

AFSED : rapport d'activité à mi-parcours Septembre 2015

Le syndrome d'Ehlers-Danlos classique (EDSc) est une maladie génétique du tissu conjonctif qui se caractérise principalement par des altérations cutanées à savoir une peau fine, vulnérable et hyper-extensible et des défauts de cicatrisation. L'EDSc est dû, dans 90% des cas, à des mutations sur les gènes codant pour le collagène V et plus particulièrement sur le gène *COL5A1* et, dans une moindre proportion, sur le gène *COL5A2*. Le collagène V est un collagène fibrillaire présent en faible quantité dans les tissus. Le pro-collagène V est secrété sous forme d'une large protéine trimérique qui est composée d'une longue partie centrale hélicoïdale flanquée par des extrémités pro-peptidiques N- et C-terminales. Contrairement aux autres collagènes fibrillaires, la chaîne pro α 1(V) n'est que partiellement clivée en N-terminal par l'enzyme BMP-1 au cours des étapes de maturation de la molécule.

Le projet développé dans l'équipe vise à établir une relation génotype-phénotype de l'EDSc en vue d'améliorer le diagnostic de cette maladie et de proposer d'éventuelles solutions thérapeutiques en focalisant l'étude sur les mutations identifiées sur le N-propeptide de la chaîne pro α 1(V). L'équipe de Anne de Paepe (Gand, Belgique) avec laquelle nous collaborons identifie et caractérise les différentes mutations et nous fournit les fibroblastes dérivés de biopsies de peau des patients.

Travail effectué

1- Impact des mutations de la chaîne α 1(V) sur la maturation du domaine N-propeptide

Dans le cadre de ce projet, notre travail a consisté à étudier 4 mutations ponctuelles (G431E-G475D-G493R-G530S) en reproduisant ces mutations par mutagenèse dirigée sur le fragment N-propeptidique de la chaîne α 1 du collagène V, que nous produisons de manière recombinante dans les cellules HEK-293EBNA. Nous étudions également une nouvelle mutation, S254L, qui ne conduit pas à un syndrome EDSc mais à une pathologie UCMD (Dystrophie Musculaire Congénitale d'Ullrich) pour laquelle le patient présente une faiblesse musculaire généralisée, des contractures articulaires et une hypermobilité des articulations. Cette mutation est particulièrement intéressante car elle se situe au niveau du site de clivage de la chaîne α 1(V) par la BMP-1 et elle conduit à une pathologie qui est classiquement due à des mutation au niveau du collagène VI. De ce fait, il semble à présent clair qu'il existe des chevauchements entre la pathologie EDSc du tissu conjonctif et les pathologies musculaires de type UCMD.

Après avoir introduit avec succès ces mutations, les protéines correspondantes, surproduites dans les cellules HEK-293EBNA, ont été purifiées. Puis, le travail a consisté à étudier l'effet des mutations sur le clivage du domaine N-propeptidique par l'enzyme de maturation BMP-1. Par une technique d'essais enzymatiques *in cellulo* développés dans notre équipe, il a montré qu'aucune des mutations étudiées n'affecte le clivage du N-propeptide par la BMP-1, exceptée la mutation S254L.

2- Impact des mutations de la chaîne $\alpha 1(V)$ sur l'intégrité et la fonction des fibroblastes

Il a été montré que des fibroblastes de peau issus de patients EDS_C présentaient des défauts de migration. Nous nous sommes donc intéressés aux capacités migratoires de fibroblastes issus des patients porteurs des différentes mutations en réalisant des tests de blessure et de suivi de la cicatrisation par vidéomicroscopie. Les résultats obtenus ont montré que la vitesse de migration cellulaire est inférieure à celle observée chez les fibroblastes sains et que l'ajout de collagène V modifie la vitesse de migration des fibroblastes.

Nous nous sommes également intéressés à la capacité de prolifération des fibroblastes issus des patients en réalisant des tests MTT. Nous avons pu observer que le taux de prolifération des mutants était inférieur à celui observé pour les fibroblastes sains. Par la suite, afin d'étudier une possible modification de l'étalement cellulaire des fibroblastes EDS_C et UCMD nous avons effectué des marquages fluorescents des fibres de stress à la phalloïdine, et des points de contact focaux à la vinculine. Une analyse des images au microscope à épifluorescence a révélé que les fibroblastes ne présentaient pas de défaut majeur dans la formation des fibres de stress. Cependant, une observation plus poussée des images a été menée en collaboration avec Martial Balland à Grenoble et a montré pour les fibroblastes mutés (i) une diminution du nombre de points de contact focaux (ii) une diminution de l'aire et (iii) une diminution de la longueur de ces adhésions focales.

Enfin, des analyses par microscopie électronique à transmission ont montré une forte accumulation de vésicules d'autophagie pour les fibroblastes mutés ainsi que la présence de mitochondries très abîmées et une dilatation du réticulum endoplasmique. Donc, dans le but d'étudier les effets des mutations sur la voie de signalisation de l'autophagie, nous avons mis au point l'induction d'autophagie par privation de sérum, en présence, ou non, d'inhibiteurs de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (E-64d/Pepstatin A). Le niveau d'autophagie a ensuite été déterminé en quantifiant par Western-blot la protéine LC3B-II, un

marqueur présent à la surface des autophagosomes. Les résultats, reproduits plusieurs fois, montrent que le niveau d'autophagie quantifié chez les mutants est supérieur à celui observé chez les fibroblastes sains. Cela est vrai à l'état basal comme après induction de l'autophagie par privation de sérum de 2h.

Perspectives

Il reste cependant un certain nombre d'expériences à réaliser et notamment :

- Déterminer si les mutations peuvent entraîner ou non une modification de l'interaction de la protéine mutée avec les partenaires identifiés et notamment le collagène VI (étudiée par la technique Elisa).
- Analyser la nature de la matrice extracellulaire produite par les fibroblastes issus des patients ainsi que vérifier si les collagènes d'intérêt, à savoir les collagène I, V et VI, sont bien sécrétés et non pas retenus dans la cellule. Cette étude sera réalisée par marquage métabolique à la proline C14 des collagènes I, V et VI qui est une technique très sensible et déjà été utilisé dans notre laboratoire dans de précédentes études.
- Etudier la migration 1D des fibroblastes issus du patient, qui nous fournira des informations supplémentaires comme notamment la vitesse.