein d'une séquence cible de quelques acides aminés. Alternativement, il se pourrait également que, *in vivo*, des exopeptidases soient actives sur l'aminotélopeptide des collagènes fibrillaires et modifient ainsi son extrémité. Les sites de clivage au sein des aminoprotéides des procollagènes de type V demeuraient un sujet controversé et n'avait jamais pu être établis de manière indiscutable à partir d'échantillons *in vivo*. Notre étude a confirmé l'existence d'un site de clivage (PGMP435.436ANQD) au sein du domaine variable de la chaîne alpha 1 V. Elle a également démontré, pour la première fois, que les chaînes alpha 1 et alpha 2 de type V étaient clivées entre la petite triple hélice aminotermine et le domaine collagène central, à l'instar de ce qui est observé pour les collagènes de type I, II et III. Bien que les analogies de séquences laissent présager un clivage à ces sites, aucune étude préalable n'avait pu les mettre en évidence et des doutes

avaient été émis quant à leur existence. Enfin, plus spécifiquement concernant l'ADAMTS14, ces analyses ont à nouveau confirmé sa faible activité aminoprocollagène peptidase envers le procollagène de type I mais elles ont également démontré pour la première fois une activité envers le procollagène de type V similaire à celle déterminée pour l'ADAMTS2.

De manière surprenante, de nombreux clivages ont été identifiés au sein du domaine central en triple hélice du collagène de type I. Certains d'entre eux avaient déjà été observés lors des analyses *in vitro* effectuées antérieurement (Bekhouche et al., 2016). Une hypothèse permettant d'expliquer ces observations serait que des défauts dans le repliement de la triple hélice soient des sites propices de clivage par les ADAMTS2 et 14. Cette activité « collagénase/gélatinase » permettrait ainsi d'éviter l'accumulation de trimères imparfaits susceptibles d'altérer la fibrillogenèse. Si cette hypothèse était avérée, elle attribuerait donc une fonction de « contrôle qualité » aux ADAMTS 2 et 14. Des premières expériences de validation ont été réalisées à l'aide de collagène extrait de peau de veau dermatosparactique, utilisé natif ou après dénaturation en gélatine. Une incubation de cette gélatine avec de l'ADAMTS2 mène à une excision du propeptide aminoterminal, ce qui est une observation originale car il avait toujours été considéré qu'une structure trimérique en triple hélice était requise pour un clivage du propeptide. Toutefois, cette étude est préliminaire et devrait être complétée au cours de test prenant en compte les paramètres cinétiques de clivage. A l'inverse de ce qui est observé avec le collagène, l'incubation de gélatine avec l'ADAMTS2 mène, en plus du clivage du propeptide aminoterminal, à l'apparition de produits de dégradation visibles après électrophorèse sous la forme de bandes discrètes et d'une « trainée » correspondant à des multiples peptides de faibles poids moléculaires, démontrant ainsi clairement l'existence d'une activité « collagénase/gélatinase ». Une activité similaire est observée pour l'ADAMTS14, alors que celle-ci n'a pourtant qu'une très faible activité aminoprocollagène peptidase sur le collagène natif, ce qui différencie bien les deux enzymes.

Afin d'identifier une potentielle activité « contrôle-qualité » dans des conditions plus physiologiques, nous avons utilisé du collagène provenant de fibroblastes de patients souffrant d'une ostéogenèse imparfaite puisque la présence d'une mutation causant le remplacement d'une Gly par un acide aminé plus volumineux induit un défaut local de la structure en triple hélice. Aucune activité collagénase/gélatinase n'a cependant pu être observée de manière évidente, suggérant que des défauts très limités dans la triple hélice ne sont pas suffisants pour induire une dégradation par les ADAMTS2 et 14. Ces expériences devront cependant être répétées en utilisant du collagène produit par des fibroblastes rendus déficients en ADAMTS2 et 14 (utilisation de siARN) pour s'assurer que les trimères les plus altérés n'ont pas été rapidement dégradés par les ADAMTS produites de manière constitutive, prévenant ainsi toute observation ultérieure d'une activité « contrôle-qualité ».

Une autre observation originale résultant des analyses N-TAILS concerne l'existence de clivages potentiels au sein du propeptide carboxyterminal des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de type I. Cette activité n'est pas partagée par l'ADAMTS14, ce qui illustre à nouveau les nombreuses différences de fonctions entre enzymes pourtant homologues. Une observation similaire concernant le collagène de type III avait cependant déjà été réalisées lors de nos études en co-cultures *in vitro* (Bekhouche et al., 2016). Les vérifications *in vitro* illustrent clairement la conversion des procollagènes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ en chaînes α matures, ce qui démontre que l'ADAMTS2 est également douée d'une activité carboxyprocollagène peptidase. Des études supplémentaires seront nécessaires pour estimer les cinétiques enzymatiques, évaluer si la PCPE-1 influence ce clivage (à l'instar de son effet co-activateur observé en présence de BMP1) et déterminer l'impact biologique d'un clivage du carboxypropeptide par l'ADAMTS2 plutôt que par la BMP1.

De nombreuses protéines autres que les collagènes fibrillaires ont été identifiées comme substrats potentiels des ADAMTS2 et 14. Pour certaines d'entre-elles, des confirmations ont également été réalisées par des techniques complémentaires. Ces caractérisations demeurent toutefois insuffisantes et des études fonctionnelles devront être entreprises pour évaluer les conséquences biologiques de ces clivages. Dans ces conditions, il ne nous a pas semblé opportun de les discuter ici de manière plus approfondie.

Chapitre 3 : Etudes par iTRAQ-TAILS du répertoire d'autres métalloprotéases.

Des travaux en collaboration sont actuellement en cours concernant les substrats potentiels d'autres métalloprotéases, dont les ADAMTS7 et 12 (Dr Rens De Groot, Haemostatis and Thrombosis, Imperial College London, UK), l'ADAM28 (Pr. Didier Cataldo, Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement, ULg) et la MT4-MMP (collaboration avec le Dr Nor Eddine Sounni, Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement, ULg).

A. Analyse des répertoires de substrats potentiels des ADAMTS7 et 12

Les ADAMTS7 et 12 présentent une structure similaire et participent à plusieurs processus physiopathologiques liés aux systèmes cardiovasculaire et musculo-squelettique. Toutefois, les mécanismes moléculaires dans lesquels sont impliquées ces deux enzymes « homologues » demeurent peu compris. C'est dans ce cadre que nous avons entrepris de déterminer leur répertoire de substrats (collaboration avec R. de Groot (Imperial College London) pour l'ADAMTS7 et C. Monseur, (LBTC) pour l'ADAMTS12).

B. Analyse du répertoire de substrats potentiels de l'ADAM28 par iTRAQ-TAILS

Une seconde collaboration actuellement en cours concerne l'ADAM28. L'ADAM28 est une métalloprotéase exprimées sous une forme transmembranaire (ADAM28-tm) et sous une forme « soluble » (ADAM28s) générée par épissage alternatif et dépourvue de domaine transmembranaire. Elle est exprimée par les lymphocytes T et B, ainsi que par les cellules épithéliales de différents organes. Elle est également surexprimée dans les carcinomes pulmonaires humains « non à petites cellules » et les carcinomes mammaires, principalement par des cellules cancéreuses (Kuroda et al., 2010; Mochizuki et al., 2012; Rocks et al., 2008). Son niveau d'expression est en corrélation avec la prolifération cellulaire maligne et la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques, ce qui serait à mettre en relation avec le clivage du VWF (Mochizuki et al., 2012). Son implication dans la pathologie asthmatique a également été décrite (Paulissen et al., 2009).

Afin de mettre en évidence des substrats potentiels de l'ADAM28 et de mieux comprendre ses différents rôles, l'équipe du Professeur Cataldo a développé des lignées cellulaires exprimant l'ADAM28, sous ses formes membranaire (tm) ou soluble (s). Des lignées contrôles exprimant les formes inactives, mutées au site catalytique (ADAM28mut) ont également été générées. Ces différentes lignées sont utilisées pour produire des milieux conditionnés qui seront ensuite analysés par iTRAQ-TAILS, en comparant les échantillons ADAM28tm actifs et inactifs ainsi que les échantillons ADAM28s actifs et inactifs.

C. Analyse du répertoire de substrats potentiels de la MT4-MMP par iTRAQ-TAILS

Enfin, une dernière collaboration avec le Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement (ULiège) concerne la MT4-MMP (Membrane-Type 4 Matrix Metalloproteinase). Cette dernière, également dénommée MMP17, est une métalloprotéase de surface cellulaire ancrée à la membrane plasmique via un groupe glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Itoh, 2015). Elle est surexprimée dans plus de 50% des cancers du sein triple négatif, un cancer particulièrement agressif et de mauvais pronostic (Yip et al., 2017). Son rôle dans la progression du cancer mammaire a été récemment établi (Itoh, 2015). Des publications récentes démontrent que la MT4-MMP est capable d'interagir avec le récepteur de l'EGF (EGFR1) et de stimuler les voies de signalisation qui en dépendent (Paye et al., 2014; Yip et al., 2017).

Afin d'identifier des nouveaux substrats potentiels de la MT4-MMP, une expérience d'iTRAQ-TAILS a été effectuée sur le sécrétome de cellules de cancer du sein MDA-MB231 surexprimant la forme sauvage de la MT4-MMP ou un mutant inactif afin de bénéficier d'un témoin négatif pertinent.

Parmi les substrats potentiels identifiés, les syndécan 1 et syndécan 4 sont particulièrement intéressants. Les syndécans sont des protéines transmembranaires dont le cœur protéique porte des chaînes de glycosaminoglycans, le plus souvent de type « héparan sulfate ». Ils interagissent avec de nombreux composants de la matrice extracellulaire, de manière directe notamment via les chaînes d'héparan sulfate, ou en conjonction avec d'autres récepteurs (Lambaerts et al., 2009). Les syndécan 1 et 4 constituent des marqueurs potentiels de pronostic du cancer du sein (et d'autres cancers) car leur taux d'expression y est lié à l'agressivité tumorale (Akl et al., 2015; Lendorf et al., 2011; Nguyen et al., 2013), ce qui a aussi été observé pour la MT4-MMP (Yip et al., 2017). Enfin, les syndécan 1 et 4 participent à l'activation de la voie EGF en régulant l'interaction entre l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ et les récepteurs HER-2 pour le syndécan 1, ou avec les récepteurs HER-1 ou EGFR pour le syndécan 4 (Wang et al., 2014a; Wang et al., 2015).

Sur base de ces résultats prometteurs, M. Liénard et N.E. Sounni (LBTD) ont entamé une étude concernant l'implication biologique des interactions entre la MT4-MMP, l'EGFR et les syndécans 1 et 4. Dans un modèle de cellules de cancer du sein, ils ont mis en évidence une co-localisation (observations par microscopie à fluorescence) entre ces différents facteurs, confirmé, par des expériences de co-immunoprécipitations, l'existence d'interactions entre la MT4-MMP et le syndécan 1 ou le syndécan 4. Bien que ces résultats ne démontrent pas l'existence d'un clivage par la MT4-MMP, ils soulignent toutefois le rôle que celle-ci pourrait jouer dans les régulations opérées sous la dépendance des syndécans. Les travaux futurs concerneront donc, notamment, la vérification des sites de clivage (Western blotting, spectrométrie de masse) sur les syndécans 1 et 4.

Nous avons démontré au cours de ce chapitre l'intérêt de la communauté scientifique pour l'iTRAQ-TAILS au vu des collaborations extérieures au LBTC qui sont en cours de réalisation.

PARTIE 4 : DISCUSSION ET **CONCLUSIONS GENERALES**

A l'aube de cette thèse, les principales fonctions connues des ADAMTS2, ADAMTS3 et ADAMTS14 se limitaient à la maturation des procollagènes fibrillaires en excisant leur aminopropeptide. Des données de la littérature et des observations réalisées au laboratoire, concernant par exemple la stérilité des souris mâles déficientes en ADAMTS2, l'implication probable de l'ADAMTS14 dans l'arthrite ou l'expression de l'ADAMTS3 dans des organes dépourvus de collagènes fibrillaires, suggéraient toutefois leur capacité à exercer d'autres rôles dans des processus physiologiques et pathologiques.

Le but de ce travail consistait donc à identifier de nouveaux substrats de ces ADAMTS de manière à déterminer la nature des mécanismes dans lesquels elles sont impliquées.

A l'aide d'une **nouvelle approche de protéomique appelée iTRAQ-TAILS** et couplée à des analyses bioinformatiques appropriées, nous avons d'abord recherché ces substrats dans **le sécrétome de fibroblastes co-cultivés avec des HEK293 surexprimant les ADAMTS2, 3 ou 14 de manière inductible**. Plusieurs substrats spécifiques ou communs ont été identifiés. Parmi ceux-ci figurent **des macromolécules de structure de la MEC**, dont bien sûr **les collagènes fibrillaires (N-propeptides des collagènes fibrillaires et C-propeptide du collagène de type III)**, mais aussi **la fibronectine** qui joue un rôle clé dans de multiples processus biologiques telles l'adhésion cellulaire, la fibrillogenèse ou la coagulation sanguine. D'autres substrats identifiés comptent aussi diverses **protéines impliquées** dans des voies de signalisation et, en particulier **dans la voie du TGF- β** , permettant la modulation de celle-ci (à l'image de **DKK3**, du **TGF- β RIII**, du **CTGF** et du **LTBP1**). Nous avons également démontré à l'aide de tests fonctionnels un impact direct de l'ADAMTS2 sur **la voie du TGF- β** , ce qui est une observation tout à fait originale. De plus, **l'ADAMTS2 a montré un impact fonctionnel** sur différents processus biologiques puisque son expression **semble stimuler la migration de fibroblastes, et qu'elle semble accélérer la coagulation sanguine**. Ces données restent cependant à confirmer, et à vérifier pour les ADAMTS3 et 14. Elles suggèrent néanmoins que **l'ADAMTS2, et par extension, ses deux homologues les ADAMTS3 et 14, sont impliquées dans des mécanismes de remodelage et de réparation tissulaires physiologiques et pathologiques, à l'image de la fibrose**, qui est réduite chez les souris *Adamts2^{-/-}* (Kesteloot et al., 2007).

Sur base de ces résultats encourageants et de l'expertise acquise, nous nous sommes ensuite intéressés à **l'analyse de fragments de peau de souris déficientes en ADAMTS2 et/ou 14**. Cette étude s'est révélée particulièrement ardue en raison de la complexité d'échantillons comprenant différentes structures tissulaires et des types cellulaires variés. Bien que préliminaires et exploratoires, ces analyses ont cependant fourni des renseignements originaux à propos des **sites de clivage des aminopropeptides des procollagènes fibrillaires, notamment du type V, mais également concernant le clivage du propeptide carboxyterminal du collagène de type I par l'ADAMTS2**, une activité qui était totalement inattendue. La capacité des ADAMTS2 et 14 à exercer une **activité gélatinase** a également été mise en évidence. Ceci suggère que ces enzymes pourraient participer à un **mécanisme de « contrôle-qualité »**, en initiant la dégradation des trimères de collagène présentant un défaut de structure, ce qui a été étayé par l'observation par N-TAILS de sites de clivage au sein de la triple hélice des collagènes fibrillaires. Cette hypothèse novatrice, qui nous est apparue au cours des derniers mois de nos recherches, n'a pu être confirmée dans le cadre du présent travail, mais pourrait faire l'objet d'un travail ultérieur.

De nombreux **autres substrats potentiels** extracellulaires ont été identifiés pour les ADAMTS2 et 14, dont **les collagènes VI et XIV**, ainsi que des **protéoglycans impliqués dans les mécanismes de fibrillogenèse et la protéine PCPE-1**. Toutefois, ces données expérimentales

demeurent préliminaires et mériteraient d'être confirmées au cours d'études futures, notamment en raison de leur intérêt potentiel pour une **meilleure compréhension des multiples processus affectant l'homéostasie des tissus conjonctifs en physiologie et au cours de diverses pathologies** (cancers, fibroses, ulcères ...).

De manière surprenante, des **substrats intracellulaires** ont aussi été identifiés, tant pour l'ADAMTS2 que pour l'ADAMTS14. Des validations, réalisées pour **l'actine et la vimentine**, ont confirmé les résultats de N-TAILS. Il conviendra toutefois de **comprendre les mécanismes et de localiser le compartiment dans lequel s'opèrent ces clivages** : dans le milieu extracellulaire lorsque des cellules sont nécrotiques ou suffisamment endommagées pour libérer du matériel cytoplasmique, au sein de vésicules de sécrétion, dans des exosomes, ou effectivement dans le cytoplasme au sein de vésicules d'endocytose.

Finalement, bien que de nombreux nouveaux substrats, avérés ou toujours potentiels, aient été identifiés, il est clair que ce travail ne fournit pas un catalogue exhaustif de toutes les fonctions de ces trois ADAMTS homologues. L'identification d'un substrat dépend bien évidemment de sa présence dans le protéome mais est également influencée par son abondance relative. Des **expériences additionnelles devront donc être effectuées** en s'adressant à d'autres tissus ou cellules de manière à élargir nos analyses à d'autres répertoires de substrats potentiels et de confirmer les résultats obtenus au cours de ce travail. Des modifications des protocoles de protéomique sont également envisageables, dont, par exemple, la génération de la librairie de peptides avec des endoprotéases autres que la trypsine afin de pouvoir identifier des sites de clivages par les ADAMTS qui seraient trop proches ou trop lointains des sites tryptiques.

Enfin, une des conséquences directes de ce travail aura été **l'établissement de collaborations** locales et internationales et une reconnaissance accrue de la réputation du LBTC, mon laboratoire d'accueil, dans le domaine des ADAMTS.

PARTIE 5 : PUBLICATIONS
PERSONNELLES

- Debacq-Chainiaux F, **Leduc C**, Verbeke A, and Toussaint O. (2012). UV, stress and aging. *Dermatoendocrinol.* 2012 Jul 1; 4(3): 236–240.
- Bauwens É, Ernst L, **Leduc C**, Dieu M, & Chainiaux F. (2015). Étude des microvésicules relarguées par les kératinocytes humains normaux en sénescence répllicative ou induite par les UVB. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* (6-7 Ed., Vol 142, p. S290).
- Janssen L*, Dupont L*, Bekhouche M, Noel A, **Leduc C**, Voz M, Peers B, Cataldo D, Apte S S, Dubail J** and Colige A**. (2016). ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. *Angiogenesis*, 19:53-65. (Annexe 1).
- Bekhouche M*, **Leduc C***, Dupont L, Janssen L, Delolme F, Vadon-Le Goff S, Smargiasso N, Baiwir D, Mazzucchelli G, Zanella-Cleon I, Dubail J, De Pauw E, Nusgens B, Hulmes DJ, Moali C and Colige A. (2016). Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets. *FASEB*, 30:1741- 56. (Résultats: Chapitre I).
- Dupont L, Ehx G, Chantry M, Monseur C, **Leduc C**, Janssen L, Cataldo D, Thiry M, Jerome C, Thomassin J-M, Nusgens B, Dubail J, Baron F, Colige A. (2018). Spontaneous atopic dermatitis due to immune dysregulation in mice lacking ADAMTS2 and 14. *Matrix Biol.*

* et ** : contribution équivalente au travail.

PARTIE 6 : ANNEXES

Annexe 1: ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis.



ORIGINAL PAPER

ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis

Lauriane Janssen¹ · Laura Dupont¹ · Mourad Bekhouche¹ · Agnès Noel² · Cédric Leduc¹ · Marianne Voz³ · Bernard Peers³ · Didier Cataldo² · Suneel S. Apte⁴ · Johanne Dubail^{1,4} · Alain Colige¹

Received: 7 May 2015 / Accepted: 28 September 2015

The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The only documented activity of a subclass of ADAMTS proteases comprising ADAMTS2, 3 and 14 is the cleavage of the aminopropeptide of fibrillar procollagens. A limited number of *in vitro* studies suggested that ADAMTS3 is mainly responsible for procollagen II processing in cartilage. Here, we created an ADAMTS3 knockout mouse (Adamts3^{-/-}) model to determine *in vivo* the actual functions of ADAMTS3. Heterozygous Adamts3^{+/+} mice were viable and fertile, but their intercrosses demonstrated lethality of Adamts3^{-/-} embryos after 15 days of gestation. Procollagens I, II and III processing was unaffected in these embryos. However, a massive lymphedema caused by the lack of lymphatics development, an abnormal blood vessel structure in the placenta and a progressive liver destruction were

observed. These phenotypes are most probably linked to dysregulation of the VEGF-C pathways. This study is the first demonstration that an aminoprocollagen peptidase is crucial for developmental processes independently of its primary role in collagen biology and has physiological functions potentially involved in several human diseases related to angiogenesis and lymphangiogenesis.

Keywords ADAMTS · Lymphangiogenesis · Angiogenesis · Collagen · Placenta · Development

Introduction

ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeat) are secreted metalloproteases forming a family of 19 different members that share an identical N-terminal domain organization [1]. By contrast, they can be characterized or classified in subfamilies according to the presence of specific C-terminal ancillary domains or on the basis of their activities or substrates. Proteoglycanases (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15, 20) constitute a super-clade of ADAMTS able to cleave various proteoglycans although they possess a variable C-terminal domain organization [2]. ADAMTS13 is the only member reported to cleave the von Willebrand Factor [3–5]. ADAMTS2, 3 and 14 are highly related enzymes with identical domain organization, high sequence homology and shared ability to process the aminopropeptide of fibrillar collagens, categorizing them as “aminoprocollagen peptidases” [6].

Mutations in ADAMTS2 are responsible for a human-inherited disease, the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome [7, 8], characterized among other features by severe skin fragility and easy bruising. These clinical hallmarks are thought to result from the accumulation of type I

Lauriane Janssen and Laura Dupont have contributed equally to this work.

Johanne Dubail and Alain Colige have promoted and supervised equally this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10456-015-9488-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alain Colige
acolige@ulg.ac.be

¹ Laboratory of Connective Tissues Biology, Tour de Pathologie, GIGA-R, University of Liege, B23/3, 4000 Sart Tilman, Belgium

² Laboratory of Tumor and Developmental Biology, GIGA-R, University of Liege, 4000 Sart Tilman, Belgium

³ Laboratory of Zebrafish Development and Disease Models, GIGA-R, University of Liege, 4000 Sart Tilman, Belgium

⁴ Department of Biomedical Engineering, Cleveland Clinic, Lerner Research Institute, Cleveland, OH 44195, USA

Published online: 07 October 2015

Springer

and type III aminoprocollagen (collagen still retaining its aminopropeptide), which hinders collagen assembly into highly organized fibrils. Other significant findings relating to potential functions are the relative resistance of *Adamts2*^{-/-} mice to liver fibrosis [9], the infertility of *Adamts2*^{-/-} males [10], the expression of ADAMTS2 by activated macrophages [11], its anti-angiogenic properties [12] and its potential role in pediatric stroke [13].

In contrast to the extensive literature on ADAMTS2, ADAMTS3 remains much less characterized. It efficiently processes the aminopropeptide of procollagen II *in vitro* and is specifically expressed in cartilage during embryogenesis and adult life [14]. Previously, *in situ* hybridization (ISH) analysis revealed that *Adamts3* was also highly expressed in specific regions of the developing mouse brain and in connective tissues such as bone and tendon [14]. It was therefore assumed that ADAMTS3 would be the main aminoprocollagen peptidase during embryogenesis, which would explain the apparent normal development of these tissues in *Adamts2*^{-/-} embryos. In experimental models, ADAMTS3 was also recently shown to be able to activate VEGF-C by proteolytic cleavage [15] through a yet poorly characterized mechanism that probably involves also CCBE1, a secreted protein containing a collagenous domain. Indeed, CCBE1 is required for lymphangiogenesis by its ability to stimulate the activation of VEGF-C [16, 17] although having no proteolytic activity. It is not yet clear, however, whether this putative VEGF-C activating property of ADAMTS3 is physiologically relevant and restricted to ADAMTS3 since the highly similar ADAMTS2 and 14 could potentially share this function *in vivo*.

The aim of the present study was to elucidate the physiological roles of ADAMTS3 through *Adamts3* gene inactivation in mice. We show here that ADAMTS3 is dispensable for aminoprocollagen processing until mid-gestation. It is, however, critical for embryonic development since its deficiency prevents the formation of the lymphatic network, alters the function of placental blood vessels and drastically impairs liver development, which finally induces embryonic lethality. Our data demonstrate the central role of ADAMTS3 during two vital developmental processes and further show that the overlap of functions with ADAMTS2 is less important than previously expected.

Results

Adamts3 inactivation leads to embryonic lethality with skin edema and impaired liver development, but procollagen processing is not altered

A mouse strain allowing the Cre-mediated conditional removal of the exon 8 to exon 10 *Adamts3* gene sequence

was created. At the protein level, the skipping of these exons results in the absence of the catalytic metalloprotease domain, which prevents the possibility of any residual enzymatic activity, and introduces a frameshift by changing the *Adamts3* ORF (Fig. S1). It is worth mentioning also that this short genomic region does not contain any described miRNA or long noncoding RNAs. These mice were crossed with mice expressing Cre globally, including in the germ lines, in order to produce mice with a single functional *Adamts3* allele (*Adamts3*^{+/+}). The shorter mRNA produced from the targeted allele was RT-PCR amplified and sequenced, confirming both the specific skipping of exons 8–10 and the reading frameshift of the mRNA. *Adamts3*^{+/+} mice were crossed, but no *Adamts3*^{-/-} neonates were observed in the litters, suggesting embryonic lethality. Genotyping of embryos at various development stages demonstrated that *Adamts3*^{-/-} embryos died around E15.0 and that the expected ratio between *Adamts3*^{+/+}, *Adamts3*^{+/+} and *Adamts3*^{-/-} was Mendelian at earlier stages [25:56:19 % for E13–13.5 (n = 113) and 21:56:23 % for E14–14.5 (n = 281), 48:46:6 % for E15–15.5 (n = 31)].

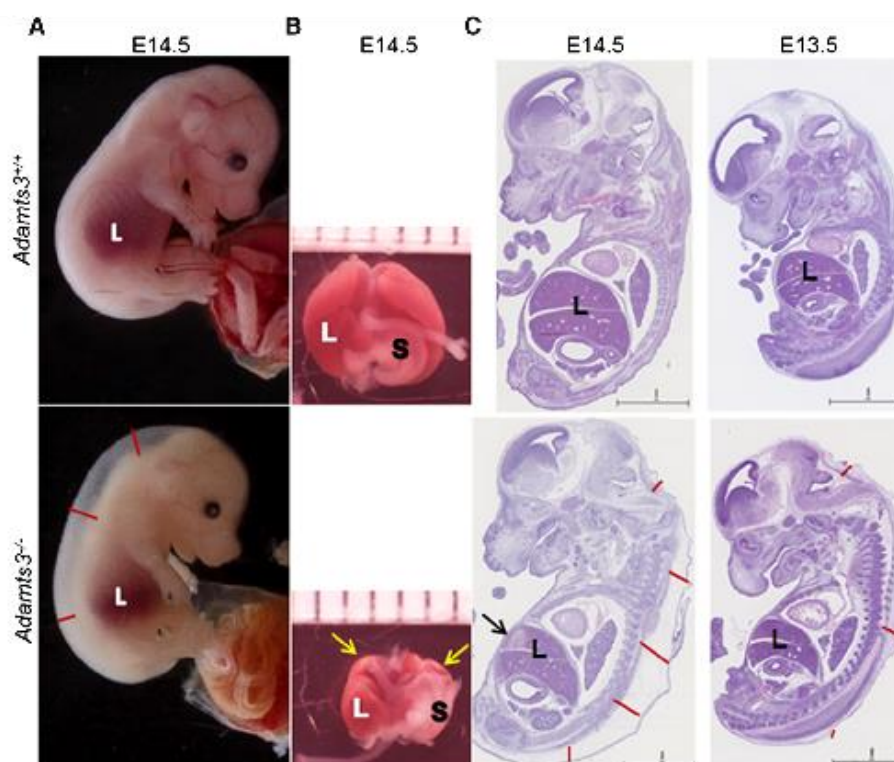
At E12.5, the gross morphological appearance of *Adamts3*^{+/+}, *Adamts3*^{+/+} and *Adamts3*^{-/-} embryos was similar, whereas *Adamts3*^{-/-} embryos could be identified at E13.5 by the presence of edema in the dorsal skin. Skin edema and a paler color were striking in E14.5 *Adamts3*^{-/-} embryos (Fig. 1a), as well as a reduction in liver size as observed after dissection (Fig. 1b). General examination of H&E-stained sections confirmed the progressive development of edema in *Adamts3*^{-/-} embryos from E13.5 to E14.5 and the reduction in liver size, while the other tissues and organs did not seem to be significantly affected (Fig. 1c).

Another relevant alteration was observed in blood-rich regions (heart, aorta, large blood vessels). At E14.5, the ratio of nucleated/nonnucleated red blood cells (RBC) was higher in *Adamts3*^{-/-} embryos and was confirmed on blood smears (Fig. S2). This observation further supported liver dysfunction, since the liver becomes the dominant hematopoietic organ at this developmental stage and produces nonnucleated RBC, while RBC produced earlier in the yolk sac are nucleated.

Since the best described substrates of ADAMTS3 are fibrillar procollagens [18], potential processing defects were therefore evaluated by Western blotting. *Adamts2*^{-/-} embryos were used for comparative purposes. As compared to WT, defects in the processing of the aminopropeptide of type I collagen was evident in *Adamts2*^{-/-}, but not in *Adamts3*^{-/-} embryos (Fig. 2a), showing that ADAMTS2, and not ADAMTS3 as previously thought, is the main type I aminoprocollagen peptidase during embryogenesis. Regarding type II and type III collagens,

Angiogenesis

Fig. 1 Characterization of *Adamts3^{-/-}* embryos. **a** General morphology of *Adamts3^{+/+}* and *Adamts3^{-/-}* embryos at E14.5. Pale color, skin edema (red lines) and smaller liver (L) are evident in *Adamts3^{-/-}* embryos. **b** General morphology of *Adamts3^{+/+}* and *Adamts3^{-/-}* livers from E14.5 embryos. Stomach (S) and liver (L) are indicated as well as degradation zones of the liver (yellow arrows). **c** Sagittal sections of whole embryos at E14.5 and E13.5 were stained with H&E, illustrating skin edema in E14.5 and E13.5 *Adamts3^{-/-}* embryos (red lines). Reduction in liver (L) size and the presence of localized altered liver zones (arrow) are visible at E14.5



the pattern was similar in the three genotypes, which suggested that ADAMTS2, ADAMTS3 and potentially ADAMTS14 would be capable of compensating their respective absence. The accumulation of type II collagen (not shown) and the formation of cartilage (Fig. 2b) were identical in *Adamts3^{+/+}* and *Adamts3^{-/-}* embryos.

Abnormal lymphangiogenesis

Because skin edema was the first visible phenotype in *Adamts3^{-/-}* embryos, we first focused our attention on cutaneous lymphatics using superficial sagittal sections. Blood vessels and lymphatics were present in the skin of *Adamts3^{+/+}* embryos (Fig. 3a, b). A comparable number of veins and arteries were seen in the *Adamts3^{-/-}* skin samples, but not a single lymphatic was identified (Fig. 3d). Full-thickness whole mounts of the dorsal skin were also evaluated after immunofluorescence labeling of blood vessels (CD31, in red) and lymphatics (VEGF-R3, in green). The blood vessel network was similar in *Adamts3^{-/-}* and *Adamts3^{+/+}* embryos (Fig. 3c, e; see also Fig. S3 for additional pictures). In sharp contrast, while VEGF-R3-positive dermal lymphatic vessels were clearly visible in control embryos, none was observed in *Adamts3^{-/-}* skin, in agreement with immunohistochemical data.

Another highly specific and localized area where lymphatics can be clearly identified is the intercostal neurovascular bundle formed by a vein, an artery, a nerve and very often a lymphatic at that embryonic stage (Fig. 3f-h). Only veins, arteries and nerves were observed in the *Adamts3^{-/-}* embryos (Fig. 3i, j), further confirming the critical role of *Adamts3* in lymphangiogenesis.

Since VEGF-C is a crucial growth factor for lymphatic formation and in line with recent data [15], we used a model of cotransfection to evaluate the ability of *Adamts3* to activate "pro-VEGF-C." As illustrated in Fig. 4, we found that *Adamts3* promoted the activation of VEGF-C, even in the absence of recombinant CCBE1. Using the same model, *Adamts2* and *Adamts14* were not able to activate VEGF-C in the presence or absence of CCBE1 (not shown). VEGF-C is similarly expressed in *Adamts3^{+/+}* and *Adamts3^{-/-}* embryos, as judged from qRT-PCR (not shown). Crude tissue extracts were also analyzed by Western blotting, an approach that turned out to be not sensitive enough to allow the detection of VEGF-C, either as pro-form or as the fully activated form (not shown). An enrichment protocol using soluble VEGF-R3 as bait was therefore designed to determine the activation status of VEGF-C in these embryos. Despite the fact that control samples (tissue extract supplemented with 10 ng of recombinant mouse VEGF-C) were positive, again no

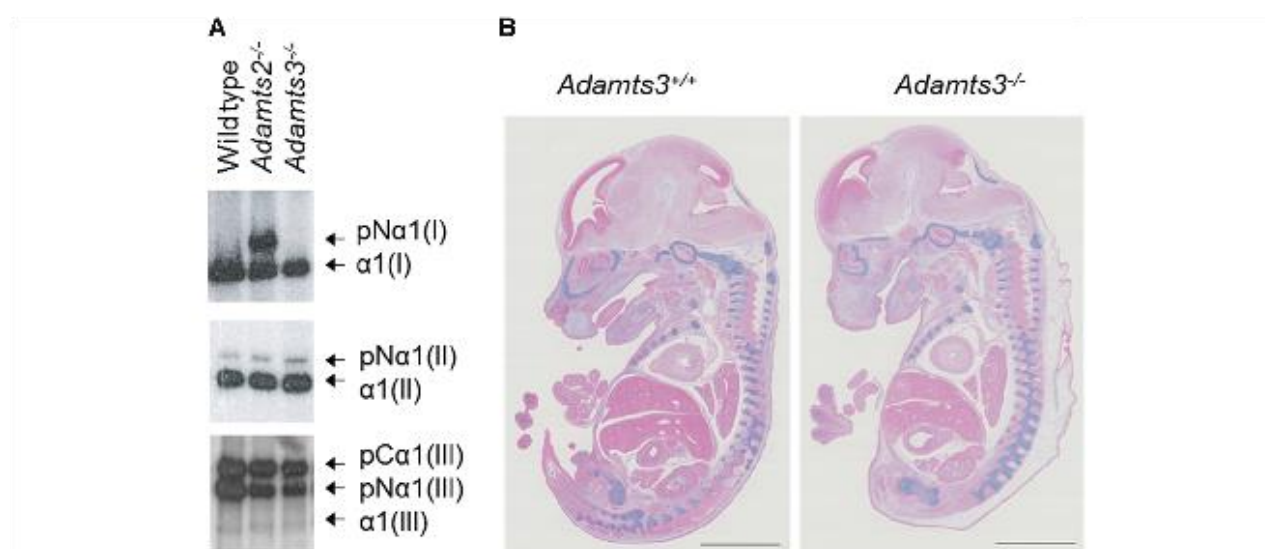


Fig. 2 Fibrillar procollagen processing and cartilage visualization in Adamts3^{-/-} embryos. **a** Connective tissue (body without head and viscera) of wild-type Adamts2^{-/-} and Adamts3^{-/-} embryos at E14.5 was homogenized and analyzed by Western blotting using antibodies specific for procollagens I, II or III. Modification of the levels of processed and unprocessed collagens was only seen for type I

collagen in Adamts2^{-/-} tissue. pCa: procollagen a chain; pNa: collagen a chain still retaining the amino-terminal extension; a: fully processed a chain. **b** Sections of Adamts3^{+/+} and Adamts3^{-/-} embryos were stained with Alcian blue to identify cartilage (scale bar 2 mm)

VEGF-C signal could be observed in experimental samples. Based on the reported active concentration range of VEGF-C in blood and in the extracellular compartment (0.1–2.5 ng/ml), the total amount of VEGF-C in the entire embryo (embryo weight \ 300 mg) is most probably largely under the detection limit by Western blotting.

Hepatic architecture deteriorates after E13.5

Before E13.0, liver histology was comparable in the Adamts3^{+/+} and Adamts3^{-/-} embryos. By E13.5, a few abnormal swollen cells systematically appeared in highly localized ventral areas of Adamts3^{-/-} livers (compare Fig. 5a, b). At E14.5, stronger alterations were apparent (Fig. 5c, d), which suggested a progressive spreading from the initial lesion.

Sections of whole embryo were further characterized by immunohistochemistry and immunofluorescence, with a more specific focus on the liver. In Adamts3^{+/+} embryos, very few hepatic cells were apoptotic (cleaved caspase 3-positive staining) (Fig. S4A), while Adamts3^{-/-} livers were characterized by a strong positivity in the ventral portion of the lobes, which progressively enlarged from E13.5 to E14.5. Diffuse labeling through the entire liver was never observed. Ki67 staining of proliferating cells was similar in all the tissues of the three genotypes, except in the affected zones of the liver (Fig. S4B). Of special interest, blood vessels appeared enlarged in the ventral part

of the liver lobes (Fig. S4C), even before the first clear signs of apoptosis.

In light of the observed skin and liver damages, RNA ISH using a new and sensitive method was used to re-evaluate the distribution of Adamts3 mRNA in embryos at E13.5 and E14.5. As previously identified, strong expression was seen in specific regions of the central nervous system, craniofacial region and limbs (Fig. S5A) and in cartilage of the ribs (Fig. S5B). Expression of Adamts3 was also detected at E13.5, although at a lower level, in dermal mesenchyme of skin (Fig. S5C) but only in scattered liver cells (Fig. S5D). RT-PCR amplification was also performed as an additional control to confirm Adamts3 expression in the liver and the “body.” Products of expected size were obtained for both tissues (Fig. S5E), with a relative expression correlating with the ISH data.

Transcriptome analyses

In an attempt to identify the pathway(s) affected in Adamts3^{-/-} liver, microarray analyses were performed using hepatic tissues of E13.5 to E14.5 embryos in order to determine the early and late events affected by Adamts3 deficiency (ArrayExpress: E-MTAB-2614). The reliability of the transcriptomic data was confirmed by RT-PCR (Fig. S6).

At E13.5, only Esm1 and Xlr4a were significantly upregulated (2) in Adamts3^{-/-}, while 8 of the 11 repressed

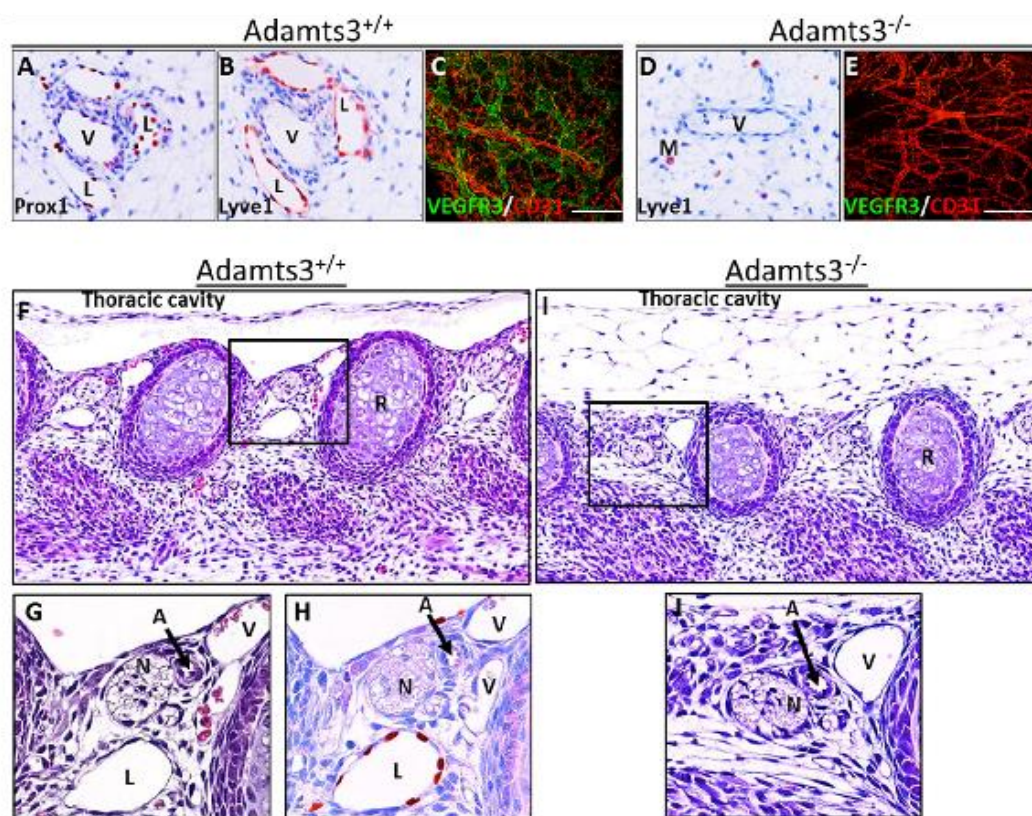


Fig. 3 Normal angiogenesis but absence of lymphatics in *Adamts3*^{-/-} embryos. Superficial sagittal sections in the skin of wild type (*Adamts3*^{+/+}) (a, b) and *Adamts3*^{-/-} (d) E14.5 embryos were stained using antibodies specific to prox-1 (a) or Lyve-1 (b, d). While many lymphatics were identified in *Adamts3*^{+/+} skin, they were never observed in *Adamts3*^{-/-}. V vein, L lymphatic, M macrophage. Full-thickness whole mounts of *Adamts3*^{+/+} (c) and *Adamts3*^{-/-} (e) dorsal skin were immunostained to identify blood vessels (CD31, in red) and lymphatics (VEGF-R3, in green). Lymphatics were observed only in

Adamts3^{+/+} skin (see also Fig S3 for individual pictures and additional data). Sections at the border between the thoracic cavity and the rib cage (f-j) were also stained with H&E (f, g, i, j) or using an anti-prox-1 antibody (h). Enlarged views of the boxed regions in f, i are shown in g, j, respectively. Prox-1 staining (h) of the section following the section in f is also provided. Nerve (N), artery (A) and vein (V) are seen in *Adamts3*^{+/+} and *Adamts3*^{-/-}. Lymphatics (L) are often seen in *Adamts3*^{+/+} but never in *Adamts3*^{-/-}.

genes (Ear2, 3, 4, 6, 10, 12; Prg2/MBP-1; Prg3/MBP-2) were related to the eosinophil lineage (Table S1). At E14.5, the number of upregulated or downregulated genes dramatically increased in agreement with the deep deteriorations occurring in the liver just before embryonic death. As these massive modifications hampered the identification of the primary causes of the phenotype, we focused our attention on genes significantly expressed (≥ 200 A.U.) in at least two samples and characterized by a consistently progressive increased or decreased expression correlating with the severity of the alterations observed in *Adamts3*^{-/-} livers. This filtering provided a limited number of genes that were all characterized by a progressively increased expression (Table 1; S2). A majority of these genes were related to one or two of the following categories: "connective tissues," "angiogenesis," "inflammation," "signaling pathways" and

"glucose metabolism." The earliest and most upregulated gene was ESM1, a marker of activated endothelial cells. Flt1 (VEGF-R1) and VEGF-A, two other factors regulating angiogenesis, were also upregulated. The most abundant group (glucose metabolism) comprised factors directly involved in glycolysis, glucose uptake (Glut3/Slc2a3) and intracellular signaling pathways regulating glucose metabolism (Trib3 and Eglfn3/Phd3, the second and third most upregulated genes after ESM1). Although the fold change remained moderate for some enzymes and factors, the overrepresentation of this well-defined category (20 out of 89 transcripts) was striking.

Although many genes and categories identified by transcriptomic analyses were known targets of the TGF β pathways, no significant modification of the mRNA level of TGF β was identified. A significant increase in TGF β 1

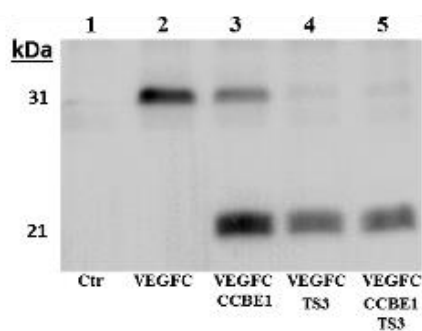


Fig. 4 Activation of the intermediate form into the fully active form of VEGF-C by ADAMTS3. HEK293 cells were transfected with an empty vector (Ctr) or with an expression vector containing the complete coding sequence of VEGF-C (lanes 2–5). In some conditions, cells were simultaneously transfected with expression vectors for CCBE1 (3, 5) and/or ADAMTS3 (4, 5). Culture media were collected after 48 h and analyzed by WB. Conversion of the intermediate processed form of VEGF-C (31 kDa) into its mature form (21 kDa) is observed in the presence of CCBE1 alone and is almost complete in the presence of ADAMTS3

was, however, observed by Western blotting in crude extracts of *Adamts3*^{-/-} livers at E14.5 (Fig. S7). The potential implication of TGF β 1 in the phenotype was therefore investigated by IHC staining of phospho-Smad2 and phospho-Smad3 in liver sections, but no clear difference between *Adamts3*^{+/+} and *Adamts3*^{-/-} samples could be identified, which suggested that TGF β 1 accumulation was not the main cause of liver apoptosis.

Blood vessels are altered in the placenta of homozygous mutants

Since many genes upregulated in *Adamts3*^{-/-} livers were linked to hypoxia and glycolysis, we made the hypothesis that it might be related to placenta alterations that would result in insufficient oxygen and nutrient supply to the embryo. RT-PCR amplifications showed that *Adamts3* is expressed in placenta. RNA ISH was next used to identify cells expressing *Adamts3*. Only a limited number of trophoblastic cells were faintly positive, and the strongest staining was observed in the chorionic plate (Fig. 6a, b; see also Fig S8). Positivity was also observed in the labyrinthine layer but mainly around large vessels and along structures looking like small blood vessels (Fig. 6c, d), which suggested that mesodermal/mesenchymal cells are the main producers of *Adamts3*.

HE-stained sections looked quite similar in *Adamts3*^{+/+} and *Adamts3*^{-/-} placentas (Fig. 7a, b), except for the presence, in some regions of *Adamts3*^{-/-} placenta, of an increased number of fetal blood vessels that were full of nucleated red blood cells and that seemed too narrow to allow free flow (Fig. 7c). This observation was confirmed

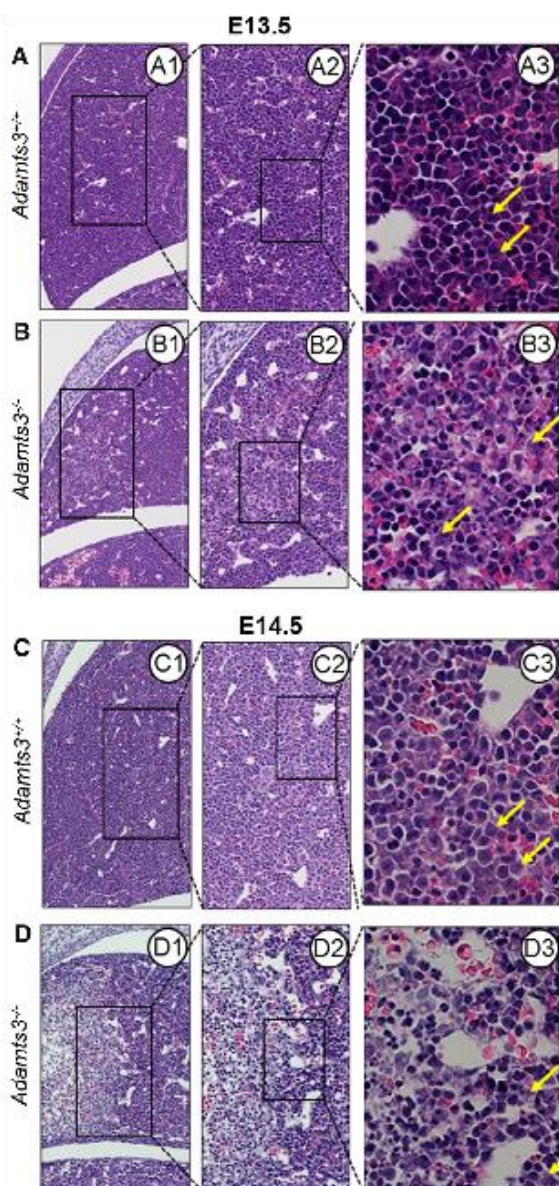


Fig. 5 Evaluation of *Adamts3*^{-/-} liver defects. Photomicrographs of HE-stained sections of whole embryos (*Adamts3*^{+/+} a, c; *Adamts3*^{-/-} b, d) at E13.5 (a, b) and E14.5 (c, d) were taken in identical regions at increasing magnifications. Hepatoblasts (yellow arrows) appear as light purple cells containing a large, weakly stained nucleus. A large proportion of blood cells (red blood cells and small rounded cells with a strongly stained nucleus) are also visible throughout the parenchyma. At E13.5, some hepatocytes in focal areas of *Adamts3*^{-/-} livers are swollen (B3), while they seem normal at short distance. At E14.5, no hepatoblasts are still present in the center of the lesions and only a reduced number are visible at the periphery, whereas many blood cells are still present

by CD31 (Fig. 7d–f) and basement membrane (collagen type IV, Fig. S9 A–C) staining. The mean diameter of the blood vessels was also determined with the NDP software

Angiogenesis

Table 1 Main functional categories of genes identified by microarray analysis as characterized by a progressive increased or decreased expression correlating with the severity of liver alterations

Angiogenesis	Egln3/PHD3, Eif4ebp1, Esm1, Fit1, Pecam/CD31, Vegf-a
Connective tissues	Adants2, Col1a1, Col5a1, Col6a1, Col6a3, Ctgf, Lamc1, Lgals3, P4ha2
Glucose metabolism/ glycolysis	Adh1, Aldoa, Glt2, Egln3/PHD3, Egr1, Eno, Fam132b, Gapdh, Gpi1, Grhpr, Ldha, PDK1, PFKI, PFKp, PKM2, Pgam1, Pgk1, Slc2a3/Glut3, Stat3, Tpi, Trib3
Inflammation	Ctgf, Ctsg, Cxcl1, Cxcl10, F13a1, Mpo, Nfkbiz, S100a9, Stat3, Vav1, Lcn2
Signaling pathways	Cebpb, Ctgf, Cxcl1, Cxcl10, Dusp6, Egln3/PHD3, Egr1, Ets2, Gata6, Junb, Mapkapk3, Mt2, Stat3, Trib3, Vav1

See Table S2 for the complete list and values

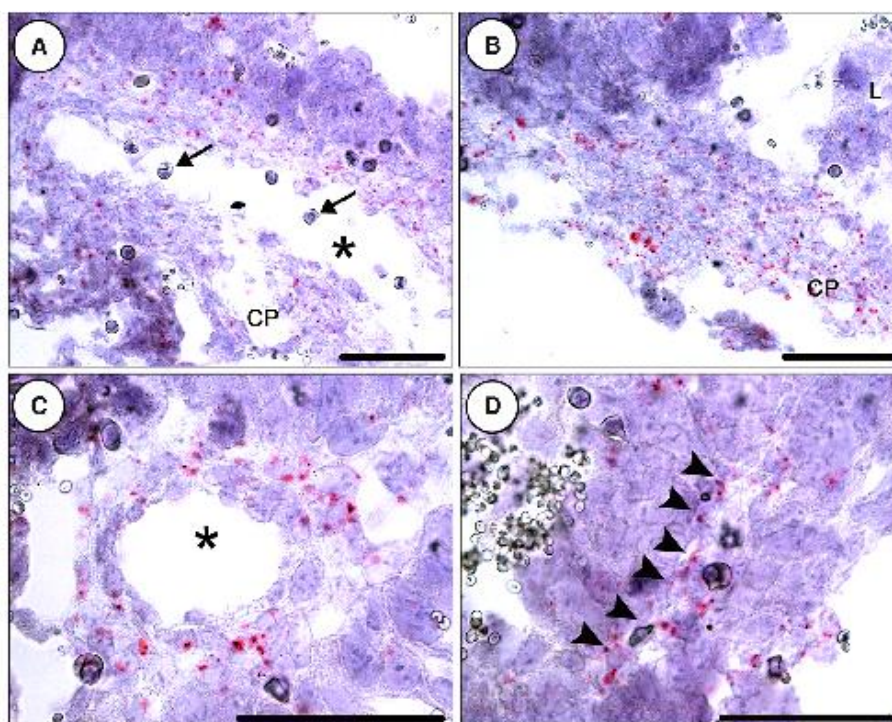


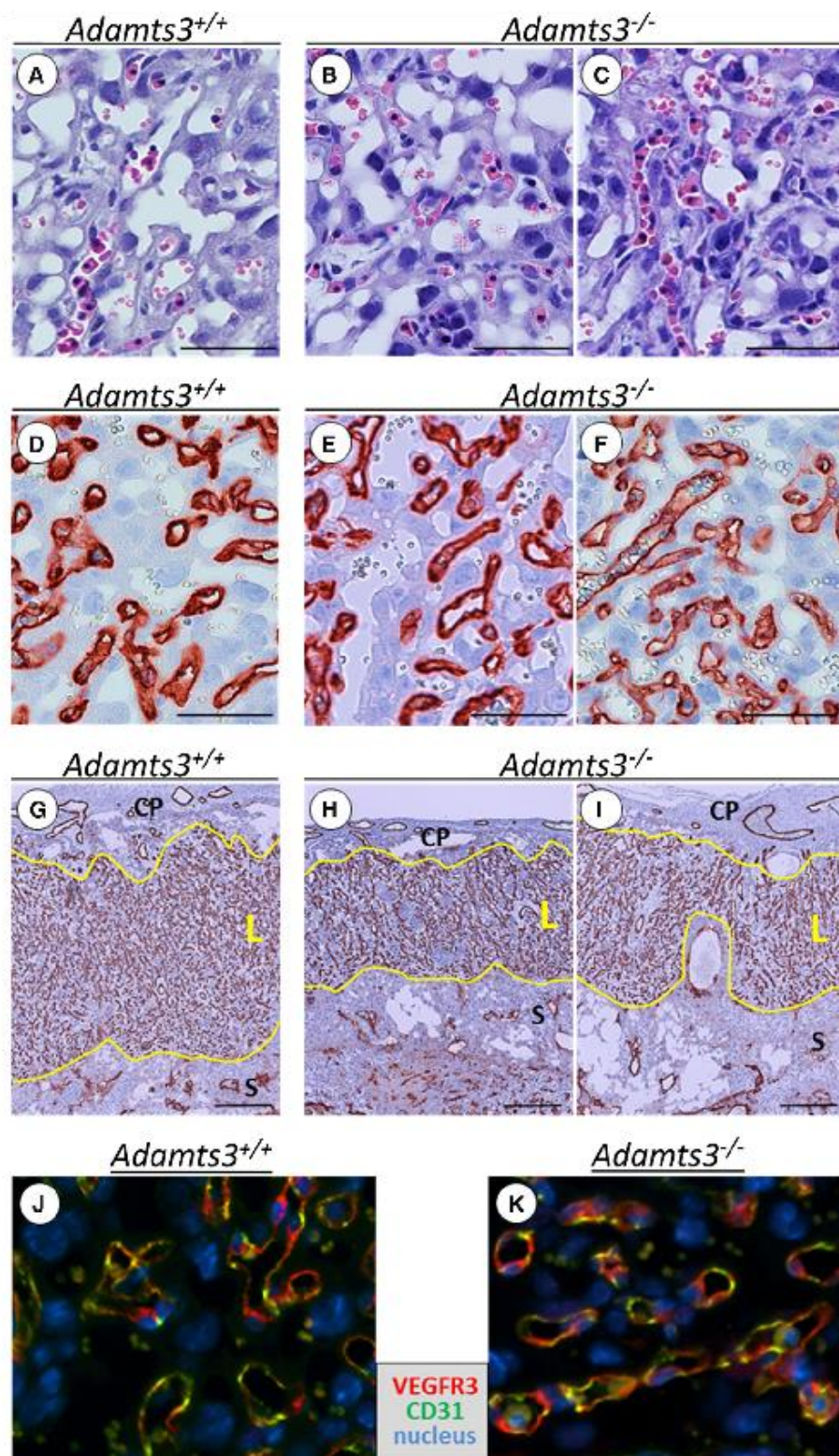
Fig. 6 Evaluation of Adants3 expression in mouse placenta. Sections of E12.5 placenta were hybridized with Adants3 probes (see Fig. S8 for additional details) and counterstained with Gill's hematoxylin. Nuclei are stained in blue, and the expression of Adants3 is revealed by the presence of red dots. The strongest Adants3 expression was observed in the chorionic plate (a, b), the structure where large embryonic vessels (asterisk) enter the placenta.

Nucleated erythroblasts are marked by arrows. Positivity is also observed in the labyrinthine layer, mainly around large vessels (c) and along structures looking like small blood vessels (arrowheads in d). Only a limited number of trophoblastic cells, identified by their very large nucleus, are faintly positive. CP chorionic plate, L labyrinthine layer. Scale bars 50 μ m

(Hamamatsu) on four pairs of placenta from four different litters (Table S3, see legend for quantification details). A slight but significant reduction (14 %, $p < 0.01$) in the vessel diameter was found in Adants3^{-/-} ($8.6 \pm 0.7 \mu$ m, $n = 799$) as compared to Adants3^{+/+} ($10.0 \pm 0.6 \mu$ m, $n = 1078$). It is worth noting that in 2 litters the number of measurable vessels with a patent circular lumen was reduced in the Adants3^{-/-} placenta, which suggested that some vessels had already collapsed and were not taken into

account. Cross sections were further realized in the center of placenta from three different litters (3 Adants3^{-/-} and 5 Adants3^{+/+}) in order to evaluate the respective thickness of the labyrinthine and the spongiotrophoblast layers, which can be easily discriminated by CD31 staining of the vessels containing the embryonic blood (Fig. 7g-i; Fig. S10). The mean total surface of the two layers was identical in the two genotypes ($7.3 \pm 1.5 \text{ mm}^2$ in Adants3^{-/-} vs $7.1 \pm 0.9 \text{ mm}^2$ in Adants3^{+/+}). However, the

Fig. 7 Immunohistologic analysis of placental blood vessels. Transverse sections were performed in E14.5 placenta (*Adamts3*^{+/+} in a, d, g, j; *Adamts3*^{-/-} in b, c, e, f, h, i, k). All the pictures were taken in the labyrinthine layer where the blood vessels containing embryonic blood are present. After H&E staining (a-c), the structure of the *Adamts3*^{-/-} placenta seemed grossly normal (compare b to a), except for the accumulation of nucleated erythroblasts in some vessels (c). CD31 staining (d-f) showed a normal pattern of blood vessel distribution in *Adamts3*^{-/-} placenta but suggested some reduction in vessel diameter (d-f). Transverse sections were also performed in the middle of other placenta (*Adamts3*^{+/+} in g; two different *Adamts3*^{-/-} placenta in h and i; see also Fig. S10 for additional data). At low magnification, the labyrinthine layer (L delineated by yellow lines) is clearly identified by its high blood vessel density. Its surface is significantly reduced in *Adamts3*^{-/-} placenta. Immunofluorescence staining (j, k) showed that blood vessels are formed by cells with different levels of expression of CD31 (green) and VEGF-R3 (red). No difference was found between *Adamts3*^{+/+} and *Adamts3*^{-/-} samples. Bars 50 μ m in a-f and 300 μ m in g-i. CP chorionic plate, S spongiosotrophoblast layer



specific surface occupied by the labyrinthine layer was significantly reduced in *Adamts3*^{-/-} placenta (48.8 ± 3.3 vs 62.3 ± 2.0 % in *Adamts3*^{+/+}).

In order to investigate why the blood vessels are not damaged in the *Adamts3*^{-/-} embryos while angiogenesis is modified in their placenta, we evaluated the potential expression of VEGF-R3 in placenta blood vessels. As we previously showed (Fig. 2c), VEGF-R3 staining was absent from blood vessels in E14.5 embryos. By contrast, endothelial cells in the placenta were positive for VEGF-R3, irrespective of the genotype (Fig. S9 D-F), which would explain why *Adamts3*^{-/-} placental vessels are affected, while vessels in the embryo are not. Faint staining of trophoblast clusters in the labyrinthine layer was also observed. Immunofluorescence studies further showed that almost all the blood vessels in the labyrinthine layer were formed by endothelial cells expressing VEGF-R3 and/or CD31, in both *Adamts3*^{+/+} and *Adamts3*^{-/-} placentas (Fig. 7j, k).

Discussion

It was initially considered that the function of ADAMTS3 was exclusively or primarily related to procollagen processing [14, 18]. We developed an *Adamts3* knockout mouse model to evaluate this hypothesis and to identify potential additional functions *in vivo*. Mice with a single inactive allele (*Adamts3*^{+/-}) were fertile, but their mating did not produce *Adamts3*^{-/-} pups because of lethality occurring around the E15.0 period. The processing of the main fibrillar collagens (types I, II and III) and their tissue localization were similar in *Adamts3*^{-/-} and *Adamts3*^{+/+} embryos, demonstrating that the strong expression of ADAMTS3 during embryonic development and the observed phenotypes in *Adamts3*^{-/-} embryos were not discernibly related to collagen biology. Two main phenotypes were observed in *Adamts3*^{-/-} embryos. Cutaneous lymphedema was striking and caused by the absence of lymphatics normally developing in the dorsal skin around E13.0-E13.5. Liver degeneration was also remarkable. It started around E13.5 in strictly localized ventral regions of *Adamts3*^{-/-} livers and then rapidly spread from this initial spot. The vast majority of the other mouse models of embryonic lymphedema do not display liver pathology [19, 20], and conversely, mouse strains characterized by severe hepatic alterations during embryogenesis do not display concomitant edema [21–24]. However, there is one gene for which deficiency leads to a phenotype displaying many similarities with the *Adamts3*^{-/-} phenotype. CCBE1 (Collagen- and Calcium-Binding EGF domain-containing protein 1) is mutated in a cohort of patients with Hennekam syndrome who present abnormal lymphangiogenesis [25].

In the mouse, *Ccbe1* deficiency leads to embryonic lethality, edema and liver hypoplasia [17, 26]. As in *Adamts3*^{-/-} embryos, lymphedema is massive and similarly characterized by the absence of lymphatics normally forming around E13–E13.5. CCBE1 is required for lymphangiogenesis because it increases the processing of pro-VEGF-C into its fully active form able to stimulate VEGF-R3 phosphorylation and downstream signaling [16]. Very recently, it was shown in experimental models that CCBE1, although lacking intrinsic enzymatic activity, facilitates pro-VEGF-C activation by ADAMTS3, but not by its closest relatives ADAMTS2 and ADAMTS14 [15]. It was not clear, however, whether ADAMTS3 is required in physiological conditions or whether other proteases could be involved *in vivo*. Our data clearly demonstrate that ADAMTS3 is indispensable for embryonic lymphangiogenesis, which is most likely related to its capacity to activate VEGF-C.

While the lymphatic phenotype is identical in *Adamts3*^{-/-} and *Ccbe1*^{-/-} embryos, some similarities and differences were evidenced for liver. Hepatic alterations appear in both genotypes around E13.0-E13.5 [26]. This is accompanied by a marked increase of the nucleated/enucleated erythrocytes ratio in the blood stream, which is likely caused by hepatic disorders since the liver becomes the most important organ for erythropoiesis at mid-gestation. In *Ccbe1*^{-/-} embryos, however, the pattern of apoptosis was not reported to be as localized as seen in *Adamts3*^{-/-} and the reduction in the liver size was attributed primarily to altered erythropoiesis [26], whereas hepatoblasts are amongst the first dying cells in *Adamts3*^{-/-} embryos. Another specific observation in *Adamts3*^{-/-} livers was the enlargement of blood vessels surrounding the apoptotic area, even at E13.5 when the hepatic lesion is still highly localized to a limited number of cells.

Transcriptome analyses were performed on strongly (E14.5), mildly (E14.0) or almost unaffected (E13.5) livers in order to identify the molecular mechanism leading to apoptosis in the hepatic tissue. We focused our attention on genes characterized by a progressive increased or decreased expression correlating with the severity of the liver alterations observed in *Adamts3*^{-/-} embryos. Categories related to “connective tissues,” “angiogenesis,” “glucose metabolism” and “inflammation” were identified. Several secreted or intracellular factors related to cell regulation (“signaling pathway”) were also upregulated, some of them (Trib3, CTGF/CCN2, Egr1, Stat3...) having been linked to inflammation, tissue repair, liver fibrosis and TGF β signaling [27, 28]. Since *Tgfb3*^{-/-} embryos are not viable and display hepatic defects at mid- to late gestation [22], the implication of the TGF β pathway was investigated. As

compared to their control littermate, accumulation of TGF β 1 was specifically found in the liver of *Adamts3*^{-/-} embryos. However, this was not accompanied by increased phosphorylation of Smad2 or Smad3, which suggested that abnormal regulation of the TGF β pathway was not the main cause of the hepatic phenotype. We next focused our attention on the categories of genes involved in "Angiogenesis" and in "Glucose metabolism/glycolysis" pathways. A common characteristic of many of these genes is that they are directly (ESM1, VEGF-R1, VEGF-A, PHD3) or indirectly (glycolysis enzymes, transcription factors regulating metabolic activity, such as *Egr1* and *Trib3*) responsive to hypoxia or deprivation of nutrients. Since blood vessels looked normal in embryos with no obvious sign of leakage or hemorrhage, we reasoned that the primary defect might reside in the placenta, a tissue allowing O₂ and nutrient exchanges between the maternal and the fetal blood. In line with this hypothesis, it was previously shown that HGF deficiency causes placental defects that secondarily lead to a specific pattern of liver apoptosis always initially localized in the ventral part of the lobes, most probably because this area is at the extremity of the liver blood vessel network and therefore the most sensitive to oxygen supply and hypoxia [29, 30]. Tissue staining showed that the labyrinthine layer containing the embryonic blood is reduced in *Adamts3*^{-/-} placenta and that the CD31-positive vessels have a reduced diameter as compared to the *Adamts3*^{+/+} controls (8.6 vs 10.0 μ m). Although this reduction is modest, it can be hypothesized to be functionally significant because nucleated erythroblasts that predominate in *Adamts3*^{-/-} embryo have an 8- to 9- μ m mean diameter. In these conditions, even a small reduction in size is expected to restrict the bloodstream and, combined with a thinner labyrinthine layer, to result in a reduced oxygenation of the embryo. Since the embryonic liver is highly metabolic and at the limit of hypoxia during normal development, especially at the extremity of its vascular bed in the ventral parts of the lobes, it was not surprising to observe hypoxic markers only in the liver. This hypothesis is further strengthened by our observations, showing that blood vessels are enlarged in the ventral part of the lobes before the first clear signs of hepatic destruction. In the mutant embryos, reduced blood volume due to lymphedema and reduced vessel diameter in the placenta would act synergistically to lower nutrients and oxygen delivery to the embryo, which would primarily affect the liver and would further compromise oxygenation by reducing the formation of mature erythroblasts in the liver. This combination of events would explain why a Mendelian proportion of *Adamts3*^{-/-} embryos was observed before E14.5, while most of them were dead after E15.0.

The expression of VEGF-R3 in endothelial cells forming placental capillaries further illustrates that the ADAMTS3/VEGF-C/VEGF-R3 pathway is critical for placenta blood vessel at this embryonic stage. In this context, it would be interesting to characterize the blood vessel structure in the *Ccbe1*^{-/-} placenta. It is worth mentioning also that *Ccbe1* deficiency is less severe (lethality at E16.5) [17] than inactivation of *Adamts3* (lethality at E15.0). It will have to be determined whether this is related to the fact that pro-VEGF-C processing by ADAMTS3 occurs in the absence of *Ccbe1*, although with a reduced efficiency, while the reverse is not true. Alternatively, it could be hypothesized that the more severe phenotype in *Adamts3*^{-/-} results from other functions (procollagen processing, TGF β pathway) that would per se only modestly affect embryos but that would synergize to aggravate the VEGF-C-related phenotype.

This study is the first demonstration that an aminoproteolytic peptidase is involved in collagen-independent processes in physiological conditions. We demonstrated that ADAMTS3 is required for embryonic lymphangiogenesis and placenta angiogenesis. These data identify ADAMTS3 as a candidate gene for genetic diseases characterized by lymphedema and/or placenta defects. Since total absence of ADAMTS3 in humans would likely lead to miscarriage, only hypomorphic mutations may be observed in genetic lymphedema. It would be most interesting also to evaluate whether ADAMTS3 is also involved in lymphatics homeostasis during the adulthood and in the abnormal lymphangiogenesis observed in several pathological conditions, including cancer and metastasis dissemination. The expression of ADAMTS3 in the brain and the implication of the VEGF-C/VEGF-R3 pathway in the activation of neural stem cells [31] suggest also a potential role for ADAMTS3 in neurogenesis.

Materials and methods

Transgenic mice

Mice were maintained under standard laboratory conditions, with 12-h light/12-h dark cycles and free access to food and water. All procedures were performed in accordance with the guidelines for animal care of the University of Liège, the Federation of European Laboratory Animal Science Associations and the American National Institutes of Health.

Genotyping of tail DNA was performed with KAPA Express Extract Kits (KAPA Biosystems, USA) using the following primer pairs: P1-P2 for wild-type allele; P3-P2 for the targeted allele; P4-P2 for the deletion of the Neo

Angiogenesis

cassette inserted into intron 10; P5–P6 for Flp recombinase (Table S4).

The gestational age of embryos was determined from a vaginal plug, corresponding to 0.5 days postcoitum (E0.5). Pregnant females were killed by cervical dislocation and decapitation according to institutional guidelines. The uterus was removed and washed with physiological saline. Embryos were dissected free of decidual tissue and washed to remove contaminating maternal blood. After removal of the placenta, embryos were rinsed in saline, exsanguinated by separation of the vitelline and umbilical vessels and allowing blood to drain. Blood was smeared on glass slide and air-dried for May–Grunwald–Giemsa staining.

Immunohistological analyses

Embryos or dissected organs were fixed in a 4 % paraformaldehyde (PFA) solution. Paraffin-embedded tissue sections (5 μ m) were deparaffined and rehydrated. Tissue sections were stained with hematoxylin/eosin for general histology or with alcian blue (GURR, UK) for cartilage.

Fibrillar collagen was stained with antibodies against Col I [α 1(I), 234167, Calbiochem, Germany], Col II [α 1(II), SAB4500366, Sigma, USA] and Col III [α 1(III), in-house developed guinea pig serum]. Blood and lymphatic vessels were identified using, respectively, anti-CD31 (Dia310, Dianova, Germany) or antibodies against LYVE1 (07-538, Upstate, USA), Prox1 (AF2777, R&D Systems) and VEGF-R3 (AF743, R&D Systems). The other antibodies were from AbD Serotec (F4/80, MCA497BB, AbD Serotec, UK), Cell Signaling Technology (USA) (Cleaved Caspase-3, 9664), Dako (Denmark) (Ki67, M7246) or Abcam (UK) (TGF β 1, ab66043).

In situ hybridization

Placenta and mouse embryos were fixed overnight in 4 % paraformaldehyde/PBS, embedded in paraffin and sectioned (6 μ m). In situ hybridization was carried out using the RNAscope technique and custom-designed in situ hybridization probes (RNAscope 2.0; Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA) according to the manufacturer's instructions. Target probes were detected using an alkaline-phosphatase-conjugated labeled probe with Fast Red as substrate and Gill's Hematoxylin as a counterstain. As a negative control, some sections were hybridized with target probe against DapB, a bacterial gene encoding dihydrodipicolinate reductase. A target probe directed against ubiquitously expressed Polr2a served as a positive control. The slides were then counterstained according to

the manufacturer's protocol with Gill's hematoxylin and treated with ammonium water before mounting. In these conditions, nuclei are stained in blue and the expression of Adants3 is revealed by the presence of red dots.

Staining of blood and lymphatic vessels in whole mount skin

Whole embryos were fixed for 1 h in 70 % ethanol. The dorsal skin was then dissected and postfixed overnight in 4 % PFA. The samples were washed twice in PBS containing 0.2 % Triton X-100 (PBT) 30 min at 4 $^{\circ}$ C and blocked for 1 h in PBT containing 1 % BSA at RT. To perform double immunostaining, primary antibody against CD31 (at 1/150) and VEGF-R3 (at 1/50) (AF743, R&D Systems, USA) was diluted in PBT/BSA and incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C. After three washings of 30 min in PBT at 4 $^{\circ}$ C and two at RT, the skin samples were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with Alexa 488 anti-goat (1/1000 in PBT/BSA) and Alexa 546 anti-rat (1/1000) (Invitrogen, USA). After washing (as above), samples were mounted on glass plates with Aquapolymount (PolySciences Inc., USA) and observed with a Leika SP5 confocal microscope, adapted from [32].

Western blotting

Liver and "body" (connective tissue remaining after careful removal of the head and viscera) were dissected, ground at liquid nitrogen temperature, homogenized in Laemmli denaturation buffer (with or without 100 mM DTT) and denatured (95 $^{\circ}$ C, 5 min). After electrophoresis (7.5–12.5 % SDS-PAGE), proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (NEN Life Sciences Products, USA). Membranes were blocked with 3 % BSA in PBS-Tween and were probed with a rabbit antiserum directed against type I, type II or type III collagens, or against TGF β 1. The secondary peroxidase-conjugated antibodies were swine anti-rabbit or rabbit anti-guinea pig immunoglobulins (1/2000, Dako). Peroxidase was revealed with an enhanced chemiluminescence assay (Pierce, USA) and X-ray film (Kodak, USA) exposure.

Microarray analysis

RNA was extracted with NucleoSpin RNA/protein kit (Machery-Nagel, Germany) according to the manufacturer's instructions. The RNA quality was evaluated with Eukaryote Total RNA Nano Assay of the Agilent 2100 Bioanalyzer (USA). Transcriptome analyses were performed on Illumina Mouse WG-6 v2.0 chips on total RNA from the liver of Adants3^{+/+} and Adants3^{-/-} littermates between E13.5 and E14.5. The raw data were analyzed

using the GeneChip Operating software. Additional analyses were also performed with Ingenuity Pathway (Qiagen, USA) or DAVID software [33].

Acknowledgments Sequencing and microarray analyses were performed at the GIGA-Genomics Platform (GIGA, University of Liège, www.giga.ulg.ac.be). The results of confocal imaging were obtained thanks to S. Ormenese and G. Moraes (Imaging and Flow Cytometry platform, GIGA, University of Liège). A special thanks to Betty Nusgens for helpful comments and to Antoine Heyeres, Audrey Hoffman and Lola Vanoverschot for excellent technical assistance. Expression vectors for VEGF-C and CCBE1 are kind gifts of Stefan Schulte-Merker, Hubrecht Institute, Utrecht, The Netherlands. Alain Colige is a "Senior Research Associate" of the FRS-FNRS, and LD is supported by a "Télévie" grant. The supports of the FRS-FNRS (FRSM, T.0183.13), the "Fonds Léon Frédéricq" and the "Centre anti-cancéreux" are also acknowledged. Funding from National Institutes of Health Program of Excellence in Glycoscience HL107147 (to Suneel S. Apte) and from the Knight Templars Eye Foundation (to Johanne Dubail) is also acknowledged.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that no competing interests exist.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Apte SS (2009) A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 284:31493–31497
- Stanton H, Melrose J, Little CB et al (2011) Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta* 1812(12):1616–1629
- Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B et al (2001) Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 98:1662–1666
- Levy GG, Nichols WC, Lian EC et al (2001) Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 413:488–494
- Zheng X, Chung D, Takayama TK et al (2001) Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 276:41059–41063
- Colige A, Vandenberghe I, Thiry M et al (2002) Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J Biol Chem* 277:5756–5766
- Colige A, Sieron AL, Li SW et al (1999) Human Ehlers-Danlos syndrome type VIII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am J Hum Genet* 65:308–317
- Colige A, Nuytink L, Hausser I et al (2004) Novel types of mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (type VIIIC) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene. *J Invest Dermatol* 123:656–663
- Kesteloot F, Desmoulière A, Ledercq I et al (2007) ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 2 inactivation reduces the extent and stability of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 46:1620–1631
- Li SW, Arita M, Fertala A et al (2001) Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *Biochem J* 355:271–278
- Hofer TP, Frankenberger M, Mages J et al (2008) Tissue-specific induction of ADAMTS2 in monocytes and macrophages by glucocorticoids. *J Mol Med* 86:323–332
- Dubail J, Kesteloot F, Deroanne C et al (2010) ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. *Cell Mol Life Sci* 67:4213–4232
- Aming A, Hiersche M, Witten A et al (2012) A genome-wide association study identifies a gene network of ADAMTS genes in the predisposition to pediatric stroke. *Blood* 120:5231–5236
- Le Goff C, Somerville RP, Kesteloot F et al (2006) Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. *Development* 133:1587–1596
- Jeltsch M, Jha SK, Tvorogov D et al (2014) CCBE1 enhances lymphangiogenesis via ADAMTS3-mediated VEGF-C activation. *Circulation* 129(19):1962–1971
- Le Guen L, Karpanen T, Schulte D et al (2014) Ccbe1 regulates Vegfc-mediated induction of Vegfr3 signaling during embryonic lymphangiogenesis. *Development* 141:1239–1249
- Bos FL, Caunt M, Peterson-Maduro J et al (2011) CCBE1 is essential for mammalian lymphatic vascular development and enhances the lymphangiogenic effect of vascular endothelial growth factor-C in vivo. *Circ Res* 109:486–491
- Fernandes RJ, Hirohata S, Engle JM et al (2001) Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *J Biol Chem* 276:31502–31509
- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438:946–953
- D'Amico G, Korhonen EA, Waltari M et al (2010) Loss of endothelial Tie1 receptor impairs lymphatic vessel development—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:207–209
- Gunes C, Heuchel R, Georgiev O et al (1998) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J* 17:2846–2854
- Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW et al (2003) Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23:4371–4385
- Reimold AM, Etkin A, Clauss I et al (2000) An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev* 14:152–157
- Chan K, Han XD, Kan YW (2001) An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4611–4616
- Alders M, Hogan BM, Gjini E et al (2009) Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans. *Nat Genet* 41:1272–1274
- Zou Z, Enis DR, Bui H et al (2013) The secreted lymphangiogenic factor CCBE1 is essential for fetal liver erythropoiesis. *Blood* 121:3228–3236
- Hua F, Mu R, Liu J et al (2011) TRIB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion. *J Cell Sci* 124:3235–3246

Angiogenesis

28. Bhattacharyya S, Fang F, Tourtellotte W, Varga J (2013) Egr-1: new conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). *J Pathol* 229:286–297
29. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S et al (1995) Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373:699–702
30. Uehara Y, Minowa O, Mori C et al (1995) Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373:702–705
31. Han J, Calvo CF, Kang TH et al (2015) Vascular endothelial growth factor receptor 3 controls neural stem cell activation in mice and humans. *Cell Rep* 10:1158–1172
32. Hirashima M, Sano K, Morisada T et al (2008) Lymphatic vessel assembly is impaired in *Aspp1*-deficient mouse embryos. *Dev Biol* 316:149–159
33. da Huang W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57

Annexe 2: Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets.

La publication "Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets" a été jointe au chapitre 1 de la partie 3 (résultats).

Annexe 3: Spontaneous atopic dermatitis due to immune dysregulation in mice lacking ADAMTS2 and 14.

Accepted Manuscript

Spontaneous atopic dermatitis due to immune dysregulation in mice lacking Adamts2 and 14

L. Dupont, G. Ehx, M. Chantry, C. Monseur, C. Leduc, L. Janssen, D. Cataldo, M. Thiry, C. Jerome, J.-M. Thomassin, B. Nusgens, J. Dubail, F. Baron, A. Colige



PII: S0945-053X(17)30441-9
DOI: [doi:10.1016/j.matbio.2018.04.002](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.04.002)
Reference: MATBIO 1476

To appear in:

Received date: 1 December 2017
Revised date: 5 April 2018
Accepted date: 5 April 2018

Please cite this article as: L. Dupont, G. Ehx, M. Chantry, C. Monseur, C. Leduc, L. Janssen, D. Cataldo, M. Thiry, C. Jerome, J.-M. Thomassin, B. Nusgens, J. Dubail, F. Baron, A. Colige, Spontaneous atopic dermatitis due to immune dysregulation in mice lacking Adamts2 and 14. The address for the corresponding author was captured as affiliation for all authors. Please check if appropriate. *Matbio*(2017), doi:[10.1016/j.matbio.2018.04.002](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.04.002)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Spontaneous atopic dermatitis due to immune dysregulation in mice lacking Adamts2 and 14.

Dupont L^a, Ehx G^b, Chantry M^a, Monseur C^a, Leduc C^a, Janssen L^a, Cataldo D^c, Thiry M^d, Jerome C^e, Thomassin J-M^e, Nusgens B^a, Dubail J^{a,f}, Baron F^b, Colige A^a.

^aLaboratory of Connective Tissues Biology & ^bLaboratory of Hematology & ^cLaboratory of Tumor and Developmental Biology & ^dLaboratory of Cell Biology, GIGA-R, University of Liege, 4000 Sart Tilman, Belgium; ^eCenter for Educational and Research on Macromolecules (CERM), University of Liege, 4000 Sart Tilman, Belgium; ^fDepartment of Genetics, INSERM UMR1163, Institut Imagine, Paris, France.

Corresponding author: Dupont Laura

E-mail address: ldupont@uliege.be

Postal address: Dupont Laura

Laboratory of Connective Tissues Biology
Avenue Hippocrate 13
Tour de Pathologie B23 +3
4000 Sart Tilman
Belgique

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

Abstract

Since its first description, ADAMTS14 has been considered as an aminoprocollagen peptidase based on its high similarity with ADAMTS3 and ADAMTS2. As its importance for procollagen processing was never experimentally demonstrated *in vivo*, we generated *Adamts14*-deficient mice. They are healthy, fertile and display normal aminoprocollagen processing. They were further crossed with *Adamts2*-deficient mice to evaluate potential functional redundancies between these two highly related enzymes. Initial characterizations made on young *Adamts2-Adamts14*-deficient animals showed the same phenotype as that of *Adamts2*-deficient mice, with no further reduction of procollagen processing and no significant aggravation of the structural alterations of collagen fibrils. However, when evaluated at older age, *Adamts2-Adamts14*-deficient mice surprisingly displayed epidermal lesions, appearing in 2 month-old males and later in some females, and then worsening rapidly. Immunohistological evaluations of skin sections around the lesions revealed thickening of the epidermis, hypercellularity in the dermis and extensive infiltration by immune cells. Additional investigations, performed on young mice before the formation of the initial lesions, revealed that the primary cause of the phenotype was not related to alterations of the epidermal barrier but was rather the result of an abnormal activation and differentiation of T lymphocytes towards a Th1 profile. However, the primary molecular defect probably does not reside in the immune system itself since irradiated *Adamts2-Adamts14*-deficient mice grafted with WT immune cells still developed lesions.

While originally created to better characterize the common and specific functions of ADAMTS2 and ADAMTS14 in extracellular matrix and connective tissues homeostasis, the *Adamts2-Adamts14*-deficient mice revealed an unexpected but significant role of ADAMTS in the regulation of immune system, possibly through a cross-talk involving mesenchymal cells and the TGF β pathways.

Keywords: ADAMTS, collagen, skin, dermatitis, immunity.

Abbreviations: WT, Wild type mice; TS2^{-/-}, *Adamts2*-deficient mice; TS14^{-/-}, *Adamts14*-deficient mice; TS2^{-/-}/TS14^{-/-}, *Adamts2-Adamts14*-deficient mice.

1. Introduction

Together with MMPs (Matrix Metalloproteinase), ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) and Astacins, ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type I repeat) are zinc-dependent metalloproteinases active in the extracellular space [1]. They form a family of 19 members possessing an identical N-terminal domain composition, including the metalloproteinase domain and one thrombospondin type 1 repeat (TSR1) [2]. Human genetic diseases and spontaneous or engineered mutations in rodent underline the diversity of their functions, their critical roles in various physio-pathological conditions and the existence of redundancies between the closest ADAMTS relatives [3]. Subfamilies have been defined based on enzyme activity and composition of the C-terminal ancillary domains. ADAMTS2, 3 and 14 are the only ADAMTS that possess 3 additional consecutive TSR1 followed by a short C-terminal domain containing a PLAC (Protease and Lacunin) signature [2]. The cleavage of the amino- and carboxy-propeptides of fibrillar procollagens is required for the assembly of collagen trimers into well-organized fibrils and fibers. The carboxy-propeptide domain is cleaved by BMP1/Tolloid like metalloproteinases [4, 5] and ADAMTS2 (previously known as "aminoprocollagen peptidase" or "procollagen N-proteinase") was the first enzyme described for its capacity to excise the aminopropeptide of fibrillar collagens [6-9]. Later, ADAMTS3 was found to be responsible for the processing of the aminopropeptide of type II procollagen in cartilage [10]. Mutations preventing the expression of active ADAMTS2 lead to the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome in human, and to similar pathologic features in several animal species [11, 12]. *Adamts2*-deficient mice, similarly to human patients and affected animals, are mainly characterized by severe skin fragility and variable, but milder, alterations of other connective tissues [13]. These phenotypic changes have been linked to the accumulation of aminoprocollagen I (type I collagen still retaining its aminoterminal propeptide) which results in the formation of abnormal collagen fibers displaying reduced mechanical resistance. It is worth noting also that, despite the constitutive absence of ADAMTS2 activity in dermatosparaxis, a significant proportion of type I collagen is correctly processed, even in the skin, and that the proportion of aminoprocollagen I strongly varies from one tissue to another [14-16]. These observations suggested the existence of functional redundancies between these three related ADAMTS. Absence of *Adamts3* is embryonically lethal at 15 days post coitum [17]. The processing of fibrillar collagens is however not altered in these embryos. Instead, it was demonstrated that *Adamts3* is required for the development of the lymphatic network by its capacity to cleave pro-VEGF-C into active VEGF-C capable to trigger the VEGF-R3 pathway [17, 18]. Furthermore, we recently showed that loss of ADAMTS3 activity in human causes Hennekam lymphangiectasia-lymphedema syndrome 3 by a lack of proteolytic activation of pro-VEGFC [19]. ADAMTS14 has remained much less

ACCEPTED MANUSCRIPT

characterized. In addition to a low aminoprocollagen peptidase activity measured *in vitro* [14], genetic linkage has been found with multiple sclerosis [20] and osteoarthritis [21], two conditions that probably do not directly involve the processing of newly synthesized procollagens. Other studies linking ADAMTS2 to angiogenesis [22], inflammation [23] and cardiovascular diseases [24, 25] similarly indicate that the collective functions of ADAMTS2, 3 and 14 are not restricted to collagen biology. The aim of the present study was to elucidate the physiological roles of ADAMTS14 through *Adamts14* gene inactivation in mice and to determine its potential redundancy with *Adamts2* by creating *Adamts2* and *Adamts14* doubly deficient mice.

2. Material and methods

2.1. Generation of *Adamts14*-deficient mice and *Adamts2-Adamts14* doubly deficient mice.

Embryonic stem (ES) cells were engineered at the Centre for Modeling Human Disease (Toronto, Canada) and mosaic and heterozygous mice were generated at the Transgenic Core Facility of the Toronto Centre for Phenogenomics (Toronto, Canada). R1 ES cells were transduced with a UPA gene trap vector (Fig. S1) [26] and then selected for neomycin-resistance with Geneticin (G418). RNA from subclones were used to generate cDNA that were amplified by 3'RACE PCR. Insertion sites of gene trap cassettes were then determined by sequencing of the 3'RACE products. One clone (CMHD-GT_511E11) was positive for an insertion between bases 9251 and 9252 of Intron 4 of the *Adamts14* gene. Cells of this clone were then fused to C57Bl/6 blastocysts to obtain mosaic mice that were further used to obtain heterozygous founders. The heterozygous mice were finally inter-crossed to obtain homozygous mice. Genotyping of tail DNA was performed using the following primers: P1 (5'-TTAATGGCTCACTCCCCACTGAAC-3') and P2 (5'-TTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGA-3') for amplifying the targeted allele while P1 and P3 (5'-GCCAGGAAGGACCAGTGATCCTC-3') were used for the wild type allele (Fig. S1).

Adamts14 expression was evaluated on RNA purified (Nucleospin RNA/protein kit, Macherey/Nagel, Germany) from skin of wild type (WT), heterozygous (*TS14^{+/+}*) and homozygous (*TS14^{-/-}*) mice. RT-PCR amplifications were performed using Tth DNA Polymerase (Roche, Bâle, Switzerland) and pairs of primers allowing the amplification of different sequences (exons 4 to 5 [forward: 5'-ACTACGTGCTGACGCTCATGAATAT-3'; reverse 5'-GCCAGCGACACACCTGCTCCA-3'], exons 2 to 3 [forward: 5'-TGTACACTGGAGGTGTCACTGGAA-3'; reverse: 5'-TGGTGAAGGTCACCATGAGGCTCT-3'], exons 5 to 7 [forward 5'-CTGATCATGGTGGGCTACCGACA-3'; reverse 5'-

ACCEPTED MANUSCRIPT

CCATCCTCGTGTTGAGGGCACA-3'] of *Adamts14*; GFP [forward 5'-CACATGAAGCAGCAGCACTTCTTC-3'; reverse 5'-GGCGGATCT TGAAGT TCACCTTGA-3']], in order to confirm the efficacy of the "gene trap" strategy.

For the initial characterisations, WT, *TS14^{fl}* and *TS14^{-/-}* mice were generated by mating *TS14^{fl}* males and females. Mice doubly deficient for *Adamts2* and *Adamts14* (*TS2^{-/-}/TS14^{-/-}*) were produced by mating *TS2^{-/-}/TS14^{fl}* males and females. Frequent backcrosses in wildtype C57bl/6 and intercrosses between the *TS2^{-/-}* and the *TS14^{-/-}* genotypes were performed to insure a homogeneous genetic background.

Mice were maintained under standard laboratory conditions, with 12 hours light/12 hours dark cycles and free access to food and water. All the procedures were performed in accordance with the guidelines for animal care of the University of Liège, the Federation of European Laboratory Animal Science Associations and the American National Institutes of Health.

2.2. Mechanical properties of the skin.

Mechanical properties of the skin were determined using the "Instron" apparatus (Instron 5566 UTM, Instron). Six 8 week-old mice of each genotype (WT, *TS14^{fl}*, *TS2^{-/-}*, *TS2^{-/-}/TS14^{fl}*) were sacrificed and three strips of dorsal skin (1 cm width; 3 cm in length in the head to tail orientation) were excised for each mouse and fixed between the two clamps of the apparatus (distant by 1 cm). Skin strips were stretched (at 1 mm/s) until rupture. The maximal tensile strength (the maximal force in newton divided by the initial cross sectional area of the specimen) and deformation (% of elongation at rupture) were measured. The statistical significance of the differences between two genotypes was determined by Student's t-test.

2.3. Type I Collagen processing.

Skin, cornea and tendon were dissected, ground at liquid nitrogen temperature, homogenized in Laemmli denaturation buffer (with 100 mM DTT) and denatured (95°C, 5 min). After electrophoresis (7.5% SDS-PAGE), the gels were stained with Coomassie blue and scanned using an ImageQuant LAS4000 device and software (GE Healthcare).

2.4. Transmission electron microscopy.

Skin and tendon samples were washed in Sørensen buffer, fixed in 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 mol/L Sørensen phosphate buffer (pH 7.4), postfixated in 1% osmium tetroxide and embedded in Epon. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Observations were made with a JEM 1400 TEM.

2.5. Immunohistological analyses.

Skin samples were fixed in a 4% paraformaldehyde (PFA) solution in PBS. Paraffin-embedded tissue sections (5 µm) were deparaffined and rehydrated. Tissue sections were

ACCEPTED MANUSCRIPT

stained with hematoxylin/eosin for general histology or with toluidine blue to assess mast cells infiltration. Immunohistological staining of skin sections was performed using KI67 (Dako, Glostrup, Denmark), cytokeratin 10 (Novus biologicals, Littleton, USA), CD45 (BD Biosciences, Allschwil, Suisse), CD3 (Roche, Bâle, Suisse), Interferon gamma (Bioss, Woburn, USA) and cleaved caspase 3 (Cell signaling, Danvers, USA) antibodies.

2.6. *In situ* hybridization.

For specificity reasons the design of the probes was made in regions encompassing several exons and with the lowest homologies between *Adamts2*, 3 and 14 (Table S1). Amplification of these sequences were performed using the forward or the reverse primer (In bold) starting by the T7 RNA polymerase promoter sequence to generate antisense or sense probes. The purified cDNAs were used to generate antisense and sense cRNA probes using a T7 DIG RNA labelling kit (Roche) and digoxigenin-11-UTP (Roche) according to the manufacturer's specifications. Paraffin sections of paraformaldehyde-fixed samples (newborns and 8 week-old wild-type mouse skin) were hybridized to 10 µg/ml DIG-11-UTP-labeled *Adamts2* or *Adamts14* cRNA probes as previously described [27]. After staining in the dark with 5-bromo-4-chloro-3'-Indoylphosphate p-toluidine salt (BCIP) and nitroblue tetrazolium chloride (NBT) (Roche) according to manufacturer's recommendations, slides were scanned using a Nanozoomer 2.0 scanner (Hamamatsu) and visualized using NDPviewer (Hamamatsu).

2.7. Induction of local skin inflammation by topical application of Imiquimod.

A daily topical dose of 62.5 mg of commercially available Imiquimod cream (5%) (Aldara Cream; Meda AB, Solna, Sweden) was applied to the shaved back skin and ears of 8 week-old mice for 5 consecutive days. Mice were killed 3 days after the last application and skin was fixed in 4% PFA for immunohistological analysis.

2.8. Measurement of transepidermal water loss.

A Courage and Khazaka Tewameter TM210 (CK Technology SPRL, Visé, Belgium) was used for measuring transepidermal water loss (TEWL) on the dorsal flank and on belly of 6 mice per genotype 24 hours after hair shaving. TEWL was recorded at ambient temperature (19°C to 21°C) and humidity (50% ± 5%).

2.9. Flow cytometry.

At the time of sacrifice, peripheral blood and spleen were collected and analyzed by flow cytometry. Splenocytes were obtained by crushing the spleen. Cells were counted with an ABX Micros 60 (HORIBA Medical). Peripheral blood was depleted of erythrocytes using RBC lysis buffer (eBioscience, San-Diego, CA, USA) according to manufacturer's instructions. The following antibodies were used: anti-CD45-PerCPy5.5 (30-F11), anti-CD3-PE (145-2C11, Becton-Dickinson (BD), Bedford, MA, USA), anti-CD3-V500 (500A2, BD), anti-CD11b-APC

ACCEPTED MANUSCRIPT

(M1/70), anti-Gr-1-V450 (RB6-8C5), anti-B220-APC-eFluor780 (RA3-6B2), anti-CD4-BV510 (RM4-5, SONY Biotechnology, The Heights, Surrey, UK), anti-CD4-eFluor450 (RM4-5), anti-CD8-PECy7 (53-6.5), anti-CD8-PerCPCy5.5 (53-6.5), anti-CD8-APC-eFluor780 (53-6.5), anti-CD25-PECy7 (PC61, BD), anti-ICOS-BV421 (7E.17G9, BD), anti-CD44-FITC (IM7), anti-CD62L-APC-eFluor780 (MEL-14), anti-CD49b-biotin (DX5), anti-FoxP3-PE (FJK-16s), anti-KI67-AlexaFluor647 (B56, BD), anti-IFN γ -PerCPCy5.5 (XMG1.2), anti-IL-4-PECy7 (BVD6-24G2), anti-IL-17-APC (eBio17B7) and anti-IL-2-PE (JES6-5H4) (all from eBioscience unless otherwise indicated). Cells ($1.5\text{-}2 \times 10^6$ cells/sample) were incubated with antibodies for 20 min at 4°C in the dark and washed twice with PBS/3% FBS (Lonza, Verviers, Belgium). Intracellular staining for FoxP3, KI67 and cytokines was performed by using the FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience). For intracellular cytokine staining, spleen homogenates were stimulated for 4h in RPMI supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (10 mg/mL) by PMA/ionomycin, brefeldin A and monensin (Cell Stimulation Cocktail + Protein Transport Inhibitors, eBioscience). Absolute counts were performed with TruCount tubes (BD). Data were acquired on a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with the Flowjo software 7.0 (Tree Star Inc., Ashland, OR). The Mann-Whitney U test was used to compare data between experimental groups.

2.10. Regulatory T cells suppression assay.

Regulatory T cells (Treg, CD3⁺CD4⁺CD25⁺) and conventional T cells (Tconv, CD3⁺CD4⁺CD25⁻) were sorted by flow cytometry (FACS Aria III, Becton-Dickinson) from spleens harvested from mice sacrificed at the age of 12 weeks. Tconvs were labelled with CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) at 5 μ M and were cultured in RPMI supplemented with 10% FBS, in the presence of CD3/CD28 beads (Bead : Cell ratio 1:8, Dynabeads, Invitrogen). Unlabeled Tregs were mixed or not with Tconvs at different Treg:Tconv ratio, in triplicate. Cells were harvested from culture after 72h, stained with 7-AAD (7-aminoactinomycin D), and analyzed by flow cytometry (FACS Canto II). The suppressive capacity of Tregs was expressed as the relative inhibition of the percentage of (CFSE)^{low} Tconvs ($100 \times (1 - \%CFSE^{\text{low}} \text{ Tconvs in coculture} / \%CFSE^{\text{low}} \text{ Tconvs alone})$).

2.11. Bone marrow transplant.

Bone marrow from femurs and tibias from six WT and six TS2⁺/TS14⁺ 8 week-old male mice was collected in sterile RPMI + 10% FBS + 1% penicillin/streptomycin. The suspensions were passed through a 70 μ m nylon filter mesh and washed with PBS + 3% FBS + 1% P/S. Cells were then resuspended and mixed in PBS at a concentration of 10×10^6 bone marrow cells/200 μ L. Recipient mice (six WT and six TS2⁺/TS14⁺) were injected intravenously with 200 μ L of the cell suspension, 6h after having received a total body irradiation of 11Gy.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Five irradiated $TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$ were grafted with WT bone marrow and one with $TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$ bone marrow, as control. An identical experimental design was used for the six irradiated WT mice (5 grafted with $TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$ bone marrow and 1 with WT bone marrow).

3. Results

3.1. *Adamts14* inactivation has no obvious phenotypical consequence.

Heterozygous $TS14^{+/+}$ obtained from the F1 generation were crossed to generate $TS14^{+/+}$ mice. Examination of different litters from $TS14^{+/+}$ mice mating showed a Mendelian ratio among wild type, heterozygous and homozygous deficient mice. RT-PCR were performed using different pairs of primers on mRNA extracted from skin of WT, $TS14^{+/+}$ and $TS14^{+/+}$ mice. Primers located on either side of the cassette (exon 4 - exon 6) allowed the amplification of RT-PCR products from WT and $TS14^{+/+}$ but not from $TS14^{+/+}$ mRNA demonstrating the efficacy of the trapping mechanism (Fig S2). As an additional control, GFP was amplified only from $TS14^{+/+}$ and $TS14^{+/+}$ mice as expected in case of successful integration of the cassette. Finally, primers specific for regions located upstream (exons 2-3) or downstream (exons 5-7) of the cassette generated RT-PCR products for the three genotypes. Altogether these data illustrate the existence of two individual transcripts when the cassette is inserted in the Intron 4 of *Adamts14*, clearly demonstrating the efficacy of the trapping mechanism (Fig. S2).

Adult $TS14^{+/+}$ males and females were fertile and their mating produced the expected Mendelian ratio. Fibrillar collagen processing was evaluated in tissues characterized by a high collagen content (tendon, skin and cornea). The electrophoretic pattern of collagen chains was identical in wild type and $TS14^{+/+}$ mice (Fig. 1), suggesting that ADAMTS14 does not possess significant aminoprocollagen peptidase activity *in vivo* or that this activity can be seen only in situations where ADAMTS2 activity is absent.

3.2. ADAMTS14 is not significantly involved in collagen fibrils formation *in vivo*.

$TS14^{+/+}$ and $TS2^{+/+}$ mice were mated and their $TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$ progeny were used to generate doubly deficient mice ($TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$). During the crossing process, all the expected genotypes were observed with a normal Mendelian frequency, which indicated an absence of embryonic lethality. Except for mice with a $TS2^{+/+}$ genotype ($TS2^{+/+}$ and $TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$), all the genotypes were fertile, even the $TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$ mice. Newborn pups of the different genotypes were undistinguishable. At 3 weeks of age, $TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$ mice and $TS2^{+/+}$ mice were easily identified by the more ruffled appearance of their fur as compared to WT and $TS14^{+/+}$ mice. However, no increase of this phenotype was seen in $TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$ doubly deficient mice as compared with $TS2^{+/+}$ mice. We then focused our analyses on 4 genotypes, i.e. WT, $TS2^{+/+}$, $TS14^{+/+}$ and $TS2^{+/+}/TS14^{+/+}$ mice. We first compared the electrophoretic pattern of type I

ACCEPTED MANUSCRIPT

collagen extracted from different tissues (Fig. 1). In skin, only fully processed alpha 1 and alpha 2 chains were identified in WT and TS14^{-/-} mice, while 50 to 80 % of type I collagen still retains the aminopropeptide (pNa11, pNa21) in TS2^{-/-} mice. There was no further reduction of aminopropeptide processing in TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice, indicating that Adamts14 is not responsible for the residual aminoprocollagen peptidase activity observed in TS2^{-/-} mice. Collagen patterns were also identical for TS2^{-/-} and TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice in tendon and cornea, with alpha chains representing, respectively, about 75 % and 60 % of total type I collagen content (Fig. 1). Finally, complete processing was observed in bone from all genotypes (Fig. S3).

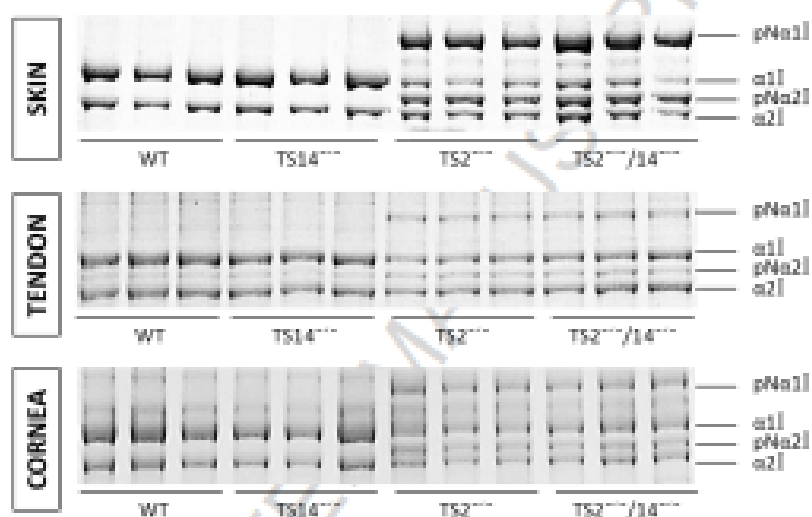


Figure 1: Type I procollagen processing.

Skin, tendon and cornea samples from three mice of each genotype were homogenized and extracted in Laemmli denaturation buffer containing DTT. Proteins corresponding to an identical amount of tissue were submitted to SDS-PAGE and stained (Coomassie blue). In tissues from WT and TS14^{-/-} mice, type I collagen appeared as two bands corresponding to the fully processed alpha1 ($\alpha1$) and alpha2 ($\alpha2$) chains. Two additional bands corresponding to alpha1 and alpha2 chains still retaining their aminopropeptide (pNa11 and pNa21, respectively) were observed in the tissues of mice lacking Adamts2 activity (TS2^{-/-} and TS2^{-/-}/TS14^{-/-}). The alteration of the maturation (reduction of the conversion of pNa11 and pNa21 into $\alpha1$ and $\alpha2$, respectively) was more pronounced in the skin. In the three tissues, the absence of Adamts14 activity did not lead to an increased accumulation of pNa $\alpha1$ or pNa $\alpha2$ chains (compare the accumulation of pNa α chains in TS2^{-/-} and in TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice).

Differences in the mechanical properties of skin were also evaluated for the 4 genotypes by submitting skin strips to progressive elongation. Maximal tensile strength and percentage of elongation at rupture were determined (Fig. 2). A slight and statistically non-significant reduction of skin tensile strength was observed in TS14^{-/-} mice as compared to WT. As expected, the mechanical properties of skin were strongly impaired in TS2^{-/-} mice and no worsened alteration was observed in TS2^{-/-}/TS14^{-/-} (Fig. 2).

ACCEPTED MANUSCRIPT

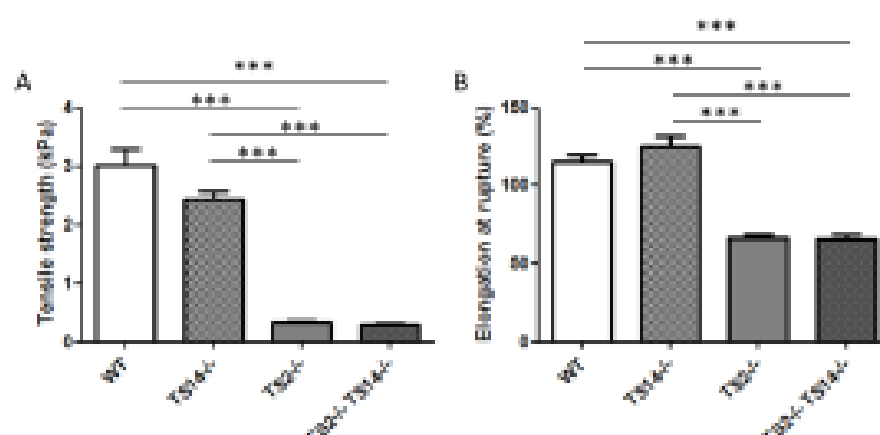


Figure 2: Mechanical properties of skin.

Freshly excised skin strips from WT, TS14^{-/-}, TS2^{-/-} and TS2^{-/-}/14^{-/-} mice were clamped into an Instron Testing System[®] and stretched to tensile failure at a constant rate of 1 mm/s. (A) Tensile strength was computed from maximal load at failure divided by the initial cross-sectional area of the specimen.

(B) The maximal elongation at rupture was also determined and corresponded to the percentage of deformation of skin strips compared to their initial length (0% elongation). Eighteen strips per genotype were analyzed (3 strips per mouse, 6 age-matched mice of each genotype). ***P<0.001.

Transmission electron microscopy was also used to examine the ultrastructure of collagen fibrils. In skin, their structure, diameter and distribution were similar in WT and TS14^{-/-} mice, as expected (Fig. 3). In TS2^{-/-} skin, the shape of collagen fibrils was highly heterogeneous and strongly disrupted, ranging from fibrils with irregular contour to ribbon-like structure, sometimes branched (Fig. 3). No further obvious increased disorganization could be evidenced in the skin of TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice.

Analyses were also performed on other collagen-rich tissues. In tendon, collagen fibrils were identical in WT and TS14^{-/-} mice and much less affected than in skin for TS2^{-/-} and TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice, with only some fibrils being less rounded, especially fibrils with small diameter or fibril tips (Fig. 3). Surprisingly, the structure of the fibrils and their organization were normal in the corneas of the different genotypes (Fig. S4) although pNa11 and pNa21 were present in TS2^{-/-} and TS2^{-/-}/TS14^{-/-} (Fig. 1).

ACCEPTED MANUSCRIPT

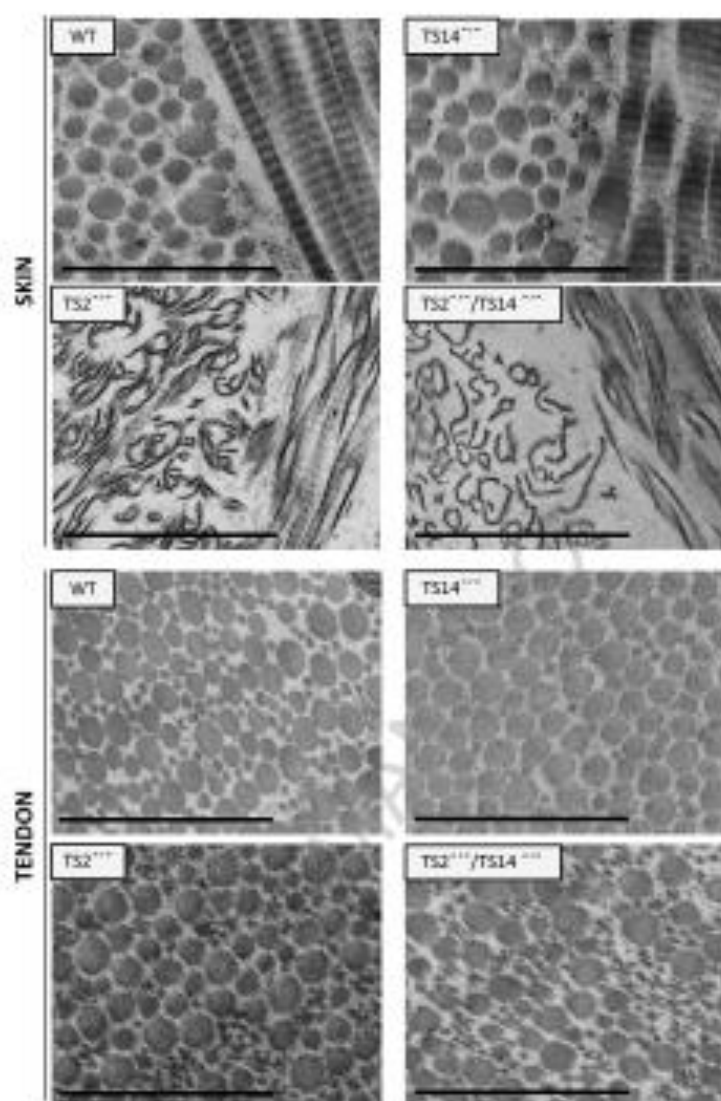


Figure 3: Ultrastructure of collagen fibrils in skin and tendon.

In skin of WT and TS14^{-/-} mice, collagen fibrils appeared cylindrical in cross section. In TS2^{-/-} skin, the structure of fibrils was highly heterogeneous, ranging from fibrils with highly irregular contour to fibrils presenting "hieroglyphic" or ribbon-like structure. No aggravation of the fibril structure was noted in TS2^{-/-}/TS14^{-/-} skin as compared to TS2^{-/-}.

In tendons, fibrils were more closely packed than in skin, and appeared in cross section as structures with a highly variable diameter. The same general pattern was observed in WT and TS14^{-/-} tendons. In TS2^{-/-} and TS2^{-/-}/TS14^{-/-} tendons, some alteration of the circular shape was observed, especially for small diameter fibrils. (Scale bar = 1 μ m).

3.3. Spontaneous development of epidermal lesions in TS2^{-/-}/TS14^{-/-} adult mice.

All the initial characterizations of TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice were made on young (\leq 8 weeks) animals and showed that their phenotype was identical to the phenotype of TS2^{-/-} mice. At an older age, TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice surprisingly started to display epidermal lesions (Fig. 4A).

ACCEPTED MANUSCRIPT

appearing mainly in males (75% of males older than 5 months have developed lesions) (Fig. 4B) and then worsening rapidly and requiring euthanasia for ethical reason.

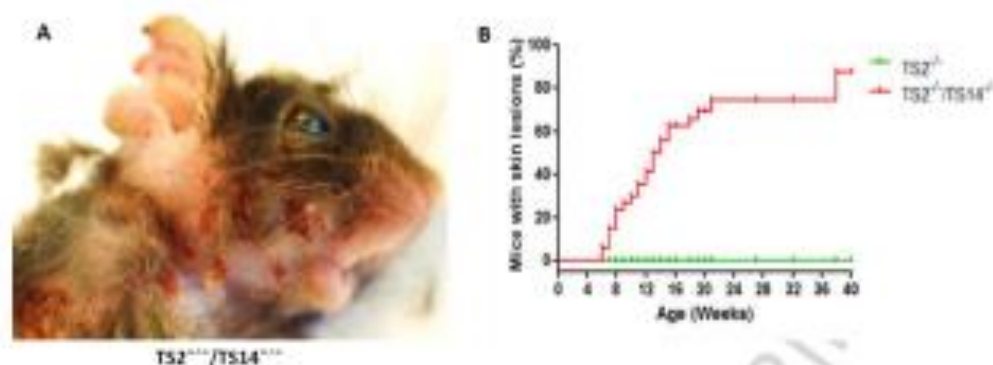


Figure 4: Emergence of epidermal lesions during the aging of $TS2^+/TS14^+$ males.

(A) Epidermal lesions appearing in $TS2^+/TS14^+$ mice, mainly affecting their back skin, ears, shoulders, snout and chin. (B) The earliest epidermal lesions were observed in 8 week-old $TS2^+/TS14^+$ mice and their frequency increased with age ($n = 35$, red line). Half of the mice have developed lesions by the age of 3 months. Such lesions were never observed in $TS2^+$ mice ($n = 23$, green line), in WT or in $TS14^+$.

HE staining of skin sections revealed a thickening of the epidermis and hyper-cellularity in the dermis around the lesions (Fig. 5). These histological alterations tended to rapidly normalize a few mm away from the site of epidermal rupture.

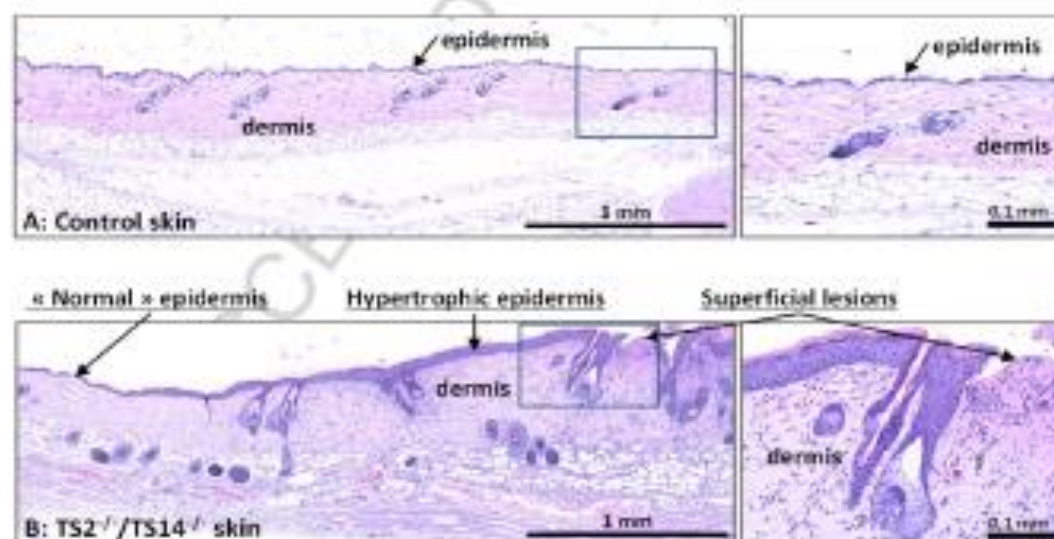


Figure 5: Hematoxylin-eosin staining of WT and $TS2^+/TS14^+$ skin.

Transversal sections of dorsal skin from WT (A) and $TS2^+/TS14^+$ mice with lesions (B) were stained with HE. Epidermis looked normal at some distance but progressively thickened near the lesion. The increased cellularity in the dermis was due to immune cells infiltration and to higher fibroblastic density. The number of blood vessels in the dermis was increased in $TS2^+/TS14^+$ mice compared with WT mice.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Immunostaining confirmed the thickening of the epidermis (Fig. 6A-D, cytokeratin 10), with a high proliferative index of the basal keratinocytes (Fig. 6E-H, Ki67), infiltration by immune cells in the epidermis and the dermis (Fig. 6I-L, CD45) and a moderately increased number of mastocytes (Fig. 6M-P, toluidine blue) only in the affected regions of the skin of $TS2^{-/-}/TS14^{-/-}$ mice.

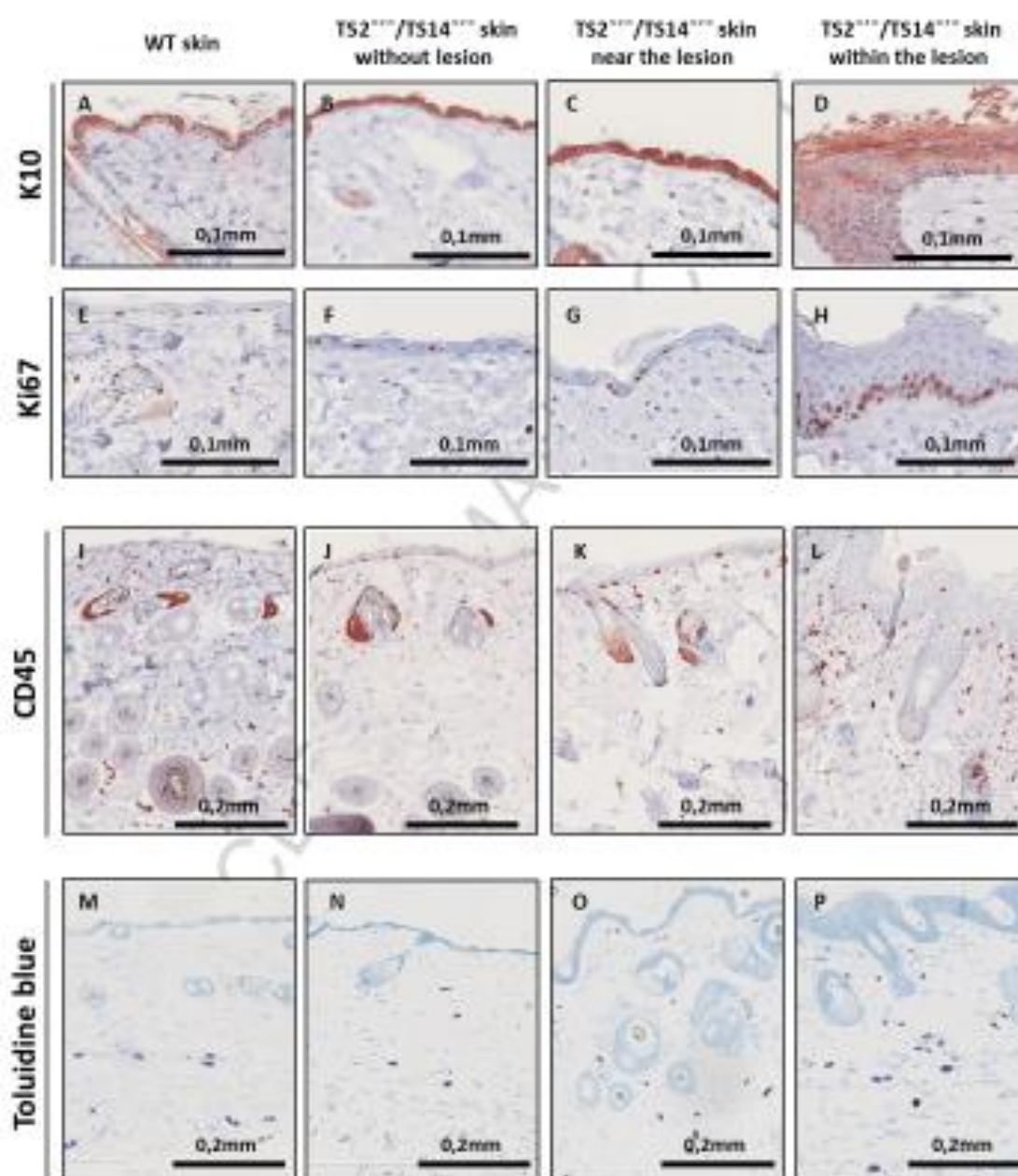


Figure 6: Progressive epidermal and dermal modifications in the skin of $TS2^{-/-}/TS14^{-/-}$ mice. Sections in WT (A, E, I, M) or $TS2^{-/-}/TS14^{-/-}$ dorsal skin at distance (B, F, J, N), near (C, G, K, O) or at the border of lesions (D, H, L, P) were stained using antibodies specific to keratin 10 (A-D), Ki67 (E-H), CD45 (I-L) and with toluidine blue (M-P). The severity of the alterations increased at the immediate proximity of the lesions.

ACCEPTED MANUSCRIPT

3.4. The formation of cutaneous lesions in $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice is not related to a general alteration of the epidermal barrier and is not stimulated by induction of local inflammation.

Spontaneous epidermal lesions can result from different primary causes such as alteration of the epidermal barrier. Histological analyses showed that the thick epidermis close to the lesions in $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice was covered by an abundant stratum corneum and comprised a well-organized stratum granulosum, suggesting that the epithelial barrier was not significantly altered (Fig. 7A).

To functionally characterize the barrier properties in the different mice, we measured the trans-epidermal water loss (TEWL). No difference was observed between the four genotypes (Fig. 7B), indicating that the barrier function of the epidermis is not altered in $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice.

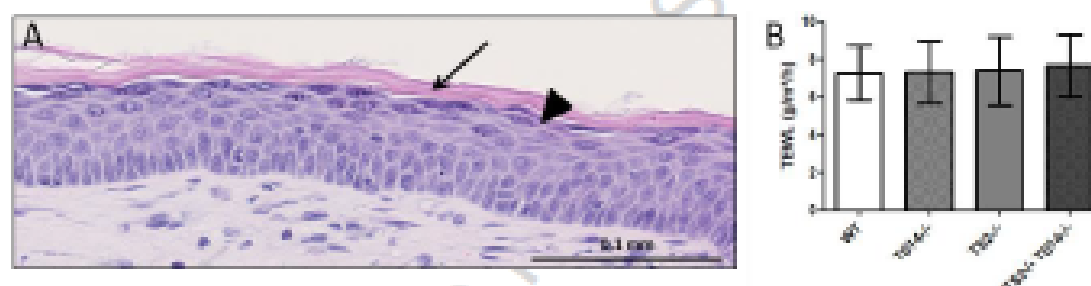


Figure 7: Effectiveness of the skin barrier in $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice.

(A) Transversal sections were made in the skin of $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice at proximity of cutaneous lesions and stained with HE. The epidermis is covered by an abundant stratum corneum (arrow) and contains a well-organized stratum granulosum (arrowhead) suggesting that the quality of the epithelial barrier is not significantly altered. (B) The "trans-epidermal water loss" was measured (Tewameter, Courage+Khazaka) in order to have a functional evaluation of the epidermal barrier. 6 week-old mice of each genotype ($n=6$) were used and none of them had visible skin lesion which could have skewed the measurements. Data are expressed in gram per square meter per hour (mean \pm SD). Similar values were obtained for the four genotypes confirming that the quality of the skin barrier is normal in $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice free of cutaneous lesions.

ADAMTS2 and ADAMTS14 are reported to be expressed mainly in cells of mesenchymal origin, but also in subpopulations of macrophages (23). Immunofluorescence and immunohistochemical analyses of skin sections were performed in order to evaluate which cells are the highest producers and therefore have the highest likelihood to be implicated in the mechanisms leading to skin lesions in $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice. None of the commercially available antibodies was sufficiently specific and effective to detect Adamts2 or Adamts14 on skin sections. Therefore, "in Situ Hybridization" was used as an alternative assay. The specificity of the hybridizations is illustrated in section of newborns, with positive staining in the spine and in the dermis (Fig S5 for Adamts2, Fig S6 for Adamts14). In adult healthy skin, however, only a weak non-specific staining was observed at the level of hair follicles. This

ACCEPTED MANUSCRIPT

suggests that the expression of *Adamts2* and *Adamts14* is too low in resting non activated fibroblasts to be detected by *In Situ* hybridization and that cells with high expression of *Adamts2* or *14* are absent or not common in healthy adult skin.

Although the skin phenotype in *TS2^{-/-}/TS14^{-/-}* mice was not fully suggestive of an "epidermolysis bullosa" condition (for review [28]), we still decided to evaluate, by transmission electron microscopy, the integrity of the basement membrane separating the epidermis from the dermis. No difference in terms of structure and thickness could be evidenced between the different genotypes (Fig. S7). Furthermore, the number and structure of the hemidesmosomes anchoring the basal layer of keratinocytes onto the basement membrane were also normal.

Different models were used to further evaluate the epidermal barrier function. Excessive skin dryness was induced in control and *TS2^{-/-}/TS14^{-/-}* mice (8 week-old) by chronic application of an acetone/ether (1:1) solution. A similar skin dryness was noted in all the mice, but the formation of epidermal lesions was never induced, explaining why this model was not investigated further.

As a complementary model to induce epidermal alterations, 8 week-old mice without lesion were topically treated with Imiquimod, an agonist of TLR7 inducing acute inflammation leading to psoriasis-like lesions. Redness and first signs of inflammation were observed in the 4 genotypes as soon as 24 hours after the first application. After three additional applications, treated skins displayed psoriatic-like plaques, but similarly in the four genotypes. As expected, histological examinations clearly showed that Imiquimod induced the formation of a thick epidermis producing an abundant stratum corneum (Fig. 8). Moderate leukocyte infiltration was also observed, but epidermal lesions similar to those spontaneously appearing in older *TS2^{-/-}/TS14^{-/-}* mice were never observed in any genotype.

ACCEPTED MANUSCRIPT

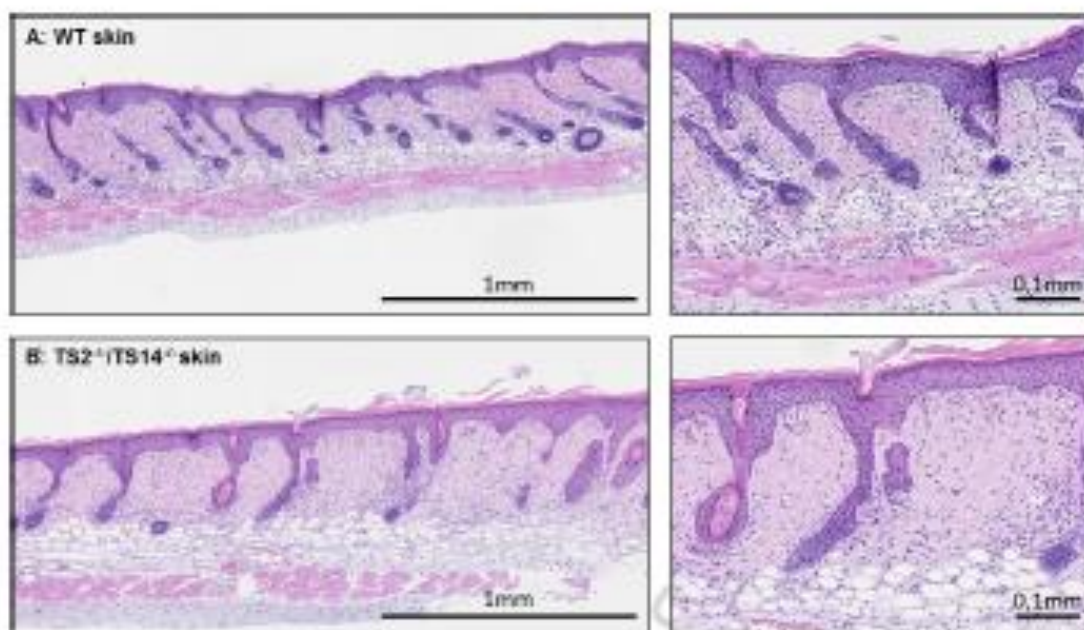


Figure 8: Induction of psoriasis-like alterations using Imiquimod.

WT, TS2⁺, TS14⁻ and TS2⁺/TS14⁻ mice (n = 2 for each genotype) were treated by topical applications of Imiquimod (one daily application during 5 consecutive days). All mice developed psoriasis-like lesions with no difference between the 4 genotypes. Representative transversal sections of skin from WT (A) and TS2⁺/TS14⁻ mice (B) stained with HE are shown. Epidermis was thickened and cellularity was increased in the dermis due to inflammatory infiltrate and a higher fibroblastic density. No difference was observed between the genotypes and lesions similar to those appearing spontaneously in aging TS2⁺/TS14⁻ mice were never noticed.

ACCEPTED MANUSCRIPT

3.5. Immunological status of $TS2^{-}/TS14^{-}$ is altered before the occurrence of skin lesions.

Other potential causes of atopic dermatitis-like skin lesions are related to dysregulation affecting the immune system. Skin sections from male $TS2^{-}/TS14^{-}$ mice were systematically analyzed before the occurrence of lesions (\approx 8 weeks) and in unaffected skin of older mice at distant sites of the primary lesions to detect any potential specific distribution of immune cells. Some clusters of CD45 positive cells were observed in the apparently asymptomatic dermis (Fig. 9A). Small clusters were also observed close to the epidermis where they seemed to trigger death of keratinocytes and local alterations of the epidermal barrier (Fig. 9B, C and D).

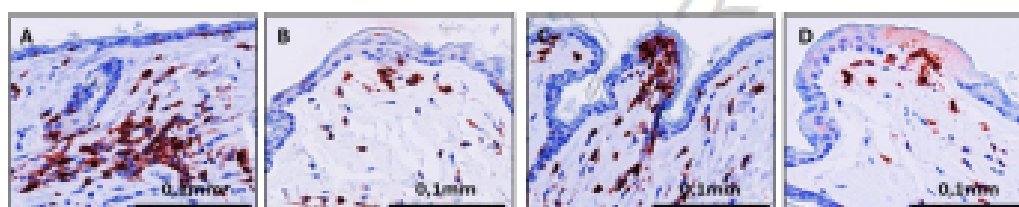


Figure 9: Infiltration of immune cells in the asymptomatic skin of $TS2^{-}/TS14^{-}$ mice. Transversal sections of non-affected skin from $TS2^{-}/TS14^{-}$ mice were stained using CD45 antibody. Accumulation of CD45 positive cells were observed locally in the dermal regions where skin lesions are still absent (A). Small clusters of immune cells were also sometimes localized in close contact with the epidermis where they appeared to progressively induce death of keratinocytes and rupture of the epidermis (B-D).

Similar areas were then more specifically characterized on serial sections (Fig 10). A highly significant accumulation of T lymphocytes was observed within, and close to, the epidermis (Fig 10D, E). Increased level of IFN γ was noticed (Fig 10F) together with positive staining for cleaved caspase 3 above the background level (Fig 10C). These immune cells are most probably causative of the local induction of apoptosis of keratinocytes, which secondarily leads to the localized disruption of the epidermal barrier and the onset of macroscopic epidermal lesions.

ACCEPTED MANUSCRIPT

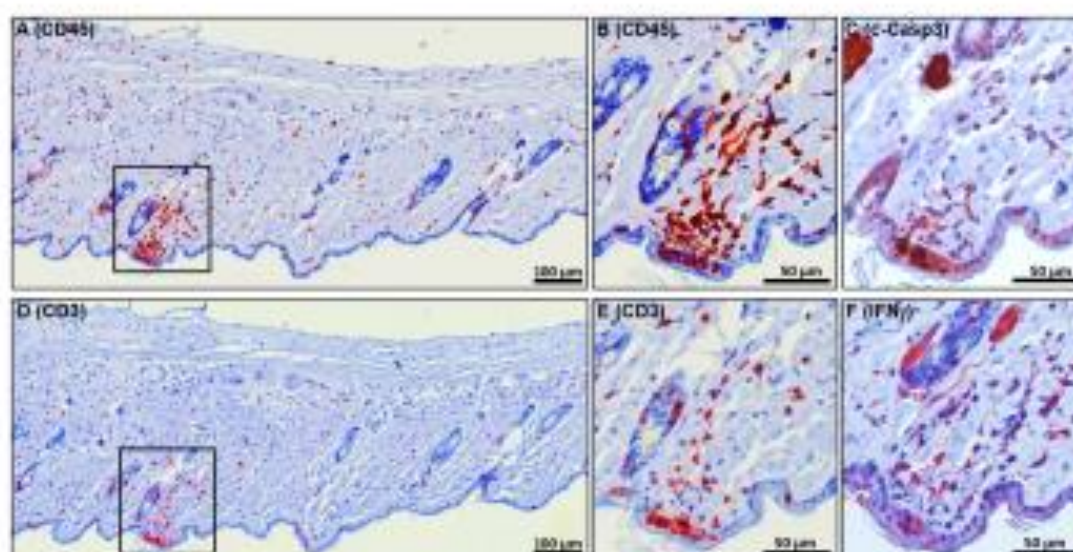


Figure 10: Characterization of the onset of epidermal lesion.

Serial transverse sections in the skin of a young $TS2^+/TS14^+$ mouse without visible macroscopic lesion were stained using antibodies specific for CD45 (A, B), cleaved caspase 3 (C), CD3 (D, E) or IFN γ (F). B and D are higher magnification pictures of the areas delineated by a rectangle in A and D, respectively. Pictures C and F were taken in the same location. CD45-positive leukocytes were scattered throughout the skin but could be sometimes observed as clusters close to the epidermis (A, B). Although T lymphocytes are rare in the skin (D), they constitute a large proportion of the immune cells forming the clusters (E). Apoptosis in the epidermis (C) and expression of IFN γ (F) were more specifically associated with immune cells accumulation.

3.5.1. Immune cells profiling in blood from WT and $TS2^+/TS14^+$ at increasing age.

Blood samples were collected in asymptomatic 8 week-old mice, and then 2 and 4 weeks later at times corresponding to increasing likelihood of developing lesions. FACS analyses showed that the total number of immune cells (Fig. S8A, CD45 $^+$) and the relative proportion of T lymphocytes (Fig. S8D, CD3 $^+$), granulocytes (Fig. S8E, CD11b $^+$ CD49b $^+$ Gr1 $^+$) and monocytes (Fig. S8F, CD11b $^+$ CD49b $^+$ Gr1 $^+$) were quite similar at the 3 time points for WT and $TS2^+/TS14^+$ mice, while moderate decreases in the number (Fig. S8B) and relative proportions of B lymphocytes were noticed (Fig. S8C, B220 $^+$).

Among T lymphocytes, the proportion of CD4 $^+$ and CD8 $^+$ cells was slightly modified in opposite way (Fig. 11A-B) but, most interestingly, they systematically tended to be more activated (Fig. 11C-D, ICOS $^+$) while their proliferation (Fig. 11E-F, KI67 $^+$) was not reproducibly modified at the three time points (except for the CD4 $^+$ T cells in 8 week-old $TS2^+/TS14^+$ mice). The proportion and the functional activity of regulatory T cells (Tregs) were not modified (Fig. S9).

ACCEPTED MANUSCRIPT

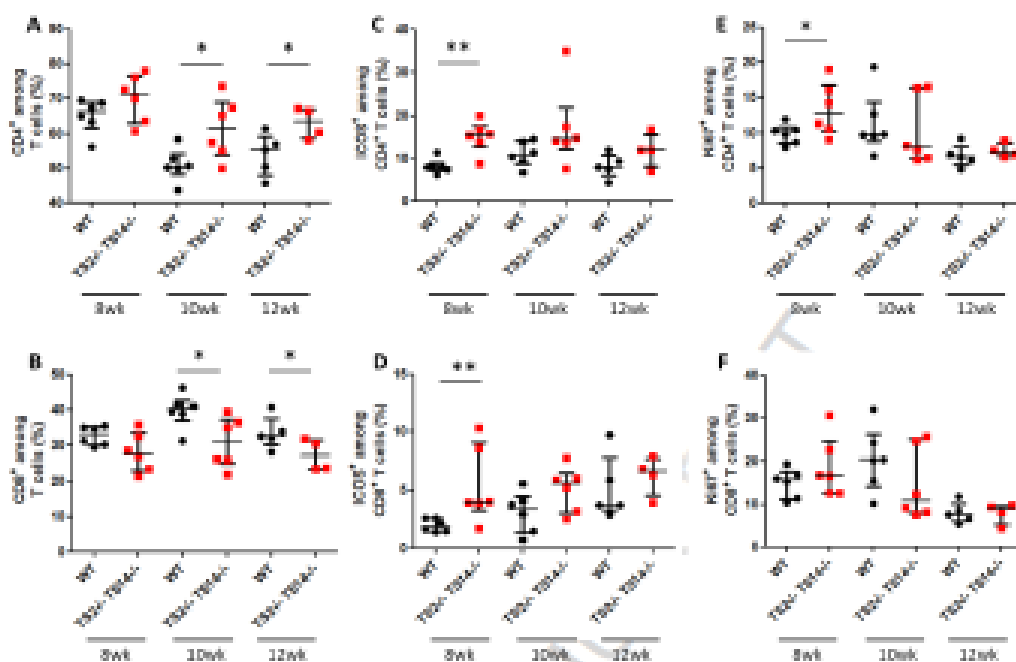


Figure 11: CD4⁺ and CD8⁺ T cell proportion and activation, but not proliferation, were modified in blood of TS2⁺/TS14⁻ mice.

As compared to WT, the proportions of CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) among T cells were modified in TS2⁺/TS14⁻ mice. The percentages of activated cells (ICOS⁺) also tended to be higher at the 3 time-points (C, D) while proliferation was not reproducibly altered (E, F). *P<0.05; **P<0.01.

3.5.2. Immunological status of the four genotypes at 8 weeks.

To evaluate the potential influence of the deletion of *Adams2* or *Adams14* alone, analyses of the immunological status were also performed on 8 week-old WT, TS2⁺, TS14⁻ and TS2⁺/TS14⁻ mice. In blood, the number and general profile of immune cells were similar for the 4 groups, except for an increase of the proportion of T lymphocytes, especially of the CD4⁺ T-helper cell lineage (Fig. S10). Increased activation (Fig. 12A, ICOS⁺) and proliferation (Fig. 12B, Ki67⁺) of CD4⁺ T cells were observed only in TS2⁺/TS14⁻ mice. The respective proportions of CD4⁺ cells being also CD44⁺ (effector memory CD4⁺ cells) or CD62L⁺ (naïve CD4⁺ cells) were also significantly altered (Fig. 12C-D). Similar analyses were performed on cells recovered from the spleen. As in blood, CD4⁺ T cells from TS2⁺/TS14⁻ mice were more activated (ICOS⁺, E) and more proliferative (Ki67, F), and displayed alterations of their differentiation status (G, H) as compared to WT cells. Clear trends of modifications of proliferation and differentiation were also identified for CD4⁺ T cells from TS2⁺ and TS14⁻ mice (F, H). These data were further confirmed through experiments quantifying the % of CD4⁺ T cells expressing IL-2 (Fig. 12I) and IFN γ (Fig. 12J), two Th1 cytokines.

ACCEPTED MANUSCRIPT

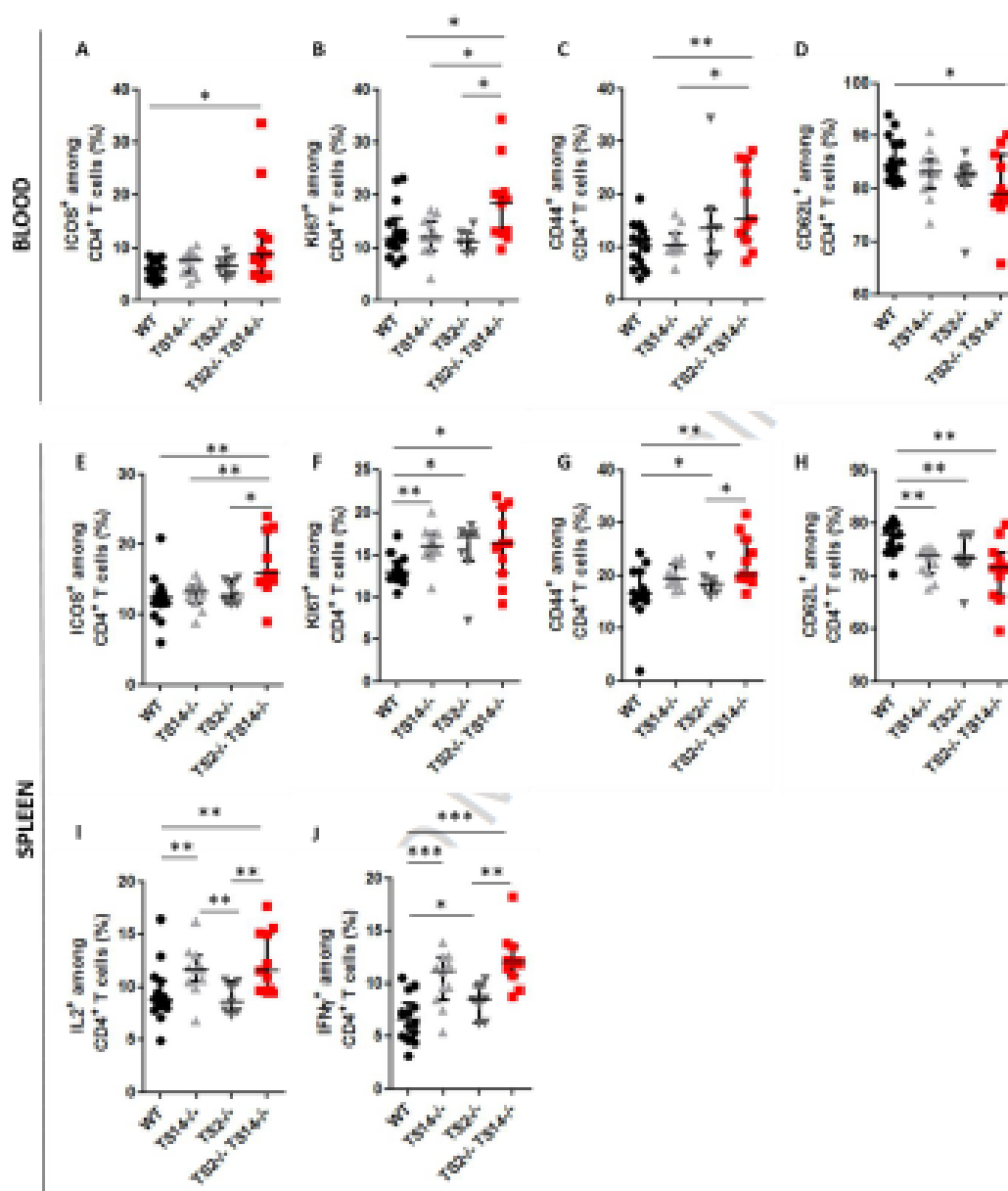


Figure 12: CD4⁺ T cells activation and proliferation in blood and in spleen from WT, TS14^{-/-}, TS2^{-/-} and TS2^{-/-}/TS14^{-/-}.

FACS analyses were performed on blood and spleen of 8 week-old mice. In blood (A-D), increased activation (ICOS⁺, A) and proliferation (Ki67⁺, B) of CD4⁺ T cells was observed only in TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice. Increase of effector memory (CD44⁺, C) and decrease of naive (CD62L⁺, D) CD4⁺ T cells frequency in blood from TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice were also observed. In the spleen (E-J), an increased activation (ICOS⁺, E) of CD4⁺ T cells was observed in TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice only. Higher proliferation (Ki67⁺, F) was observed for TS14^{-/-}, TS2^{-/-} and TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice, as well as trends towards an increase of effector memory (CD44⁺, G) and a decrease of naive (CD62L⁺, H) CD4⁺ T cells frequency. The proportion of CD4⁺ cells expressing IL-2 (I) or IFN γ (J), two Th1 cytokines, was increased in TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice but also in TS14^{-/-} mice. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

ACCEPTED MANUSCRIPT

3.6. Non immune events are the causes of the immune activation leading to epidermal lesions in $TS2^{+}/TS14^{-}$ mice.

In order to evaluate if the Immune dysregulations are related to alteration of the Immune system itself or to its environment, bone marrow cells from WT mice were grafted in irradiated $TS2^{+}/TS14^{-}$ mice, and vice versa. It has to be noted that 8 week-old male mice were used and that $TS2^{+}/TS14^{-}$ mice did not display any visible epidermal lesions at the beginning of the experiment. Six $TS2^{+}/TS14^{-}$ mice were irradiated, from which 5 were grafted with WT bone marrow and one with $TS2^{+}/TS14^{-}$ bone marrow, as control. An identical experimental design was used for the six irradiated WT mice (5 grafted with $TS2^{+}/TS14^{-}$ bone marrow and 1 with WT bone marrow). After 3 months, the 6 irradiated WT mice had survived and did not display any sign of cutaneous lesion. The $TS2^{+}/TS14^{-}$ mouse grafted with $TS2^{+}/TS14^{-}$ bone marrow cells developed lesions, as expected. Regarding the $TS2^{+}/TS14^{-}$ irradiated mice receiving WT bone marrow, 2 died from infection and intestinal problems while the 3 remaining mice developed lesions 4, 7 (Fig. 13) or 11 weeks after the transplant, which corresponded to the expected onset of the phenotype.

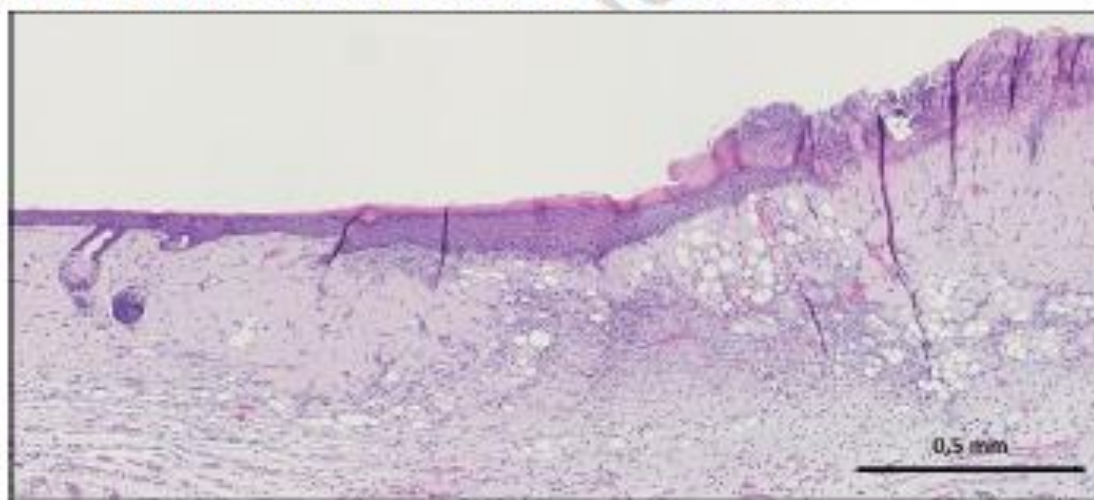


Figure 13: Hematoxylin-eosin staining of skin with lesions from $TS2^{+}/TS14^{-}$ mice grafted with WT bone marrow.

Transversal sections of skin with lesions from $TS2^{+}/TS14^{-}$ mice grafted with WT bone marrow were stained with HE. At the lesion site, both epidermal rupture and keratinocytes hyperproliferation can be seen. Infiltration of immune cells in the dermis and a high number of blood vessels are observed in the lesional zone.

4. Discussion

ADAMTS2, 3 and 14 are highly similar enzymes in terms of sequence and domain organization [29]. Among the ADAMTS family, they form the "aminoproteolytic" sub-family, a name describing the first identified function of ADAMTS2: the excision of the aminopropeptide of fibrillar procollagens [6, 14]. Recently, ADAMTS3, but not ADAMTS2 or

ACCEPTED MANUSCRIPT

ADAMTS14, was found to be crucial for the proteolytic activation of pro-VEGF-C into active VEGF-C able to drive embryonic lymphangiogenesis [17, 18]. The knowledge and data regarding ADAMTS14 are much scarce and often indirect. For instance, genetic linkage analyses have identified ADAMTS14 as a gene potentially involved in multiple sclerosis [20] and osteoarthritis [21].

Here we have generated *Adamts14*^{-/-} (TS14^{-/-}) mice to gain a better insight into the biological functions of ADAMTS14. These mice are healthy, fertile and display no obvious phenotype. The maturation of type I and type III fibrillar collagens in the main connective tissues, such as skin, tendon or bone, is also normal, suggesting that ADAMTS14 is not a major aminoproteolytic enzyme *in vivo*. However, it does not rule out the possibility that ADAMTS14 could act as an ancillary enzyme, especially when ADAMTS2 is defective. Indeed, it has been described that the processing of the aminopropeptide of type I procollagen is far from being completely prevented in absence of active ADAMTS2 [14]. In *Adamts2*^{-/-} mice (TS2^{-/-}), as in human patients with the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome, the percentage of fully matured type I collagen varies from 20-30 % in the skin to 80 % in tendons and almost 100 % in bone, which indicates the existence of another enzyme able to compensate for the absence of ADAMTS2 activity. In order to evaluate if ADAMTS14 could be responsible for this compensatory activity, we generated mice deficient for both *Adamts2* and *Adamts14* (TS2^{-/-}/TS14^{-/-}). These doubly deficient mice are viable and displayed initially the same phenotype as TS2^{-/-} mice [13], with a ruffled aspect of their fur, male sterility and severe skin fragility caused by the accumulation of abnormal collagen fibrils in the dermis. Mechanical properties of the skin of the different genotypes were also determined. Elongation and tensile strength at rupture are similar in wild type and TS14^{-/-} mice, while they are strongly and similarly altered in both TS2^{-/-} and TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice. Altogether the data indicate that ADAMTS14 is not involved in procollagen processing *in vivo*, even as a minor and ancillary enzyme, and that other enzymes, potentially meprins [30], can supplement the absence of ADAMTS2 activity.

Unexpectedly, formation of superficial scabs was observed in TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice, occurring mainly in males at a mean age of 13 weeks. Similar lesions were never found neither in TS14^{-/-} mice nor in TS2^{-/-} mice, which indicates that the structural alteration of collagen fibrils and dermal fragility are not involved in this peculiar phenotype. Histological evaluations clearly confirmed that the lesions are always superficial and do not result from dermal damage. Hypertrophic epidermis and hyper-cellularity in the dermis were striking close to the lesions but never observed a few millimeters away where skin seems to remain healthy, suggesting that these features are the consequence and not the primary cause of the epidermal lesions.

ACCEPTED MANUSCRIPT

In human, epidermal alterations are found in several inherited or acquired pathologies, such as epidermolysis bullosa (EB), psoriasis, systemic lupus erythematosus (SLE) and atopic dermatitis (AD). EB is characterized by blistering and erosion of the epidermis and caused by mutations in proteins involved in the formation of the cutaneous basement membrane or in the anchoring of keratinocytes to the basement membrane [28]. However, blisters were never observed in $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice and the basement membrane was shown to be normal by electron microscopy. In psoriasis, the epidermis is hypertrophic and characterized by the presence of an abundant stratum corneum [31], but focal epidermal rupture as seen in $TS2^{+}/TS14^{+}$ skin are not common. Furthermore, stimulation of TLR7 by Imiquimod, a recognized model of induced psoriatic-like skin [32, 33], gave similar alterations in the four genotypes, but did not induce the formation of epidermal lesions similar to those appearing spontaneously in $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice, indicating that the involved pathological mechanisms should be different.

In $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice, the integrity and the efficacy of the epidermal barrier does not seem to be significantly altered, as judged from histological examinations and trans-epidermal water loss (TEWL) measurements. Furthermore, induction of skin dryness and permeability by chemicals did not promote the formation of epidermal lesions, suggesting that dysfunction of the epidermal barrier is not the primary cause of the phenotype. The implication of the immune system was therefore evaluated. Asymptomatic young $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice and their age-matched controls (WT, $TS2^{+}$ and $TS14^{+}$) were used to evaluate a potential immune dysregulation before the occurrence of cutaneous manifestations. FACS analyses indicate that the most consistent differences between $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice and their WT controls were related to T lymphocytes which were more activated and secreted higher levels of IL-2 and IFN γ . Similar trends were also observed for both cytokines in $TS14^{+}$ mice and for IFN γ in $TS2^{+}$ despite the fact that they never develop epidermal lesions. This observation suggests that the absence of these two enzymes has a direct global impact in the regulation of the immune system, and not only at the skin level. Immunohistochemical analyses of non-lesional skin of $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice revealed the presence of immune cells clusters, mainly T lymphocytes, in the dermis or in contact with the epidermis where they seem to induce the apoptosis of keratinocytes and localized epidermal rupture. Altogether, these observations showed that dysregulation of the immune system in $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice precedes and causes the epidermal lesions. However, the primary molecular defect is probably not directly related to the immune system itself since $TS2^{+}/TS14^{+}$ mice grafted with WT immune cells still developed lesions.

T lymphocytes are directly involved in the pathogeny of SLE [34] and AD [35]. SLE is a human immune disease affecting mostly females [36]. A reduction of IL-2 synthesis is

ACCEPTED MANUSCRIPT

considered to be a driver of the disease by allowing a progressive Th17 polarization. A decreased TReg activity is also a key mechanism in the evolution of SLE [34]. In $TS2^+/TS14^+$ mice, TReg are not affected, the synthesis of IL-2 is increased and lesions occur mostly in males, suggesting that these mice do not represent a SLE-like syndrome. AD is a multifactorial and complex syndrome which is more common during childhood, but might affect equally males and females at any age [35]. It involves alterations of the epithelial barrier and activation of the immune system, two mechanisms strengthening each other and progressively leading to the worsening of the phenotype with epidermal eczematous lesions, immune infiltration and inflammation in other organs such as lung and intestine [37]. Although still controversial, AD can be divided in two distinct entities, referred as extrinsic and intrinsic [38]. Extrinsic AD results from immunization to foreign allergens and is characterized by elevated IgE, eosinophilic infiltration and a Th2 response with a high production of IL-4. In most cases, its primary cause is a defect in the epidermal barrier allowing penetration and contacts with allergens. The intrinsic AD is less well defined but an abnormal activation of innate immunity and/or production of autoantibodies against components of the epidermis seem to be involved [38]. In human intrinsic AD the Th2 response is absent, there is no production of IgE and no eosinophilic infiltration, but rather a Th1/Th17/Th22 dominance with a high production of IFN γ [39], which is reminiscent of what is observed in our $TS2^+/TS14^+$ mice.

The reasons why double deficiency in *Adamts2* and *Adamts14* is required to induce epidermal lesions and the nature of molecular mechanisms leading to activation of the immune system are still open questions. Several hypotheses can be made based on our current knowledge about the potential and validated substrates of ADAMTS2 and 14 [40], but also regarding cells which produce them *in vivo*. ADAMTS are secreted enzymes, meaning that they can cleave substrates that are at some distance of the producing cells. ADAMTS2 is mostly expressed by cells of mesenchymal origin (fibroblasts, adipocytes, smooth muscle cells, mesenchymal stem cells) and, to a much lower extent, in some other tissues or cells such as spleen and activated macrophages. Many cell types, such as keratinocytes, do not display any detectable level of expression. ADAMTS14 is similarly distributed as ADAMTS2 but with lower levels of expression. We have recently demonstrated that ADAMTS2 and ADAMTS14 can cleave several factors participating in the TGF β pathway and that inhibition of ADAMTS2 in fibroblasts represses their response to TGF β 1 or TGF β 2 [40]. Since the TGF β pathway and mesenchymal stem cells are both strongly involved in the regulation of several key pathways stimulating or repressing the immune system [41, 42], the hypothesis of their direct implications in the phenotype of the $TS2^+/TS14^+$ mice would be worth to be evaluated in priority. Several factors of the innate immunity such as C1q, ficolins, collectins, adiponectin and mannose binding lectin (MBL) are other potential substrates of ADAMTS2

ACCEPTED MANUSCRIPT

and ADAMTS14, since they contain a "collagen" domain shorter but similar to the triple helical domain found in fibrillar collagens [43], the first identified substrates of ADAMTS2 and 14. Other potential substrates are those containing TSR1 repeats such as propeptin. Different elements hamper a straightforward identification of the substrates responsible for, or at least involved in, the peculiar phenotype in the TS2^{-/-}/TS14^{-/-} mice. These candidate substrates might be expressed at low level or at high level but in a very low number of cells, such as some subtypes of resident or infiltrating immune cells present in the skin, which would prevent their identification from crude extracts and would require specifically dedicated enrichment procedures such as immunoprecipitation. Furthermore, the cleavage of a substrate close to its NH₂- or the COOH-extremities can dramatically change its biological activities without changing significantly its size and its electrophoretic mobility, preventing the identification of such substrates by Western blot. Finally, although the main phenotype is seen in the skin, we cannot exclude that the primary alterations occur in a distant tissue involved in the regulation of the immune system, such as spleen, thymus or bone marrow. In order to overcome all these potential pitfalls, an integrated analysis, which will use different tissue samples, purified enzymes and the cutting edge N-TAILS proteomic analysis [40], is currently being designed, but will go well beyond the objectives of this study.

Here we have demonstrated that ADAMTS2 and ADAMTS14 participate to the regulation of the activation of the immune system and that their simultaneous deficiency lead to an intrinsic atopic dermatitis-like syndrome. This study therefore highlights the existence of critical additional functions for these two enzymes initially described for their role in collagen maturation and matrix biology.

5. Authorship contributions

DL, EG, NB, BF and CA designed the research. DL and EG performed the research with help of CM, MC, LG, JL and DJ. CD participated to the analysis of (immuno)histological sections. TM performed electron microscopy pictures. JC and TJM were involved in the evaluation of the mechanical properties of the skin samples. DL and CA wrote the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

6. Conflicts of interest

Conflicts of Interest: None.

ACCEPTED MANUSCRIPT

7. Acknowledgements

A special thanks to Antoine Heyeres and Lola Vanoorschot for excellent technical assistance. Alain Collge is a "Senior Research Associate" of the FRS-FNRS, and LD is supported by a "Télévie" grant. The supports of the FRS-FNRS (FRSM, T.0183.13), the "Fonds Léon Frédéricq" and the "Centre anti-cancéreux" are also acknowledged. A thanks to Marie-Alix Sauvage, CK Technology, Visé for lending us the Tewameter. A thanks to GIGA-Mouse facility platform of University of Liège.

ACCEPTED MANUSCRIPT

8. References

- [1] Apte SS, Parks WC (2015). Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* May-Jul;44-46:1-6.
- [2] Apte, S. S. (2009). A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 284, 31493-31497.
- [3] Duball J, Apte SS (2015). Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics. *Matrix Biol.* 2015 May-Jul;44-46:24-37
- [4] Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS (2007). The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biol.* Sep;26(7):508-23.
- [5] Vadon-Le Goff S, Hulmes DJ, Moali C (2015). BMP-1/tolloid-like proteinases synchronize matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling. *Matrix Biol.* May-Jul;44-46:14-23
- [6] Collge, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Duball, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapiere, C. M. and Nusgens, B. (2005). Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types III and V. *J Biol Chem* 280, 34397-34408.
- [7] Collge A, Beschin A, Samyn B, Goebels Y, Van Beeumen J, Nusgens BV, Lapière CM (1995). Characterization and partial amino acid sequencing of a 107-kDa procollagen I N-proteinase purified by affinity chromatography on immobilized type XIV collagen. *J Biol Chem.* 270 (28):16724-30.
- [8] Collge A, Li SW, Sieron AL, Nusgens BV, Prockop DJ, Lapière CM (1997). 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 USA* 94 (6):2374-9.
- [9] Prockop DJ, Sieron AL, Li SW (1998). Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol.* 16 (7):399-408.
- [10] Fernandes, R.J., Hirohata, S., Engle, J.M., Collge, A., Cohn, D.H., Eyre, D.R. and Apte, S.S. (2001). Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *J Biol Chem.* 276, 31502-9.
- [11] Collge, A., Sieron, A. L., Li, S. W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilcox, W., Krakow, D., Cohn, D. H., Reardon, W. et al. (1999). Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am J Hum Genet* 65, 308-317.
- [12] Collge, A., Nuytink, L., Hausser, I., van Essen, A. J., Thiry, M., Herens, C., Ades, L. C., Malfait, F., Paepé, A. D., Franck, P. et al. (2004). Novel types of mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIc) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene. *J Invest Dermatol* 123, 656-663.
- [13] Li, S. W., Arita, M., Fertala, A., Bao, Y., Kopen, G. C., Langsjö, T. K., Hyttinen, M. M., Helminen, H. J. and Prockop, D. J. (2001). Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *Biochem J* 355, 271-278.
- [14] Collge, A., Vandenberghe, I., Thiry, M., Lambert, C. A., Van Beeumen, J., Li, S. W., Prockop, D. J., Lapiere, C. M. and Nusgens, B. V. (2002). Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J Biol Chem* 277, 5756-5766.
- [15] Le Goff, C., Somerville, R. P., Kesteloot, F., Powell, K., Birk, D. E., Collge, A. C. and Apte, S. S. (2006). Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: Insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. *Development* 133, 1587-1596.
- [16] Kesteloot, F., Desmoulière, A., Leclercq, I., Thiry, M., Arrese, J.E., Prockop, D.J., Lapière, C.M., Nusgens, B.V. and Collge, A. (2007). ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 2 inactivation reduces the extent and stability of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Hepatology 46, 1620-31.

[17] Janssen, L., Dupont, L., Bekhouche, M., Noel, A., Leduc, C., Voz, M., Peers, B., Cataldo, D., Apte, SS., Dubail, J. and Collge, A. (2015). ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. *Angiogenesis*, 19, 53-65.

[18] Jeltsch, M., Jha, SK., Tvorogov, D., Anisimov, A., Leppänen, VM., Holopainen, T., Kivela, R., Ortega, S., Kärpänen, T. and Aitalo, K. (2014) CCBE1 enhances lymphangiogenesis via ADAMTS3-mediated VEGF-C activation. *Circulation* 129, 1962–1971.

[19] Brouillard, P., Dupont, L., Helaers, R., Coulle, R., Tiller, GE., Feeden, J., Collge, A. and Vilkki, M. (2017) Loss of ADAMTS3 activity causes Hennekam lymphangiectasia-lymphedema syndrome 3. *Hum Mol Genet.* 21, 4095-4104.

[20] Goertsches, R., Comabella, M., Navarro, A., Perkal, H. and Montalban, X. (2005). Genetic association between polymorphisms in the ADAMTS14 gene and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 164, 140-7.

[21] Rodriguez-Lopez, J., Pombo-Suarez, M., Loughlin, J., Tsezou, A., Blanco, F.J., Meulenbelt, I., Slagboom, PE., Valdes, AM., Spector, TD., Gomez-Reino, JJ. and Gonzalez, A. (2009). Association of a rsSNP in ADAMTS14 to some osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthr Cartilage* 17, 321-7.

[22] Dubail, J., Kesteloot, F., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J. M., Lapiere, C., Nusgens, B. and Collge, A. (2010). ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. *Cell Mol Life Sci* 67, 4213-4232.

[23] Hofer, TP., Frankenberger, M., Mages, J., Lang, R., Meyer, P., Hoffmann, R., Collge, A. and Ziegler-Heitbrock, L. (2008). Tissue-specific induction of ADAMTS2 in monocytes and macrophages by glucocorticoids. *J Mol Med* 86, 323-32.

[24] Arning, A., Hiersche, M., Witten, A., Kurlemann, G., Kumik, K., Manner, D., Stoll, M. and Nowak-Gottl, U. (2012). A genome-wide association study identifies a gene network of ADAMTS genes in the predisposition to pediatric stroke. *Blood* 120, 5231-5236.

[25] Lee, CW., Hwang, I., Park, CS., Lee, H., Park, DW., Kang, SJ., Lee, SW., Kim, YH., Park, SW. and Park, SJ. (2012). Expression of ADAMTS-2, -3, -13, and -14 in culprit coronary lesions in patients with acute myocardial infarction or stable angina. *J Thromb Thrombolysis* 33, 362-70.

[26] Shigeoka, T., Kawachi, M. and Ishida, Y. (2005). Suppression of nonsense-mediated mRNA decay permits unbiased gene trapping in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 33, e20.

[27] Le Goff C, Morice-Picard F, Dagonneau N, Wang LW, Perrot C, Crow YJ, Bauer F, Flori E, Prost-Squandroni C, Krakow D, Ge G, Greenspan DS, Bonnet D, Le Merrer M, Munnich A, Apte SS, Comier-Daire V. (2008). ADAMTS2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat Genet* 40, 1119-23.

[28] Uitto J, Has C, Vahidnezhad H, Yousefian L, Bruckner-Tuderman L (2017). Molecular pathology of the basement membrane zone in heritable blistering diseases: The paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix Biology* 57–58, 76-83

[29] Bekhouche, M. and Collge, A. (2015). The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biol* 44-46, 46-53.

[30] Prox J, Arnold P, Becker-Pauly C (2015). Mepripin α and mepripin β : Procollagen proteinases in health and disease. *Matrix Biol.* May-Jul;44-46:7-13

[31] Di Meglio, P., Villanova, F. and Nestle, FO. (2014). Psoriasis. *CSH Perspect Med.* 8, 1-4.

[32] van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, JS., Kant, M., Boon, L., Laman, JD., Cornelissen, F., Mus, AM., Floencia, E., Prens, EP. and Lubberts, E. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* 182, 5836–5845.

[33] Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, VR., Zhang, HG., Wang, T., Zheng, J. and Yan, J. (2011). Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity* 35, 596–610.

[34] Kaul, A., Gordon, C., Crow, MK., Touma, Z., Urowitz, MB., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G. and Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers* 2, n° 16039.

[35] Levin, J., Fallon Friedlander, S. and Del Rosso, JQ. (2013). Atopic Dermatitis and the Stratum

ACCEPTED MANUSCRIPT

Comeum: Part 3: The Immune System In Atopic Dermatitis. *J Clin Aesthet Dermatol.* 6, 37–44.

[36] Somers, EC., Marder, W., Cagnoli, P., Lewis, EE., DeGulre, P., Gordon, C., Helmick, CG., Wang, L., Wing, JJ., Dhar, JP., Leisen, J., Shaltis, D. and McCune, WJ. (2014). Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance program. *Arthritis Rheumatol* 66, 369–378.

[37] Bleber, T. (2008). Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 358, 1483–94.

[38] Tokura, Y. (2010). Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 58, 1-7.

[39] Eyerich, K. and Novak, N. (2013). Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy.* 68, 974-82.

[40] Bekhouche, M., Leduc, C., Dupont, L., Janssen, L., Deloime, F., Vadon-Le Goff, S., Smargliasso, N., Balwir, D., Mazzucchelli, G., Zanella-Cleon, I., Dubail, J., De Pauw, E., Nusgens, B., Hulmés, DJ, Moall, C, and Colige, A. (2016). Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets. *FASEB J* 30, 1741-56.

[41] Li, N. and Hua, J. (2017). Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci* 74, 2345-2360.

[42] Komai, T., Inoue, M., Morita, K., Okamura, T. and Yamamoto, K. (2016). Revisiting the regulatory roles of the TGF- β family of cytokines. *Autoimmun Rev.* 15, 917-22.

[43] Myllyharju, J. and Kivirikko, K. I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20, 33-43.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Highlights

- Based on *in vitro* studies, ADAMTS14 was thought to be an aminoprocollagen peptidase.
- We show that ADAMTS14 does not have aminoprocollagen peptidase activity *in vivo*.
- Mice deficient for both ADAMTS2 and ADAMTS14 spontaneously develop epidermal lesions.
- ADAMTS2 and ADAMTS14 participate in the regulation of the immune system.
- The absence of both ADAMTS2 and ADAMTS14 leads to an atopic dermatitis-like phenotype.

ACCEPTED MANUSCRIPT

PARTIE 7 : BIBLIOGRAPHIE

- Abbaszade, I., Liu, R.Q., Yang, F., Rosenfeld, S.A., Ross, O.H., Link, J.R., Ellis, D.M., Tortorella, M.D., Pratta, M.A., Hollis, J.M., *et al.* (1999). Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *The Journal of biological chemistry* 274, 23443-23450.
- Adams, J.C., and Lawler, J. (2011). The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a009712.
- Ahram, D., Sato, T.S., Kohilan, A., Tayeh, M., Chen, S., Leal, S., Al-Salem, M., and El-Shanti, H. (2009). A homozygous mutation in ADAMTSL4 causes autosomal-recessive isolated ectopia lentis. *Am J Hum Genet* 84, 274-278.
- Ai, J., Smith, P., Wang, S., Zhang, P., and Zheng, X.L. (2005). The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J Biol Chem* 280, 29428-29434.
- Akl, M.R., Nagpal, P., Ayoub, N.M., Prabhu, S.A., Gliksman, M., Tai, B., Hatipoglu, A., Goy, A., and Suh, K.S. (2015). Molecular and clinical profiles of syndecan-1 in solid and hematological cancer for prognosis and precision medicine. *Oncotarget* 6, 28693-28715.
- Alonso, S., Gonzalez, B., Ruiz-Larroya, T., Duran Dominguez, M., Kato, T., Matsunaga, A., Suzuki, K., Strongin, A.Y., Gimenez-Bonafe, P., and Perucho, M. (2015). Epigenetic inactivation of the extracellular matrix metalloproteinase ADAMTS19 gene and the metastatic spread in colorectal cancer. *Clin Epigenetics* 7, 124.
- Anderson, N.L., and Anderson, N.G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1, 845-867.
- Ansorge, H.L., Meng, X., Zhang, G., Veit, G., Sun, M., Klement, J.F., Beason, D.P., Soslowsky, L.J., Koch, M., and Birk, D.E. (2009). Type XIV Collagen Regulates Fibrillogenesis: PREMATURE COLLAGEN FIBRIL GROWTH AND TISSUE DYSFUNCTION IN NULL MICE. *J Biol Chem* 284, 8427-8438.
- Apte, S.S. (2009). A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 284, 31493-31497.
- Arning, A., Hiersche, M., Witten, A., Kurlemann, G., Kurnik, K., Manner, D., Stoll, M., and Nowak-Gottl, U. (2012). A genome-wide association study identifies a gene network of ADAMTS genes in the predisposition to pediatric stroke. *Blood* 120, 5231-5236.
- Arning, A., Jeibmann, A., Kohnemann, S., Brokinkel, B., Ewelt, C., Berger, K., Wellmann, J., Nowak-Gottl, U., Stummer, W., Stoll, M., *et al.* (2016). ADAMTS genes and the risk of cerebral aneurysm. *J Neurosurg* 125, 269-274.
- auf dem Keller, U., and Overall, C.M. (2012). CLIPPER: an add-on to the Trans-Proteomic Pipeline for the automated analysis of TAILS N-terminomics data. *Biol Chem* 393, 1477-1483.
- auf dem Keller, U., Prudova, A., Eckhard, U., Fingleton, B., and Overall, C.M. (2013). Systems-level analysis of proteolytic events in increased vascular permeability and complement activation in skin inflammation. *Sci Signal* 6, rs2.
- Bader, H.L., Wang, L.W., Ho, J.C., Tran, T., Holden, P., Fitzgerald, J., Atit, R.P., Reinhardt, D.P., and Apte, S.S. (2012). 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* 31, 398-411.
- Bai, X.H., Wang, D.W., Kong, L., Zhang, Y., Luan, Y., Kobayashi, T., Kronenberg, H.M., Yu, X.P., and Liu, C.J. (2009a). ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. *Mol Cell Biol* 29, 4201-4219.
- Bai, X.H., Wang, D.W., Luan, Y., Yu, X.P., and Liu, C.J. (2009b). Regulation of chondrocyte differentiation by ADAMTS-12 metalloproteinase depends on its enzymatic activity. *Cell Mol Life Sci* 66, 667-680.
- Bakhtiar, R., and Tse, F.L. (2000). Biological mass spectrometry: a primer. *Mutagenesis* 15, 415-430.

- Ball, D.K., Rachfal, A.W., Kemper, S.A., and Brigstock, D.R. (2003). The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion. *J Endocrinol* 176, R1-7.
- Ball, D.K., Surveyor, G.A., Diehl, J.R., Steffen, C.L., Uzumcu, M., Mirando, M.A., and Brigstock, D.R. (1998). Characterization of 16- to 20-kilodalton (kDa) connective tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings. *Biol Reprod* 59, 828-835.
- Barrett, A., Rawlings, N., and Woessner, F. (2012). *Handbook of Proteolytic Enzymes* Academic London.
- Beck, F., Burkhart, J.M., Geiger, J., Zahedi, R.P., and Sickmann, A. (2012). Robust workflow for iTRAQ-based peptide and protein quantification. *Methods Mol Biol* 893, 101-113.
- Becker-Pauly, C., Barre, O., Schilling, O., Auf dem Keller, U., Ohler, A., Broder, C., Schutte, A., Kappelhoff, R., Stocker, W., and Overall, C.M. (2011). Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol Cell Proteomics* 10, M111 009233.
- Beighton, P., De Paepe, A., Steinmann, B., Tsipouras, P., and Wenstrup, R.J. (1998). Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet* 77, 31-37.
- Bekhouche, M., and Colige, A. (2015). The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biol* 44-46, 46-53.
- Bekhouche, M., Kronenberg, D., Vadon-Le Goff, S., Bijakowski, C., Lim, N.H., Font, B., Kessler, E., Colige, A., Nagase, H., Murphy, G., *et al.* (2010). Role of the netrin-like domain of procollagen C-proteinase enhancer-1 in the control of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* 285, 15950-15959.
- Bekhouche, M., Leduc, C., Dupont, L., Janssen, L., Delolme, F., Vadon-Le Goff, S., Smargiasso, N., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., Zanella-Cleon, I., *et al.* (2016). 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* 30, 1741-1756.
- Bengtsson, E., Morgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegard, D., and Aspberg, A. (2002). The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. *J Biol Chem* 277, 15061-15068.
- Birk, D.E. (2001). Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 32, 223-237.
- Blacher, S., Jost, M., Melen-Lamalle, L., Lund, L.R., Romer, J., Foidart, J.M., and Noel, A. (2008). Quantification of in vivo tumor invasion and vascularization by computerized image analysis. *Microvasc Res* 75, 169-178.
- Blelloch, R., and Kimble, J. (1999). Control of organ shape by a secreted metalloprotease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 399, 586-590.
- Boivin, W.A., Shackelford, M., Vanden Hoek, A., Zhao, H., Hackett, T.L., Knight, D.A., and Granville, D.J. (2012). Granzyme B cleaves decorin, biglycan and soluble betaglycan, releasing active transforming growth factor-beta1. *PLoS One* 7, e33163.
- Bolz, H., Ramirez, A., von Brederlow, B., and Kubisch, C. (2001). Characterization of ADAMTS14, a novel member of the ADAMTS metalloproteinase family. *Biochim Biophys Acta* 1522, 221-225.
- Bonaldo, P., Braghetta, P., Zanetti, M., Piccolo, S., Volpin, D., and Bressan, G.M. (1998). Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: an animal model for Bethlem myopathy. *Hum Mol Genet* 7, 2135-2140.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 786-801.

- Bonnemann, C.G. (2011). The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. *Nat Rev Neurol* 7, 379-390.
- Bork, P., and Beckmann, G. (1993). The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 231, 539-545.
- Brkic, M., Balusu, S., Libert, C., and Vandenbroucke, R.E. (2015). Friends or Foes: Matrix Metalloproteinases and Their Multifaceted Roles in Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm* 2015, 620581.
- Brodsky, B., and Persikov, A.V. (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem* 70, 301-339.
- Bruckner, P. (2010). Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res* 339, 7-18.
- Cain, S.A., Mularczyk, E.J., Singh, M., Massam-Wu, T., and Kielty, C.M. (2016). ADAMTS-10 and -6 differentially regulate cell-cell junctions and focal adhesions. *Sci Rep* 6, 35956.
- Cal, S., Arguelles, J.M., Fernandez, P.L., and Lopez-Otin, C. (2001). Identification, characterization, and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats. *The Journal of biological chemistry* 276, 17932-17940.
- Cal, S., Obaya, A.J., Llamazares, M., Garabaya, C., Quesada, V., and Lopez-Otin, C. (2002). Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 283, 49-62.
- Campbell, I.D., and Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Canals, F., Colome, N., Ferrer, C., Plaza-Calonge Mdel, C., and Rodriguez-Manzaneque, J.C. (2006). Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. *Proteomics* 6 Suppl 1, S28-35.
- Cardoso, H.J., Figueira, M.I., and Socorro, S. (2017). The stem cell factor (SCF)/c-KIT signalling in testis and prostate cancer. *Journal of cell communication and signaling* 11, 297-307.
- Carragher, N.O., and Frame, M.C. (2004). Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 14, 241-249.
- Chang, W., Barnes, A.M., Cabral, W.A., Bodurtha, J.N., and Marini, J.C. (2010). Prolyl 3-hydroxylase 1 and CRTAP are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. *Hum Mol Genet* 19, 223-234.
- Chen, S.H., Chen, C.R., Chen, S.H., Li, D.T., and Hsu, J.L. (2013). Improved N(alpha)-acetylated peptide enrichment following dimethyl labeling and SCX. *J Proteome Res* 12, 3277-3287.
- Chiquet, M., Renedo, A.S., Huber, F., and Fluck, M. (2003). How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 22, 73-80.
- Cho, J., and Mosher, D.F. (2006). Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* 4, 1461-1469.
- Choi, G.C., Li, J., Wang, Y., Li, L., Zhong, L., Ma, B., Su, X., Ying, J., Xiang, T., Rha, S.Y., *et al.* (2014). The metalloprotease ADAMTS8 displays antitumor properties through antagonizing EGFR-MEK-ERK signaling and is silenced in carcinomas by CpG methylation. *Mol Cancer Res* 12, 228-238.
- Christin-Maitre, S., and Tachdjian, G. (2010). Genome-wide association study and premature ovarian failure. *Ann Endocrinol (Paris)* 71, 218-221.
- Cicha, I., and Goppelt-Struebe, M. (2009). Connective tissue growth factor: context-dependent functions and mechanisms of regulation. *Biofactors* 35, 200-208.

- Colaert, N., Helsens, K., Martens, L., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2009). Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. *Nat Methods* 6, 786-787.
- Colige, A., Beschin, A., Samyn, B., Goebels, Y., Van Beeumen, J., Nusgens, B.V., and Lapiere, C.M. (1995). Characterization and partial amino acid sequencing of a 107-kDa procollagen I N-proteinase purified by affinity chromatography on immobilized type XIV collagen. *J Biol Chem* 270, 16724-16730.
- Colige, A., Li, S.W., Sieron, A.L., Nusgens, B.V., Prockop, D.J., and Lapiere, C.M. (1997). 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.
- Colige, A., Nuytinck, L., Hausser, I., van Essen, A.J., Thiry, M., Herens, C., Ades, L.C., Malfait, F., Paepe, A.D., Franck, P., *et al.* (2004). Novel types of mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIC) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene. *J Invest Dermatol* 123, 656-663.
- Colige, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Dubail, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapiere, C.M., and Nusgens, B. (2005). Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *The Journal of biological chemistry* 280, 34397-34408.
- Colige, A., Sieron, A.L., Li, S.W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilcox, W., Krakow, D., Cohn, D.H., Reardon, W., *et al.* (1999). Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am J Hum Genet* 65, 308-317.
- Colige, A., Vandenberghe, I., Thiry, M., Lambert, C.A., Van Beeumen, J., Li, S.W., Prockop, D.J., Lapiere, C.M., and Nusgens, B.V. (2002). Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J Biol Chem* 277, 5756-5766.
- Collins-Racie, L.A., Flannery, C.R., Zeng, W., Corcoran, C., Annis-Freeman, B., Agostino, M.J., Arai, M., DiBlasio-Smith, E., Dorner, A.J., Georgiadis, K.E., *et al.* (2004). ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 23, 219-230.
- Comoglio, P.M., Boccaccio, C., and Trusolino, L. (2003). Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol* 15, 565-571.
- Dancevic, C.M., Fraser, F.W., Smith, A.D., Stupka, N., Ward, A.C., and McCulloch, D.R. (2013). Biosynthesis and expression of a disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin-1 repeats-15: a novel versican-cleaving proteoglycanase. *J Biol Chem* 288, 37267-37276.
- Das, D.S., Wadhwa, N., Kunj, N., Sarda, K., Pradhan, B.S., and Majumdar, S.S. (2013). Dickkopf homolog 3 (DKK3) plays a crucial role upstream of WNT/beta-CATENIN signaling for Sertoli cell mediated regulation of spermatogenesis. *PLoS One* 8, e63603.
- De Maeyer, B., De Meyer, S.F., Feys, H.B., Pareyn, I., Vandeputte, N., Deckmyn, H., and Vanhoorelbeke, K. (2010). The distal carboxyterminal domains of murine ADAMTS13 influence proteolysis of platelet-decorated VWF strings in vivo. *J Thromb Haemost* 8, 2305-2312.
- Delolme, F., Anastasi, C., Alcaraz, L.B., Mendoza, V., Vadon-Le Goff, S., Talantikite, M., Capomaccio, R., Mevaere, J., Fortin, L., Mazzocut, D., *et al.* (2015). Proteolytic control of TGF-beta co-receptor activity by BMP-1/tolloid-like proteases revealed by quantitative iTRAQ proteomics. *Cell Mol Life Sci* 72, 1009-1027.
- Deroanne, C.F., Lapiere, C.M., and Nusgens, B.V. (2001). In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovasc Res* 49, 647-658.

- Desir, J., Sznajder, Y., Depasse, F., Roulez, F., Schrooyen, M., Meire, F., and Abramowicz, M. (2010). LTBP2 null mutations in an autosomal recessive ocular syndrome with megalocornea, spherophakia, and secondary glaucoma. *Eur J Hum Genet* 18, 761-767.
- Dickinson, S.C., Vankemmelbeke, M.N., Buttle, D.J., Rosenberg, K., Heinegard, D., and Hollander, A.P. (2003). Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 22, 267-278.
- Domogatskaya, A., Rodin, S., and Tryggvason, K. (2012). Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 523-553.
- Dong, C., Li, H.J., Chang, S., Liao, H.J., Zhang, Z.P., Huang, P., and Tang, H.H. (2013). A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin Motif 2 May Contribute to Cirrhosis in Humans through the Transforming Growth Factor-beta/SMAD Pathway. *Gut Liver* 7, 213-220.
- Doucet, A., and Overall, C.M. (2008). Protease proteomics: revealing protease in vivo functions using systems biology approaches. *Mol Aspects Med* 29, 339-358.
- Dubail, J., and Apte, S.S. (2015). Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics. *Matrix Biol* 44-46, 24-37.
- Dubail, J., Aramaki-Hattori, N., Bader, H.L., Nelson, C.M., Katebi, N., Matuska, B., Olsen, B.R., and Apte, S.S. (2014). A new Adamts9 conditional mouse allele identifies its non-redundant role in interdigital web regression. *Genesis* 52, 702-712.
- Dubail, J., Kesteloot, F., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J.M., Lapiere, C., Nusgens, B., and Colige, A. (2010). ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. *Cell Mol Life Sci* 67, 4213-4232.
- Dunn, J.R., Reed, J.E., du Plessis, D.G., Shaw, E.J., Reeves, P., Gee, A.L., Warnke, P., and Walker, C. (2006). Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours. *Br J Cancer* 94, 1186-1193.
- Dupont, L., Ehx, G., Chantry, M., Monseur, C., Leduc, C., Janssen, L., Cataldo, D., Thiry, M., Jerome, C., Thomassin, J.M., *et al.* (2018). Spontaneous atopic dermatitis due to immune dysregulation in mice lacking Adamts2 and 14. *Matrix Biol*.
- Dupuis, L.E., McCulloch, D.R., McGarity, J.D., Bahan, A., Wessels, A., Weber, D., Diminich, A.M., Nelson, C.M., Apte, S.S., and Kern, C.B. (2011). Altered versican cleavage in ADAMTS5 deficient mice; a novel etiology of myxomatous valve disease. *Dev Biol* 357, 152-164.
- Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res* 339, 259-268.
- Eckhard, U., Huesgen, P.F., Schilling, O., Bellac, C.L., Butler, G.S., Cox, J.H., Dufour, A., Goebeler, V., Kappelhoff, R., Auf dem Keller, U., *et al.* (2016a). Active site specificity profiling datasets of matrix metalloproteinases (MMPs) 1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 and 14. *Data Brief* 7, 299-310.
- Eckhard, U., Huesgen, P.F., Schilling, O., Bellac, C.L., Butler, G.S., Cox, J.H., Dufour, A., Goebeler, V., Kappelhoff, R., Keller, U.A., *et al.* (2016b). Active site specificity profiling of the matrix metalloproteinase family: Proteomic identification of 4300 cleavage sites by nine MMPs explored with structural and synthetic peptide cleavage analyses. *Matrix Biol* 49, 37-60.
- Eckhard, U., Marino, G., Abbey, S.R., Tharmarajah, G., Matthew, I., and Overall, C.M. (2015). The Human Dental Pulp Proteome and N-Terminome: Levering the Unexplored Potential of Semitryptic Peptides Enriched by TAILS to Identify Missing Proteins in the Human Proteome Project in Underexplored Tissues. *J Proteome Res* 14, 3568-3582.
- Eckhard, U., Marino, G., Butler, G.S., and Overall, C.M. (2016c). Positional proteomics in the era of the human proteome project on the doorstep of precision medicine. *Biochimie* 122, 110-118.
- Edwards, I.J. (2012). Proteoglycans in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 9, 196-206.

- El Hour, M., Moncada-Pazos, A., Blacher, S., Masset, A., Cal, S., Berndt, S., Detilleux, J., Host, L., Obaya, A.J., Maillard, C., *et al.* (2010). Higher sensitivity of Adamts12-deficient mice to tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 29, 3025-3032.
- El Khoury, L., Posthumus, M., Collins, M., Handley, C.J., Cook, J., and Raleigh, S.M. (2013). Polymorphic variation within the ADAMTS2, ADAMTS14, ADAMTS5, ADAM12 and TIMP2 genes and the risk of Achilles tendon pathology: a genetic association study. *J Sci Med Sport* 16, 493-498.
- Enomoto, H., Nelson, C.M., Somerville, R.P., Mielke, K., Dixon, L.J., Powell, K., and Apte, S.S. (2010). Cooperation of two ADAMTS metalloproteases in closure of the mouse palate identifies a requirement for versican proteolysis in regulating palatal mesenchyme proliferation. *Development* 137, 4029-4038.
- Fallas, J.A., Gauba, V., and Hartgerink, J.D. (2009). Solution structure of an ABC collagen heterotrimer reveals a single-register helix stabilized by electrostatic interactions. *The Journal of biological chemistry* 284, 26851-26859.
- Fernandes, R.J., Hirohata, S., Engle, J.M., Colige, A., Cohn, D.H., Eyre, D.R., and Apte, S.S. (2001). Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *The Journal of biological chemistry* 276, 31502-31509.
- Finehout, E.J., and Lee, K.H. (2004). An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochem Mol Biol Educ* 32, 93-100.
- Flannery, C.R., Zeng, W., Corcoran, C., Collins-Racie, L.A., Chockalingam, P.S., Hebert, T., Mackie, S.A., McDonagh, T., Crawford, T.K., Tomkinson, K.N., *et al.* (2002). Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites. *The Journal of biological chemistry* 277, 42775-42780.
- Fontanil, T., Rua, S., Llamazares, M., Moncada-Pazos, A., Quiros, P.M., Garcia-Suarez, O., Vega, J.A., Sasaki, T., Mohamedi, Y., Esteban, M.M., *et al.* (2014). Interaction between the ADAMTS-12 metalloprotease and fibulin-2 induces tumor-suppressive effects in breast cancer cells. *Oncotarget* 5, 1253-1264.
- Fortelny, N., Yang, S., Pavlidis, P., Lange, P.F., and Overall, C.M. (2015). Proteome TopFIND 3.0 with TopFINDER and PathFINDER: database and analysis tools for the association of protein termini to pre- and post-translational events. *Nucleic Acids Res* 43, D290-297.
- Fushimi, K., Troeberg, L., Nakamura, H., Lim, N.H., and Nagase, H. (2008). Functional differences of the catalytic and non-catalytic domains in human ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in aggrecanolytic activity. *The Journal of biological chemistry* 283, 6706-6716.
- Gabriel, L.A., Wang, L.W., Bader, H., Ho, J.C., Majors, A.K., Hollyfield, J.G., Traboulsi, E.I., and Apte, S.S. (2012). ADAMTSL4, a secreted glycoprotein widely distributed in the eye, binds fibrillin-1 microfibrils and accelerates microfibril biogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 461-469.
- Gao, G., Plaas, A., Thompson, V.P., Jin, S., Zuo, F., and Sandy, J.D. (2004). ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1. *The Journal of biological chemistry* 279, 10042-10051.
- Gao, S., De Geyter, C., Kossowska, K., and Zhang, H. (2007). FSH stimulates the expression of the ADAMTS-16 protease in mature human ovarian follicles. *Mol Hum Reprod* 13, 465-471.
- Ge, G., Seo, N.S., Liang, X., Hopkins, D.R., Hook, M., and Greenspan, D.S. (2004). Bone morphogenetic protein-1/tolloid-related metalloproteinases process osteoglycin and enhance its ability to regulate collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem* 279, 41626-41633.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 793-805.

- Geiger, B., and Yamada, K.M. (2011). Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Gelse, K., Poschl, E., and Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1531-1546.
- Gendron, C., Kashiwagi, M., Lim, N.H., Enghild, J.J., Thogersen, I.B., Hughes, C., Caterson, B., and Nagase, H. (2007). Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. *The Journal of biological chemistry* 282, 18294-18306.
- George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H., and Hynes, R.O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119, 1079-1091.
- Gerecke, D.R., Meng, X., Liu, B., and Birk, D.E. (2003). Complete primary structure and genomic organization of the mouse Col14a1 gene. *Matrix Biol* 22, 209-216.
- Gerhardt, S., Hassall, G., Hawtin, P., McCall, E., Flavell, L., Minshull, C., Hargreaves, D., Ting, A., Pauptit, R.A., Parker, A.E., *et al.* (2007). Crystal structures of human ADAMTS-1 reveal a conserved catalytic domain and a disintegrin-like domain with a fold homologous to cysteine-rich domains. *Journal of molecular biology* 373, 891-902.
- Gevaert, K., Goethals, M., Martens, L., Van Damme, J., Staes, A., Thomas, G.R., and Vandekerckhove, J. (2003). Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat Biotechnol* 21, 566-569.
- Gevaert, K., Van Damme, P., Ghesquiere, B., Impens, F., Martens, L., Helsens, K., and Vandekerckhove, J. (2007). A la carte proteomics with an emphasis on gel-free techniques. *Proteomics* 7, 2698-2718.
- Giebeler, N., and Zigrino, P. (2016). A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins (Basel)* 8, 122.
- Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B., Blanchet, T., Ma, H.L., Flannery, C.R., Peluso, D., Kanki, K., Yang, Z., *et al.* (2005). Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 434, 644-648.
- Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B.A., Blanchet, T., Ma, H.L., Flannery, C.R., Kanki, K., Wang, E., Peluso, D., *et al.* (2004). Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum* 50, 2547-2558.
- Goertsches, R., Comabella, M., Navarro, A., Perkal, H., and Montalban, X. (2005). Genetic association between polymorphisms in the ADAMTS14 gene and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 164, 140-147.
- Gomis-Ruth, F.X. (2009). Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem* 284, 15353-15357.
- Gordon, M.K., and Hahn, R.A. (2010). Collagens. *Cell Tissue Res* 339, 247-257.
- Greenspan, D.S. (2005). Biosynthetic processing of collagen molecules, Vol 247.
- Gross, J., and Lapiere, C.M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48, 1014-1022.
- Halfter, W., Oertle, P., Monnier, C.A., Camenzind, L., Reyes-Lua, M., Hu, H., Candiello, J., Labilloy, A., Balasubramani, M., Henrich, P.B., *et al.* (2015). New concepts in basement membrane biology. *FEBS J* 282, 4466-4479.
- Hassoun, E., Safrin, M., Ziv, H., Pri-Chen, S., and Kessler, E. (2016). Procollagen C-Proteinase Enhancer 1 (PCPE-1) as a Plasma Marker of Muscle and Liver Fibrosis in Mice. *PLoS One* 11, e0159606.
- Held-Feindt, J., Paredes, E.B., Blomer, U., Seidenbecher, C., Stark, A.M., Mehdorn, H.M., and Mentlein, R. (2006). Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *Int J Cancer* 118, 55-61.

- Hills, R., Mazzarella, R., Fok, K., Liu, M., Nemirovskiy, O., Leone, J., Zack, M.D., Arner, E.C., Viswanathan, M., Abujoub, A., *et al.* (2007). Identification of an ADAMTS-4 cleavage motif using phage display leads to the development of fluorogenic peptide substrates and reveals matrilin-3 as a novel substrate. *The Journal of biological chemistry* 282, 11101-11109.
- Hjorten, R., Hansen, U., Underwood, R.A., Telfer, H.E., Fernandes, R.J., Krakow, D., Sebald, E., Wachsmann-Hogiu, S., Bruckner, P., Jacquet, R., *et al.* (2007). Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone* 41, 535-542.
- Hoffmann, E.d., and Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry : Principles and applications*. John Wiley & Sons, Ltd Chichester.
- Hubmacher, D., and Apte, S.S. (2015). ADAMTS proteins as modulators of microfibril formation and function. *Matrix Biol* 47, 34-43.
- Hubmacher, D., Schneider, M., Berardinelli, S.J., Takeuchi, H., Willard, B., Reinhardt, D.P., Haltiwanger, R.S., and Apte, S.S. (2017). Unusual life cycle and impact on microfibril assembly of ADAMTS17, a secreted metalloprotease mutated in genetic eye disease. *Sci Rep* 7, 41871.
- Huesgen, P.F., and Overall, C.M. (2012). N- and C-terminal degradomics: new approaches to reveal biological roles for plant proteases from substrate identification. *Physiol Plant* 145, 5-17.
- Hulin, A., Deroanne, C.F., Lambert, C.A., Dumont, B., Castronovo, V., Defraigne, J.O., Nusgens, B.V., Radermecker, M.A., and Colige, A.C. (2012). Metallothionein-dependent up-regulation of TGF-beta2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve. *Cardiovasc Res* 93, 480-489.
- Hurskainen, T.L., Hirohata, S., Seldin, M.F., and Apte, S.S. (1999). ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. *The Journal of biological chemistry* 274, 25555-25563.
- Inagaki, J., Takahashi, K., Ogawa, H., Asano, K., Faruk Hatipoglu, O., Cilek, M.Z., Obika, M., Ohtsuki, T., Hofmann, M., Kusachi, S., *et al.* (2014). ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor. *Exp Cell Res* 323, 263-275.
- Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 42, 11-55.
- Itoh, Y. (2015). Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol* 44-46, 207-223.
- Janssen, L., Dupont, L., Bekhouche, M., Noel, A., Leduc, C., Voz, M., Peers, B., Cataldo, D., Apte, S.S., Dubail, J., *et al.* (2016). ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. *Angiogenesis* 19, 53-65.
- Jeltsch, M., Jha, S.K., Tvorogov, D., Anisimov, A., Leppanen, V.M., Holopainen, T., Kivela, R., Ortega, S., Karpanen, T., and Alitalo, K. (2014). CCBE1 enhances lymphangiogenesis via A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-3-mediated vascular endothelial growth factor-C activation. *Circulation* 129, 1962-1971.
- Jones, G.C., and Riley, G.P. (2005). ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, 160-169.
- Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., and Boot-Handford, R.P. (2007). Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120, 1955-1958.
- Kalamajski, S., and Oldberg, A. (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol* 29, 248-253.
- Kalchishkova, N., Furst, C.M., Heinegard, D., and Blom, A.M. (2011). NC4 Domain of cartilage-specific collagen IX inhibits complement directly due to attenuation of membrane attack formation and indirectly through binding and enhancing activity of complement inhibitors C4B-binding protein and factor H. *J Biol Chem* 286, 27915-27926.

- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 16, 582-598.
- Kashiwagi, M., Enghild, J.J., Gendron, C., Hughes, C., Caterson, B., Itoh, Y., and Nagase, H. (2004). Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing. *The Journal of biological chemistry* 279, 10109-10119.
- Kawano, Y., Kitaoka, M., Hamada, Y., Walker, M.M., Waxman, J., and Kypka, R.M. (2006). Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3. *Oncogene* 25, 6528-6537.
- Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74, 5383-5392.
- Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G.N., and Edwards, D.R. (2015a). The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol* 16, 113.
- Kelwick, R., Wagstaff, L., Decock, J., Roghi, C., Cooley, L.S., Robinson, S.D., Arnold, H., Gavrilovic, J., Jaworski, D.M., Yamamoto, K., *et al.* (2015b). Metalloproteinase-dependent and -independent processes contribute to inhibition of breast cancer cell migration, angiogenesis and liver metastasis by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-15. *Int J Cancer* 136, E14-26.
- Kern, C.B., Wessels, A., McGarity, J., Dixon, L.J., Alston, E., Argraves, W.S., Geeting, D., Nelson, C.M., Menick, D.R., and Apte, S.S. (2010). Reduced versican cleavage due to Adamts9 haploinsufficiency is associated with cardiac and aortic anomalies. *Matrix Biol* 29, 304-316.
- Kesteloot, F., Desmouliere, A., Leclercq, I., Thiry, M., Arrese, J.E., Prockop, D.J., Lapiere, C.M., Nusgens, B.V., and Colige, A. (2007). ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 2 inactivation reduces the extent and stability of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 46, 1620-1631.
- Kevorkian, L., Young, D.A., Darrah, C., Donell, S.T., Shepstone, L., Porter, S., Brockbank, S.M., Edwards, D.R., Parker, A.E., and Clark, I.M. (2004). Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis and rheumatism* 50, 131-141.
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., and Hudson, B.G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 71, 357-370.
- Kirkbride, K.C., Townsend, T.A., Bruinsma, M.W., Barnett, J.V., and Blobe, G.C. (2008). Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem* 283, 7628-7637.
- Kleifeld, O., Doucet, A., auf dem Keller, U., Prudova, A., Schilling, O., Kainthan, R.K., Starr, A.E., Foster, L.J., Kizhakkedathu, J.N., and Overall, C.M. (2010). Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat Biotechnol* 28, 281-288.
- Kleifeld, O., Doucet, A., Prudova, A., auf dem Keller, U., Gioia, M., Kizhakkedathu, J.N., and Overall, C.M. (2011). Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. *Nat Protoc* 6, 1578-1611.
- Knauff, E.A., Franke, L., van Es, M.A., van den Berg, L.H., van der Schouw, Y.T., Laven, J.S., Lambalk, C.B., Hoek, A., Goverde, A.J., Christin-Maitre, S., *et al.* (2009). Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Hum Reprod* 24, 2372-2378.
- Koch, M., Laub, F., Zhou, P., Hahn, R.A., Tanaka, S., Burgeson, R.E., Gerecke, D.R., Ramirez, F., and Gordon, M.K. (2003). Collagen XXIV, a vertebrate fibrillar collagen with structural features of invertebrate collagens: selective expression in developing cornea and bone. *J Biol Chem* 278, 43236-43244.
- Kok, H.M., Falke, L.L., Goldschmeding, R., and Nguyen, T.Q. (2014). Targeting CTGF, EGF and PDGF pathways to prevent progression of kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 10, 700-711.

- Koo, B.H., Coe, D.M., Dixon, L.J., Somerville, R.P., Nelson, C.M., Wang, L.W., Young, M.E., Lindner, D.J., and Apte, S.S. (2010). ADAMTS9 is a cell-autonomously acting, anti-angiogenic metalloprotease expressed by microvascular endothelial cells. *Am J Pathol* 176, 1494-1504.
- Koo, B.H., Longpre, J.M., Somerville, R.P., Alexander, J.P., Leduc, R., and Apte, S.S. (2006). Cell-surface processing of pro-ADAMTS9 by furin. *J Biol Chem* 281, 12485-12494.
- Koo, B.H., Longpre, J.M., Somerville, R.P., Alexander, J.P., Leduc, R., and Apte, S.S. (2007). Regulation of ADAMTS9 secretion and enzymatic activity by its propeptide. *J Biol Chem* 282, 16146-16154.
- Kramerova, I.A., Kawaguchi, N., Fessler, L.I., Nelson, R.E., Chen, Y., Kramerov, A.A., Kusche-Gullberg, M., Kramer, J.M., Ackley, B.D., Sieron, A.L., *et al.* (2000). Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development* 127, 5475-5485.
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K.N., and Wood, J.G. (2015). Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers in immunology* 6, 620.
- Kubler, D., Gosenca, D., Wind, M., Heid, H., Friedberg, I., Jahnen-Dechent, W., and Lehmann, W.D. (2007). Proteolytic processing by matrix metalloproteinases and phosphorylation by protein kinase CK2 of fetuin-A, the major globulin of fetal calf serum. *Biochimie* 89, 410-418.
- Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F., and Matsushima, K. (1997). Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *The Journal of biological chemistry* 272, 556-562.
- Kuno, K., and Matsushima, K. (1998). ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *The Journal of biological chemistry* 273, 13912-13917.
- Kuroda, H., Mochizuki, S., Shimoda, M., Chijiwa, M., Kamiya, K., Izumi, Y., Watanabe, M., Horinouchi, H., Kawamura, M., Kobayashi, K., *et al.* (2010). ADAM28 is a serological and histochemical marker for non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer* 127, 1844-1856.
- Kutz, W.E., Wang, L.W., Bader, H.L., Majors, A.K., Iwata, K., Traboulsi, E.I., Sakai, L.Y., Keene, D.R., and Apte, S.S. (2011). ADAMTS10 protein interacts with fibrillin-1 and promotes its deposition in extracellular matrix of cultured fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 286, 17156-17167.
- Lai, Y., Bai, X., Zhao, Y., Tian, Q., Liu, B., Lin, E.A., Chen, Y., Lee, B., Appleton, C.T., Beier, F., *et al.* (2014). ADAMTS-7 forms a positive feedback loop with TNF-alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 73, 1575-1584.
- Lambaerts, K., Wilcox-Adelman, S.A., and Zimmermann, P. (2009). The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol* 21, 662-669.
- Lambert, C.A., Colige, A.C., Lapiere, C.M., and Nusgens, B.V. (2001a). Coordinated regulation of procollagens I and III and their post-translational enzymes by dissipation of mechanical tension in human dermal fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 80, 479-485.
- Lambert, C.A., Colige, A.C., Munaut, C., Lapiere, C.M., and Nusgens, B.V. (2001b). Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biol* 20, 397-408.
- Lapiere, C.M., Lenaers, A., and Kohn, L.D. (1971). Procollagen peptidase: an enzyme excising the coordination peptides of procollagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 3054-3058.
- Le Goff, C., and Cormier-Daire, V. (2011). The ADAMTS(L) family and human genetic disorders. *Hum Mol Genet* 20, R163-167.
- Le Goff, C., Mahaut, C., Wang, L.W., Allali, S., Abhyankar, A., Jensen, S., Zylberberg, L., Collod-Beroud, G., Bonnet, D., Alanay, Y., *et al.* (2011). Mutations in the TGFbeta binding-protein-like domain 5 of FBN1 are responsible for acromicric and geleophysic dysplasias. *Am J Hum Genet* 89, 7-14.

- Le Goff, C., Morice-Picard, F., Dagoneau, N., Wang, L.W., Perrot, C., Crow, Y.J., Bauer, F., Flori, E., Prost-Squarcioni, C., Krakow, D., *et al.* (2008). ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat Genet* 40, 1119-1123.
- Le Goff, C., Somerville, R.P., Kesteloot, F., Powell, K., Birk, D.E., Colige, A.C., and Apte, S.S. (2006). Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. *Development* 133, 1587-1596.
- LeBleu, V.S., Macdonald, B., and Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 1121-1129.
- Lee, C.W., Hwang, I., Park, C.S., Lee, H., Park, D.W., Kang, S.J., Lee, S.W., Kim, Y.H., Park, S.W., and Park, S.J. (2012). Expression of ADAMTS-2, -3, -13, and -14 in culprit coronary lesions in patients with acute myocardial infarction or stable angina. *J Thromb Thrombolysis* 33, 362-370.
- Lee, N.V., Sato, M., Annis, D.S., Loo, J.A., Wu, L., Mosher, D.F., and Iruela-Arispe, M.L. (2006). ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *The EMBO journal* 25, 5270-5283.
- Lenaers, A., Ansay, M., Nusgens, B.V., and Lapiere, C.M. (1971). Collagen made of extended -chains, procollagen, in genetically-defective dermatosparaxical calves. *Eur J Biochem* 23, 533-543.
- Lendorf, M.E., Manon-Jensen, T., Kronqvist, P., Multhaupt, H.A., and Couchman, J.R. (2011). Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem* 59, 615-629.
- Li, S.W., Arita, M., Fertala, A., Bao, Y., Kopen, G.C., Langsjö, T.K., Hyttinen, M.M., Helminen, H.J., and Prockop, D.J. (2001). Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *Biochem J* 355, 271-278.
- Lin, E.A., and Liu, C.J. (2010). The role of ADAMTSs in arthritis. *Protein Cell* 1, 33-47.
- Liu, C.J., Kong, W., Ilalov, K., Yu, S., Xu, K., Prazak, L., Fajardo, M., Sehgal, B., and Di Cesare, P.E. (2006a). ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB J* 20, 988-990.
- Liu, C.J., Kong, W., Xu, K., Luan, Y., Ilalov, K., Sehgal, B., Yu, S., Howell, R.D., and Di Cesare, P.E. (2006b). ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem* 281, 15800-15808.
- Lo, P.H., Lung, H.L., Cheung, A.K., Apte, S.S., Chan, K.W., Kwong, F.M., Ko, J.M., Cheng, Y., Law, S., Srivastava, G., *et al.* (2010). Extracellular protease ADAMTS9 suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 70, 5567-5576.
- Longpre, J.M., McCulloch, D.R., Koo, B.H., Alexander, J.P., Apte, S.S., and Leduc, R. (2009). Characterization of proADAMTS5 processing by proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1116-1126.
- Lonnqvist, L., Child, A., Kainulainen, K., Davidson, R., Puhakka, L., and Peltonen, L. (1994). A novel mutation of the fibrillin gene causing ectopia lentis. *Genomics* 19, 573-576.
- Lopez-Otin, C., and Matrisian, L.M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 7, 800-808.
- Lopez-Otin, C., and Overall, C.M. (2002). Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 509-519.
- Luan, Y., Kong, L., Howell, D.R., Ilalov, K., Fajardo, M., Bai, X.H., Di Cesare, P.E., Goldring, M.B., Abramson, S.B., and Liu, C.J. (2008). Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 1413-1420.
- Majerus, E.M., Anderson, P.J., and Sadler, J.E. (2005). Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *The Journal of biological chemistry* 280, 21773-21778.

- Majerus, E.M., Zheng, X., Tuley, E.A., and Sadler, J.E. (2003). Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *The Journal of biological chemistry* 278, 46643-46648.
- Majumdar, M.K., Askew, R., Schelling, S., Stedman, N., Blanchet, T., Hopkins, B., Morris, E.A., and Glasson, S.S. (2007). Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56, 3670-3674.
- Malfait, A.M., Arner, E.C., Song, R.H., Alston, J.T., Markosyan, S., Staten, N., Yang, Z., Griggs, D.W., and Tortorella, M.D. (2008). Proprotein convertase activation of aggrecanases in cartilage in situ. *Arch Biochem Biophys* 478, 43-51.
- Malfait, F., De Coster, P., Hausser, I., van Essen, A.J., Franck, P., Colige, A., Nusgens, B., Martens, L., and De Paepe, A. (2004). The natural history, including orofacial features of three patients with Ehlers-Danlos syndrome, dermatosparaxis type (EDS type VIIC). *Am J Med Genet A* 131, 18-28.
- Malfait, F., Wenstrup, R.J., and De Paepe, A. (2010). Clinical and genetic aspects of Ehlers-Danlos syndrome, classic type. *Genet Med* 12, 597-605.
- Mallick, P., and Kuster, B. (2010). Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol* 28, 695-709.
- Manso, A.M., Elsharif, L., Kang, S.M., and Ross, R.S. (2006). Integrins, membrane-type matrix metalloproteinases and ADAMs: potential implications for cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 69, 574-584.
- Marini, J.C., and Blissett, A.R. (2013). New genes in bone development: what's new in osteogenesis imperfecta. *J Clin Endocrinol Metab* 98, 3095-3103.
- Marino, G., Eckhard, U., and Overall, C.M. (2015). Protein Termini and Their Modifications Revealed by Positional Proteomics. *ACS Chem Biol* 10, 1754-1764.
- Matsuo, N., Tanaka, S., Yoshioka, H., Koch, M., Gordon, M.K., and Ramirez, F. (2008). Collagen XXIV (Col24a1) gene expression is a specific marker of osteoblast differentiation and bone formation. *Connect Tissue Res* 49, 68-75.
- Maurer, L.M., Tomasini-Johansson, B.R., and Mosher, D.F. (2010). Emerging roles of fibronectin in thrombosis. *Thromb Res* 125, 287-291.
- McCulloch, D.R., Nelson, C.M., Dixon, L.J., Silver, D.L., Wylie, J.D., Lindner, V., Sasaki, T., Cooley, M.A., Argraves, W.S., and Apte, S.S. (2009). ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Dev Cell* 17, 687-698.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289, 1202-1206.
- Melching, L.I., Fisher, W.D., Lee, E.R., Mort, J.S., and Roughley, P.J. (2006). The cleavage of biglycan by aggrecanases. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 14, 1147-1154.
- Mendoza, V., Vilchis-Landeros, M.M., Mendoza-Hernandez, G., Huang, T., Villarreal, M.M., Hinck, A.P., Lopez-Casillas, F., and Montiel, J.L. (2009). Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF-beta binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry* 48, 11755-11765.
- Mittaz, L., Russell, D.L., Wilson, T., Brasted, M., Tkalcevic, J., Salamonsen, L.A., Hertzog, P.J., and Pritchard, M.A. (2004). Adamts-1 is essential for the development and function of the urogenital system. *Biol Reprod* 70, 1096-1105.
- Mochizuki, S., Soejima, K., Shimoda, M., Abe, H., Sasaki, A., Okano, H.J., Okano, H., and Okada, Y. (2012). Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. *J Natl Cancer Inst* 104, 906-922.

- Moncada-Pazos, A., Obaya, A.J., Llamazares, M., Heljasvaara, R., Suarez, M.F., Colado, E., Noel, A., Cal, S., and Lopez-Otin, C. (2012). ADAMTS-12 metalloprotease is necessary for normal inflammatory response. *J Biol Chem* *287*, 39554-39563.
- Mott, J.D., Thomas, C.L., Rosenbach, M.T., Takahara, K., Greenspan, D.S., and Banda, M.J. (2000). Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. *J Biol Chem* *275*, 1384-1390.
- Motto, D.G., Chauhan, A.K., Zhu, G., Homeister, J., Lamb, C.B., Desch, K.C., Zhang, W., Tsai, H.M., Wagner, D.D., and Ginsburg, D. (2005). Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* *115*, 2752-2761.
- Mouw, J.K., Ou, G., and Weaver, V.M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 771-785.
- Myllyharju, J., and Kivirikko, K.I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* *20*, 33-43.
- Nagase, T., Ishikawa, K., Nakajima, D., Ohira, M., Seki, N., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., and Ohara, O. (1997). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res* *4*, 141-150.
- Nakamura, H., Fujii, Y., Inoki, I., Sugimoto, K., Tanzawa, K., Matsuki, H., Miura, R., Yamaguchi, Y., and Okada, Y. (2000). Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS4) at different sites. *The Journal of biological chemistry* *275*, 38885-38890.
- Nandadasa, S., Foulcer, S., and Apte, S.S. (2014). The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. *Matrix Biol* *35*, 34-41.
- Nardi, J.B., Martos, R., Walden, K.K., Lampe, D.J., and Robertson, H.M. (1999). Expression of lacunin, a large multidomain extracellular matrix protein, accompanies morphogenesis of epithelial monolayers in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* *29*, 883-897.
- Nguyen, T.L., Grizzle, W.E., Zhang, K., Hameed, O., Siegal, G.P., and Wei, S. (2013). Syndecan-1 overexpression is associated with nonluminal subtypes and poor prognosis in advanced breast cancer. *Am J Clin Pathol* *140*, 468-474.
- Nikolov, M., Schmidt, C., and Urlaub, H. (2012). Quantitative mass spectrometry-based proteomics: an overview. *Methods Mol Biol* *893*, 85-100.
- Nusgens, B., and Lapiere, C.M. (1979). A simplified procedure for measuring amino-procollagen peptidase type I. *Anal Biochem* *95*, 406-412.
- Nusgens, B.V., Verellen-Dumoulin, C., Hermanns-Le, T., De Paepe, A., Nuytinck, L., Pierard, G.E., and Lapiere, C.M. (1992). Evidence for a relationship between Ehlers-Danlos type VII C in humans and bovine dermatosparaxis. *Nat Genet* *1*, 214-217.
- Overall, C.M., and Blobel, C.P. (2007). In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 245-257.
- Pankov, R., and Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* *115*, 3861-3863.
- Paulissen, G., El Hour, M., Rocks, N., Gueders, M.M., Bureau, F., Foidart, J.M., Lopez-Otin, C., Noel, A., and Cataldo, D.D. (2012). Control of allergen-induced inflammation and hyperresponsiveness by the metalloproteinase ADAMTS-12. *J Immunol* *189*, 4135-4143.
- Paulissen, G., Rocks, N., Gueders, M.M., Crahay, C., Quesada-Calvo, F., Bekaert, S., Hacha, J., El Hour, M., Foidart, J.M., Noel, A., *et al.* (2009). Role of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in airway diseases. *Respir Res* *10*, 127.

- Paye, A., Truong, A., Yip, C., Cimino, J., Blacher, S., Munaut, C., Cataldo, D., Foidart, J.M., Maquoui, E., Collignon, J., *et al.* (2014). EGFR activation and signaling in cancer cells are enhanced by the membrane-bound metalloprotease MT4-MMP. *Cancer Res* 74, 6758-6770.
- Peng, W.J., Yan, J.W., Wan, Y.N., Wang, B.X., Tao, J.H., Yang, G.J., Pan, H.F., and Wang, J. (2012). Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. *J Clin Immunol* 32, 1409-1414.
- Persikov, A.V., Ramshaw, J.A., Kirkpatrick, A., and Brodsky, B. (2005). Electrostatic interactions involving lysine make major contributions to collagen triple-helix stability. *Biochemistry* 44, 1414-1422.
- Piccini, E., Kalkkinen, N., Saarma, M., and Runeberg-Roos, P. (2013). Glial cell line-derived neurotrophic factor: characterization of mammalian posttranslational modifications. *Ann Med* 45, 66-73.
- Poonpet, T., Honsawek, S., Tammachote, N., Kanitnate, S., and Tammachote, R. (2013). ADAMTS14 gene polymorphism associated with knee osteoarthritis in Thai women. *Genet Mol Res* 12, 5301-5309.
- Prudova, A., auf dem Keller, U., Butler, G.S., and Overall, C.M. (2010). Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 9, 894-911.
- Prudova, A., Gocheva, V., Auf dem Keller, U., Eckhard, U., Olson, O.C., Akkari, L., Butler, G.S., Fortelny, N., Lange, P.F., Mark, J.C., *et al.* (2016). TAILS N-Terminomics and Proteomics Show Protein Degradation Dominates over Proteolytic Processing by Cathepsins in Pancreatic Tumors. *Cell Rep* 16, 1762-1773.
- Przemyslaw, L., Boguslaw, H.A., Elzbieta, S., and Malgorzata, S.M. (2013). ADAM and ADAMTS family proteins and their role in the colorectal cancer etiopathogenesis. *BMB Rep* 46, 139-150.
- Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., and Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 4, 544-558.
- Rawlings, N.D. (2016). Peptidase specificity from the substrate cleavage collection in the MEROPS database and a tool to measure cleavage site conservation. *Biochimie* 122, 5-30.
- Ray, S., Lukyanov, P., and Ochieng, J. (2003). Members of the cystatin superfamily interact with MMP-9 and protect it from autolytic degradation without affecting its gelatinolytic activities. *Biochim Biophys Acta* 1652, 91-102.
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004978.
- Richards, J.S., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I., Teuling, E., Lo, Y., Boerboom, D., Falender, A.E., Doyle, K.H., LeBaron, R.G., Thompson, V., *et al.* (2005). Regulated expression of ADAMTS family members in follicles and cumulus oocyte complexes: evidence for specific and redundant patterns during ovulation. *Biol Reprod* 72, 1241-1255.
- Rocks, N., Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders, M., Foidart, J.M., Noel, A., and Cataldo, D. (2008). Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie* 90, 369-379.
- Rodriguez-Lopez, J., Pombo-Suarez, M., Loughlin, J., Tsezou, A., Blanco, F.J., Meulenbelt, I., Slagboom, P.E., Valdes, A.M., Spector, T.D., Gomez-Reino, J.J., *et al.* (2009). Association of a nsSNP in ADAMTS14 to some osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 321-327.
- Rodriguez-Manzaneque, J.C., Carpizo, D., Plaza-Calonge Mdel, C., Torres-Collado, A.X., Thai, S.N., Simons, M., Horowitz, A., and Iruela-Arispe, M.L. (2009). Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 800-810.
- Rodriguez-Manzaneque, J.C., Fernandez-Rodriguez, R., Rodriguez-Baena, F.J., and Iruela-Arispe, M.L. (2015). ADAMTS proteases in vascular biology. *Matrix Biol* 44-46, 38-45.

- Rodriguez-Manzaneque, J.C., Westling, J., Thai, S.N., Luque, A., Knauper, V., Murphy, G., Sandy, J.D., and Iruela-Arispe, M.L. (2002). ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* 293, 501-508.
- Romero, D., Kawano, Y., Bengoa, N., Walker, M.M., Maltry, N., Niehrs, C., Waxman, J., and Kypta, R. (2013). Downregulation of Dickkopf-3 disrupts prostate acinar morphogenesis through TGF-beta/Smad signalling. *J Cell Sci* 126, 1858-1867.
- Romero, D., and Kypta, R. (2013). Dickkopf-3 function in the prostate: implications for epithelial homeostasis and tumor progression. *Bioarchitecture* 3, 42-44.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., *et al.* (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154-1169.
- Roy, R., Louis, G., Loughlin, K.R., Wiederschain, D., Kilroy, S.M., Lamb, C.C., Zurakowski, D., and Moses, M.A. (2008). Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. *Clin Cancer Res* 14, 6610-6617.
- Sabino, F., Hermes, O., Egli, F.E., Kockmann, T., Schlage, P., Croizat, P., Kizhakkedathu, J.N., Smola, H., and auf dem Keller, U. (2015). In vivo assessment of protease dynamics in cutaneous wound healing by degradomics analysis of porcine wound exudates. *Mol Cell Proteomics* 14, 354-370.
- Sakwe, A.M., Koumangoye, R., Goodwin, S.J., and Ochieng, J. (2010). Fetuin-A (α 2HS-glycoprotein) is a major serum adhesive protein that mediates growth signaling in breast tumor cells. *J Biol Chem* 285, 41827-41835.
- Sanchez-Lopez, E., Rodrigues Diez, R., Rodriguez Vita, J., Rayego Mateos, S., Rodrigues Diez, R.R., Rodriguez Garcia, E., Lavoiz Barria, C., Mezzano, S., Egido, J., Ortiz, A., *et al.* (2009). [Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. *Nefrologia* 29, 382-391.
- Sandy, J.D., Neame, P.J., Boynton, R.E., and Flannery, C.R. (1991). Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *J Biol Chem* 266, 8683-8685.
- Sandy, J.D., Westling, J., Kenagy, R.D., Iruela-Arispe, M.L., Verscharen, C., Rodriguez-Mazaneque, J.C., Zimmermann, D.R., Lemire, J.M., Fischer, J.W., Wight, T.N., *et al.* (2001). Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *The Journal of biological chemistry* 276, 13372-13378.
- Schaefer, L., and Schaefer, R.M. (2010). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 339, 237-246.
- Schilling, O., Barre, O., Huesgen, P.F., and Overall, C.M. (2010). Proteome-wide analysis of protein carboxy termini: C terminomics. *Nat Methods* 7, 508-511.
- Schlage, P., Kockmann, T., Sabino, F., Kizhakkedathu, J.N., and Auf dem Keller, U. (2015). Matrix Metalloproteinase 10 Degradomics in Keratinocytes and Epidermal Tissue Identifies Bioactive Substrates With Pleiotropic Functions. *Mol Cell Proteomics* 14, 3234-3246.
- Serini, G., Valdembri, D., and Bussolino, F. (2006). Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp Cell Res* 312, 651-658.
- Shaker, J.L., Albert, C., Fritz, J., and Harris, G. (2015). Recent developments in osteogenesis imperfecta. *F1000Res* 4, 681.
- Sheu, M.J., Hsieh, M.J., Chou, Y.E., Wang, P.H., Yeh, C.B., Yang, S.F., Lee, H.L., and Liu, Y.F. (2017). Effects of ADAMTS14 genetic polymorphism and cigarette smoking on the clinicopathologic development of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 12, e0172506.

- Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wada, T., Kurihara, Y., Imai, T., Wang, Y., Ogata, M., Nishimatsu, H., *et al.* (2000). ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest* *105*, 1345-1352.
- Shoulders, M.D., and Raines, R.T. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* *78*, 929-958.
- Shozu, M., Minami, N., Yokoyama, H., Inoue, M., Kurihara, H., Matsushima, K., and Kuno, K. (2005). ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J Mol Endocrinol* *35*, 343-355.
- Silver, D.L., Hou, L., Somerville, R., Young, M.E., Apte, S.S., and Pavan, W.J. (2008). The secreted metalloprotease ADAMTS20 is required for melanoblast survival. *PLoS Genet* *4*, e1000003.
- Singh, D., Paduch, D.A., Schlegel, P.N., Orwig, K.E., Mielnik, A., Bolyakov, A., and Wright, W.W. (2017). The production of glial cell line-derived neurotrophic factor by human sertoli cells is substantially reduced in sertoli cell-only testes. *Hum Reprod* *32*, 1108-1117.
- Sipes, J.M., Guo, N., Negre, E., Vogel, T., Krutzsch, H.C., and Roberts, D.D. (1993). Inhibition of fibronectin binding and fibronectin-mediated cell adhesion to collagen by a peptide from the second type I repeat of thrombospondin. *J Cell Biol* *121*, 469-477.
- Soejima, K., Matsumoto, M., Kokame, K., Yagi, H., Ishizashi, H., Maeda, H., Nozaki, C., Miyata, T., Fujimura, Y., and Nakagaki, T. (2003). ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* *102*, 3232-3237.
- Somerville, R.P., Jungers, K.A., and Apte, S.S. (2004a). Discovery and characterization of a novel, widely expressed metalloprotease, ADAMTS10, and its proteolytic activation. *The Journal of biological chemistry* *279*, 51208-51217.
- Somerville, R.P., Longpre, J.M., Apel, E.D., Lewis, R.M., Wang, L.W., Sanes, J.R., Leduc, R., and Apte, S.S. (2004b). ADAMTS7B, the full-length product of the ADAMTS7 gene, is a chondroitin sulfate proteoglycan containing a mucin domain. *J Biol Chem* *279*, 35159-35175.
- Somerville, R.P., Longpre, J.M., Jungers, K.A., Engle, J.M., Ross, M., Evanko, S., Wight, T.N., Leduc, R., and Apte, S.S. (2003). Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *J Biol Chem* *278*, 9503-9513.
- Stanczak, P., Witecka, J., Szydło, A., Gutmajster, E., Lisik, M., Augusciak-Duma, A., Tarnowski, M., Czekaj, T., Czekaj, H., and Sieron, A.L. (2009). Mutations in mammalian tolloid-like 1 gene detected in adult patients with ASD. *Eur J Hum Genet* *17*, 344-351.
- Stankunas, K., Hang, C.T., Tsun, Z.Y., Chen, H., Lee, N.V., Wu, J.I., Shang, C., Bayle, J.H., Shou, W., Iruela-Arispe, M.L., *et al.* (2008). Endocardial Brg1 represses ADAMTS1 to maintain the microenvironment for myocardial morphogenesis. *Dev Cell* *14*, 298-311.
- Stanton, H., Melrose, J., Little, C.B., and Fosang, A.J. (2011). Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta* *1812*, 1616-1629.
- Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 463-516.
- Su, S.C., Hsieh, M.J., Liu, Y.F., Chou, Y.E., Lin, C.W., and Yang, S.F. (2016). ADAMTS14 Gene Polymorphism and Environmental Risk in the Development of Oral Cancer. *PLoS One* *11*, e0159585.
- Sun, M., Chen, S., Adams, S.M., Florer, J.B., Liu, H., Kao, W.W., Wenstrup, R.J., and Birk, D.E. (2011). Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model. *J Cell Sci* *124*, 4096-4105.
- Takeda, S. (2016). ADAM and ADAMTS Family Proteins and Snake Venom Metalloproteinases: A Structural Overview. *Toxins (Basel)* *8*.

- Tauchi, R., Imagama, S., Natori, T., Ohgomori, T., Muramoto, A., Shinjo, R., Matsuyama, Y., Ishiguro, N., and Kadomatsu, K. (2012). The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury. *J Neuroinflammation* 9, 53.
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., and Karamanos, N.K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 97, 4-27.
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Tzanakakis, G.N., and Karamanos, N.K. (2010). Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J* 277, 3904-3923.
- To, W.S., and Midwood, K.S. (2011). Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 21.
- Torres-Collado, A.X., Kisiel, W., Iruela-Arispe, M.L., and Rodriguez-Manzaneque, J.C. (2006). ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. *The Journal of biological chemistry* 281, 17827-17837.
- Tortorella, M., Pratta, M., Liu, R.Q., Abbaszade, I., Ross, H., Burn, T., and Arner, E. (2000a). The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem* 275, 25791-25797.
- Tortorella, M.D., Arner, E.C., Hills, R., Easton, A., Korte-Sarfaty, J., Fok, K., Wittwer, A.J., Liu, R.Q., and Malfait, A.M. (2004). Alpha2-macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes. *The Journal of biological chemistry* 279, 17554-17561.
- Tortorella, M.D., Burn, T.C., Pratta, M.A., Abbaszade, I., Hollis, J.M., Liu, R., Rosenfeld, S.A., Copeland, R.A., Decicco, C.P., Wynn, R., *et al.* (1999). Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 284, 1664-1666.
- Tortorella, M.D., Liu, R.Q., Burn, T., Newton, R.C., and Arner, E. (2002). Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4). *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 21, 499-511.
- Tortorella, M.D., Pratta, M., Liu, R.Q., Austin, J., Ross, O.H., Abbaszade, I., Burn, T., and Arner, E. (2000b). Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *The Journal of biological chemistry* 275, 18566-18573.
- Tsutsui, K., Manabe, R., Yamada, T., Nakano, I., Oguri, Y., Keene, D.R., Sengle, G., Sakai, L.Y., and Sekiguchi, K. (2010). 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.
- Tucker, R.P. (2004). The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 969-974.
- Vadon-Le Goff, S., Hulmes, D.J., and Moali, C. (2015). BMP-1/tolloid-like proteinases synchronize matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling. *Matrix Biol* 44-46, 14-23.
- Vadon-Le Goff, S., Kronenberg, D., Bourhis, J.M., Bijakowski, C., Raynal, N., Ruggiero, F., Farndale, R.W., Stocker, W., Hulmes, D.J., and Moali, C. (2011). Procollagen C-proteinase enhancer stimulates procollagen processing by binding to the C-propeptide region only. *J Biol Chem* 286, 38932-38938.
- Van Damme, P., Staes, A., Bronsoms, S., Helsen, K., Colaert, N., Timmerman, E., Aviles, F.X., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2010). Complementary positional proteomics for screening substrates of endo- and exoproteases. *Nat Methods* 7, 512-515.
- van der Rest, M., and Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J* 5, 2814-2823.
- van der Vorst, E.P., Keijbeck, A.A., de Winther, M.P., and Donners, M.M. (2012). A disintegrin and metalloproteases: molecular scissors in angiogenesis, inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 224, 302-308.

- van Goor, H., Melenhorst, W.B., Turner, A.J., and Holgate, S.T. (2009). Adamalysins in biology and disease. *J Pathol* *219*, 277-286.
- Vazquez, F., Hastings, G., Ortega, M.A., Lane, T.F., Oikemus, S., Lombardo, M., and Iruela-Arispe, M.L. (1999). METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* *274*, 23349-23357.
- Veenstra, T.D., Conrads, T.P., and Issaq, H.J. (2004). What to do with "one-hit wonders"? *Electrophoresis* *25*, 1278-1279.
- Veit, G., Kobbe, B., Keene, D.R., Paulsson, M., Koch, M., and Wagener, R. (2006). Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *The Journal of biological chemistry* *281*, 3494-3504.
- Viloria, C.G., Obaya, A.J., Moncada-Pazos, A., Llamazares, M., Astudillo, A., Capella, G., Cal, S., and Lopez-Otin, C. (2009). Genetic inactivation of ADAMTS15 metalloprotease in human colorectal cancer. *Cancer Res* *69*, 4926-4934.
- Vogtle, F.N., Wortelkamp, S., Zahedi, R.P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., Voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N., *et al.* (2009). Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* *139*, 428-439.
- Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2007). New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today* *81*, 229-240.
- Wang, H., Jin, H., Beauvais, D.M., and Rapraeger, A.C. (2014a). Cytoplasmic domain interactions of syndecan-1 and syndecan-4 with alpha6beta4 integrin mediate human epidermal growth factor receptor (HER1 and HER2)-dependent motility and survival. *J Biol Chem* *289*, 30318-30332.
- Wang, H., Jin, H., and Rapraeger, A.C. (2015). Syndecan-1 and Syndecan-4 Capture Epidermal Growth Factor Receptor Family Members and the alpha3beta1 Integrin Via Binding Sites in Their Ectodomains: NOVEL SYNSTATINS PREVENT KINASE CAPTURE AND INHIBIT alpha6beta4-INTEGRIN-DEPENDENT EPITHELIAL CELL MOTILITY. *J Biol Chem* *290*, 26103-26113.
- Wang, J., Perez-Santiago, J., Katz, J.E., Mallick, P., and Bandeira, N. (2010). Peptide identification from mixture tandem mass spectra. *Mol Cell Proteomics* *9*, 1476-1485.
- Wang, P., Tortorella, M., England, K., Malfait, A.M., Thomas, G., Arner, E.C., and Pei, D. (2004). Proprotein convertase furin interacts with and cleaves pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans-Golgi network. *J Biol Chem* *279*, 15434-15440.
- Wang, W.M., Ge, G., Lim, N.H., Nagase, H., and Greenspan, D.S. (2006). TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. *Biochem J* *398*, 515-519.
- Wang, W.M., Lee, S., Steiglit, B.M., Scott, I.C., Lebares, C.C., Allen, M.L., Brenner, M.C., Takahara, K., and Greenspan, D.S. (2003). Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. *J Biol Chem* *278*, 19549-19557.
- Wang, Y., Reheman, A., Spring, C.M., Kalantari, J., Marshall, A.H., Wolberg, A.S., Gross, P.L., Weitz, J.I., Rand, M.L., Mosher, D.F., *et al.* (2014b). Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *J Clin Invest* *124*, 4281-4293.
- Wei, J., Liu, C.J., and Li, Z. (2014a). ADAMTS-18: a metalloproteinase with multiple functions. *Front Biosci (Landmark Ed)* *19*, 1456-1467.
- Wei, J., Richbourgh, B., Jia, T., and Liu, C. (2014b). ADAMTS-12: a multifaced metalloproteinase in arthritis and inflammation. *Mediators Inflamm* *2014*, 649718.
- Widmer, C., Gebauer, J.M., Brunstein, E., Rosenbaum, S., Zaucke, F., Drogemuller, C., Leeb, T., and Baumann, U. (2012). Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 13243-13247.

- Wise, S.G., and Weiss, A.S. (2009). Tropoelastin. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 494-497.
- Xie, Y., Gou, Q., Xie, K., Wang, Z., Wang, Y., and Zheng, H. (2016). ADAMTS6 suppresses tumor progression via the ERK signaling pathway and serves as a prognostic marker in human breast cancer. *Oncotarget* *7*, 61273-61283.
- Yip, C., Foidart, P., Somja, J., Truong, A., Lienard, M., Feyereisen, E., Schroeder, H., Gofflot, S., Donneau, A.F., Collignon, J., *et al.* (2017). MT4-MMP and EGFR expression levels are key biomarkers for breast cancer patient response to chemotherapy and erlotinib. *Br J Cancer* *116*, 742-751.
- Zander, C.B., Cao, W., and Zheng, X.L. (2015). ADAMTS13 and von Willebrand factor interactions. *Curr Opin Hematol* *22*, 452-459.
- Zeng, W., Corcoran, C., Collins-Racie, L.A., Lavallie, E.R., Morris, E.A., and Flannery, C.R. (2006). Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18. *Biochim Biophys Acta* *1760*, 517-524.
- Zhang, K., Watanabe, M., Kashiwakura, Y., Li, S.A., Edamura, K., Huang, P., Yamaguchi, K., Nasu, Y., Kobayashi, Y., Sakaguchi, M., *et al.* (2010). Expression pattern of REIC/Dkk-3 in various cell types and the implications of the soluble form in prostatic acinar development. *Int J Oncol* *37*, 1495-1501.
- Zhang, Q., Huang, M., Wang, X., Xu, X., Ni, M., and Wang, Y. (2012). Negative effects of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 on endplate cartilage differentiation. *J Orthop Res* *30*, 1238-1243.
- Zhang, Y., Lin, J., and Wei, F. (2015). The Function and Roles of ADAMTS-7 in Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm* *2015*, 801546.
- Zhen, E.Y., Brittain, I.J., Laska, D.A., Mitchell, P.G., Sumer, E.U., Karsdal, M.A., and Duffin, K.L. (2008). Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum* *58*, 2420-2431.
- Zheng, X., Chung, D., Takayama, T.K., Majerus, E.M., Sadler, J.E., and Fujikawa, K. (2001). Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* *276*, 41059-41063.
- Zheng, X., Nishio, K., Majerus, E.M., and Sadler, J.E. (2003). Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *The Journal of biological chemistry* *278*, 30136-30141.
- Zheng, X.L. (2013). Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease. *J Thromb Haemost* *11 Suppl 1*, 11-23.
- Zieske, L.R. (2006). A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* *57*, 1501-1508.
- Zollinger, A.J., and Smith, M.L. (2016). Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol.*