

IV. Discussion

L'analyse de l'évolution de la famille des ADAMTSs suggère que les gènes des différents sous-groupes décrits chez les mammifères sont apparus par dédoublement de leurs ancêtres communs (Nicholson et al., 2005). Les enzymes résultant de ces duplications montrent dès lors très souvent une structure et une activité originelle largement conservées tout en adoptant un profil d'expression différent (sous-fonctionnalisation) (Huxley-Jones et al., 2005). C'est le cas pour la sous-famille des ADAMTS2, 3 et 14 qui se caractérise par un site catalytique hautement conservé, la présence de quatre répétitions de type I des thrombospondines (TSR1), une homologie entre leur domaine "Spacer" respectif nettement plus élevée que dans les autres ADAMTSs, et la présence d'un domaine PNP spécifique signant leur activité aminoprocollagène peptidase.

Les collagènes, et plus particulièrement les collagènes fibrillaires, comptent parmi les protéines les plus abondantes des tissus conjonctifs. Initialement synthétisés sous forme de précurseurs monomériques, ils subissent ensuite de nombreuses modifications post-traductionnelles leur permettant de s'assembler en structures trimériques capables de former des fibrilles et des fibres mécaniquement résistantes. Une des dernières étapes de leur maturation est le clivage du propeptide C-terminal, par les carboxyprocollagène peptidases de la sous-famille des "BMP1/tolloid", et du propeptide N-terminal, par trois aminoprocollagène peptidases, les ADAMTS2, 3 et 14. L'excision de ces propeptides globulaires permet aux parties centrales des molécules de collagène, qui présentent une conformation caractéristique en triple-hélice, de s'agencer en structures fibrillaires correctement organisées. Cette disposition des molécules de collagène en fibres compactes et stabilisées par des liaisons croisées est à la base de leurs propriétés mécaniques et de leur rôle essentiel au sein des tissus conjonctifs.

Une mutation entraînant l'abolition de la fonction aminoprocollagène peptidase de l'ADAMTS2 est à l'origine d'une maladie héréditaire chez l'Homme (syndrome d'Ehlers-Danlos de type VIIC (EDS-VIIC) ou de type dermatosparactique) et l'animal (dermatosparaxie), dont le symptôme clinique majeur est une fragilité cutanée extrême résultant d'une organisation défectueuse des fibres de collagène (Nusgens et al., 1992; Li et al., 2001; Colige et al., 1999). Celles-ci y sont en effet plus fines et organisées en feuillets lâchement torsadés. En section transversale, elles présentent un aspect hiéroglyphique et non pas circulaire et de diamètre relativement uniforme comme dans le derme normal.

L'altération de la maturation du procollagène de type I et de type III se manifeste principalement au niveau de la peau. D'autres tissus, pourtant riches également en collagène de type I, comme l'os ou le tendon, ne sont que peu affectés (Lapière et al., 1993). Par ailleurs, le clivage du propeptide aminoterminal du procollagène de type II, un substrat de l'ADAMTS2, n'est que peu, voire pas du tout altéré dans les cartilages d'animaux dermatosparactiques (Fernandes et al., 2001; Li et al., 2001). Ces observations indiquaient donc une expression et une activité tissulaire différentielle des ADAMTS2, 3 et 14 ainsi qu'une spécificité préférentielle de leur substrat.

Dans un premier temps, nous avons collaboré à une étude visant à analyser les fonctions et expressions respectives des ADAMTS2, 3 et 14 au cours du développement chez la souris, dans le but d'améliorer nos connaissances des processus menant au dépôt de fibres de collagène dans divers organes et de mieux comprendre les mécanismes pathogéniques à l'origine de la dermatosparaxie.

Le rôle particulier de l'ADAMTS2 a ensuite été évalué dans le contexte de deux pathologies caractérisées par le dépôt excessif d'une matrice conjonctive composée en grande partie de collagènes fibrillaires: la fibrose hépatique d'origine toxique et la fibrose cicatricielle consécutive à une inflammation chronique granulomateuse à corps étranger.

Enfin, la structure de l'ADAMTS2 en termes de domaines et d'homologie avec d'autres protéines nous a incité à évaluer son potentiel anti-angiogène, en particulier au cours de la croissance tumorale.

1. Les ADAMTS2, 3 et 14 au cours du développement

Afin d'établir de manière rigoureuse la signification biologique *in vivo* d'une réaction enzymatique, il convient avant tout de s'assurer de la co-localisation, spatiale et temporelle, de l'enzyme et de ses substrats, en l'occurrence, au cours de cette étude, les aminoprocollagène peptidases et les collagènes fibrillaires. L'impact de l'absence de la protéase étudiée sur l'état de ses substrats et sur le système biologique envisagé est également des plus informatif.

En termes de collagène fibrillaire, les substrats potentiels de chacune des aminoprocollagène peptidases ont, pour la plupart d'entre eux, été identifiés. L'ADAMTS2

est capable de cliver les procollagènes de type I, II, III et V (Lapière et al., 1971; Nusgens et al., 1992; Colige et al., 1999; Fernandes et al., 2001; Tuderman et al., 1978; Wang et al., 2003; *publication n°1*); l'ADAMTS3 réalise la maturation du procollagène de type II dans le cartilage (Fernandes et al., 2001), et est également capable de cliver le procollagène de type I, comme décrit dans nos travaux; enfin, l'ADAMTS14 peut, elle aussi, maturer le procollagène de type I (Colige et al., 2002). Il est important de noter que l'excision du propeptide aminoterminal par les trois enzymes de cette famille est réalisée au niveau du même site de clivage et non pas au niveau de séquences adjacentes (Colige et al., 2002). Les résultats de notre étude suggèrent que le clivage de l'aminopropeptide du procollagène de type III est essentiellement le fait de l'ADAMTS2, tandis que le clivage du procollagène de type I semble partagé par les ADAMTS2 et 3.

Une co-localisation du collagène de type II et de l'ADAMTS3 a été observée au niveau du cartilage au cours du développement embryonnaire, alors que les ADAMTS2 et 14 ne sont pas détectables. Ces résultats sont à mettre en relation avec des observations antérieures démontrant que l'ARNm de l'ADAMTS3 est 5 fois plus abondant que celui de l'ADAMTS2 dans le cartilage chez l'adulte (Fernandes et al., 2001). Par ailleurs, l'analyse du phénotype des veaux et souris dermatosparactiques ne montre pas de déficit majeur des structures cartilagineuses en l'absence d'ADAMTS2. De faibles différences de taux de maturation de procollagène de type II ont toutefois été observées, notamment entre le cartilage nasal bovin dermatosparactique (Fernandes et al., 2001) et celui provenant du sternum de souris TS2^{-/-} (Li et al., 2001). Il reste à déterminer si ces variations sont liées aux espèces étudiées ou à l'origine tissulaire. Ces observations suggèrent que l'ADAMTS3 est l'enzyme majoritairement responsable de la maturation du collagène de type II *in vivo* dans le cartilage de la souris et du bovin et, par analogie, probablement de l'Homme.

Durant l'ostéogenèse et le développement musculo-tendineux chez la souris, l'ADAMTS3 est co-exprimée avec le collagène de type I. A l'inverse, les ADAMTS2 et 14, qui sont fonctionnellement capables de cliver le procollagène de type I, ne sont pas exprimées dans le tissu osseux et les tendons durant le développement embryonnaire. Ces résultats indiquent que l'ADAMTS3 est l'aminoprocollagène peptidase essentielle lors de la formation et du développement des tissus musculo-squelettiques, ce qui est confirmé par l'absence d'anomalie visible des os et des tendons chez les souris TS2^{-/-}. L'absence d'étude des tissus cartilagineux, tendineux et osseux chez les patients atteints d'EDS-VIIC et la variabilité des

signes cliniques signant une altération de ces tissus ne nous permet pas de tirer de conclusion définitive chez l'Homme.

La disparition de l'ADAMTS3 après la naissance, hormis dans le cartilage et dans l'œil, ne pourrait être compensée par la faible activité de l'ADAMTS14. Ceci expliquerait la détérioration progressive des propriétés mécaniques de la peau qui ne se manifeste pleinement qu'après quelques semaines chez les souris TS2^{-/-}.

Cette étude démontre également que l'ADAMTS3 exerce probablement d'autres fonctions que le clivage des procollagènes puisqu'elle est, par exemple, détectée près de l'aqueduc de Sylvius, une région très localisée du cerveau et dépourvue de collagène. La SCO-spondine, une protéine contenant 4 TSR1, des domaines largement impliqués dans les mécanismes d'interactions intermoléculaires, et qui requiert un clivage pour permettre sa polymérisation dans la fibre de Reissner de la moelle épinière (Gobron et al., 1996), pourrait être un substrat potentiel de l'ADAMTS3. Cette étude suggère également qu'une déficience en ADAMTS3 serait probablement létale au niveau embryonnaire, en raison des altérations profondes attendues au niveau des tissus de soutien.

Il est connu de longue date qu'une proportion significative du collagène de type III dans les tissus était sous la forme immature de pNcollagène (Lenaers et al., 1975). Plusieurs auteurs ont par ailleurs rapporté que l'enzyme clivant le procollagène de type III était différente de celle responsable du clivage du procollagène de type I (Peltonen et al., 1985; Halila et al., 1986; Halila et al., 1986; Tuderman et al., 1982). Cependant, la déficience génétique en ADAMTS2 induit un déficit profond de maturation du procollagène III (Nusgens et al., 1980). Ces résultats expérimentaux ont été largement confirmés et précisés au cours de cette étude. Les analyses par hybridation *in situ* chez l'embryon démontrent en effet une corrélation élevée entre l'expression du procollagène de type III et l'ADAMTS2, les ADAMTS3 et 14 ne présentant pas la même localisation tissulaire ou n'étant pas exprimé à un niveau détectable.

Les enseignements apportés par cette étude soulèvent des points d'interrogation quant au décours de la maladie EDS-VIIC puisque tous les patients connus à ce jour n'ont pas encore atteint l'âge adulte.

- Les parois vasculaires de la souris TS2^{-/-} contiennent une grande proportion de collagène de type III non clivé (pN-III), ce qui serait susceptible d'altérer leurs propriétés fonctionnelles. Aucune anomalie vasculaire n'a cependant été détectée chez la souris. Il n'est pas exclu toutefois que des altérations puissent apparaître avec l'âge

ou lors d'atteintes diverses. En conséquence, un suivi attentif des structures vasculaires de large diamètre devrait être la règle chez les patients souffrant d'un EDS-VIIC.

- Nous avons également montré l'importance de l'ADAMTS2 pour la formation du tissu pulmonaire, puisque celui-ci est altéré dans les souris TS2^{-/-}. A l'heure actuelle, nous n'avons pu préciser si cette détérioration de l'architecture du poumon résulte spécifiquement du manque de maturation des procollagènes de type I ou de type III. Toutefois, comme pour le réseau vasculaire, une fragilité pulmonaire est à craindre chez les patients et mériterait un suivi médical attentif.

2. Matrices conjonctives cicatricielles

De nombreux stimuli pathogènes d'origine variée sont susceptibles de provoquer des lésions aiguës ou chroniques dans de nombreux tissus et organes. Ils incluent notamment les traumatismes mécaniques, les infections, les réactions auto-immunes, et l'exposition à des agents toxiques. En réponse à cette agression, l'organisme développe une réaction inflammatoire, initiée par la libération de nombreux médiateurs dont des cytokines et chémokines, dont le but est d'éliminer l'élément causal et les tissus altérés, dont les foyers nécrotiques. Elle est généralement suivie de la formation d'une trame conjonctive, majoritairement composée de collagène, qui peut être considérée comme une réponse d'urgence permettant de rendre rapidement aux tissus lésés leur continuité physique. Le remodelage progressif de cette matrice fibreuse par les cellules qui la colonisent permettra le plus souvent de restaurer l'architecture et la fonctionnalité du tissu initialement lésé.

Dans certains cas, l'absence de mécanisme(s) adéquat(s) permettant de contrôler l'évolution spatiale et temporelle de cette réaction cicatricielle provoque un remodelage inapproprié du tissu lésé, pouvant mener à la destruction définitive de l'architecture tissulaire, à une insuffisance grave de l'organe atteint, voire à la mort de l'individu. La mise en place de stratégies thérapeutiques, actuellement inexistantes, est donc requise pour inhiber ce dépôt matriciel et améliorer la condition des patients atteints de pathologies caractérisées par une composante fibrotique.

Ainsi qu'exposé plus en détail dans le chapitre introductif, les mécanismes moléculaires et enzymatiques gouvernant la biosynthèse et l'accumulation du collagène semblent être des cibles thérapeutiques de choix, puisque tout à la fois les collagènes sont les principaux constituants des dépôts cicatriciels, qu'une inhibition temporaire de leur biosynthèse ne

devrait induire que des effets secondaires d'ampleur très limitée, et que, contrairement aux événements complexes conduisant à la fibrose, les étapes successives menant à la formation du réseau de fibres de collagène sont très similaires d'un tissu à l'autre quelle que soit la cause initiale de la pathologie.

L'étude des rôles de l'ADAMTS2 au cours de l'embryogenèse et du développement a confirmé qu'elle était l'enzyme responsable d'une partie importante de la maturation des collagènes de type I et III dans un contexte physiologique et que l'absence de son activité était à l'origine d'anomalies qualitatives et quantitatives du réseau de fibres de collagène et de la trame conjonctive dans son ensemble. Nous avons donc étudié le bénéfice potentiel de l'inhibition de l'ADAMTS2 dans plusieurs processus pathologiques caractérisés par un dépôt excessif de MEC.

Notre première approche a consisté en un modèle de **fibrose hépatique d'origine toxique** par injections de CCl₄ chez les souris WT et TS2^{-/-}. Plusieurs paramètres reflétant la réaction aiguë initiale, dont l'étendue histologique de la nécrose, le taux sérique des transaminases hépatiques et l'expression de gènes impliqués dans la fibrogenèse, ont été évalués et étaient tous similaires dans les deux groupes de souris. En accord avec des données de la littérature, nous avons par exemple observé un pic de surexpression de gènes tels que MMP-13, MMP-9, et TIMP-1, reflétant probablement la libération de cytokines inflammatoires (Yata et al., 1999; Hemmann et al., 2007).

Des injections répétées de CCl₄ pendant plusieurs semaines mènent au développement d'une fibrose cicatricielle bien établie, dont l'étendue a été évaluée par coloration des dépôts fibrillaires et dosage du collagène. Ces analyses ont démontré que la quantité de matériel fibrotique déposé en absence d'ADAMTS2 chez les souris TS2^{-/-} était **significativement réduit** pour une même période d'intoxication par rapport aux animaux WT. Par ailleurs, pour un même niveau de fibrose, l'arrêt du traitement par l'agent toxique résulte en une **réversion plus marquée de la fibrose chez les animaux dépourvus d'activité ADAMTS2**. Afin d'analyser les causes moléculaires à l'origine de ces différences, une analyse transcriptomique de plusieurs gènes potentiellement impliqués dans les processus d'apparition de la fibrose et de sa régression a été réalisée. Les gènes des collagènes, des MMPs et des TIMPs présentent des profils d'expression bien marqués quant à l'ampleur de leurs variations et leur évolution au cours du temps. L'ADAMTS2 a montré, chez les souris WT, un profil d'expression similaire aux collagènes, mais de moindre amplitude.

L'ADAMTS14 ne semble pas modulée au cours de la fibrose, et l'ADAMTS3 n'est pas exprimée dans le foie à un niveau significatif. Le dépôt d'une matrice conjonctive est un processus complexe, régulé par une balance positive entre la production de nouvelles molécules de structure et celle d'enzymes impliquées dans leur dégradation. Cette balance est clairement illustrée dans nos travaux par l'accroissement simultané de l'expression des collagènes et des enzymes de dégradation. Lors de la régression de la fibrose, l'expression relative des enzymes de dégradation dépasse celle des collagènes. Au cours de notre étude, tous ces paramètres variaient de manière similaire dans les souris WT et TS2^{-/-}. Ces données suggèrent que l'étendue réduite de la fibrose en l'absence d'ADAMTS2 n'est pas due à une réduction de la production de collagène, ni à une synthèse accrue d'enzymes protéolytiques, mais plutôt à l'altération de la structure des fibres de collagène.

Cette hypothèse a été confirmée par des analyses biochimiques et ultrastructurales montrant la persistance d'une proportion significative du propeptide aminoterminal dans les molécules de collagène de type I et III dans le foie des souris TS2^{-/-}, responsable par encombrement stérique d'une altération du processus de polymérisation (Hulmes et al., 1989). Ceci est à l'origine de l'élaboration d'un réseau tridimensionnel de fibres de collagène de médiocre qualité, probablement plus enclin à la dégradation. Des résultats additionnels non publiés montrent en effet que des polymères composés en grande partie d'aminoprocollagène de type I sont plus sensibles à la dégradation par la collagénase que des polymères composés exclusivement de collagène I correctement maturé. Par ailleurs, des souris transgéniques exprimant un collagène muté résistant à la collagénase montrent au contraire un niveau accru de dépôt fibrotique (Issa et al., 2003), confirmant bien que la stabilité du réseau de fibres de collagène est un élément crucial dans l'établissement de la fibrose hépatique.

L'ADAMTS2 est la seule aminoprocollagène peptidase qui soit modulée au cours de la fibrose hépatique. Elle semble donc constituer une cible de choix pour une approche thérapeutique. Il est toutefois probable que l'inhibition simultanée des ADAMTS2, 3 et 14 pourrait avoir un effet encore plus marqué sur le processus fibrotique, en abolissant toute maturation résiduelle des procollagènes fibrillaires. Des études préalables minutieuses seront toutefois requises pour vérifier l'innocuité d'une telle approche.

Un modèle alternatif de fibrose du foie, à savoir une **fibrose péri-portale**, a permis d'évaluer le rôle de l'ADAMTS2 dans un autre contexte de fibrose hépatique, dont les mécanismes pathogéniques divergent de la fibrose induite par les agents toxiques. Dans ce

modèle, la ligature du canal cholédoque provoque une stase biliaire. Elle est suivie d'une inflammation des espaces portes, de l'activation et de la prolifération de cellules épithéliales et de myofibroblastes portaux, d'une prolifération des canaux biliaires et du développement d'une fibrose péri-portale, contrairement à la fibrose induite par le CCl₄ qui montre une prédominance centrolobulaire. Dans ce modèle, une fibrose péri-portale classique a été mise en évidence dans nos souris WT. Dans les souris TS2^{-/-}, par contre, les dépôts conjonctifs autour des canaux biliaires était beaucoup plus modérés, et on n'observait pas d'extension fibreuse vers le parenchyme. Ces observations semblent bien confirmer l'idée selon laquelle une inhibition de l'activité aminoprocollagène peptidase pourrait être une option thérapeutique de choix pour le traitement de tout type de fibrose hépatique, quelle que soit son origine, mais également pour toute fibrose quel que soit l'organe lésé et le facteur inducteur

Enfin, l'implication de l'ADAMTS2 dans le dépôt d'une matrice cicatricielle ectopique a été évaluée dans un modèle d'implantation d'éponges d'Ivalon sous la peau de souris WT et TS2^{-/-}. Ce modèle expérimental fait appel à des mécanismes très proches d'une inflammation chronique granulomateuse à corps étranger, comme en témoigne la présence de cellules géantes de type Langhans. Il permet également l'évaluation de l'invasion progressive du matériau par un tissu de granulation qui, au cours de sa maturation, s'enrichit en collagènes de type I et III et est irrigué par un réseau de vaisseaux sanguins dont on peut suivre la formation progressive (voir point 3). Des analyses histologiques et biochimiques ont mis en évidence une réduction quantitative très significative du tissu de granulation colonisant les éponges implantées chez les souris TS2^{-/-} par rapport aux éponges des souris WT. Par ailleurs, un déficit de maturation des aminoprocollagènes de type I et III a été mis en évidence uniquement dans les éponges TS2^{-/-}. L'infiltrat inflammatoire présent dans les éponges ne semble pas jouer de rôle significatif, car il est similaire dans les éponges implantées aux deux types de souris.

Ces observations sont en totale concordance avec les résultats obtenus dans nos modèles de fibrose hépatique puisqu'ils confirment notre hypothèse selon laquelle une inhibition de l'activité de l'ADAMTS2 serait susceptible de réduire l'accumulation et la vitesse de formation de toute trame conjonctive cicatricielle et de trouver ainsi de nombreuses applications en thérapie humaine dans le cadre du traitement des fibroses.