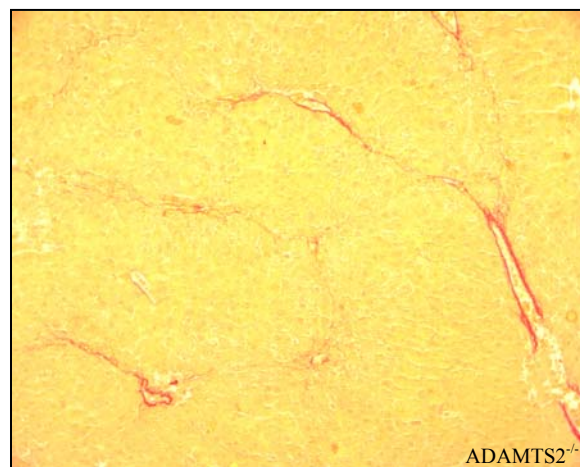
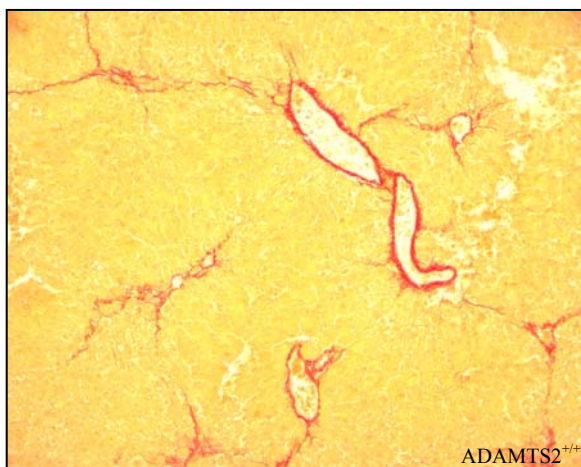

LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES TISSUS CONJONCTIFS

Professeur B. Nusgens

Docteur A. Colige

L'ADAMTS2 - une métalloprotéase contenant un domaine désintégrine et des motifs thrombospondines de type I - dans la fibrose, la cicatrisation et l'angiogénèse tumorale



Fibrose hépatique induite chez la souris normale (ADAMTS2^{+/+}) ou dont le gène de l'ADAMTS2 est invalidé (ADAMTS2^{-/-}).



Frédéric KESTELOOT

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Remerciements

Le travail décrit dans ce manuscrit n'a pas été réalisé en solitaire. A son terme, je voudrais profiter de l'occasion pour remercier toutes les personnes qui, de loin ou de près, ont contribué à sa réalisation.

Je tiens avant tout à remercier profondément les Professeurs Betty Nusgens et Charles Lapière de m'avoir accueilli au sein de leur Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs et de m'avoir fait confiance durant toutes ces années. Leur rigueur scientifique et leur sagacité, mais aussi et surtout leur patience, leur extrême dévouement, leurs qualités humaines et leur soutien m'ont permis de mener à bien ces travaux. Dès mes premiers pas en recherche, ils ont tous deux réussi à me donner le goût de la découverte scientifique. Travailler au sein de leur équipe fut un réel honneur.

Je voudrais également remercier très chaleureusement le Docteur Alain Colige, sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Sa curiosité insatiable et communicative, sa constante envie d'apprendre et ses encouragements dans les moments de découragement et de doute furent un réel moteur pour moi. Il a su m'inculquer des valeurs scientifiques telles que la continuelle remise en question des prétendues certitudes et la quête incessante de nouveaux horizons de recherche. Outre la passion commune que nous avons tous deux pour le tennis, son amitié et sa bonne humeur perpétuelle ont permis d'instaurer une atmosphère de travail agréable, sereine et productive, qui fut primordiale dans mon épanouissement professionnel. Pour tout cela, Alain, très sincèrement merci.

J'ai eu la chance unique de pouvoir évoluer dans un cadre agréable, dynamique, stimulant et dénué de conflit. L'équipe exceptionnelle que composent tous mes collègues et amis du LBTC fut essentielle pour l'aboutissement de ce travail. De plus, la présence d'une équipe technique extrêmement performante et compétente fut une condition sine qua non à la réalisation rigoureuse de ce projet. Je suis heureux de pouvoir leur rendre hommage.

Je commencerai par Yvette, dont l'aide et l'expérience furent indispensables à la réalisation d'une grande partie de ce travail. Je prends plaisir à me remémorer les moments passés en sa compagnie à soigner nos petites "cocottes".

Je voudrais également remercier notre précieux Toto, "l'as de la PCR", sur qui on peut toujours compter; notre chère Marie-Jeanne, dont le sourire permanent n'a d'égal que sa rigueur professionnelle, sa disponibilité et sa compréhension, notamment pour les fastidieux dosages d'hydroxyproline, toujours réalisés avec une précision sans faille; Georges, pour m'avoir inculqué les rudiments de la culture cellulaire avec méthode, et pour sa gentillesse communicative; et enfin Cocotte, la dernière venue, pour son enthousiasme, sa bonne volonté et ses préférences sportives teintées de rouge, qui ont souvent provoqué une bonne ambiance voire une hilarité collective dans le labo.

Toute ma reconnaissance va aussi à Christophe pour ses encouragements continuels et pour l'apport de son raisonnement scientifique, de son regard critique et enthousiaste, et de ses nombreuses connaissances dans des domaines très variés.

Merci également aux "anciens" du labo: Charlie, Pierre et Christine, qui font partie de mon quotidien depuis le début, et Olivier, Sandrine et Zakia, qui évoluent depuis sous d'autres cieux.

Il y a enfin les "nouveaux": Audrey "ON" et Alexia, qui contribuent à la sérénité et la bonne humeur du bureau, mais aussi Johanne, Giang, Victor, Audrey "C", Thibaut et Audrey "S".

Chacun d'entre eux a, à sa manière, contribué à la réussite de cette aventure scientifique et humaine.

Je remercie vivement le Docteur Olivier Vanhooteghem pour son enthousiasme et sa curiosité inassouvie, notamment envers les mécanismes de la cicatrisation. Je lui suis très reconnaissant pour son soutien durant ces derniers mois.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers les "filles d'à côté" qui, en cours de route, sont devenues les "filles d'en haut" pour leur aide précieuse et leurs conseils en matière d'histologie: Patricia, Isabelle, Emilie et Laurence. De manière plus générale, j'ai toujours entretenu avec les membres du Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement des Professeurs Agnès Noël et Jean-Michel Foidart d'excellentes relations basées sur l'entraide et le respect mutuel.

Plusieurs collaborations fructueuses ont été développées au cours de ce travail. Je tiens à remercier le Professeur Alexis Desmoulière, qui m'a fait part de toute son expertise dans le domaine de la fibrose hépatique. Merci aussi au Docteur Isabelle Leclercq pour les expériences de ligature du canal cholédoque. Pour réaliser les expériences de néovascularisation choroïdienne, j'ai pu compter sur l'aide du Docteur Vincent Lambert, du Professeur Jean-Marie Rakjic et du Docteur Patrick Motte.

Je remercie le Fonds National de la Recherche Scientifique de m'avoir fait confiance et offert l'opportunité de réaliser ce projet par les financements "Télévie" successifs qu'il m'a accordés. Dans ce contexte, je tiens à souligner combien la générosité du Grand Public est importante, même de manière indirecte.

Se réaliser dans sa vie professionnelle va de pair avec une vie privée harmonieuse. Je tiens également à remercier ma famille et mes amis pour l'équilibre vital qu'ils m'apportent tous les jours.

Merci à mes parents. Par leur présence, leur soutien inconditionnel, les valeurs humaines et morales qu'ils ont réussi à m'inculquer tout au long de mon enfance et de mon éducation, ils m'ont permis d'arriver là où je suis. Leurs innombrables qualités restent pour moi un exemple dont je m'inspire journallement. Je suis très fier d'eux.

Je terminerai ces remerciements avec une pensée particulière pour Alex, celle qui partage ma vie depuis bientôt 3 ans. Son soutien quotidien tout au long de la rédaction de ce mémoire m'ont souvent donné ce petit coup de pouce indispensable quand le découragement apparaît. Je tiens à te présenter mes excuses pour les nombreuses absences tant physiques que mentales, que tu as endurées en silence. Merci, ma BB, d'être là à mes côtés. Nos projets sont à mes yeux indispensables à mon équilibre de vie.

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	iii
Liste des abréviations	vi
I. Introduction générale	1
1. Tissus conjonctifs	1
1.1 Composition de la matrice extracellulaire	1
A. COLLAGENES.....	2
<i>i- Collagènes fibrillaires</i>	4
<i>ii- FACIT</i>	7
<i>iii- Collagène de type IV</i>	7
B. FIBRES ELASTIQUES	8
C. GLYCOPROTEINES.....	8
D. SUBSTANCE FONDAMENTALE.....	9
1.2 Interactions cellules-matrice extracellulaire.....	10
2. Enzymes protéolytiques	13
2.1 MMPs	14
2.2 Astacines.....	15
2.3 ADAMs	15
2.4 ADAMTSs.....	16
A. Structure des ADAMTSs	17
B. Régulation de l'activité enzymatique et mécanismes de dégradation.....	19
C. Fonctions des ADAMTSs	20
<i>i- ADAMTS2, 3 et 14</i>	20
Fonction aminoprocollagène peptidase	20
Déficiences génétiques	20
<i>ii- ADAMTS13</i>	21
<i>iii- ADAMTS1, 4, 5, 8 et 15</i>	21
<i>iv- ADAMTS9 et 20</i>	22
<i>v- ADAMTS6, 7, 10, 12, 16, 17, 18 et 19</i>	22
3. Réparation tissulaire et cicatrisation.....	23
3.1 Généralités.....	23
3.2 Foie.....	23
A. Architecture fonctionnelle du foie.....	23

B. Fibrose hépatique et cirrhose.....	26
<i>i- Etiologie</i>	27
Excès d'alcool.....	28
Hépatites virales	29
Causes biliaires.....	29
Pathologie hépatique médicamenteuse et toxique.....	29
Autres causes.....	31
<i>ii- Pathogénie</i>	32
<i>iii- Evolution</i>	36
<i>iv- Traitement et régression</i>	37
3.3 Inflammation chronique	39
A. Aspects histologiques.....	39
B. Réaction granulomateuse	39
4. Angiogenèse	41
4.1 Généralités.....	41
4.2 Mécanismes de l'angiogenèse.....	43
A. Etapes de l'angiogenèse bourgeonnante	43
B. Régulation	43
II. Buts et plan du travail	47
III. Résultats	49
<u>Chapitre 1 : Les ADAMTS2, 3 et 14 au cours du développement</u>	<u>49</u>
1. Introduction.....	49
2. Résumé des résultats	50
3. Conclusions.....	52
<u>Chapitre 2 : L'ADAMTS2 dans les processus de réparation tissulaire</u>	<u>63</u>
2.A FIBROSE HEPATIQUE	63
1. Introduction.....	63
2. Résumé des résultats	63
3. Conclusions.....	66
2.B INFLAMMATION CHRONIQUE.....	81
1. Introduction.....	81
2. Résumé des résultats	81
3. Conclusions.....	82
<u>Chapitre 3 : L'ADAMTS2 dans l'angiogenèse</u>	<u>90</u>
1. Introduction.....	90
2. Résumé des résultats	90
3. Conclusions.....	93

IV. Discussion	108
1. Les ADAMTS2, 3 et 14 au cours du développement.....	109
2. Matrices conjonctives cicatricielles.....	112
3. ADAMTS2 et angiogenèse	116
V. Conclusions et perspectives.....	121
VI. Bibliographie	123
VII. Liste des publications personnelles.....	133
1. Articles	133
2. Abstracts publiés.....	134
VIII. Annexe : publication n°1	135

Liste des abréviations

$\alpha 1(I)$: chaîne alpha 1 du collagène de type I
ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase
ADAMTS: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type I motif
AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique
Ang-1: Angiopoïétine-1
ARNm: ARN messenger
 α -SMA: α -actine de type musculaire lisse
bFGF: basic Fibroblast Growth Factor
BMP1: Bone Morphogenetic Protein 1
C1q: sous-unité du premier composant de la voie classique du complément
CCl₄: tétrachlorure de carbone
CE: cellule endothéliale
CLS: structure pseudo-capillaire
CNV: néovascularisation choroïdienne
COMP: Cartilage Oligomeric Matrix Protein
C-terminal: carboxyterminal
CTGF: Connective Tissue Growth Factor
DDR: Discoidin Domain Receptor
DMLA: dégénérescence maculaire liée à l'âge
EB: corps embryonnaire
EDS-VIIC: syndrome d'Ehlers-Danlos de type VIIC
EGF: Epidermal Growth Factor
EGM: Endothelial Growth Medium
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
FACIT: Fibril-Associated Collagen with Interrupted Triple-helices
FAK: Focal Adhesion Kinase
GAG: glycosaminoglycan
G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor
Gly: glycine
HEK293: Human Epithelial Kidney 293 cell
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HMEC: Human Microvessel Endothelial Cell
HSC: cellule étoilée du foie ou cellule de Ito
HSPG: protéoglycan de type héparan sulfate
HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IFN: interféron
IL: Interleukin
ILK: Integrin-Linked Kinase
IPP: complexe associant ILK (Integrin-Linked Kinase), Pinch et Parvin
LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
MARCO: MACrophage Receptor with COLlagenous structure
MEC: Matrice ExtraCellulaire
MMP: Matrix MetalloProteinase

MT-MMP: Membrane-Type Matrix MetalloProteinase
mTS2: ADAMTS2 mutée au niveau du site catalytique
NO: monoxyde d'azote
N-terminal: aminoterminal
OH-Pro: hydroxyproline
OO: Olive Oil
PAI-1: Inhibiteur des Activateurs du Plasminogène de type 1
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PI3-K: Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLAC: Protease/LACunin
PIGF: Placental Growth Factor
pN-III: aminoprotéoglycane de type III
pNcollagène: aminoprotéoglycane
PF-4: Platelet Factor-4
PNP: Procollagen N-Proteinase
Pro: proline
RGD: tripeptide arginine/glycine/acide aspartique
ROCK: Rho-kinase
SCO-spondin: SubCommissural Organ-spondin
SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
TACE: Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme
TGF- β : Transforming Growth Factor-Beta
TIMP: Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProteinases
TNF: Tumor Necrosis Factor
TS2: forme sauvage de l'ADAMTS2
TS2-/-: souris déficientes en ADAMTS2
TSP: ThromboSPondine
TSR1: répétition de type I des thrombospondines
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WT: Wild Type

I. Introduction générale

1. Tissus conjonctifs

Le terme "**tissu conjonctif**" s'applique à un tissu fondamental d'origine mésodermique, servant de support structural aux organes et assurant les échanges métaboliques de l'organisme. Il est formé de deux éléments principaux: les **cellules** et la **matrice extracellulaire** (MEC). Les cellules résidentes sont responsables de la synthèse et de la maintenance de la MEC qui, en retour, influence les fonctions cellulaires.

Du statut de simple charpente de l'organisme, le tissu conjonctif est aujourd'hui reconnu comme un support d'information essentiel pour toutes les cellules. Dans tout organisme pluricellulaire, le bon fonctionnement des cellules au sein des organes est en permanence contrôlé par leurs contacts mutuels et par les signaux issus de l'environnement. Parmi ceux-ci, on peut citer les facteurs diffusibles, comme les facteurs de croissance et les chimiokines, et les informations chimio-mécaniques fournies par les éléments structuraux de la MEC.

1.1 Composition de la matrice extracellulaire

La composition et l'organisation architecturale de la MEC sont adaptées à chaque fonction tissulaire. Elle est ainsi dense et minéralisée dans l'os et la dent, transparente et formée de couches orthogonales successives dans la cornée, résistante dans les tendons ou élastique dans la peau et les vaisseaux. La MEC est constituée de protéines participant à la formation de structures fibreuses, principalement **fibres de collagène** et **fibres élastiques**, de **glycoprotéines** adhésives, telles la fibronectine et la laminine, et d'une matrice organique fortement hydratée, dont l'ancienne dénomination de **substance fondamentale** est toujours en vigueur, composée d'acide hyaluronique et de protéoglycans. En raison de leur rôle essentiel dans l'architecture de la MEC et du centre d'intérêt majeur qu'ils occupent dans ce travail, seule l'information relative aux collagènes sera détaillée, les autres groupes de molécules ne faisant l'objet que de rappels succincts.

A. COLLAGENES

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes du corps humain. Ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurelle de la plupart des tissus. Ils sont par ailleurs impliqués dans d'autres processus biologiques essentiels comme l'adhésion et la migration cellulaire.

Le nom de "collagène" est utilisé comme terme générique pour les protéines composées de trois chaînes polypeptidiques, appelées chaînes α , s'associant pour former un domaine caractéristique en triple-hélice au niveau de séquences répétitives de type $(\text{Gly-X-Y})_n$ (Fig. 1). Un résidu glycine est requis en position 1 car sa petite taille permet le repliement spécifique en triple-hélice. Les positions X et Y peuvent être occupées par divers acides aminés. Toutefois, on retrouve souvent une proline (Pro) en position X et une hydroxyproline (OH-Pro) en position Y. Cette composition et cette distribution caractéristiques sont requises pour la stabilité de la triple-hélice.

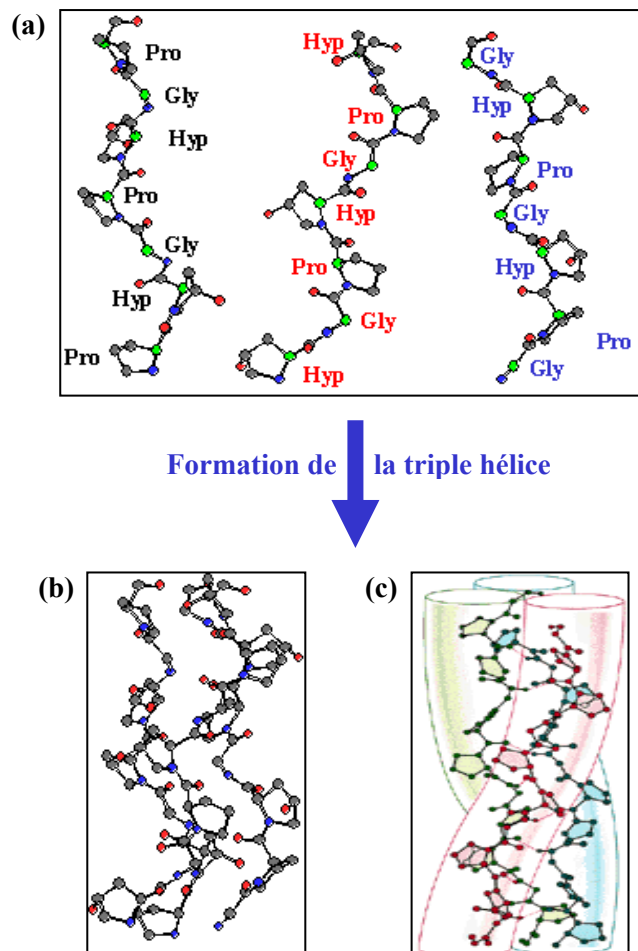


Fig. 1. Structure en triple-hélice

Trois chaînes alpha individuelles (a) s'associent au niveau des séquences répétitives de type Gly-X-Y pour former un domaine en triple-hélice représenté de deux manières différentes (b, c).

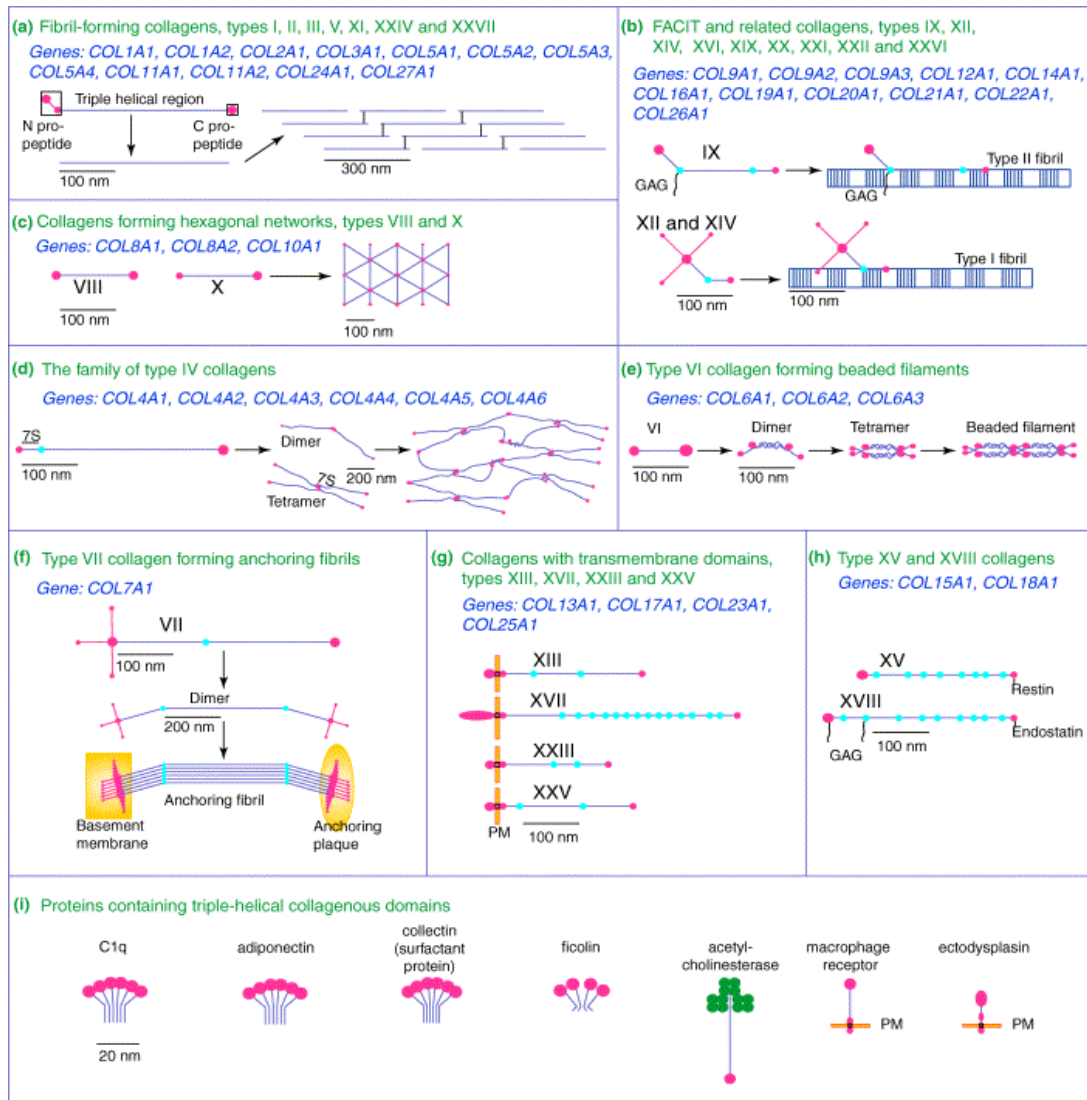


Fig. 2. Membres de la superfamille des collagènes et leur assemblage supramoléculaire.

La superfamille des collagènes peut être divisée en neuf familles distinctes sur base de particularités de ses membres et de leur assemblage supramoléculaire: (a) **collagènes fibrillaires**; (b) collagènes contenant des interruptions dans leur domaine en triple-hélice et associés aux fibres des collagènes fibrillaires (**FACIT**); (c) collagènes formant des réseaux hexagonaux; (d) famille des **collagènes de type IV**, retrouvés *in vivo* au niveau des lames basales; (e) collagènes de type VI; (f) collagène de type VII formant des fibres d'ancrage pour la lame basale; (g) collagènes comprenant un domaine transmembranaire; (h) famille des collagènes XV et XVIII. L'assemblage supramoléculaire des familles (g) et (h) n'a pas encore été établi. Les chaînes polypeptidiques retrouvées dans les 27 types de collagènes différents repris dans ce schéma sont codées par un total de 42 gènes, chaque molécule de collagène étant constituée de trois chaînes pouvant être identiques ou différentes. Le collagène de type XXVIII a été récemment décrit (Veit et al., 2006). En dépit de similitudes avec les collagènes de types VI, son appartenance à une des huit familles mentionnées ci-dessus n'a pu être établie. Un dernier groupe hautement hétérogène (i) est constitué de protéines qui contiennent un domaine collagène en triple-hélice mais ne sont pas considérées comme des collagènes à part entière.

Les domaines collagènes sont en bleu foncé, les domaines amino- et carboxy-terminaux en rose, et les domaines interrompant les triples hélices sont représentés par des points en bleu clair, les très courtes interruptions n'étant pas illustrées. Pour l'acétylcholinestérase, le domaine catalytique est en vert. D'après Myllyharju et al., 2004.

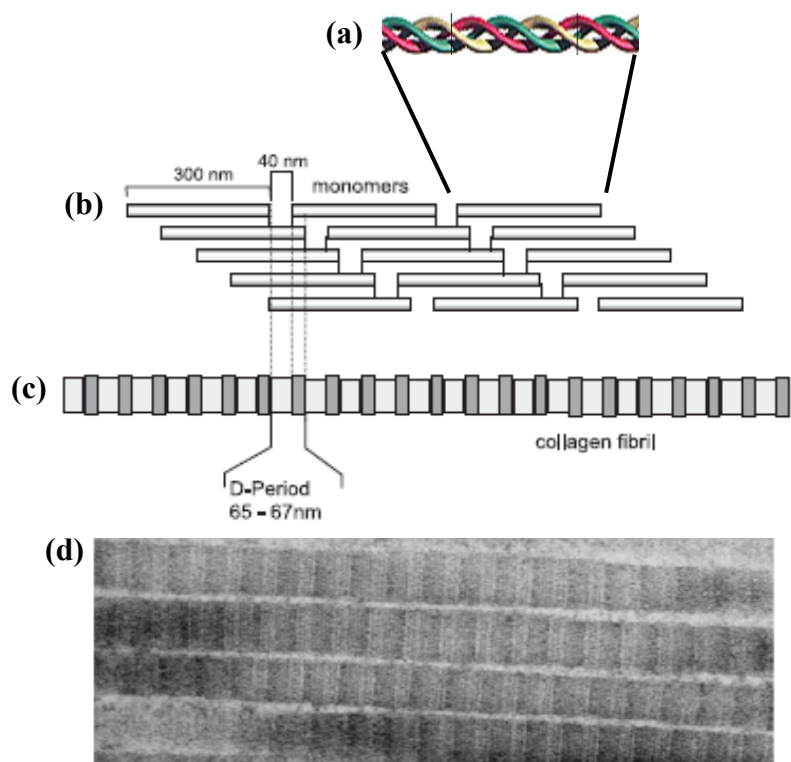
Tous les membres de la famille des collagènes forment cette structure supramoléculaire en triple-hélice dans la MEC, bien que leur taille, leur fonction et leur distribution tissulaire varient considérablement. Jusqu'à présent, 28 collagènes distincts (numérotés de I à XXVIII en fonction de l'ordre chronologique de leur découverte), formés à partir de 43 chaînes α différentes, ont été décrits (Myllyharju et al., 2004; Veit et al., 2006). Sur base de leur structure génomique, de l'agencement de leurs domaines et de considérations fonctionnelles, les collagènes ont été regroupés en sous-familles (Fig. 2). Parmi celles-ci, seuls les collagènes fibrillaires, les FACIT et la famille du collagène de type IV seront décrits plus précisément. Une vingtaine d'autres molécules possèdent des domaines en triple-hélice (MARCO, collectines, adiponectine, ficolines, sous-unité du C1q...) mais ne sont pas considérées comme collagène au sens strict du terme.

1- Collagènes fibrillaires

Il existe 7 types de collagènes fibrillaires (I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII), formés par l'association de 12 chaînes α différentes (Gelse et al., 2003; Myllyharju et al., 2004). Ils sont principalement caractérisés par leur capacité à s'assembler en fibrilles orientées de structure particulière. Le diamètre des fibrilles varie de 25 à 400 nm. Les monomères, composés de 3 chaînes α enroulées en triple-hélice ininterrompue, présentent un décalage progressif d'un

Fig. 3. Représentation schématique de l'assemblage supramoléculaire de fibrilles de collagène.

Les monomères de collagène (a) ont une longueur de 300 nm et sont séparés les uns des autres par des intervalles d'environ 40 nm (b). Cet arrangement est à l'origine de la striation caractéristique des fibres de collagène en microscopie électronique (c et d). D'après Gelse et al., 2003.



quart de leur longueur, résultant, en microscopie électronique, en une striation périodique d'environ 65 à 70 nm (Fig. 3). Ils peuvent être des homotrimères ou des hétérotrimères composés de deux ou trois chaînes différentes.

Le **collagène de type I** est la protéine la plus abondante du corps humain. Il représente plus de 90 % de la masse organique du tissu osseux et est le collagène majoritaire dans les tendons, la peau et les ligaments. On le retrouve aussi dans les tissus conjonctifs interstitiels de la plupart des organes à l'exception du cerveau, et des cartilages et de l'humeur vitrée, où il est remplacé par le collagène de type II. Chaque monomère est composé de deux chaînes α identiques, désignées $\alpha 1(I)$, et d'une troisième chaîne appelée $\alpha 2(I)$, différente dans sa composition en acides aminés. Le collagène de type I est donc un hétérotrimère $\alpha 1(I)_2-\alpha 2(I)$. Le collagène de type I forme des fibres composites en association avec le collagène de type III (par exemple dans la peau, les vaisseaux ou les fibres de réticuline) et/ou le collagène de type V (comme dans les tendons, les os ou la cornée). Dans la plupart des organes, notamment les tendons et les fascias, le collagène de type I apporte aux structures leur solidité mécanique par formation de gros faisceaux de fibres. Dans les os, en association avec l'hydroxyapatite, il définit des propriétés biomécaniques cruciales relatives aux contraintes mécaniques, en termes de charge, de force de tension et de résistance à la torsion.

Le **collagène de type III** est un homotrimère de trois chaînes $\alpha 1(III)$. Il est très largement distribué dans les tissus contenant du collagène de type I, à l'exception du tissu osseux. Il entre dans la composition des fibres de réticuline dans le poumon, le foie, le derme, la rate et la paroi des vaisseaux sanguins. On le retrouve également dans des tissus élastiques comme le ligament jaune (von der Mark, 1981; Kawahara et al., 1991). Comme mentionné ci-dessus, il participe souvent à la formation de fibrilles mixtes en association avec le collagène de type I et, dans une moindre mesure, le **collagène de type V**. Ce dernier, bien que relativement peu abondant, joue un rôle clef puisqu'il forme le cœur des fibres de collagène et qu'il module à la fois leur assemblage et leur diamètre.

Les principales étapes de la synthèse du collagène sont schématisées dans la Fig. 4. Les chaînes α sont synthétisées au niveau des ribosomes sous forme de précurseurs possédant un peptide signal et des extensions (propeptides amino- et carboxy-terminaux) de part et d'autre du domaine central (domaine collagène) contenant la séquence répétitive $(Gly-X-Y)_n$. Elles subissent ensuite différentes modifications enzymatiques dont l'hydroxylation des résidus

prolyl en position Y et d'un nombre plus limité de résidus lysyl par la prolyl-4-hydroxylase et la lysyl-hydroxylase, respectivement. Cette étape rend compte du contenu élevé en hydroxyproline (OH-Pro) (environ 10 %) très caractéristique des molécules de collagène. Certains résidus hydroxylysyl sont ensuite glycosylés, de même que certains résidus asparagyl au niveau des propeptides, au cours de réactions similaires à celles observées pour d'autres protéines. Après ces modifications, les chaînes de procollagène s'alignent, s'associent au niveau de leur extrémité C-terminale, et s'enroulent progressivement en triple-hélice, de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Puisque la stabilité de la triple-hélice dépend du taux d'OH-Pro et que la prolyl-4-hydroxylase n'est active que sur les chaînes individuelles, la vitesse de repliement du domaine collagène sera fonction de l'activité enzymatique. La structure trimérique est ensuite acheminée vers l'espace extracellulaire où des endoprotéases spécifiques, les aminoprocollagène peptidases (**ADAMTS2, 3 et 14**) et les carboxypocollagène peptidases (BMP1/tolloid-like), excisent les propeptides terminaux, ne laissant de part et d'autre du domaine en triple-hélice que deux courtes séquences globulaires, les télépeptides. L'excision des propeptides réduit la solubilité des molécules de collagène qui s'associent alors spontanément pour former des

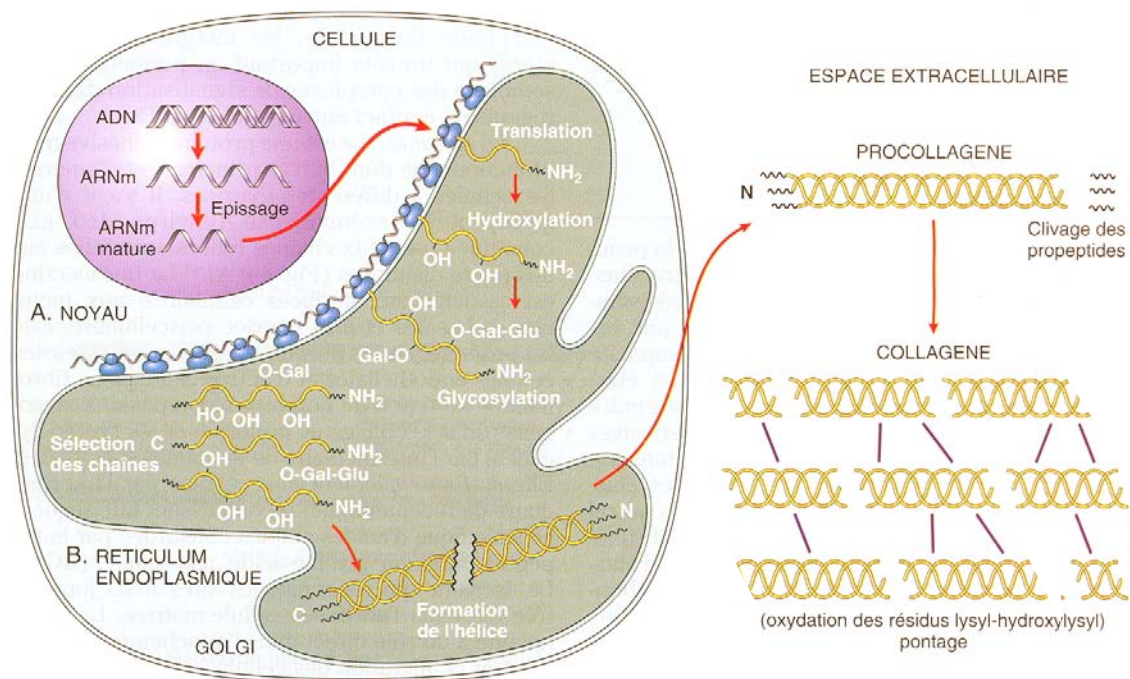


Fig. 4. Etapes de la synthèse du collagène.

Description: *crf* texte. ARNm: ARN messenger ; NH₂: extrémité aminoterminal ; C: extrémité carboxyterminale ; OH: groupe hydroxyl ; Gal-Glu: glucosylgalactose attaché à un résidu hydroxylysyl. D'après Cotran et al., 2000.

fibrilles. Sous l'activité des lysyl-oxydases extracellulaires, certains résidus lysyl et hydroxylysyl sont oxydés en aldéhydes réactionnels qui forment des liaisons croisées avec des groupements amines présents sur une autre chaîne ou une autre molécule. Ceci permet la formation de liaisons covalentes qui, en collaboration avec l'établissement d'interactions complexes avec d'autres protéines ou molécules présentes dans la matrice extracellulaire, confèrent aux fibres de collagène les propriétés de résistance mécanique adéquates.

ii- FACIT

La sous-famille des collagènes FACIT (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helices) est formée de 9 types de collagène comprenant au total 11 chaînes α différentes (Ruggiero et al., 2005). Leur structure est radicalement différente de celle des collagènes fibrillaires puisqu'ils contiennent un nombre variable de courts domaines en triple-hélice espacés par des régions ne présentant pas cette structure. Le **collagène de type IX** s'associe aux fibres de collagène de type II par l'intermédiaire des domaines Col1 et Col2. Ses fonctions restent peu connues. Les **collagènes de type XII et XIV** sont des molécules homotrimériques trouvées en association avec les fibres de collagène de type I avec lesquelles elles interagissent directement ou par l'intermédiaire d'un protéoglycan comme la décorine. Il semble que leurs fonctions essentielles soient de moduler les interactions entre les fibres de collagène de type I et leur environnement et de prévenir la fusion de multiples fibrilles entre elles, contrôlant ainsi les propriétés des fibres et faisceaux de collagène.

iii- Collagène de type IV

Le collagène de type IV est un constituant structural essentiel des lames basales. Celles-ci se composent en outre de laminine, d'entactine, de fibronectine et d'héparan sulfate. Ces différents composants sont intégrés en un agrégat supramoléculaire en feuillet. La structure du collagène de type IV est caractérisée par 3 domaines: le domaine aminoterminal 7S, un domaine carboxyterminal glomérulaire NC1 et une partie centrale en triple-hélice, contenant néanmoins quelques interruptions des répétitions Gly-X-Y, ce qui résulte en une triple-hélice relativement flexible. Cette flexibilité de la structure fibrillaire permet une interaction aisée avec d'autres collagènes ou les autres composants non-collagéniques formant cette lame basale. Ce modèle structural induit une stabilité mécanique considérable combinée à une flexibilité physiologique, deux propriétés requises aux interfaces

dynamiques, comme à la jonction derme/épiderme ou autour de vaisseaux sanguins, sous l'endothélium.

B. FIBRES ELASTIQUES

Les fibres élastiques forment un réseau responsable des propriétés de souplesse, d'étirement et d'élasticité de différents organes, en particulier de la peau, des poumons et des vaisseaux sanguins artériels dont l'aorte. L'**élastine** est synthétisée par les fibroblastes sous forme d'un précurseur, la tropoélastine. Sa polymérisation se réalise au sein d'un réseau de microfibrilles de glycoprotéines de structure, dont la fibrilline et la fibuline, en se disposant en fibres et en lames discontinues.

C. GLYCOPROTEINES

Les glycoprotéines autres que le collagène forment un groupe de molécules composées principalement de chaînes protéiques liées à des polysaccharides ramifiés. Elles incluent des molécules fibrillaires, dont la **fibrilline** et la **fibronectine**, et de nombreuses protéines non filamenteuses comme la **laminine**, composante principale des lames basales, l'**ostéonectine** (ou SPARC pour Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein), les **thrombospondines**, l'**ostéopontine**, l'**entactine** et la **ténascine**. Leur propriété principale est leur capacité à se fixer sur d'autres composants de la MEC, mais également sur des protéines spécifiques de la membrane cellulaire, justifiant leur appellation de protéines matricellulaires. Par ailleurs, leurs domaines structuraux individuels sont doués de propriétés spécifiques (adhésion et prolifération cellulaire, interactions avec des facteurs de croissance et diverses macromolécules de structure) (Engel et al., 1999). Ces domaines sont considérés comme des modules puisqu'on les retrouve sous une forme relativement bien conservée dans des protéines d'origines diverses, parfois en de multiples copies. Enfin, il peut exister plusieurs variants d'une même glycoprotéine, générés par des mécanismes d'épissage alternatif des pré-ARN messagers ou de modifications post-traductionnelles (clivage, glycosylation).

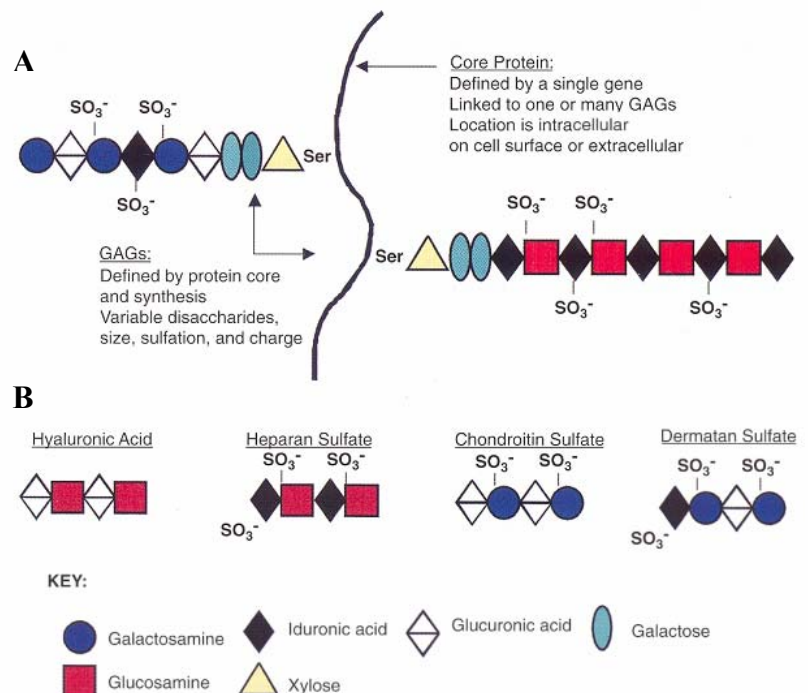
D. SUBSTANCE FONDAMENTALE

La substance fondamentale est amorphe, transparente et possède les propriétés d'un gel semi-fluide. Le liquide interstitiel n'étant pas intimement lié à cette substance, elle forme ainsi une voie de passage de matériaux à travers les tissus conjonctifs et une voie d'échange de métabolites avec l'appareil circulatoire. La substance fondamentale est composée de chaînes polysaccharidiques acides non ramifiées, les **glycosaminoglycans** (GAG).

L'**acide hyaluronique**, principal GAG des tissus conjonctifs lâches, est le seul qui ne contient pas de groupement sulfate. Les autres GAG sont par ailleurs liés de façon covalente à un cœur protéique pour former des **protéoglycans** (Fig. 5), des molécules géantes comportant 90 à 95 % de glucides. En raison des interactions électrostatiques répulsives entre leurs groupements SO_3^- , les molécules de GAG ont tendance à se repousser mutuellement et gardent une forme déployée qui leur permet d'occuper un volume important. Leur caractère hydrophile leur permet d'attirer une grande quantité d'eau et d'ions et est donc responsable de la turgescence caractéristique des tissus conjonctifs. Les GAG participent aussi à la régulation des interactions entre protéines et au contrôle de certaines activités enzymatiques, ce qui en fait des déterminants cruciaux pour des fonctions cellulaires en conditions physiologiques et pathologiques. Ils sont par ailleurs impliqués dans les processus régulant la formation des fibres de collagène (Ameye et al., 2002). A titre

Fig. 5. Structure des protéoglycans.

Le cœur protéique peut supporter de 1 à plus de 100 chaînes de glycosaminoglycans (GAG). Deux chaînes de GAG sont représentées en A: un dermatan sulfate à gauche et un héparan sulfate à droite. Ser représente les résidus sérine auxquels les GAG sont attachés. Les motifs répétitifs formant l'acide hyaluronique, l'héparan sulfate, le chondroïtin sulfate et le dermatan sulfate sont représentés en B.



d'exemple, la structure des fibrilles de collagène est altérée en absence de décorine, avec comme caractéristiques principales la présence conjointe de fibrilles présentant un diamètre inférieur ou supérieur à la normale et l'existence de fibres irrégulières générées par des processus de fusion entre fibrilles individuelles. Ces altérations mènent à une fragilité extrême de la peau chez les souris invalidées pour la décorine (Danielson et al., 1997; Goldberg et al., 2005; Zhang et al., 2006).

1.2 Interactions cellules-matrice extracellulaire

Les propriétés cellulaires d'adhésion, de migration, de prolifération et de différenciation sont en permanence régulées par des signaux issus de leur environnement. A cette fin, les cellules disposent à leur surface de différents récepteurs spécifiques capables de lier des molécules associées aux membranes des cellules adjacentes (interactions cellule-cellule), des facteurs diffusibles (facteurs de croissance, cytokine) mais aussi des composants de la MEC (interaction cellule-matrice extracellulaire). Parmi ces derniers, certains sont hautement

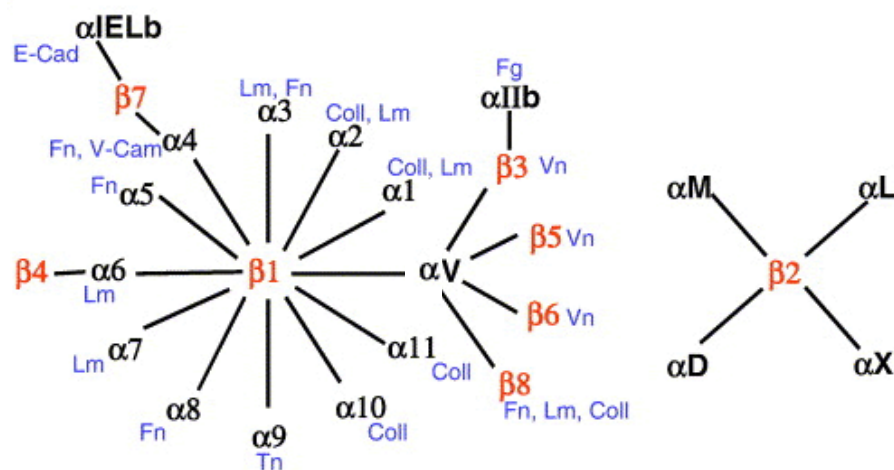


Fig. 6. La famille des intégrines.

La famille des intégrines est composée de 18 sous-unités α et de 8 sous-unités β , qui s'associent pour former une intégrine fonctionnellement active. Sur base de leur association en hétérodimères, les intégrines sont réparties en trois sous-familles principales: les intégrines contenant un monomère β_1 ou α_v , qui sont ubiquitaires, et les intégrines contenant une chaîne β_2 , qui sont plus spécifiquement exprimées dans les leucocytes. Les connections entre les différentes sous-unités α et β symbolisent les associations connues sous forme d'hétérodimère. Chaque hétérodimère se lie à des composants spécifiques de la matrice extracellulaire ou à des contre-récepteurs membranaires. Les ligands des intégrines de la famille β_2 ne sont pas illustrés.

Coll: collagène ; *E-Cad*: E-cadhérine ; *Fg*: fibrinogène ; *Fn*: fibronectine ; *Lm*: laminine ; *Tn*: tenascine ; *V-Cam*: vascular cell adhesion molecule ; *Vn*: vitronectine.

spécifiques, comme les Discoidin Domain Receptors (DDR) qui ne reconnaissent que certains collagènes sous leur forme native (Vogel et al., 2006). D'autres, par contre, manifestent une affinité variable pour divers ligands, comme les syndécans (Couchman et al., 2001).

Les **intégrines** constituent la principale famille de récepteurs impliqués dans l'adhérence des cellules à leur environnement matriciel. Elles consistent en 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui s'associent pour former 24 hétérodimères $\alpha\beta$ différents selon la fonction et le type cellulaire. Les combinaisons uniques des sous-unités déterminent les molécules extracellulaires qui seront spécifiquement reconnues par la cellule, même si les composants matriciels majeurs, tels la fibronectine et le collagène, sont reconnus par diverses intégrines (Fig. 6).

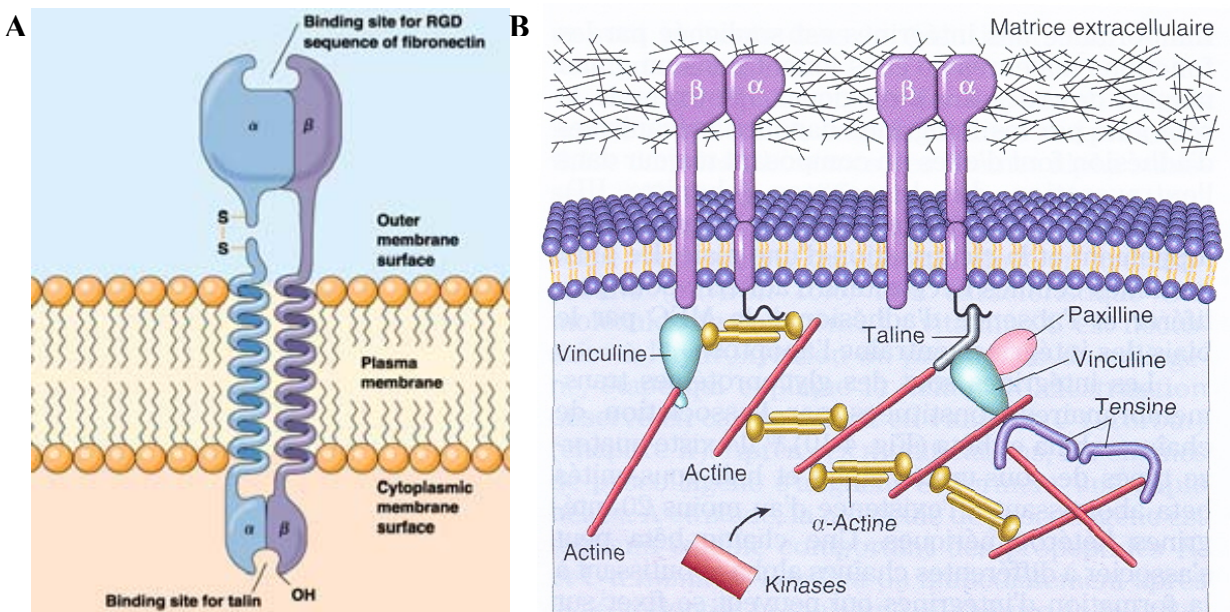


Fig. 7. Structure des intégrines et complexe d'adhésion focale.

A. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires composés de deux sous-unités α et β . Elles se lient aux molécules de la MEC via des séquences spécifiques (comme la séquence RGD de la fibronectine). **B.** Elles induisent l'assemblage d'un complexe de signalisation et de redistribution de certains éléments du cytosquelette. Ce complexe protéique est composé entre autres de la taline, l'actine, la vinculine, la paxilline, la tensine et l' α -actine. La fixation d'un ligand entraîne également l'accumulation focale de molécules de signalisation et de kinases. Ces complexes induisent des signaux qui activent diverses voies de signalisation intracellulaires qui, in fine, permettent de régler plusieurs processus vitaux pour la cellule tels que la survie, la prolifération et la migration en favorisant l'activation de facteurs de transcription. D'après Cotran et al., 2000.

Chaque sous-unité possède un très grand domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un court domaine intracellulaire, pour un total dépassant les 1600 acides aminés. Les domaines extracellulaires se fixent à différents composants de la MEC (fibronectine, laminine, certains collagènes, ...) par l'intermédiaire de séquences spécifiques d'acides aminés, comme par exemple le tripeptide arginine/glycine/acide aspartique (RGD) (Fig. 7A). Par leur domaine cytoplasmique, les intégrines vont indirectement se lier au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de diverses protéines s'associant pour former un complexe, la plaque d'adhésion focale (Fig. 7B).

L'ensemble de ces mécanismes renseigne la cellule sur son environnement, qu'il s'agisse de sa composition ou des résistances mécaniques qui s'y développent, et permet à la cellule, en retour, de modifier la matrice extracellulaire, en y exerçant des tractions et en remodelant sa composition (Deroanne et al., 2001; Lambert et al., 2001a; Lambert et al., 2001b; Chiquet et al., 2003).

Les voies de signalisation intracellulaire, régulées par différentes classes de récepteurs (différentes sous-unités des intégrines, récepteurs aux facteurs de croissance, ...), sont fortement interconnectées puisqu'elles partagent de nombreux médiateurs communs et sont également capables d'influencer leur niveau d'activation respectif (Comoglio et al., 2003; Carragher et al., 2004; Serini et al., 2006; Manso et al., 2006). De ce fait, les divers récepteurs pour les composants matriciels, ainsi que la composition et la structure de la MEC elle-même, constituent des acteurs-clés dans la plupart des processus cellulaires (prolifération, différenciation, survie, synthèse protéique, ...).

2. Enzymes protéolytiques

Les protéases, des enzymes responsables de clivages protéolytiques parfois hautement sélectifs, ont des fonctions biologiques variées: elles interviennent dans la maturation des protéines, la digestion des aliments, la coagulation sanguine, le remodelage des tissus au cours du développement de l'organisme et la cicatrisation. Il existe plusieurs grandes familles de protéases, classées selon l'acide aminé (sérine, thréonine, acide aspartique, cystéine) ou l'atome métallique directement impliqué dans le mécanisme d'action.

Parmi celles-ci, la super-famille des **metzincins** joue un rôle prépondérant dans le tissu conjonctif. Ses membres ont la caractéristique commune de contenir un atome de zinc au

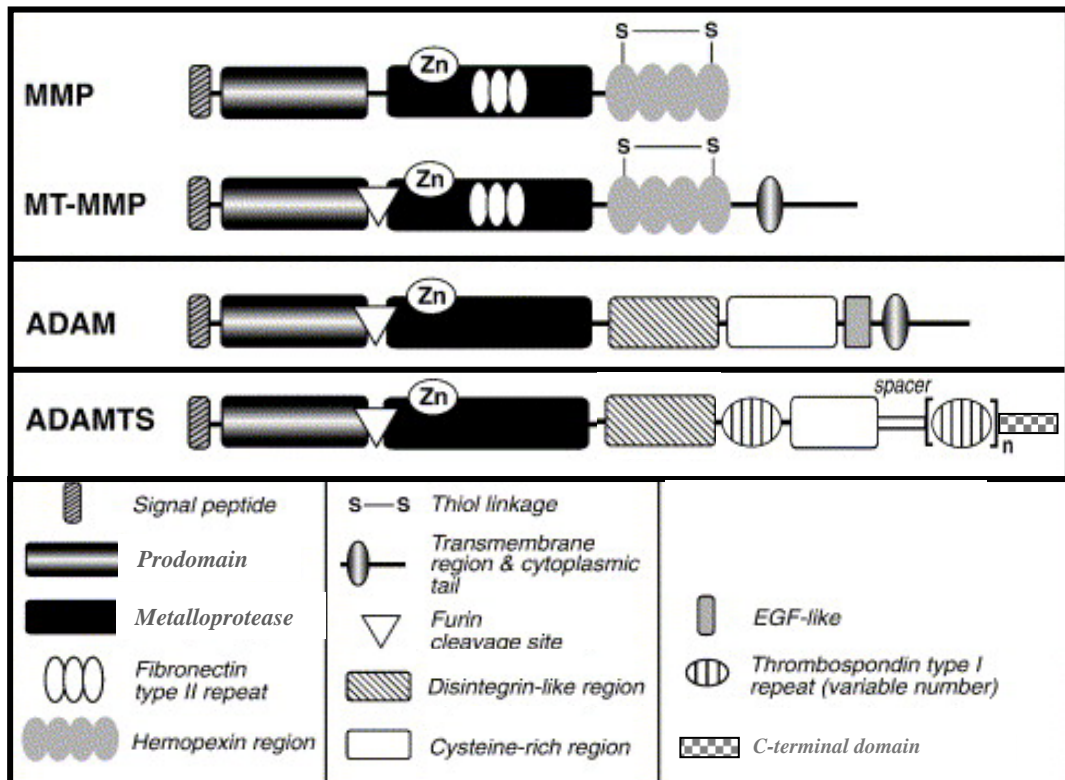


Fig. 8. Structure générale des MMPs, ADAMs et ADAMTSs.

Toutes les MMPs, ADAMs et ADAMTSs contiennent un peptide signal, un prodomaine et un domaine métalloprotéase contenant un site catalytique liant un atome de Zn^{++} . La majorité des MMPs contiennent un domaine hémopexine C-terminal. Certaines MT-MMPs et les ADAMs possèdent un domaine transmembranaire et une queue intracytoplasmique. Les ADAMs et ADAMTSs contiennent également un domaine désintégrine et un domaine riche en cystéines. Chez les ADAMTSs on retrouve, en plus, un nombre variable (1 à 15) de répétitions de type I des thrombospondines, un domaine "Spacer" et parfois un domaine C-terminal de structure variable. D'après Roy et al., 2006.

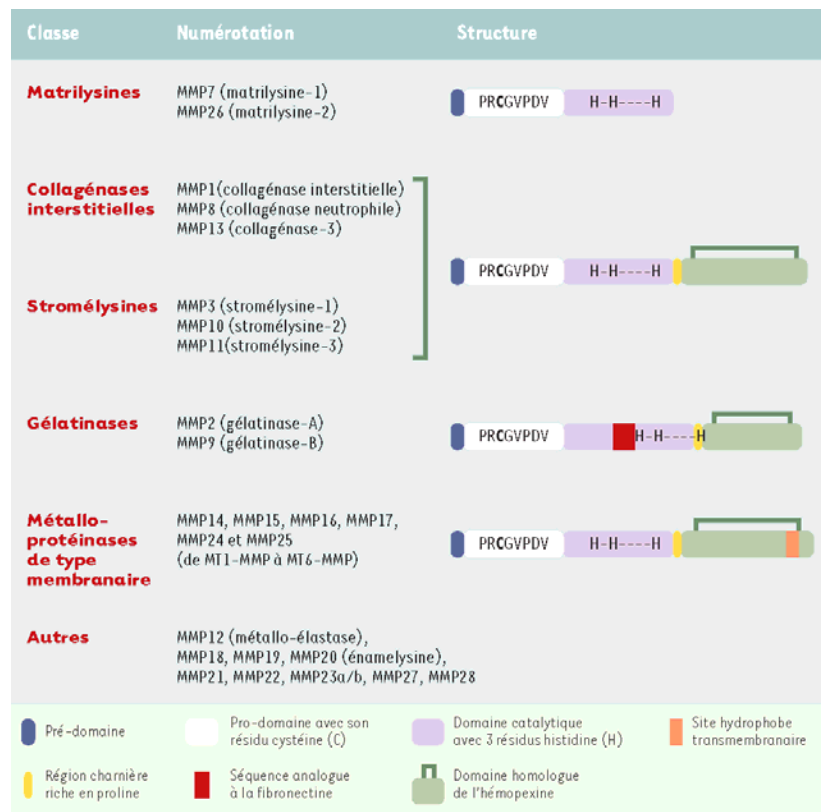
niveau leur site catalytique et de posséder une méthionine cruciale pour le repliement tridimensionnel du domaine actif. Cette super-famille de métalloprotéases est formée entre autres par les "Matrix Metalloproteinases" (MMPs), les astacines, les ADAMs et les ADAMTSs (Stocker et al., 1995) (Fig. 8).

2.1 MMPs

Les métalloprotéases matricielles (MMPs), également appelées matrixines, sont au nombre de 24 membres actuellement décrits chez l'Homme. Elles sont classées en sous-familles en fonction de leur structure et de leur fonction (Fig. 9).

Fig. 9. Classification des MMPs.

Les MMPs sont groupées en 6 classes en fonction de leur structure. Chaque MMP est dénommée par un numéro ou par un nom descriptif en rapport avec ces différentes classes. Seules les métalloprotéases membranaires (MT-MMPs) possèdent un domaine transmembranaire et restent ancrées à la membrane plasmique. Les autres sont sécrétées. D'après Chantrain et al., 2002.



Ces protéases matricielles sont produites sous une forme inactive, appelée zymogène ou pro-MMP. Leur activation nécessite le clivage protéolytique du pro-domaine, généralement induit en-dehors de la cellule par d'autres MMPs, des dérivés mercuriques ou des protéases à sérine, comme la plasmine. Les principaux substrats des MMPs sont les constituants de la MEC. De plus, ils peuvent dégrader des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion cellulaire, des cytokines, des chémokines, des ligands apoptotiques,

des facteurs angiogéniques mais également des zymogènes qu'elles activent, tels que les pro-MMPs (Folgueras et al., 2004).

De ce fait, les MMPs sont des acteurs majeurs participant à la régulation des interactions entre les cellules et leur environnement, tant en conditions physiologiques (développement, cicatrisation, angiogenèse, ...) que pathologiques (arthrite, cancers, ...) (Malemud, 2006). Récemment, il a été démontré que des fragments de dégradation de certains composants de la MEC par des MMPs possédaient des activités biologiques dont étaient dépourvues les protéines mères intactes (Tran et al., 2005). Le mécanisme le plus documenté est la génération de peptides pro- ou anti-angiogènes à partir de divers collagènes (de types IV, VIII, XV ou XVIII), du plasminogène ou du perlécan (Hamano et al., 2003; Mongiat et al., 2003). Il a également été démontré que des fragments spécifiques d'autres protéines de la MEC (laminine, fibronectine) pouvaient moduler la migration et la différenciation cellulaires (Gilles et al., 2001).

2.2 Astacines

Les astacines exercent diverses fonctions au cours du développement et chez les individus adultes, variant de la dégradation des protéines au niveau digestif, au clivage protéolytique de protéines extracellulaires en passant par l'activation de facteurs de croissance. Parmi celles-ci, les membres du sous-groupe des "BMP1/tolloid-like" exercent un rôle important dans la régulation et la formation de la MEC, par clivage de précurseurs protéiques inactifs en protéines matures fonctionnelles. On peut notamment citer l'excision du propeptide C-terminal des procollagènes de type I, II et III (Li et al., 1996), l'activation protéolytique de la lysyl oxydase, nécessaire à la formation de liaisons covalentes au sein des fibres de collagène et d'élastine et à leur stabilisation, ainsi que l'activation de facteurs de croissance de la famille du TGF- β .

2.3 ADAMs

Les ADAMs constituent une famille d'une quarantaine d'orthologues, dont la plupart sont exprimés chez les mammifères. Parmi leurs caractéristiques communes, on peut citer leur localisation transmembranaire, la présence d'un domaine désintégrine connu pour

interagir avec d'autres protéines, dont les intégrines, et d'un domaine catalytique typique des metzincines (Huovila et al., 2005). Elles possèdent des fonctions variées dans de nombreuses situations physiologiques et pathologiques dont la fertilisation, la neurogenèse, l'adipogenèse, la myogenèse et le remodelage cardiaque (Manso et al., 2006). Les ADAMs sont responsables de la plupart des activités "sheddase" qui consistent à cliver une protéine transmembranaire au niveau de sa région "juxta-membranaire" extracellulaire permettant ainsi le relargage d'un peptide possédant une fonction propre. Un exemple bien décrit est le "shedding" par l'ADAM-17 du proTNF- α (TACE) et de ligands du récepteur à l'EGF, ce qui permet leur libération (Sahin et al., 2004). Il est à noter que toutes les ADAMs ne possèdent pas d'activité métalloprotéase. Dans ce cas, leur fonction primaire réside sans doute dans la capacité de leur domaine désintégrine à interagir avec d'autres molécules, dont plusieurs intégrines mais également la fibronectine, la laminine et des protéoglycans (Tomczuk et al., 2003).

2.4 ADAMTSs

Depuis la découverte de deux gènes codant pour les ADAMTS1 et ADAMTS2 en 1997 (Kuno et al., 1997; Colige et al., 1997), un total de 19 membres de la famille des ADAMTSs (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motif) ont été répertoriés dans le génome humain. Ces enzymes sont numérotées de 1 à 20 car l'une d'entre elles, décrite simultanément par deux équipes distinctes, a de ce fait reçu deux noms différents, ADAMTS5 et ADAMTS11. Plusieurs de ses membres sont impliqués dans des pathologies liées notamment aux tissus conjonctifs (Colige et al., 1999; Tortorella et al., 1999).

Au cours de ce travail, nous avons contribué à la caractérisation et à l'étude fonctionnelle de différents domaines des ADAMTSs, ainsi qu'à l'étude de processus de maturation qui régulent leur activité, celle de l'ADAMTS2 en particulier. Pour la cohérence du manuscrit, il nous a paru adéquat d'insérer ces résultats dans ce chapitre introductif. La publication n°1, relative à ces résultats, est reprise en annexe.

A. Structure des ADAMTSs

D'un point de vue évolutif et structurel, les ADAMTSs présentent des caractéristiques communes avec les MMPs et surtout les ADAMs. Elles tirent leur nom de la présence de trois types de domaine: un domaine métalloprotéase, un domaine désintégrine proche de celui de la famille des ADAMs, et un nombre variable de domaines appelés répétitions de type I des thrombospondines (TSR1) (Fig. 10).

Le **peptide signal** est suivi du **prodomaine** de longueur variable qui maintient le domaine catalytique dans un état inactif chez la plupart des ADAMTSs, à l'exception de l'ADAMTS13. Ce prodomaine est clivé par une endopeptidase de la famille de la furine (*publication n°1*) au niveau d'un site de reconnaissance localisé entre le prodomaine et le domaine catalytique (Flannery et al., 2002; Wang et al., 2004).

Le **site catalytique** contient une séquence conservée dans toutes les metzincins (HEXXHXXGXXH). Trois résidus histidyl interagissent et fixent un ion Zn^{++} dont la présence est requise pour la réaction catalytique. Cette interaction est stabilisée par une glycine, qui positionne correctement les trois histidines. Un résidu méthionyl, crucial pour la conformation du domaine, se trouve également à courte distance en aval du site de liaison du Zn^{++} (Bode et al., 1993; Rawlings et al., 1995).

À la suite du domaine catalytique se retrouve un **domaine désintégrine**, présentant une certaine homologie de séquence avec celui rencontré dans les ADAMs, sans posséder toutefois le même arrangement des résidus cystéyl (Colige et al., 1997). Il n'est pas certain que cette région soit capable de se lier effectivement aux intégrines. Une analyse cristallographique récente démontre d'ailleurs que le domaine désintégrine de l'ADAMTS1 ne possède pas d'homologie de structure avec le domaine désintégrine des ADAMs, en particulier l'ADAM10, mais plutôt avec leur domaine riche en cystéines (Gerhardt et al., 2007).

Les différenciant des autres métalloprotéases, les ADAMTSs possèdent un ou plusieurs domaines appelés **répétitions de type I des thrombospondines** (TSR1). Ces domaines sont retrouvés dans de nombreuses protéines de familles différentes (Tucker, 2004) où ils sont responsables d'interactions moléculaires complexes et variées. Ainsi, un domaine présent dans la thrombospondine 1 peut lier l'héparine, activer des formes latentes de TGF- β , favoriser l'adhésion cellulaire ou inhiber l'angiogenèse (Guo et al., 1992; Sipes et al., 1993; Iruela-Arispe et al., 2004).

Le **domaine riche en cystéine** possède une séquence RGD susceptible d'interagir avec certaines intégrines (Colige et al., 1997). Sa fonction reste néanmoins mal connue. Il est suivi d'un domaine **Spacer** dépourvu de tout résidu cystéyl et dont la fonction est également mal documentée. Il pourrait être impliqué dans la spécificité de reconnaissance du substrat par les différentes ADAMTSs (Colige et al., 2004; Hashimoto et al., 2004; Ai et al., 2005).

A l'exception de l'ADAMTS4, les autres ADAMTSs possèdent ensuite de 1 à 15 domaines TSR1, de séquence plus variable que le TSR1 central, qui pourraient également jouer un rôle dans la spécificité d'action propre à chaque ADAMTS (*publication n°1*).

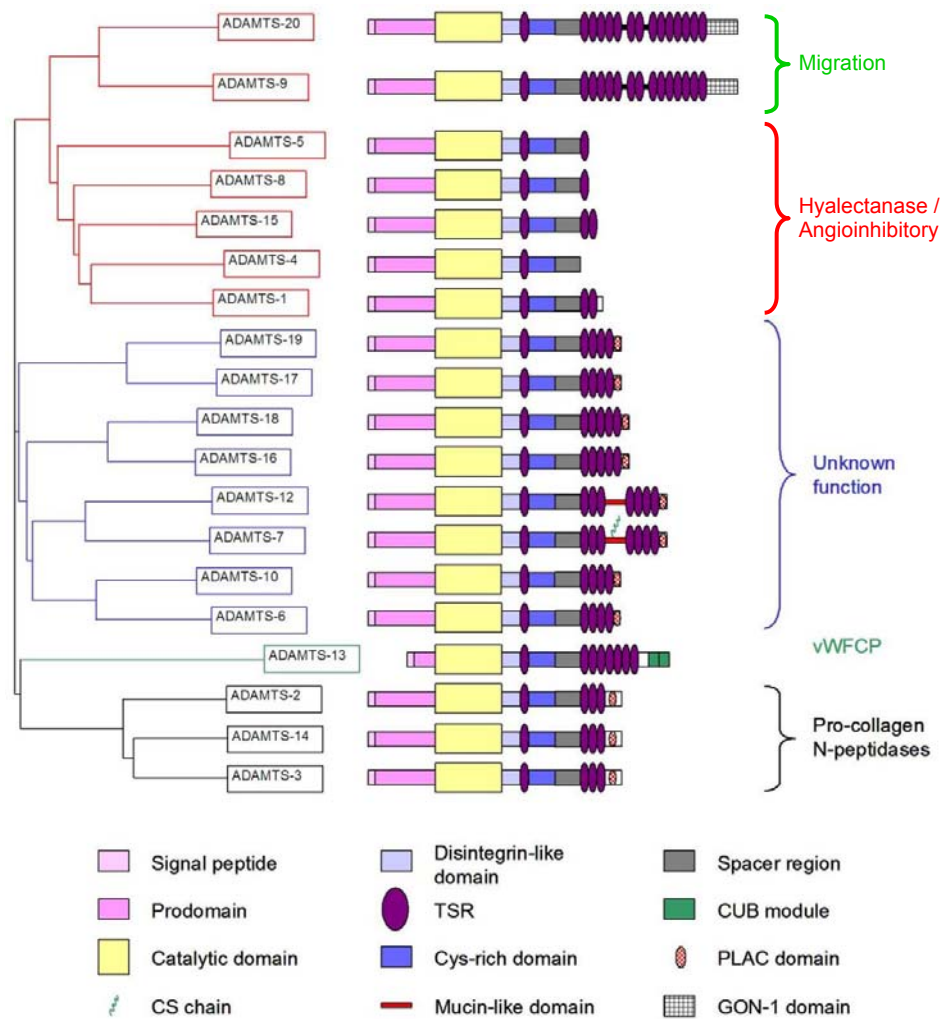


Fig. 10. La famille des ADAMTSs.

Ce schéma représente de façon succincte le degré de parenté des différentes ADAMTSs, les différents domaines structuraux retrouvés dans les différents membres de cette famille et les rôles fonctionnels principaux actuellement connus. CS: chondroïtine sulfate ; CUB: complément C1r/c1s, Uegf (epidermal growth factor-related sea urchin protein) and BMP1 (bone morphogenetic protein 1) ; PLAC: protease and lacunin ; TSR: thrombospondin type I repeat ; vWFCP: von Willebrand factor-cleaving protease ; GON-1: domaine similaire à un domaine retrouvé dans la protéine GON-1 chez *C. elegans*. D'après Jones et al., 2005.

Enfin, quatre types de **modules C-terminaux** ont été décrits pour différents sous-groupes d'ADAMTSs:

- Un **domaine GON-1**, du nom de l'ADAMTS caractérisée chez *C. elegans* (ADAMTS9 et 20) ;
- Un **module PLAC** (ADAMTS6, 7, 10, 12, 16, 17, 18 et 19) caractérisé entre autres par 6 résidus cystéyl ;
- Un **domaine CUB** est retrouvé sur la seule ADAMTS13 ;
- Un **domaine PNP** (pour Procollagen-N-Proteinase specific domain), plus étendu, se retrouve dans les ADAMTS2, 3 et 14, et inclut un module PLAC.

B. Régulation de l'activité enzymatique et mécanismes de dégradation

Tout comme pour les MMPs et les ADAMs, le contrôle de l'activité enzymatique des ADAMTSs peut être exercé à de multiples niveaux, notamment lors de la transcription, de la traduction, de son activation à partir du zymogène ou de son inhibition par des inhibiteurs spécifiques naturels.

Comme rappelé ci-dessus, le prodomaine est clivé par un membre de la famille des furines dans la plupart des ADAMTSs (Wang et al., 2003; Wang et al., 2004). De plus, des clivages protéolytiques dans les domaines C-terminaux de certaines ADAMTSs ont été décrits (Rodriguez-Manzaneque et al., 2000) permettant d'accroître leur activité, notamment dans le cas de l'ADAMTS4 (Kashiwagi et al., 2004), de l'ADAMTS13 (Zheng et al., 2003) et de l'ADAMTS2 (*publication n°1*). Toutefois, il est également possible que ces mêmes mécanismes protéolytiques, ou le clivage d'autres domaines, puissent inhiber l'activité enzymatique intrinsèque de l'enzyme, ou de modifier sa liaison à divers ligands. Ces protéolyses sont le résultat soit de mécanismes autocatalytiques (*publication n°1*), soit de l'action d'autres enzymes (Gao et al., 2004).

Les inhibiteurs naturels des ADAMTSs sont peu nombreux. A l'heure actuelle, seuls l' α 2-macroglobuline (*publication n°1*) et le TIMP-3 (Wang et al., 2006) ont démontré un potentiel inhibiteur significatif. Des protéines de la famille de la papiline, présentant des ressemblances avec les domaines auxiliaires des ADAMTSs, ont été décrites comme

inhibiteurs non compétitifs de l'ADAMTS2 (Kramerova et al., 2000; Hirohata et al., 2002; Hall et al., 2003).

C. Fonctions des ADAMTSs

i- ADAMTS2, 3 et 14

Fonction aminoprocollagène peptidase

L'ADAMTS2 est responsable de l'essentiel du clivage de l'aminoprocollagène (pNcollagène) de type I dans la peau (Lapière et al., 1971; Nusgens et al., 1992; Colige et al., 1999; Colige et al., 2004). Elle est également capable de cliver le pNcollagène de type II dans le cartilage (Tuderman et al., 1978; Fernandes et al., 2001). Il a récemment été démontré qu'elle était par ailleurs capable de cliver les pNcollagènes de type III et de type V (Wang et al., 2003; *publication n°1*). Les ADAMTS3 et 14 sont également des aminoprocollagène peptidases dont les substrats préférentiels sont les pNcollagènes de type II et I, respectivement (Fernandes et al., 2001; Colige et al., 2002).

Déficiences génétiques

Le manque d'activité de l'ADAMTS2 est responsable d'une maladie héréditaire chez l'Homme (le syndrome d'Ehlers-Danlos de type VIIC) et chez l'animal (dermatosparaxie bovine) caractérisée par une fragilité extrême de la peau (Nusgens et al., 1992; Colige et al., 1999) et d'autres organes. Des souris, dont le gène de l'ADAMTS2 a été invalidé, ont été créées par le groupe de D. Prockop à Philadelphie (Li et al., 2001). Sous leur forme homozygote, ces souris présentent la plupart des caractéristiques cliniques rencontrées dans la dermatosparaxie humaine et animale. De plus, une stérilité des mâles a été mise en évidence (Li et al., 2001), ce qui suggère que l'ADAMTS2 exerce d'autres fonctions encore inconnues.

ii- ADAMTS13

L'ADAMTS13 est l'ADAMTS dont la fonction est la mieux décrite. Elle est responsable de l'activation protéolytique du facteur de von Willebrand (Zheng et al., 2003), un intermédiaire essentiel de la cascade de coagulation, d'où son autre appellation de **von Willebrand factor-cleaving protease**. Des mutations de ce gène sont à l'origine du purpura thrombotique thrombocytopenique (Levy et al., 2001).

iii- ADAMTS1, 4, 5, 8 et 15

Ces ADAMTSs sont appelées **aggrécanases** vu leur capacité à cliver l'aggrécan, un protéoglycan de la famille des hyalectans, en un site spécifique (Sandy et al., 1992; Kuno et al., 2000). Une activité protéolytique envers d'autres hyalectans a également été décrite, notamment pour le versican et le brévican (Nakamura et al., 2000; Sandy et al., 2001). Ce sous-groupe d'ADAMTSs possède sans doute un spectre beaucoup plus large de substrats potentiels, ce qui est illustré par les multiples anomalies observées chez la souris déficiente en ADAMTS1 (Shindo et al., 2000; Yokoyama et al., 2002). L'ADAMTS5 et, dans une moindre mesure, l'ADAMTS4, semblent fortement liées à la pathogénie de l'arthrite (Glasson et al., 2004; Glasson et al., 2005; Stanton et al., 2005). Récemment, la double délétion des ADAMTS4 et 5 chez la souris a permis la mise en évidence de mécanismes non protéolytiques compensatoires qui permettent l'homéostasie du cartilage (Ilic et al., 2007).

Les ADAMTS1 et 8 sont capables d'inhiber l'angiogenèse induite par le VEGF et le bFGF avec une efficacité remarquable (Iruela-Arispe et al., 1999; Vazquez et al., 1999). Cet effet anti-angiogène de l'ADAMTS1 résulte de son interaction avec le VEGF165 (Luque et al., 2003) empêchant ainsi sa liaison avec un des ses récepteurs spécifiques, le VEGFR-2. Plusieurs domaines de l'ADAMTS1, dont le domaine métalloprotéase, semblent impliqués dans ce mécanisme (Iruela-Arispe et al., 2003; Iruela-Arispe et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que l'ADAMTS1 était par ailleurs capable de cliver et de relarguer de peptides anti-angiogènes à partir des thrombospondines 1 et 2 (Lee et al., 2006).

iv- ADAMTS9 et 20

L'ADAMTS20 est requise pour la migration des mélanoblastes au cours du développement embryonnaire chez la souris, à l'instar d'un de ses orthologues chez *C. Elegans*, Gon-1, impliqué dans la migration cellulaire durant la formation des gonades (Blelloch et al., 1999). La capacité de l'ADAMTS9 à cliver certains protéoglycans, dont le versican et l'aggrécane, a été démontrée (Somerville et al., 2003), ce qui indique une certaine redondance de la fonction des diverses ADAMTSs.

v- ADAMTS6, 7, 10, 12, 16, 17, 18 et 19

Les informations relatives à la fonction de ces ADAMTSs restent incomplètes. Certaines sont douées d'activités enzymatiques, comme les ADAMTS7 et 12 qui peuvent dégrader la Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), une protéine de la famille des thrombospondines, présente principalement dans la MEC des tissus musculo-squelettiques (Liu et al., 2006a; Liu et al., 2006b). Par ailleurs, une mutation de l'ADAMTS10 provoque une forme récessive du syndrome de Weill-Marchesani (Dagoneau et al., 2004).

3. Réparation tissulaire et cicatrisation

3.1 Généralités

Toute lésion tissulaire induit une réaction inflammatoire dont le but est d'éliminer l'agent agresseur et/ou les tissus nécrotiques et de permettre la réparation des tissus lésés. Dans un nombre limité de situations, cette réparation peut aboutir à la restitution *ad integrum* des structures tissulaires (régénération tissulaire parfaite). Dans la majorité des cas, on assiste cependant au remplacement des structures lésées par un tissu fibreux au cours d'un processus de **cicatrisation**.

Dans un premier temps, les mécanismes inflammatoires vasculaires, cellulaires et humoraux induisent la formation d'un **granulome inflammatoire**, tissu riche en fibrine caractérisé par le développement de nouveaux vaisseaux, la mobilisation de fibroblastes et l'infiltration par des leucocytes. Les macrophages permettent ensuite l'élimination des tissus nécrotiques, des germes, de l'exsudat inflammatoire et des corps étrangers éventuels. Cette phase de détersion est immédiatement suivie de la formation d'un **bourgeon charnu**, qui peut être considéré comme un tissu conjonctif hautement cellularisé mais relativement pauvre en collagène et en vaisseaux. Ce tissu néoformé va progressivement s'appauvrir en cellules inflammatoires et s'enrichir en collagène et en vaisseaux pour mener à la formation d'un tissu cicatriciel pouvant éventuellement évoluer en **fibrose**.

Ce processus intervient dans des situations pathologiques variées affectant de nombreux organes et tissus. Dans un souci de concision, nous n'introduirons plus spécifiquement que deux processus pathologiques étudiés au cours de notre travail.

3.2 Foie

A. Architecture fonctionnelle du foie

Le foie, qui est l'organe interne le plus volumineux de l'organisme, est situé sous le diaphragme et traverse la cavité abdominale sur toute sa largeur. Il est compartimenté en lobes et entouré d'une capsule conjonctive, la capsule de Glisson. La vésicule biliaire est située au niveau de son lobe droit. Le foie présente une organisation vasculaire particulière

puisque l'apport sanguin y est double. D'une part, la **veine porte**, formée de l'union de la veine splénique et de la veine mésentérique supérieure, apporte au foie un sang riche en nutriments en provenance de la rate et du tube digestif. L'**artère hépatique**, branche du tronc coeliaque, apporte au foie du sang oxygéné. Le sang quitte ensuite le foie par trois **veines sushépatiques** principales et 2 à 4 veines sushépatiques accessoires qui se jettent dans la veine cave inférieure. Autre particularité: les gros vaisseaux qui irriguent le tissu hépatique se ramifient rapidement en très petits capillaires (sinusoïdes), ce qui a pour effet de ralentir brusquement la circulation sanguine.

Responsable de près de 500 activités métaboliques différentes, le foie est un organe très complexe qui occupe une position stratégique dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Il joue le rôle d'une vaste usine chimique, synthétisant de grosses molécules complexes à partir de substances de faible poids moléculaire drainées par le sang, en particulier des substances absorbées par l'intestin et véhiculées par le système porte. Le foie synthétise la bile qui est transportée au duodénum par un système de canaux (voies biliaires) et dégrade de nombreuses substances toxiques qui lui parviennent par l'artère hépatique.

La ramification vasculaire aboutit aux **espaces portes** constitués d'une branche de l'artère hépatique, d'une branche de la veine porte et d'un ou deux canaux biliaires (Fig. 11). Plusieurs espaces portes délimitent un **lobule** centré autour d'une branche terminale de la veine sus-hépatique, encore appelée veinule hépatique terminale ou **veine centrolobulaire**. Le sang circule de l'espace porte vers la veine centrolobulaire au sein du parenchyme hépatique. Celui-ci s'organise en travées monocellulaires **d'hépatocytes** qui s'étendent de la zone périportale à la zone centrolobulaire et sont séparées les unes des autres par les **sinusoïdes**. Ces derniers sont tapissés par un endothélium largement fenestré, qui ne repose pas sur une lame basale mais est intimement lié aux plaques et cordons d'hépatocytes dont il reste cependant séparé par un espace. Cet **espace périsinguoidal de Disse** est le principal siège des échanges bilatéraux de substances entre les hépatocytes et le sang sinusoïdal. Les capillaires sinusoïdes sont partiellement tapissés de cellules phagocytaires (**cellules de Kupffer**) dérivées des monocytes du sang circulant. Ils ont pour fonction de débarrasser le sang sinusoïdal des impuretés non retenues par la barrière intestinale (endotoxines bactériennes, particules minérales ou virales, ...). Les **cellules étoilées du foie** (HSCs), également appelées cellules stellaires ou cellules de Ito, et dont l'origine reste sujet à débat (Geerts, 2004), sont situées dans l'espace de Disse et ont pour fonctions le stockage de la vitamine A, la synthèse de la matrice extracellulaire hépatique et, en tant que sources

importantes de médiateurs solubles, le maintien de l'homéostasie dans le microenvironnement du sinusoïde hépatique (Geerts, 2001).

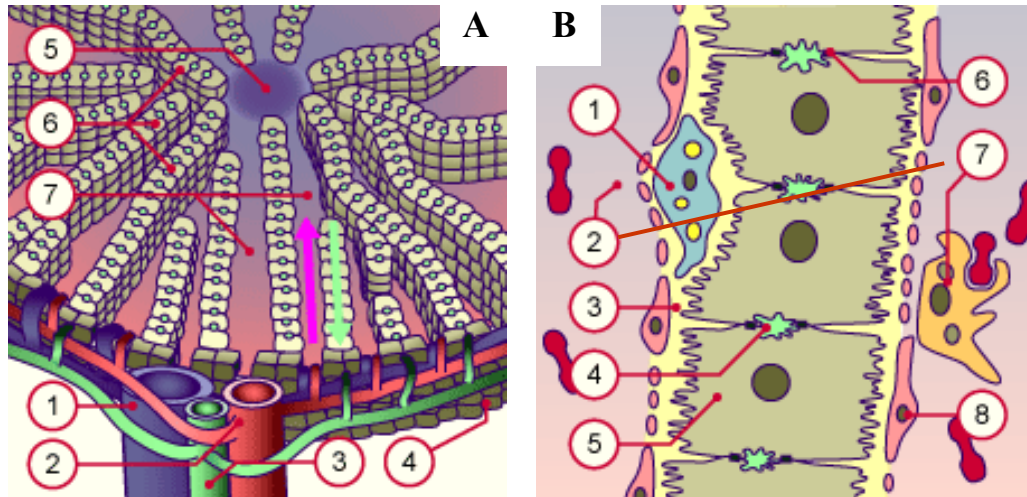


Fig. 11. Architecture du foie

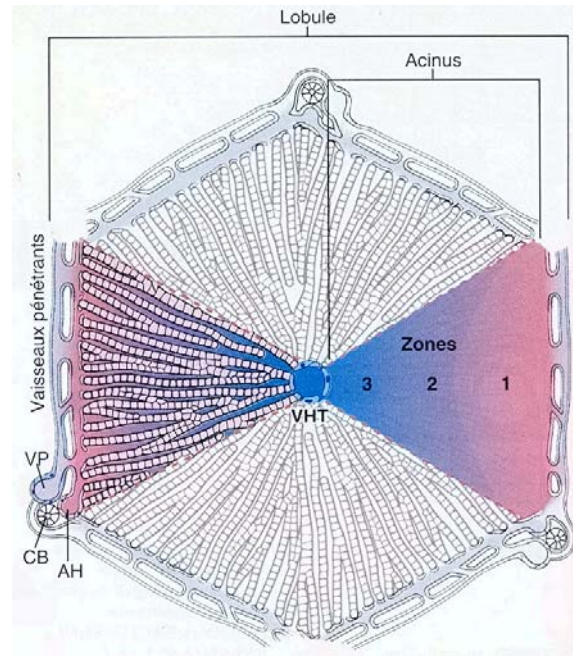
(A) Les hépatocytes sont disposés en travées (6) entre lesquelles se trouvent les sinusoides (7) où circule le sang amené par les artérioles hépatiques (2) et les veinules portes (1). Le sang du sinusoides se déverse dans une veinule hépatique centrolobulaire (5). La bile produite par les hépatocytes entre dans d'étroits canalicules qui se déversent dans de petits canaux biliaires (3). Les lobules sont séparés les uns des autres par une lame limitante (4) d'hépatocytes. (B) La face sinusoidale de l'hépatocyte (5) est séparée du capillaire sinusoidal (2) par l'espace de Disse (3) bordé de cellules endothéliales (8). Les cellules de Kupffer (7) tapissent partiellement la face sinusoidale de l'endothélium, tandis que les cellules étoilées (1) sont situées dans l'espace de Disse. Les faces canaliculaires des hépatocytes adjacents montrent de petites gouttières exactement opposées qui forment un tube appelé canalicule biliaire (4) limité par des jonctions serrées (6).

Il existe au sein des hépatocytes une hétérogénéité fonctionnelle et ultrastructurale, selon leur distance par rapport à l'irrigation artérielle. Alternativement au concept classique de lobule hexagonal orienté autour de la veine centrolobulaire, l'architecture hépatique peut être considérée sur base d'une unité structurale triangulaire, l'**acinus**, comportant à sa base les ramifications terminales de l'artère hépatique et de la veine porte provenant des espaces portes, et à leur sommet une veine centrolobulaire (Fig. 12). Le parenchyme de chaque acinus hépatique est subdivisé en 3 zones, la première étant la plus proche de l'apport vasculaire, la troisième située près de la veine centrolobulaire, et la seconde occupant la région intermédiaire. Cette zonation reflète également des fonctionnalités spécifiques du parenchyme hépatique. Par exemple, la régulation de l'écoulement de la bile en condition physiologique est principalement le fait des hépatocytes périportaux, les hépatocytes centrolobulaires ne subissant l'accumulation de bile qu'en cas de syndrome rétentionnel

(cholestase). De même, il existe un gradient lobulaire fonctionnel pour de nombreuses enzymes. Par ailleurs, de nombreuses atteintes hépatiques montrent également une distribution zonale.

Fig. 12. Organisation du foie

Le lobule hexagonal classique est orienté autour d'une veine centrolobulaire, avec des espaces portes à ses sommets (3 sont représentés sur ce schéma). L'acinus, triangulaire, présente, à sa base, les vaisseaux d'apport provenant des veines portes et des artères hépatiques, et pénétrant dans le parenchyme. Le sommet est formé par la veine centrolobulaire. Les zones 1, 2 et 3 représentent les régions métaboliques s'éloignant progressivement de l'apport sanguin. AH: artère hépatique ; VP: veine porte ; CB: canalicule biliaire ; VHT: veine hépatique terminale ou centrolobulaire. D'après Crawford, 2000.



B. Fibrose hépatique et cirrhose

Initialement bénéfique et destinée à combler rapidement les pertes tissulaires importantes, la formation d'un tissu cicatriciel peut s'avérer pathogénique si le remodelage tissulaire est excessif et mène à la persistance d'une trame conjonctive abondante. Dans certaines situations, cette trame ectopique pourra finalement être à l'origine d'une insuffisance, voire d'une perte fonctionnelle complète, de l'organe lésé. Pour cette raison, la fibrose cicatricielle est souvent considérée comme le résultat d'un processus de réparation tissulaire inadéquat et excessif.

La fibrose hépatique constitue un problème médical majeur en raison de la morbidité et de la mortalité significatives qui lui sont associées. Son impact socio-économique grandissant, ainsi que l'absence d'outils thérapeutiques efficaces, sont soulignés dans la littérature récente (Fallowfield et al., 2004; Fowell et al., 2006; Friedman et al., 2006).

La **cirrhose** est le stade ultime de la destruction progressive et diffuse des cellules hépatiques et de l'architecture générale du foie. Elle est caractérisée par la formation de **septa fibreux** en ponts (c'est-à-dire reliant espace porte et veine centrolobulaire), déposés

sous la forme de fines bandes ou de larges cicatrices remplaçant plusieurs lobules adjacents, et de **nodules parenchymateux** de taille variable et peu fonctionnels, créés par la régénération d'hépatocytes. Outre les profonds remaniements de l'architecture hépatique, la cirrhose provoque une augmentation de la résistance au flux sanguin portal au niveau sinusoidal ainsi que la compression des veines sus-hépatiques par la fibrose périvasculaire et les nodules parenchymateux, ce qui induit une augmentation de la pression dans le système vasculaire porte (**hypertension portale**).

i- Etiologie

Les principales causes primaires de la fibrose hépatique sont l'excès d'alcool, une infection virale, une stase des sels biliaires ou divers syndromes métabolique (Tableau 1). L'exposition chronique à de nombreux médicaments et substances hépatotoxiques peut également mener à une fibrose voire à une cirrhose (Sherlock et al., 2002).

Tableau 1. Causes des cirrhoses chez l'adulte.

Causes fréquentes	Alcoolisme Hépatite chronique B ou B-D Hépatite chronique C Hémochromatose génétique
Causes rares	Cirrhose biliaire primitive Cirrhose biliaire secondaire à une lésion traumatique de la voie biliaire principale Cirrhose biliaire secondaire à une lithiase intrahépatique diffuse Cirrhose biliaire secondaire à une cholangite sclérosante Hépatite chronique auto-immune Foie cardiaque Thrombose des veines sus-hépatiques (syndrome de Budd-Chiari)
Causes très rares	Cirrhose pseudo-alcoolique de l'obésité et du diabète Maladie de Wilson Déficit homozygote en α -1-antitrypsine Protoporphyrurie érythropoïétique Cholestérolose hépatique Maladie de Gaucher

D'après Benhamou et al., 1995.

Excès d'alcool

La consommation chronique d'alcool entraîne des effets néfastes variés, liés principalement à la toxicité d'un de ses métabolites, l'acétaldéhyde. Bien que des chevauchements soient fréquemment rencontrés, trois formes distinctes d'affections sont décrites suite à l'excès d'alcool: une infiltration graisseuse (**stéatose** hépatique), une réaction inflammatoire avec nécrose focale des hépatocytes (**hépatite** alcoolique) et une fibrose (évoluant vers la **cirrhose**). Les deux premières affections peuvent se développer indépendamment et ne représentent pas obligatoirement un continuum lésionnel (Fig. 13). On estime que le risque de cirrhose commence avec une ingestion quotidienne de 60 g d'alcool pour l'homme et 40 g pour la femme (Benhamou et al., 1995). Par ailleurs, une consommation quotidienne de 150 à 200 g entraîne généralement une cirrhose cliniquement évidente au bout de 20 ans chez 50 % des sujets. La maladie alcoolique est la cause d'environ 70 % des cirrhoses chez l'Homme. Il existe cependant d'importantes différences interindividuelles. Ainsi, certains sujets, malgré une consommation importante, ne développent pas de fibrose, alors que pour d'autres, une cirrhose surviendra à la suite d'une consommation relativement modérée.

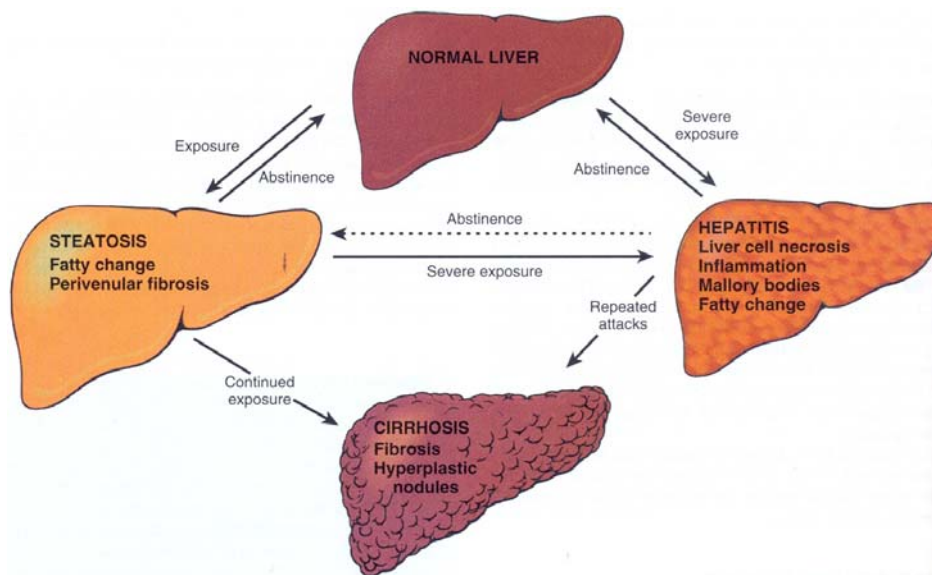


Fig. 13. Maladie alcoolique du foie

Interrelations entre stéatose hépatique, hépatite et cirrhose, et description des principaux aspects morphologiques observés à l'échelle microscopique. D'après Crawford, 1999.

Hépatites virales

Après l'alcoolisme, les **infections virales** B et C et la co-infection virale B-D (le virus de l'hépatite D présentant une réplication défective) représentent la cause la plus importante de fibrose et, dans les cas les plus sévères, de cirrhose. On considère ainsi que 10 % des hépatites B et 50 % des hépatites C sont à l'origine d'une infection virale persistante susceptible d'induire une hépatite chronique et éventuellement une cirrhose. Bien que dans certains cas la cirrhose se constitue rapidement après contamination, un intervalle de 10 à 50 ans sépare le plus souvent la contamination de l'apparition clinique de la cirrhose (Benhamou et al., 1995).

Causes biliaires

Trois maladies des voies biliaires peuvent également aboutir à la cirrhose (Crawford, 2000). La **cirrhose biliaire primitive**, probablement d'origine auto-immune, est caractérisée par la destruction des canaux biliaires intrahépatiques, une inflammation portale et une cicatrisation fibreuse. La **cholangite sclérosante primitive** est généralement associée à une maladie inflammatoire de l'intestin et caractérisée par une inflammation, une fibrose oblitérante et un rétrécissement segmentaire des canaux biliaires intra et extrahépatiques. Enfin, la **cirrhose biliaire secondaire** résulte d'une obstruction prolongée de l'arbre biliaire extrahépatique, causée notamment par une atrésie biliaire chez l'enfant, la formation de calculs dans les voies biliaires, une sténose traumatique des voies biliaires, ou encore par un cancer de la tête du pancréas. Les signes morphologiques initiaux de cholestase (dilatation des canalicules biliaires, prolifération des canaux biliaires portaux,...) sont complètement réversibles après la levée de l'obstacle. Cependant, l'inflammation secondaire due à l'obstruction biliaire entraîne une fibrose péri-portale, conduisant éventuellement à une cirrhose.

Pathologie hépatique médicamenteuse et toxique

Le foie est l'organe essentiel pour la métabolisation et la détoxification des médicaments et de divers produits chimiques. Certaines de ces molécules sont toutefois susceptibles de provoquer, de manière directe ou indirecte, diverses pathologies hépatiques (Tableau 2). Si une affection médicamenteuse guérit habituellement suite à l'arrêt du

traitement, une exposition prolongée à un toxique pourra par contre évoluer vers une hépatite chronique, une fibrose ou même une cirrhose. Ainsi, l'exposition aiguë au **tétrachlorure de carbone** (CCl₄), par inhalation ou ingestion, provoque une nécrose spécifique des régions centrolobulaires, au niveau de la zone 3 des acini (Fig. 14). Cette localisation particulière résulte de la production d'un métabolite toxique qui est généré par l'activité mono-oxygénase de cytochromes P450, principalement CYP2E1, dont l'expression est principalement localisée au niveau du réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes centrolobulaires. L'effet toxique est accru par des inducteurs des enzymes de métabolisation tels que l'alcool et les barbituriques, et est réduit par une carence en protéines (Sherlock et al., 2002). Une stéatose peut apparaître et on observe une légère infiltration de neutrophiles polymorphonucléaires au niveau des espaces portes. Lors d'expérimentations menées chez le rongeur, il a été démontré que des administrations répétées de CCl₄ mènent au développement d'une cirrhose (Constandinou et al., 2005). Les cellules hépatiques peuvent présenter une résistance plus importante en cas d'exposition prolongée au CCl₄, vraisemblablement par diminution des cytochromes P450 impliqués dans sa métabolisation (Ugazio et al., 1973).

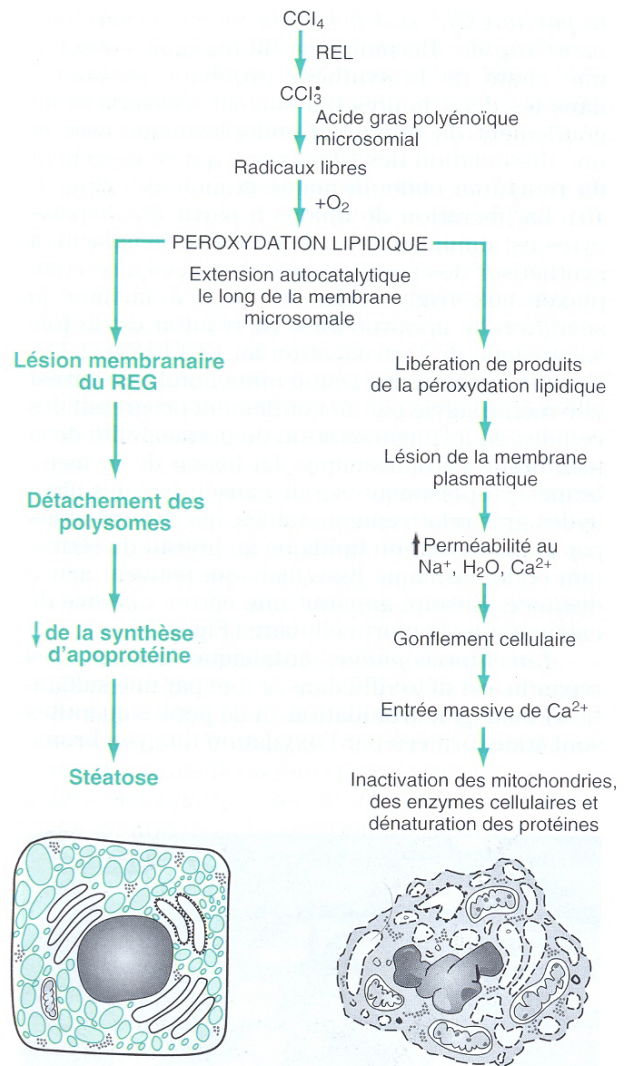
Tableau 2. Atteinte hépatique médicamenteuse et toxique.

Lésions hépatocytaires	Exemples d'agent étiologique
Stéatose microvésiculaire	Tétracycline, salicylates, phosphore, éthanol
Stéatose macrovésiculaire	Ethanol, méthotrexate, amiodarone
Nécrose centrolobulaire	Bromobenzène, CCl ₄ , acétaminophène
Nécrose diffuse ou massive	Halothane, isoniazide, acétaminophène, méthylidopa, trinitrotoluène, phalloïdine, amanitine
Hépatite aiguë ou chronique	Méthylidopa, isoniazide, nitrofurantoïne, phénytoïne, oxyphénisatine
Fibrose - Cirrhose	Ethanol, méthotrexate, amiodarone, la plupart des médicaments responsables d'hépatite chronique
Granulomes	Sulfonamides, méthylidopa, quinidine, phénylbutazone, hydralazine, allopurinol
Cholestase (avec ou sans lésion hépatocytaires)	Chlorpromazine, stéroïdes anabolisants, érythromycine, contraceptifs oraux, arsenic

D'après Crawford, 2000.

Fig. 14 Séquence des événements aboutissant à la stéatose et à la nécrose cellulaire lors d'une intoxication par le tétrachlorure de carbone (CCl_4).

L'effet toxique du CCl_4 est dû à sa conversion par le cytochrome P450 en $\text{CCl}_3\cdot$, radical libre hautement toxique. Les radicaux libres produits localement entraînent une oxydation en cascade des acides gras polyéniques présents au sein des phospholipides membranaires. Une décomposition oxydative des lipides se déclenche, et des peroxydes organiques sont formés après réaction avec l'oxygène (peroxydation lipidique). Cette réaction est autocatalytique car de nouveaux radicaux libres sont formés à partir des radicaux peroxydes eux-mêmes. Ainsi, la destruction rapide de la structure et de la fonction du réticulum endoplasmique est due à la décomposition des lipides. Il en résulte d'une part une diminution de la libération des lipides entraînant une stéatose, et d'autre part des lésions au niveau de la membrane plasmique entraînant une augmentation de la perméabilité, une entrée massive de calcium et la mort cellulaire. REG: réticulum endoplasmique rugueux; REL: réticulum endoplasmique lisse. D'après Cotran et al., 2000.



Autres causes

Plusieurs maladies génétiques, telles que l'hémochromatose, le déficit en α_1 -antitrypsine ou la maladie de Wilson, engendrent des perturbations métaboliques et peuvent déterminer une cirrhose.

Le foie cardiaque, le syndrome de Budd-Chiari et la maladie veino-occlusive sont trois conditions qui ont en commun de provoquer un bloc sur le **flux sanguin efférent** du foie. L'hypertension portale post-sinusoidale suprahépatique qui en découle détermine une fibrose à prédominance centrolobulaire, et quelquefois une cirrhose avec nodule de régénération.

ii- Pathogénie

Les dépôts primitifs de matrice cicatricielle s'observent essentiellement au niveau des régions initialement lésées. Par exemple, un point de départ portal est caractéristique dans les maladies cholestatiques ou virales, alors qu'une fibrose initialement centrolobulaire est observée dans les causes cardiaques ou en cas d'intoxication chronique par le CCl₄. Une fibrose sinusoidale s'observe toutefois précocement, quel que soit l'agent causal (Lamireau et al., 2002) (Fig. 15).

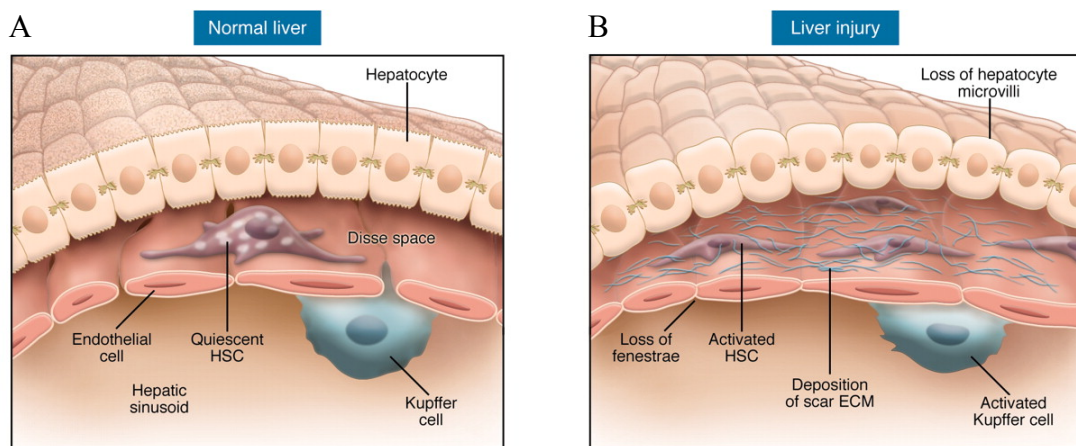


Fig. 15. Développement de la fibrose hépatique au niveau des sinusoides

(A) Architecture normale des sinusoides avec une cellule étoilée (HSC) contenant des gouttelettes périnucléaires de vitamine A et élaborant des prolongements cytoplasmiques qui entourent les sinusoides. Seule une matrice de faible densité, non illustrée sur ce schéma, est présente dans cette situation physiologique. (B) Une lésion des hépatocytes provoque le recrutement et la stimulation de cellules inflammatoires, circulantes ou résidentes, dont les cellules de Kupffer. Les molécules secrétées par les leucocytes activés modifient les propriétés des cellules étoilées (HSCs) qui acquièrent un phénotype myofibroblastique, caractérisé notamment par une synthèse abondante de macromolécules de la MEC. L'accumulation d'une MEC fibrillaire dans l'espace de Disse altère la fonction des hépatocytes, menant à la perte de leurs microvillosités, et de l'endothélium sinusoidal dont les cellules deviennent jointives au lieu de présenter de nombreuses fenêtrures permettant les échanges entre les hépatocytes et le sang. La perte de l'architecture normale du tissu contribue donc de manière significative à l'altération de la fonction hépatique. D'après Iredale, 2007.

Les **cellules étoilées** (HSCs) sont responsables de l'essentiel de la synthèse de la matrice cicatricielle qui se dépose autour des veines centrolobulaires et au sein du parenchyme hépatique. En conditions physiologiques, elles sont quiescentes et stockent la vitamine A. Leur activation mène à une modification de leur phénotype, caractérisée entre autres par l'expression d' α -actine de type musculaire lisse (α -SMA) et par la synthèse de

collagène fibrillaire et d'autres composants de la MEC de type conjonctif. Ce processus d'activation comporte deux étapes (Olaso et al., 1998). La première, ou phase d'*initiation*, fait référence à des modifications précoces de l'expression de gènes et du phénotype cellulaire. Des produits résultant de la peroxydation des lipides, provenant d'hépatocytes, de cellules endothéliales ou de cellules de Kupffer lésés, sont probablement des signaux essentiels pour l'activation précoce des HSCs. La seconde, ou phase de *perpétuation*, implique ensuite la régulation à la fois autocrine et paracrine d'événements clés comprenant chémoattraction de leucocytes, libération de cytokines et prolifération cellulaire (Fig. 16). Les HSCs se différencient en cellules de type myofibroblastique, qui se caractérisent par l'expression d' α -SMA et la perte de vitamine A, et acquièrent des propriétés proinflammatoires et fibrogéniques sous l'influence de nombreux facteurs de croissance, cytokines et chimiokines (Bataller et al., 2005) (Fig. 17). Parmi ceux-ci, le TGF- β 1 est l'un des plus importants. Il est produit principalement par les cellules de Kupffer et les HSCs, mais probablement aussi par

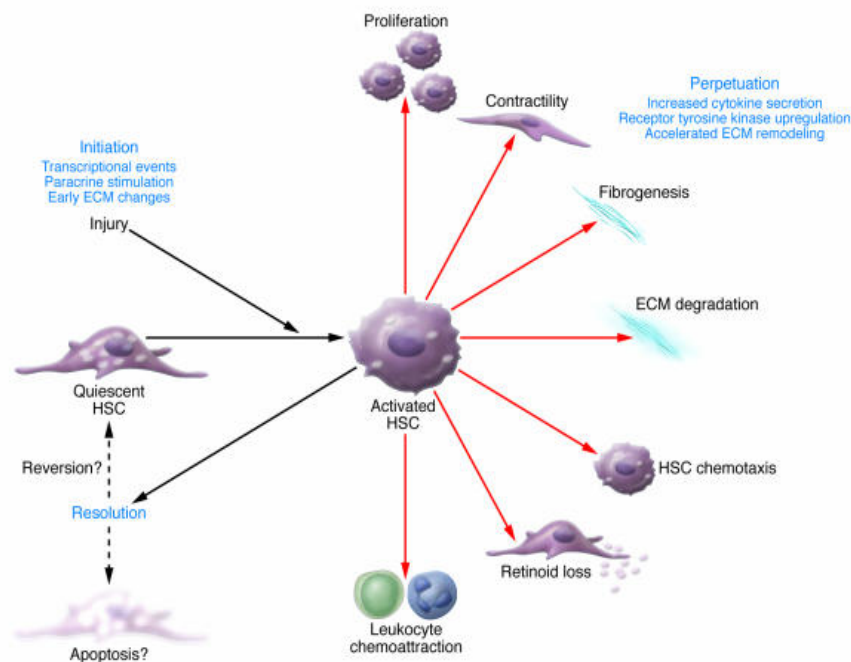


Fig. 16. Répertoire des activités des cellules étoilées (HSCs) activées de type myofibroblastique

Les HSCs activées de type myofibroblastique sont métaboliquement actives et démontrent un phénotype prolifératif, fibrogénique et contractile. Elles secrètent également des médiateurs chimiotactiques et des facteurs participant à la régulation de la dégradation de la MEC (MMPs et TIMPs). La perte de vitamine A pourrait également participer à l'installation d'un phénotype pro-fibrogène, bien que ce point reste sujet à débat. Durant la régression de la lésion hépatique, des facteurs spécifiques sont susceptibles de faire entrer les HSCs activées en apoptose, ou au contraire de les ramener vers un état plus quiescent caractéristique d'une situation physiologique normale. D'après Iredale, 2007.

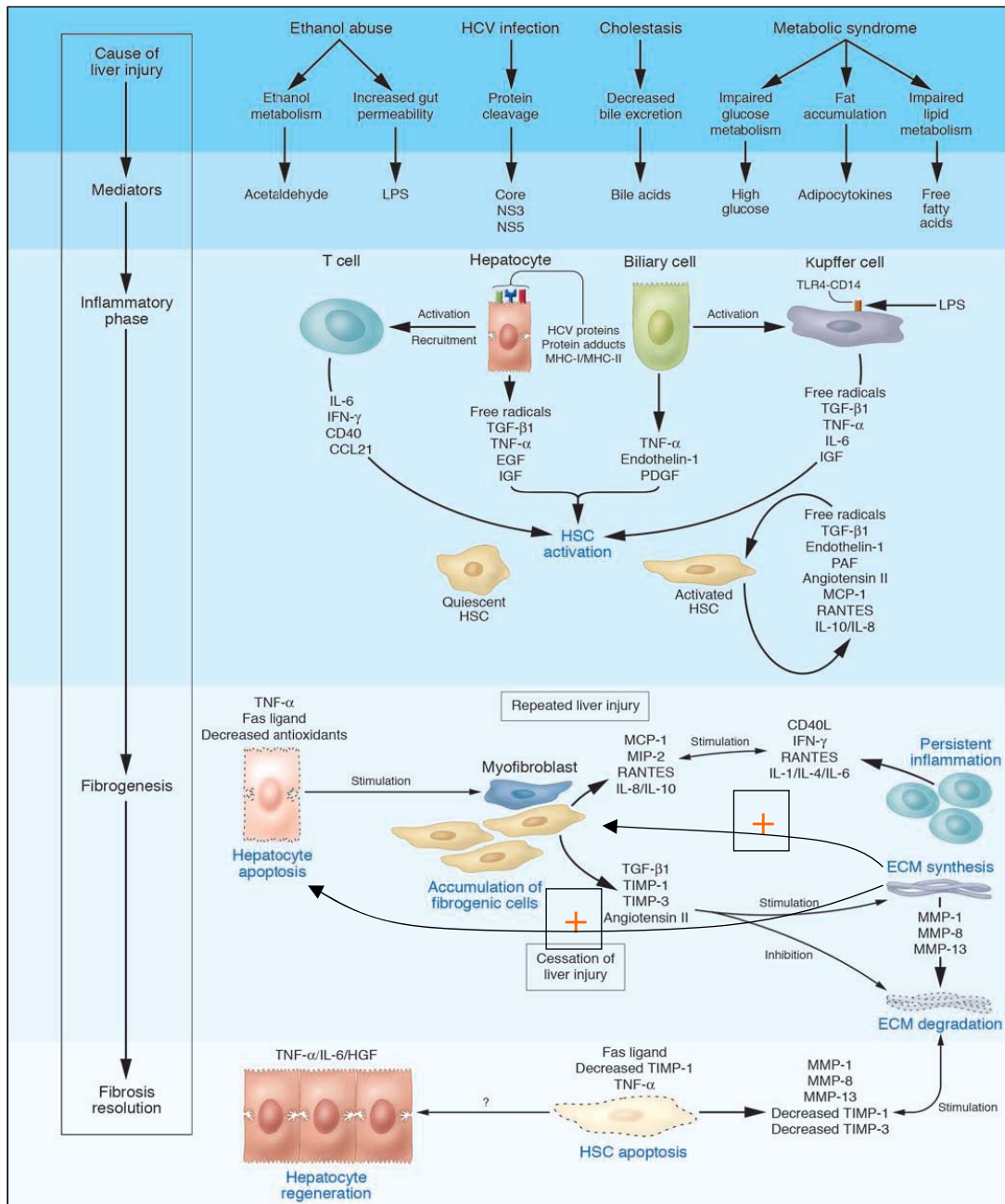


Fig. 17. Mécanismes cellulaires de la fibrose hépatique

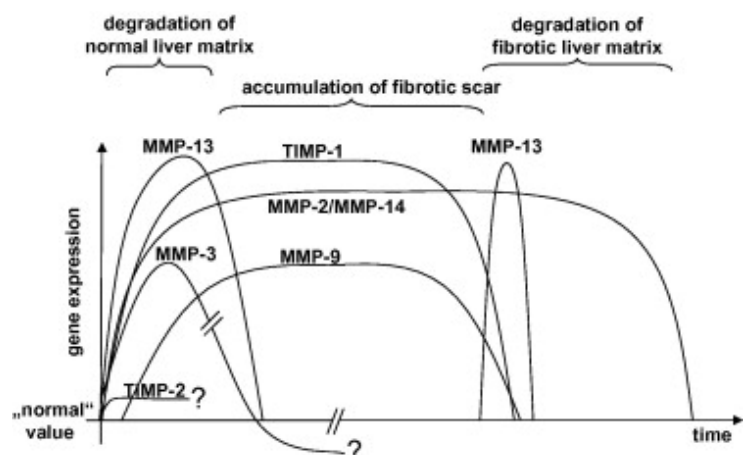
Suite à différentes atteintes pathogéniques, les hépatocytes lésés et les cellules biliaires sécrètent des cytokines proinflammatoires et des facteurs solubles qui vont activer les cellules de Kupffer et stimuler le recrutement de lymphocytes T activés. Ce contexte inflammatoire stimule l'activation des cellules étoilées résidentes (HSCs) en myofibroblastes qui synthétisent du collagène et sécrètent des cytokines, ce qui concourt à perpétuer leur état d'activation. L'apoptose des hépatocytes est également un processus conduisant à l'activation des HSCs. Si la cause initiale des altérations hépatiques perdure, par exemple en cas d'hépatite chronique, les cellules conjonctives activées continuent à proliférer et à déposer une matrice extracellulaire conjonctive (MEC), conduisant ainsi à la fibrose. En retour, cette MEC ectopique favorise la prolifération des cellules conjonctives et, dans une certaine mesure, l'apoptose des hépatocytes, aggravant de ce fait le mécanisme pathologique. Lorsque l'agent inducteur initial est supprimé, la fibrose est toutefois susceptible de régresser au cours d'un processus lent et le plus souvent incomplet. D'après Bataller et al., 2005.

les cellules endothéliales, les cellules épithéliales biliaires et les hépatocytes (Lamireau et al., 2002). Après son activation protéolytique par diverses protéases, dont la plasmine, la MMP-2 ou la MMP-9, et sa fixation aux récepteurs membranaires de type I et II, le signal est transmis au niveau nucléaire par les protéines Smad (Flanders, 2004). Le TGF- β 1 stimule la synthèse des collagènes de type I, III et IV, de protéoglycans et de glycoprotéines, et promeut la survie cellulaire (Gressner et al., 2002). Le CTGF joue également un rôle majeur en tant qu'intermédiaire participant à la voie de signalisation du TGF- β 1 (Tsukada et al., 2006) et stimulant ainsi l'accumulation de MEC (Paradis et al., 2002; Uchio et al., 2004).

Les HSCs expriment également un large répertoire de MMPs et de certains de leurs activateurs et de leurs inhibiteurs spécifiques (TIMPs) (Fig. 18). La production de MMPs et de TIMPs est régulée selon l'agent inducteur incriminé (Hemmann et al., 2007) et l'état d'activation des HSCs. A des stades précoces chez le rongeur, les HSCs ne produisent que peu de TIMPs mais expriment la MMP-13 (Watanabe et al., 2000) et la MMP-3 qui sera à l'origine de l'activation de multiples pro-MMPs (MMP-7, -8, -9 et -13) par clivage de leur prodomaine (Knittel et al., 1999). L'excès d'activité protéolytique qui en résulte permet la dégradation de la matrice physiologique normalement présente dans l'espace de Disse et sa substitution par des collagènes fibrillaires. Au contraire, l'accroissement différé de l'expression de TIMP-1 et TIMP-2 par les HSCs pleinement activées inverse la balance protéolytique et résulte en une réduction dramatique de l'activité collagénolytique dans le foie (Lotersztajn et al., 2005; Hemmann et al., 2007) conduisant à l'accumulation progressive d'une MEC de type cicatriciel.

Fig. 18. Profils d'expression des MMPs et des TIMPs selon les connaissances actuelles de la physiopathologie d'une lésion toxique chronique du foie.

Les valeurs reprises en ordonnée sont choisies de façon arbitraire pour une meilleure compréhension. D'après Hemmann et al., 2007.



Des types cellulaires autres que les HSCs ont été identifiés comme précurseurs potentiels de myofibroblastes susceptibles de produire la MEC, dont les fibroblastes portaux

(Desmouliere et al., 1997), des cellules localisées dans la seconde couche entourant les veines centrolobulaires (Bhunchet et al., 1992), des fibroblastes de la capsule de Glisson, des cellules musculaires lisses vasculaires (Guyot et al., 2006), et des cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse (Forbes et al., 2004; Guyot et al., 2006).

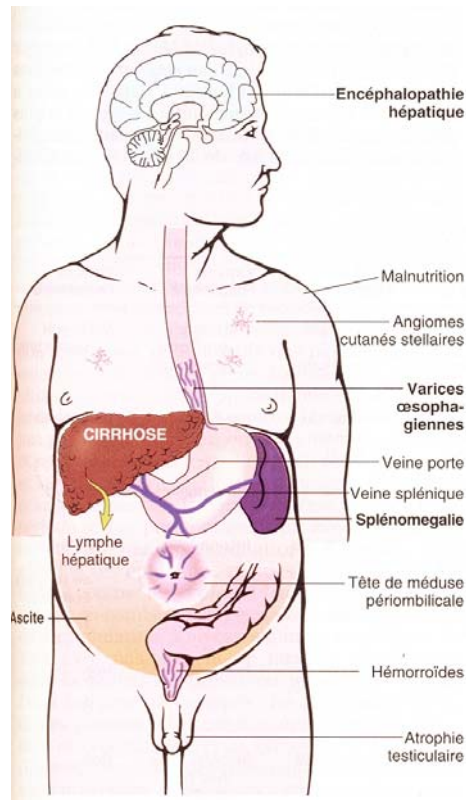
iii- Evolution

Suite à une exposition chronique à un agent fibrogénique, des fibres de collagène de type I et III se déposent dans le lobule, formant des septa plus ou moins larges à partir des veines centrolobulaires ou des espaces portes. Les dépôts persistants de collagène dans l'espace de Disse au sein d'un parenchyme intact s'accompagnent de la perte des fenêtres de l'endothélium sinusoidal qui ne permettent donc plus les échanges de solutés entre les hépatocytes et le plasma. La synthèse hépatocytaire de protéines (albumine, facteurs de coagulation, lipoprotéines) et leur sécrétion dans le compartiment sanguin sont également très altérées (Crawford, 2000). Par ailleurs, de nouveaux réseaux vasculaires se forment dans les septa cicatriciels et finissent par unir les structures vasculaires de la région porte (artères hépatiques et veines portes) et les veines centrolobulaires, formant des shunts sanguins au sein du parenchyme qui réduisent d'autant plus les possibilités d'échanges entre le parenchyme hépatique et le compartiment sanguin. Enfin, les HSCs, suite à leur transformation en myofibroblastes, augmentent également les résistances vasculaires dans le parenchyme hépatique, du fait du rétrécissement des lumières sinusoidales par la contraction de leurs myofilaments.

Durant le processus de lésions hépatiques menant à la cirrhose, les hépatocytes subsistants prolifèrent pour former des amas cellulaires peu fonctionnels, ou **nodules**, en bordure des septa fibreux. Il en résulte un foie fibreux, nodulaire, dans lequel la vascularisation est sérieusement compromise, ainsi que la capacité des hépatocytes à sécréter des substances dans le plasma. La désorganisation de l'interface parenchyme/espaces portes altère également les canaux biliaires. Ainsi, un ictère peut s'installer, malgré une masse hépatique normale. Un dernier mécanisme pouvant mener au décès est l'insuffisance hépatique progressive, une complication liée à l'hypertension portale (Fig. 19) ou à l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire, que l'on rencontre dans environ 10 % des cirrhoses dues au virus de l'hépatite B.

Fig. 19. Principales conséquences cliniques de l'hypertension portale dans la fibrose.

D'après Crawford, 2000.



iv- Traitement et régression

Si différentes stratégies visant à interférer directement avec le processus fibrogénique sont en cours de développement, aucun médicament n'est encore reconnu comme agent antifibrotique chez l'homme. En cas de traitement symptomatique, l'évolution vers la cirrhose peut se poursuivre et l'ultime solution curative reste alors la transplantation hépatique.

Outre la transplantation, l'unique traitement de la fibrose hépatique est actuellement celui de la maladie causale. Bien que plusieurs études expérimentales aient révélé des cibles thérapeutiques efficaces pour freiner la progression de la fibrose chez le rongeur, l'efficacité de la plupart de ces traitements n'a pas pu être démontrée chez l'Homme. L'élimination de l'agent inducteur reste ainsi la stratégie la plus efficace pour de nombreuses étiologies des maladies hépatiques chroniques (Bataller et al., 2005). Suite à son éradication, on observe une réduction de l'expression de TIMP-1, ce qui conduit à un accroissement de l'activité de diverses métalloprotéases dont les collagénases MMP-1, -8 et -13 chez l'Homme (et MMP-13 chez le rongeur) (Hemmann et al., 2007). Le processus de dégradation des fibres de collagène entraîne une altération des interactions entre les HSCs et la MEC, et favorise

l'apoptose de ces dernières (Issa et al., 2004). La stimulation des récepteurs de mort dans les HSCs activées et la réduction des facteurs de survie, dont TIMP-1, favorisent également l'apoptose des HSCs. La disparition des HSCs activées par apoptose est suivie de la résolution plus ou moins complète de la fibrose, en fonction des circonstances spécifiques, dont le stade évolutif atteint.

La question de la réversibilité complète de la cirrhose hépatique reste débattue. Le degré de réversion peut varier selon la nature des fibres de collagène et le nombre de liaisons covalentes entre elles, la topographie des septa (s'ils contiennent ou non des shunts vasculaires), et la densité de la MEC conjonctive, susceptible de constituer une masse finalement inaccessible aux enzymes de dégradation. Il est important de souligner que, lorsque le stade ultime de cirrhose est atteint, la disparition complète de la cicatrice fibreuse ne signifie pas automatiquement un retour à la normale, puisque la fonctionnalité des nodules parenchymateux et l'architecture du tissu hépatique dans son ensemble ne sont que faiblement restaurés, et que les shunts vasculaires restent jusqu'ici virtuellement irréversibles (Desmet et al., 2004).

Comme décrit ci-dessus, de nombreux médiateurs (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, molécules de signalisation) sont impliqués dans le processus de fibrogenèse. En raison du rôle essentiel de ces molécules dans des processus physiologiques divers, une stratégie thérapeutique visant à inhiber leur(s) fonction(s) ne peut être envisagée qu'avec précaution et nécessiterait une parfaite connaissance des voies de signalisation impliquées dans le type particulier de fibrose visée. Une approche alternative, consistant à inhiber la formation du tissu cicatriciel ectopique ou à le rendre plus sensible à une dégradation physiologique, aurait deux avantages majeurs: elle favoriserait la restauration d'une MEC spécifique, et donc la réparation des organes, et elle s'appliquerait à tous les types de fibrose puisque le tissu cicatriciel est généralement similaire quel que soit l'organe atteint. Dans ce contexte, deux stratégies sont envisageables. La première consisterait à stimuler la dégradation des principaux composants des tissus fibrosés tout en veillant toutefois à ne pas altérer les matrices extracellulaires physiologiques, ce qui serait à l'origine d'effets secondaires néfastes. La deuxième approche viserait à inhiber les voies métaboliques responsables de l'accumulation des dépôts conjonctifs pathologiques, afin de les rendre moins denses et de permettre leur dégradation dans un contexte physiologique. Les effets secondaires liés à une thérapie de ce type devraient être limités puisque, chez l'adulte, rares sont les tissus conjonctifs subissant un remodelage aussi rapide que celui observé dans les fibroses.

3.3 Inflammation chronique

Toute lésion tissulaire induit une réaction inflammatoire dont le but est d'éliminer l'agent causal et les tissus nécrotiques. Cette inflammation est étroitement interconnectée avec le processus de réparation, qui va permettre le comblement des pertes tissulaires par régénération parfaite du tissu lésé, par remplacement du foyer endommagé par un tissu cicatriciel ou, très souvent, par une combinaison de ces deux processus. Dans certains cas, les mécanismes mis en œuvre ne parviennent pas à reconstituer *ad integrum* le tissu primitif de façon ordonnée et adéquate. La lésion devient alors un foyer d'inflammation chronique, dans lequel s'associent au niveau histologique la présence de lymphocytes et macrophages, une nécrose tissulaire, un processus d'angiogenèse et une fibrose cicatricielle. Une inflammation est considérée comme chronique si sa durée excède plusieurs semaines ou mois. Elle survient dans le cadre d'infections persistantes, en cas d'expositions répétées ou prolongées à des agents toxiques ou suite à une réaction auto-immune (Collins, 2000).

A. Aspects histologiques

A la différence d'une inflammation aiguë qui se manifeste par des lésions vasculaires, de l'œdème et surtout un infiltrat majoritairement neutrophile, l'inflammation chronique est caractérisée par plusieurs processus évoluant de manière simultanée:

- une tentative de destruction de la zone tissulaire envahie par le pathogène ou le corps étranger ;
- la persistance d'un tissu de granulation ;
- une cicatrisation par remplacement du tissu altéré par un tissu conjonctif riche en collagène et contenant de nombreux petits vaisseaux ;
- un infiltrat composé de cellules mononucléées, principalement de macrophages mais aussi de lymphocytes et de plasmocytes, reflétant une réaction à un agent agresseur persistant.

B. Réaction granulomateuse

L'**inflammation granulomateuse** est un aspect particulier de réaction inflammatoire chronique au cours de laquelle le type cellulaire principal est un macrophage activé d'aspect

modifié, pseudo-épithélial ou épithélioïde. Ces cellules épithélioïdes peuvent fusionner pour former des cellules géantes pouvant contenir plus de 20 noyaux localisés en périphérie cellulaire (cellules géantes de type Langhans) ou de façon désordonnée (cellules géantes "à corps étrangers") (Collins, 2000).

Deux types de granulomes montrant une pathogénie différente sont décrits (Collins, 2000). Les *granulomes à corps étrangers* sont déclenchés par des corps étrangers relativement biologiquement inertes, d'origine endogène ou exogène. Typiquement, ils apparaissent lorsqu'un matériau, tel que du matériel de suture, est assez volumineux pour empêcher la phagocytose par un macrophage unique mais ne déclenche pas de réaction inflammatoire ou immune. Les cellules épithélioïdes et les cellules géantes viennent au contact de la surface et entourent le corps étranger. Les *granulomes immuns*, quant à eux, sont provoqués par des particules insolubles capables d'induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire, comme par exemple lors de la tuberculose pulmonaire (Stevens et al., 1997).

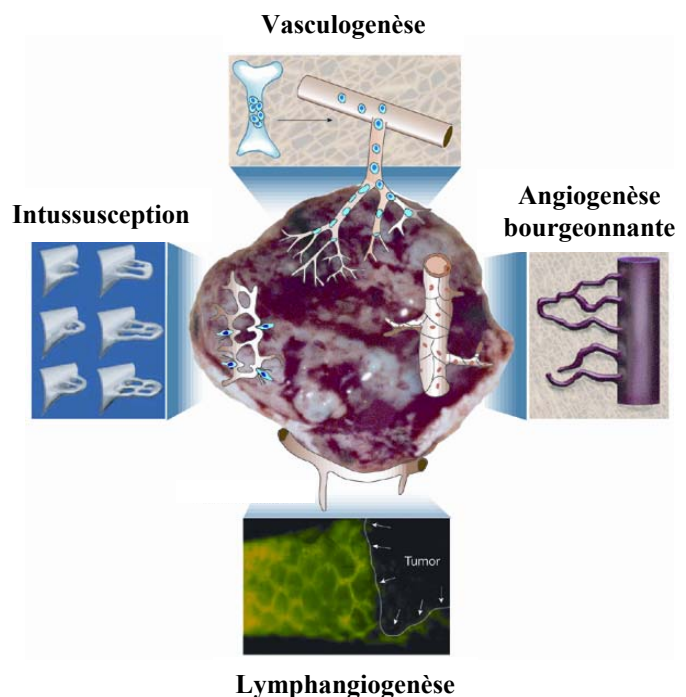
4. Angiogenèse

4.1 Généralités

Le sang, dont la circulation est assurée au sein du réseau vasculaire, assure le transport d'éléments nutritifs et de l'oxygène, et permet l'élimination des déchets du métabolisme cellulaire. La formation des vaisseaux sanguins, au cours du développement embryonnaire, est assurée par deux processus: la vasculogenèse et l'angiogenèse. La **vasculogenèse** consiste en la formation d'un plexus capillaire primaire par recrutement et différenciation de cellules souches précurseurs, les angioblastes, en cellules endothéliales. L'**angiogenèse** est le mécanisme par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés par des processus de bourgeonnement, de branchement et intussusception à partir de structures vasculaires préexistantes (Carmeliet, 2000). On peut également mentionner la **lymphangiogenèse**, processus très proche de l'angiogenèse, par lequel se forment les vaisseaux lymphatiques qui participent au drainage des fluides interstitiels et permettent la circulation des leucocytes vers les organes lymphoïdes (Fig. 20).

Fig. 20. Différents mécanismes de la formation des néo-vaisseaux sanguins.

La **vasculogenèse** est caractérisée par le recrutement de cellules précurseurs endothéliales circulantes et/ou médullaires ; l'**angiogenèse** bourgeonnante est caractérisée par la prolifération de cellules endothéliales préexistantes, la dégradation de la lame basale et la formation de bourgeons ; l'**intussusception** est caractérisée par la séparation longitudinale des gros vaisseaux en vaisseaux de plus petit calibre ; la **lymphangiogenèse** est caractérisée par la prolifération de cellules endothéliales lymphatiques. D'après Carmeliet et al., 2000.



Normalement quiescents chez l'adulte, ces processus, et principalement l'angiogenèse, peuvent cependant être sollicités et activés au cours de nombreux processus physiologiques tels que l'implantation du placenta, la cicatrisation ou le développement cyclique de

l'endomètre. Ils sont également impliqués dans divers processus pathologiques (Carmeliet, 2003). A titre d'exemple, la maladie d'Alzheimer, le diabète, l'athérosclérose et l'ostéoporose sont des pathologies liées à une angiogenèse insuffisante et/ou une régression des vaisseaux. Par contre, une angiogenèse anormale ou excessive est associée à d'autres pathologies telles que l'arthrite, le psoriasis, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), la croissance tumorale, ainsi que le développement de métastases. En l'absence de vascularisation, une simple diffusion passive de l'oxygène et des nutriments ne permettrait pas d'assurer une croissance des tumeurs au-delà de quelques mm³.

En marge des cellules cancéreuses proprement dites, le tissu péri-tumoral est constitué du stroma, un tissu conjonctif néoformé fourni par l'hôte et de nature non tumorale. Celui-ci représente une modification du tissu de soutien physiologique de l'organe, qui s'adapte à la prolifération tumorale et à la destruction du tissu normal. Il est donc en remaniement constant et, sous certains aspects, peut être considéré comme une plaie perpétuellement en cours de cicatrisation, ce qui démontre la puissance des régulations opérées par les cellules néoplasiques sur les tissus conjonctifs environnants. En retour, la croissance tumorale est largement influencée par diverses propriétés du stroma (Bagloli et al., 2006). Celui-ci constitue en effet la charpente de la tumeur et, à ce titre, joue un rôle majeur dans la régulation des interactions entre les cellules et la MEC (Munaut et al., 1995; Noel et al., 1993; Noel et al., 1999). La composition de ce stroma dépend largement des propriétés biosynthétiques des fibroblastes résidents, qui sont également responsables de la synthèse de facteurs de croissance et de protéases dont les activités respectives favoriseront la progression tumorale, notamment par stimulation de l'angiogenèse (Kalluri et al., 2006; Desmoulière et al., 2004; Maillard et al., 2005; Masson et al., 2005). Ce passage d'un état prévasculaire de la tumeur à un état vascularisé est appelée "switch angiogénique" (Folkman et al., 1991) et est déclenché par de très nombreux signaux métaboliques (hypoxie, ...), mécaniques (pression intratumorale), inflammatoires ou subséquents à des mutations génétiques. Il faut également noter que la néovascularisation déclenchée dans une tumeur est à certains points de vue anarchique et mène à la formation de vaisseaux peu structurés, fragiles, relativement perméables (Tozer et al., 2005) et dépourvus de péricytes et relativement autonomes vis-à-vis des mécanismes physiologiques de régulation de la microcirculation sanguine (Hashizume et al., 2000).

4.2 Mécanismes de l'angiogenèse

A. Etapes de l'angiogenèse bourgeonnante

Les processus menant à la formation de néo-vaisseaux, rencontrés dans des circonstances physiopathologiques variées, présentent pourtant de nombreuses similitudes. Suite au détachement des péricytes périvasculaires, la production de monoxyde d'azote (NO) induit une dilatation des vaisseaux existants. Ceux-ci voient par ailleurs leur perméabilité accrue suite à l'action de facteurs diffusibles dont le VEGF, qui induisent des modifications de la distribution des molécules d'adhésion intercellulaire et la formation de fenestrations au sein de l'endothélium. Il s'ensuit une extravasation de protéines plasmatiques qui composent en partie la matrice provisoire nécessaire à la migration des cellules endothéliales.

L'activation des cellules endothéliales et leur regroupement en masses cellulaires à la surface externe des capillaires, ou **bourgeonnement**, conduit à la dégradation de la lame basale et de la matrice extracellulaire environnante par des protéases spécifiques dont les MMPs. La **migration** orientée de ces cellules vers la source du stimulus angiogénique (tumeur, tissu ischémique, ...) est suivie d'une phase proliférative. Les cellules endothéliales s'organisent ensuite en structures de type capillaire qui, lors de la phase de **différenciation**, acquièrent une architecture fonctionnelle. Enfin, la **maturation** des vaisseaux néo-formés est indispensable pour former un réseau vasculaire fonctionnel nécessaire au développement des tissus. L'association de péricytes et de cellules musculaires lisses à la paroi vasculaire régule la prolifération, la survie, la migration et la différenciation des cellules endothéliales.

B. Régulation

Les étapes successives de l'angiogenèse dépendent d'un équilibre entre de nombreux facteurs pro- et anti-angiogènes (Tableau 3) (Hanahan et al., 1996; Rusnati et al., 2006). Parmi les éléments pro-angiogènes figurent de nombreux facteurs de croissance dont les plus puissants sont probablement le VEGF et le bFGF (Presta et al., 2005; Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2005). D'autres molécules sont également impliquées comme des protéases et certaines intégrines dont l'interaction avec leur ligand permet la survie cellulaire et potentialise l'effet de certains facteurs de croissance. La diversité des facteurs anti-angiogènes est également remarquable. On y compte des facteurs de croissance et des

cytokines, des enzymes, des hormones, des protéases, des inhibiteurs de protéases et des protéines de structure, qu'ils soient sous leur forme native ou sous forme de fragments de dégradation.

Tableau 3. Liste non exhaustive des facteurs pro- et anti-angiogènes.

Régulateurs positifs	Régulateurs négatifs
VEGFs VEGFRs PlGF bFGF PDGF-B IL-8, IL-13 Intégrines Ang-1 Récepteurs aux angiopoïétines (Tie) PAI-1 Plasmine G-CSF HGF EGF MMPs	Angiostatine (fragment plasminogène) Endostatine (fragment coll. $\alpha 1$ (XVIII)) TIMPs IFNs IL-1, -4, -10, -12, -18 PF-4 Thrombospondines 1 et 2 ADAMTS1 et 8 Fragments 16K de la prolactine TGF- β Tumstatine (fragment coll. $\alpha 3$ (IV)) Arrestine (fragment coll. $\alpha 1$ (IV)) Canstatine (fragment coll. $\alpha 2$ (IV)) Restine (fragment coll. $\alpha 1$ (XV)) Endorépelline (fragment perlécan)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor ; PlGF: Placental Growth Factor ; bFGF: basic Fibroblast Growth Factor ; PDGF: Platelet-Derived Growth Factor ; IL: Interleukin ; Ang-1: Angiopoïétine-1 ; PAI-1: Inhibiteur des Activateurs du Plasminogène de type 1 ; G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor ; HGF: Hepatocyte Growth Factor ; EGF: Epidermal Growth Factor ; MMP: métalloprotéase matricielle ; TIMP: Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases ; PF-4: Platelet Factor-4 ; IFN: interféron ; ADAMTS: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type I motif ; TGF- β : Transforming Growth Factor-Beta. D'après Distler et al., 2003; Nyberg et al., 2005.

Parmi les différents facteurs anti-angiogènes, les **thrombospondines** (TSPs) constituent une famille de glycoprotéines sécrétées multimodulaires qui s'associent avec une forte affinité à la matrice extracellulaire (Bornstein et al., 2002). Parmi les cinq membres de la famille, les TSP1 et 2 possèdent la propriété d'inhiber l'angiogenèse tumorale par des effets directs sur la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (Jimenez et al., 2000; Lawler et al., 2004; Reiher et al., 2002). Cette fonction angiostatique est largement médiée par l'intermédiaire d'un domaine appelé "répétition de type 1 des thrombospondines" (TSR1) capable d'interagir avec le CD36, un récepteur trans-

membranaire présent à la surface des cellules endothéliales (Febbraio et al., 2001). La TSP1 est par ailleurs capable d'inhiber l'angiogenèse en inactivant la MMP9 et la mobilisation du VEGF séquestré dans la matrice (Rodriguez-Manzaneque et al., 2001).

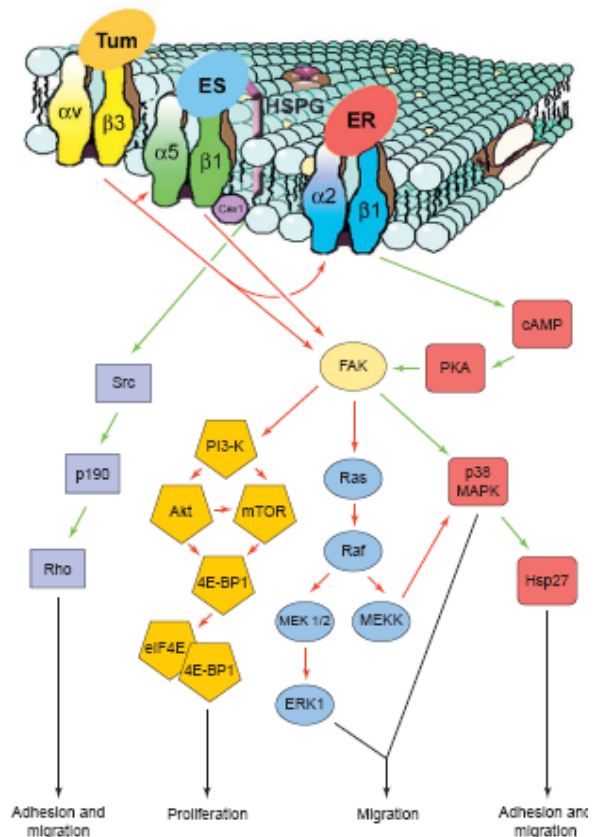
L'analyse fonctionnelle des **ADAMTS1 et 8** a démontré une activité anti-angiogénique plus puissante que celle des TSP1 et 2 ou de l'angiostatine, un fragment du plasminogène (voir ci-dessous) (Vazquez et al., 1999). Cette activité se manifeste spécifiquement envers les cellules endothéliales, sans affecter les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses par exemple.

De nombreux inhibiteurs naturels de l'angiogenèse sont des **fragments de dégradation de protéines** qui, à l'état natif, sont dépourvues d'activité anti-angiogène. L'**angiostatine** est un fragment du plasminogène (O'Reilly et al., 1994). *In vitro*, elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales et la formation de structures capillaires. Le **fragment de 16 kDa de la prolactine** est également une molécule anti-angiogène puissante (Ferrara et al., 1991; Clapp et al., 1993; Tabruyn et al., 2005). La **restine** et l'**endostatine** sont les fragments C-terminaux des collagènes de type XV et XVIII, respectivement (Tableau 3) (John et al., 2005). Toutes deux possèdent une puissante activité anti-angiogène et sont capables d'inhiber la croissance des tumeurs primaires et des métastases *in vivo*. De façon similaire, les domaines C-terminaux d'autres composants de la lame basale (perlécan, chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV) sont également capables d'inhiber l'angiogenèse (Bix et al., 2005). Ces divers fragments présentent peu d'homologie entre eux mais ils partagent la caractéristique commune d'exercer leur effet par interactions avec des protéines membranaires, dont les intégrines (Fig. 21) (Bix et al., 2005). L'**endostatine** interagit avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ et, probablement, avec la cavéoline et des protéoglycans à héparan sulfate. Le complexe ainsi formé régule deux voies distinctes de signalisation intracellulaire. La première mène à l'inhibition de RhoA, la désorganisation du cytosquelette d'actine et l'inhibition de l'adhésion et de la migration cellulaire. La deuxième module la migration cellulaire par l'intermédiaire de FAK et de ERK1/2. La **tumstatine**, un fragment de dégradation du collagène IV, se lie aux intégrines $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_v\beta_3$ (Hamano et al., 2005; Sudhakar et al., 2003). Cette dernière est une intégrine particulièrement importante lors de l'angiogenèse tumorale mais peu impliquée dans les processus de développement ou de cicatrisation physiologique, ce qui en fait une cible de choix pour une thérapie anti-tumorale spécifique. L'interaction entre $\alpha_v\beta_3$ et la tumstatine prévient l'activation de FAK et de la PI3-K et conduit finalement à une inhibition de la prolifération endothéliale. Enfin, l'**endorepelline** se fixe à la surface cellulaire via l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Bix et al., 2004), ce qui induit une augmentation du taux intracellulaire

d'AMPC et aboutit, comme dans le cas de l'endostatine mais par des voies alternatives, à une désorganisation du cytosquelette et à une inhibition de l'adhésion et la migration cellulaire. L'implication spécifique de ces diverses molécules de signalisation est d'autant plus complexe à déterminer que d'autres mécanismes de régulation sont mis en œuvre. Par exemple, l'endorepelline est capable de lier l'endostatine et de réduire son activité anti-angiogène. Par ailleurs, il a été établi que l'engagement de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ avec son substrat permettait de moduler l'activité de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Borza et al., 2006).

Fig. 21. Schéma simplifié des cascades de signalisation médiées par des intégrines et régulées par la tumstatine (Tum), l'endostatine (ES) et l'endorepelline (ER).

La **Tum** (voie de signalisation intracellulaire schématisée par les pentagones jaunes) et l'**ES** (voie de signalisation intracellulaire schématisée par les rectangles bleus) interagissent avec, respectivement, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_3\beta_1$ ce qui induit une inhibition (flèches rouges) de la phosphorylation de FAK. Bien que la **Tum** et l'**ES** inhibent toutes deux la phosphorylation de FAK, les voies de signalisation régulées en aval sont distinctes. L'implication de signaux additionnels induits par l'**ES** via les héparan sulfate protéoglycans (HSPG) et la cavéoline (Cav) sont peut-être à l'origine de cette spécificité. A l'inverse de la **Tum** et l'**ES**, l'**ER** (voie de signalisation en rouge) se lie à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ de manière à stimuler (flèches vertes) la phosphorylation de FAK, ce qui active p38 MAPK, Hsp27 et, finalement, induit la désorganisation du cytosquelette d'actine et des plaques d'adhésion focale. Il résulte de ces observations que la **Tum**, l'**ER** et l'**ES**, bien qu'agissant via des intégrines et des modes de signalisation largement indépendants, concourent toutes trois à inhiber l'angiogenèse. Un niveau supplémentaire de régulation consiste en l'inhibition de la fonction des intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ liée à la **Tum**. D'après Bix et al., 2005.



Ces observations démontrent que l'angiogenèse est un processus hautement et finement régulé, impliquant notamment diverses macromolécules de la MEC, des protéases et des récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales. Elles attestent également de la possibilité d'utiliser ces molécules et voies de signalisation comme cibles dans le cadre de pathologies liées à une angiogenèse excessive ou anormale.

II. Buts et plan du travail

Les collagènes fibrillaires sont les principaux constituants structurels de la matrice extracellulaire (MEC) conjonctive, qui sert de charpente aux différents organes mais aussi de support informationnel essentiel pour les cellules. Une étape cruciale de la maturation de ces collagènes en fibrilles et fibres correctement organisées et mécaniquement résistantes est l'excision de leur propeptide aminoterminal. Les ADAMTS2, 3 et 14, un groupe d'enzymes présentant une homologie structurelle, exercent en commun cette activité protéolytique appelée aminoprocollagène peptidase.

Des mutations dans le gène de l'ADAMTS2 sont la cause d'une maladie héréditaire, appelée Ehlers-Danlos de type dermatosparactique chez l'Homme (ou Ehlers-Danlos de type VIIC), et dermatosparaxie chez l'animal, dont la caractéristique majeure est une fragilité cutanée extrême. Tous les tissus riches en collagènes ne sont pas affectés de la même manière, ce qui suggère une hétérogénéité dans la distribution spatiale et temporelle de l'expression des ADAMTS2, 3 et 14 et/ou de leur spécificité envers les différents collagènes fibrillaires. Dans la première partie de ce travail (**Chapitre I**), nous avons contribué à l'étude de l'expression différentielle de ces trois ADAMTSs au cours du développement embryonnaire chez la souris.

L'analyse morphologique des animaux dermatosparactiques (déficients pour l'ADAMTS2) montre que la peau est anormalement mince, extrêmement fragile et caractérisée par une réduction du dépôt de fibres de collagène dont la structure est, par ailleurs, profondément altérée. Alors que le taux de renouvellement des collagènes fibrillaires est relativement lent en conditions physiologiques chez l'adulte, il est bien connu que certaines situations pathologiques induisent le dépôt rapide et excessif d'une matrice conjonctive majoritairement composée de collagène. La deuxième partie de nos travaux évalue le rôle de l'ADAMTS2 au cours de deux processus cicatriciels, la fibrose hépatique (**Chapitre II.A**) et l'invasion fibrovasculaire induite lors d'une inflammation granulomateuse à corps étranger (**Chapitre II.B**).

Ainsi que décrit précédemment, la formation de néo-vaisseaux est un processus complexe, faisant intervenir des composants de la MEC et des facteurs diffusibles,

inhibiteurs et activateurs. Ce processus est impliqué dans de nombreuses pathologies, dont la croissance tumorale. Une inhibition de cette angiogenèse excessive pourrait permettre de freiner l'évolution rapide de ces tumeurs, par privation des nutriments et de l'oxygène nécessaires à leur croissance. Parallèlement à notre axe de recherche principal, le rôle de l'ADAMTS2 dans l'angiogenèse a été évalué en raison (i) de sa fonction aminoprocollagène peptidase et de sa capacité à moduler ainsi la structure de la MEC, (ii) de la présence dans sa structure de quatre domaines appelés répétitions de type I des thrombospondines (TSR1), responsables de l'activité anti-angiogène des thrombospondines 1 et 2, et (iii) de son homologie de séquence avec les ADAMTS1 et 8, dont l'effet anti-angiogène est très puissant. Ces travaux font l'objet de la troisième partie de ce mémoire (**Chapitre III**).