Rapport

(pour diffusion dans le journal de l'AFSED)

Le syndrome d'Ehlers-Danlos induit par une déficience en Collagène V ou Ténascine-X: vers l'analyse d'un mécanisme commun.

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (SED) classique est une maladie rare (OMIM 130 000, prévalence en France 1/15000) qui se caractérise par une peau fine et fragile et hyperétirable, des cicatrices atrophiques, et une fragilité vasculaire conduisant à la formation d'hématomes inhabituellement fréquents. D'autres signes cliniques sont également observés, comme l'hypermobilité des articulations et la présence de malformations osseuses (souvent aux chevilles), tous deux étant la conséquence très probable d'une laxité anormale des tendons et ligaments. Le SED classique est une pathologie héréditaire dominante autosomale pour lequel aucun traitement efficace n'existe aujourd'hui.

En revanche, la cause moléculaire majeure du SED classique est bien établie. Elle correspond pour 90% des patients, à une déficience en collagène V, une protéine de la matrice extracellulaire présent en faible quantité dans les tissus affectés par la maladie comme notamment la peau. Cette forme classique peut également, mais plus rarement, être imputée à des mutations sur la ténascine-X, glycoprotéine de la matrice extracellulaire, mais également le collagène I qui forme des fibres de collagène avec le collagène V. Plus récemment, d'autres gènes ont été impliqués dans des syndromes dits chevauchants pour lesquels les patients présentent des symptômes de type SED classique associés à ceux de myopathies. C'est le cas des collagène V ne peuvent ni expliquer les nombreuses manifestations cliniques observées chez les patients atteints du SED classique, ni rendre compte de la pluralité des causes moléculaires.

La matrice extracellulaire forme un réseau complexe multi-protéique dans lequel, comme pour un échafaudage, chaque élément interagit avec un ou plusieurs partenaires. L'équipe de Florence Ruggiero travaille depuis quelques années sur l'hypothèse selon laquelle les défauts observés dans le derme des patients SED classique pourraient être la conséquence d'un défaut d'interactions, plus ou moins important selon la position de cette molécule dans le réseau. Comme pour un jeu de mikado où retirer une seule baguette selon sa position dans l'échafaudage peut conduire à son effondrement. Ulrich Valcourt s'intéresse aussi à la matrice extracellulaire. Il étudie le rôle de la ténascine-X dans une étape initiale et cruciale de la tumorigenèse, qui est la transformation d'une cellule tumorale d'origine épithéliale en cellule de type mésenchymateuse qui devient alors invasive.

Ce qui a réuni Florence Ruggiero (porteur de projet) et Ulrich Valcourt (partenaire), c'est l'observation d'un lien commun entre leur protéine préférée, le collagène V et la ténascine-X, toutes deux impliquées dans la pathogenèse du SED classique/hypermobile. Nous avons observé que non seulement le collagène V et la ténascine-X peuvent interagir ensemble mais les deux molécules peuvent se lier au TGF- β , facteur de croissance transformant, impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires et responsables de la régulation de gènes de la matrice extracellulaire.

L'hypothèse de travail a alors été qu'un lien pourrait exister entre la pathogenèse du SED et l'absence d'activation du TGF- β due à une haploinsuffisance ou déficience totale en ténascine-X ou du collagène V. Pendant l'année de financement de notre projet par l'AFSED, nous proposions d'analyser les interactions moléculaires fonctionnelles par différentes approches (Biacore, ELISA, immunoprécipitation) entre le TGF- β , le collagène V et la ténascine-X, et de définir les sites d'interactions en utilisant les domaines constitutifs de

ces protéines produits sous forme recombinante. Nous avons pu montrer que le collagène V interagissait avec la ténascine-X et le TGF- β en utilisant un test d'interaction en phase solide et/ou la technologie de résonance plasmonique de surface (Biacore). Pour cela, il a fallu au préalable produire certaines des protéines et de leurs fragments par ingénierie moléculaire. Cette année de financement nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires et faire une demande à l'ANR (Agence Nationale pour la Recherche) qui vient d'être pré-sélectionnée.

- Porteur de projet : Florence RUGGIERO, Directeur de Recherche, CNRS Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, ENS de Lyon *contact : florence.ruggiero@ens-lyon.fr*
- Partenaire : Ulrich VALCOURT, Maître de Conférences, Université de Lyon Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université de Lyon

Description des Résultats (ne pas diffuser)

Participants

<u>Equipe 1</u> Elisabeth VAGANAY, IE1, CNRS Christelle Bonod-Bidaud, MCU, Université de Lyon Florence RUGGIERO, DR, CNRS, responsable de l'équipe

Equipe 2 Elodie ROGER, Doctorante, Université Lyon 1 Alexandre AUBERT, Master 2, Université Lyon 1 Ulrich VALCOURT, MCU, Université Lyon 1

Le collagène V homotrimère et les fragments recombinants dérivés (les fragments N α 1(V) et TSPN) ont été produites dans des cellules HEK-293 et ont été purifiés par chromatographie, par le partenaire 1, selon le protocole décrit précédemment (Fichard *et al.*, 1997 ; Bonod-Bidaud *et al.*, 2007) (Figure 1). La ténascine-X recombinante entière et ses fragments dérivés (Figure 2) ont également été produits dans les cellules HEK-293 et ont été purifiés par deux chromatographies distinctes, par le partenaire 2, comme indiqué précédemment (Lethias *et al.*, 2006 ; Alcaraz *et al.*, 2014). Le degré de pureté de la ténascine-X recombinante et du collagène V a été vérifié sur SDS-PAGE et la concentration déterminée par dosage au BCA.



Figure 1 : Gauche: Structure des chaînes pro α 1 collagène V. Les domaines TSPN, le fragment N-terminal N α 1(V) et l'homotrimère pro[α 1(V)]₃ ont été clonés dans le plasmide pCEP4 et exprimés dans les cellules HEK-293. Droite: Analyse électrophorétique des différents domaines du collagène V produits de façon recombinante et purifiés. 1 : pro-collagène V homotrimère ; 2 : N α 1(V) ; 3 : NC3 ; 4 : TSPN ; 5 : mini-collagène V comprenant N α 1, 30 triplets de COL1, et le domaine



Figure 2 : Structure de la ténascine-X entière et des fragments dérivés. La ténascine-X entière (TN-X), la région constituée uniquement des répétitions de type Fibronectine de type III (FNIII) (TN-XΔEΔF), et le domaine C-terminal ressemblant au Fibrinogène (FBG) ont été clonés dans le vecteur pSecTag2-Hygro et ont été produits dans les cellules HEK-293.

L'interaction entre le collagène V et la ténascine-X a été réalisée par test ELISA. Des premiers essais ont été réalisés pour déterminer les conditions optimales en terme de dilution des protéines et de choix des anticorps et de la dilution à utiliser. Un exemple de résultats est donné en Figure 3). Les anticorps polyclonaux anti-collagène V humain ont été retenus pour cette étude, la ténascine-X est immobilisée alors que le collagène V est le ligand soluble.

Après ces essais de mise au point technique, des tests ont été effectués avec différentes formes du collagène V :

- les 2 formes hétérotrimériques (l'une commerciale comportant les 3 chaînes du collagène V, l'autre extraite de peau bovine et composé de 2 chaînes du collagène V)
- l'homotrimère du collagène V obtenu de façon recombinante
- la forme dénaturée du collagène V obtenue en incubant le collagène V à 60°C pendant 20 min.



Figure 3: Interaction entre la ténascine recombinante (immobilisée) et le collagène V commercial (Sigma) analysée par ELISA.

Figure 4 : Interactions entre la ténascine X recombinante (immobilisée) et le collagène V sous différentes isoformes analysée par ELISA.

Les résultats sont présentés en Figure 4 et montrent que l'interaction entre le collagène V et la ténascine-X dépend de la conformation en triple hélice du collagène V et que l'hétérotrimère est la forme active indiquant que la chaîne $\alpha 1(V)$ seule ne comporte pas le

site d'interaction. Afin de cartographier la région de la ténascine-X qui interagit avec le collagène V, des analyses sont actuellement en cours en utilisant les domaines FNIII (TN- $X\Delta E\Delta F$) et le domaine C-terminal de type Fibrinogène (FBG) de la ténascine-X (Figure 2).

Le Partenaire 1 avait montré que le domaine $N\alpha 1(V)$ était capable de se lier au TGF- β (Symoens *et al*, 2011). En collaboration avec C. MOALI (LBTI, Lyon), nous avons montré que le domaine N-terminal TSPN (Figure 1, gauche) était le domaine responsable de cette interaction par SPR (Figure 5). La constante d'affinité a pu être déterminée : KD=18,7 nM indiquant une forte affinité pour le TGF- β . Ce domaine est clivé au cours de la maturation du collagène V indiquant que le collagène V pourrait servir de réservoir du TGF- β .

Enfin, nous avons montré que la présence de TSPN augmentait l'activation de la voie Smad par le TGF- β dans des fibroblastes dermiques humains, indiquant un rôle double du collagène V: de réservoir avant son clivage par la BMP1, et après libération, un effet synergique de ce domaine dans la signalisation TGF- β . La Figure 6 décrit le modèle hypothétique qui résulte de ces premiers résultats.



Figure 5 : Interaction entre le collagène V et le TGF- β . Gauche, Sensorgramme obetenu par la technique SPR, montrant l'interaction entre TSPN (immobilisé) et le TGF- β soluble à différentes concentrations. Droite, Phospho-blot révélé par des anticorps anti-phospho-smad2 et anti-smad montrant l'activation de la voie de signalisation du TGF- β en absence (0) ou en présence de TSPN après 10 et 30 minutes d'incubation. L'histogramme montre la quantification par densitométrie du phospho-blot.



Interaction TSPN-TGFß : modèle hypothétique

Figure 6: Modèle hypothétique du collagène V comme réservoir du TGF- β . Sur la base de nos travaux antérieurs (Symoens *et al.*, 2011) et issus de la présente étude, le modèle suivant est proposé : le TGF- β est séquestré par le procollagène V par l'intermédiaire du domaine TSPN. Ce domaine interagit également avec la protéine PCPE qui stimule l'activité de la BMP1 favorisant la libération du domaine TSPN, étape cruciale de la maturation du collagène V. La libération du domaine TSPN va soit (gauche) libérer le TGF- β qui va pouvoir se lier à son récepteur et activer la voie Smad, soit (droite) le TSPN va servir à présenter TGF- β à son récepteur membranaire.

Le laboratoire du Partenaire 2 a montré que le domaine C-terminal de type Fibrinogène (FBG) de la Ténascine-X pouvait activer le TGF- β latent *in vitro* (Alcaraz *et al.*, 2014). Il était important de vérifier si cette activation pouvait également se produire *in vivo*. Des données préliminaires ont montré que la voie de signalisation canonique du TGF- β (voie des protéines Smad) était altérée dans les tissus des souris déficientes en ténascine-X (résultats non publiés). En effet, la phosphorylation de la protéine Smad2, de même que l'expression de gènes de réponse au TGF- β , sont diminuées dans les cellules des souris déficientes en ténascine-X par rapport aux souris sauvages.

Il restait à montrer si cette diminution de la signalisation du TGF-β en absence de ténascine-X dépendait d'un déficit en synthèse et sécrétion du TGF-β par les cellules. Nous avons alors comparé le taux de TGF-β1 dans le sérum de souris sauvages ou déficientes en ténascine-X. Comme illustré sur la Figure 7A, nos résultats montrent un taux significativement plus élevé de TGF-β1 (×12) dans le sérum des souris déficientes en ténascine-X par rapport aux souris sauvages. En outre, nous avons déterminé le taux de protéine TGF-β1 dans des extraits de peau d'animaux déficients ou non en ténascine-X. Comme observé sur la Figure 7B, le taux de TGF-β1 est plus élevé (×4,5) dans la peau des souris déficientes en ténascine-X que dans celle des souris sauvages. Collectivement, ces résultats montrent que le TGF-β1 est bien synthétisé par les cellules, mais est éliminé dans le sérum. Le fait que la voie de signalisation du TGF-β1 soit altérée, malgré une synthèse et sécrétion accrue de TGF-β1 en absence de ténascine-X, corrobore l'hypothèse selon laquelle la ténascine-X puisse activer le TGF-β *in vivo*. En outre, cette clairance élevée en TGF-β1 suggère que la ténascine-X possède aussi un rôle dans la

séquestration du TGF-β latent dans la matrice extracellulaire.



Figure 7: (A) Dosage ELISA indiquant le taux de TGF-β1 total dans le sérum de souris sauvages $(Tnx^{+/+}; n = 6)$ ou déficientes en ténascine-X $(Tnx^{-/-}; n = 4)$. ***, *p*<0,0001. (B) Western-blotting montrant le taux de protéine TGF-B1 dans la peau de souris sauvages (n = 3) ou déficientes en ténascine-X (n = 3). Le ratio des signaux TGF-β1/GAPDH indiqué sous chaque est échantillon.

Ces résultats suggèrent alors une autre question biologique: comment pouvons-nous alors concilier les deux fonctions de la ténascine-X, à savoir séquestration et activation du TGF-β latent ? Une hypothèse séduisante serait que la ténascine-X entière serait capable de séquestrer le TGF-β latent au sein de la matrice extracellulaire, alors que le domaine C-terminal (FBG) de la ténascine-X serait clivé de la molécule native pour pouvoir activer le TGF-β latent au niveau des cellules. Nous avons récemment identifié une famille de protéases qui peuvent cliver la ténascine-X in vitro (Figure 8A). Nous nommerons ces protéases α et β pour des raisons de confidentialité. En utilisant la méthode iTrag (Isobaric tag for relative and absolute quantitation), une approche quantitative couplée à la spectrométrie de masse, nous avons identifié les sites de clivage de la ténascine-X par ces protéases. Nous avons déterminé que ces protéases pouvaient toutes les deux cliver un site commun permettant de libérer un fragment comportant le domaine FBG ainsi que 6 domaines fibronectine de type III (Figure 8B). Afin de vérifier si le fragment généré pouvait induire une activation du TGF- β , nous avons (1) immunoprécipité le domaine FBG, juste après le clivage in vitro de la ténascine-X par ces protéases, et (2) stimulé des cellules rapportant la signalisation du TGF-B1 avec le produit de l'immunoprécipitation. Comme illustré que la Figure 8C, les fragments générés par les protéases conservent leur capacité à activer le TGF-β1.



Figure 8: (A) Clivage *in vitro* de la ténascine-X (TN-X) entière par les protéases α et β et la métalloprotéinase matricielle (MMP)-9 et analyse par Western-blotting des fragments comportant le domaine FBG. Les protéases α et β clivent la ténascine-X *in vitro*, mais pas la MMP-9. (B) Résultat de l'analyse iTraq couplée à la spectrométrie de masse. Les protéases α et β libèrent toutes les deux un fragment comportant le domaine FBG ainsi que 6 domaines FNIII. La protéase β libère un second fragment de masse moléculaire plus faible et comportant aussi le domaine FBG. (C). Après clivage de la ténascine-X par les protéases α ou β , les fragments comportant le domaine FBG ont été immunoprécipités (IP) et utilisés pour stimuler des cellules rapportant l'activité de signalisation du TGF- β (cellules MCF10A-TRE-Luc). Un anticorps pré-immun (IgG) a été utilisé pour l'immunoprécipitation contrôle.

En parallèle de ces résultats acquis, le partenaire 2 a également progressé sur deux aspects du projet :

• <u>Le croisement de souris sauvages ou non en ténascine-X avec des souris</u> <u>comportant une construction rapportrice de la signalisation canonique du TGF- β , à savoir les souris SBE-RFP. Ce croisement permettra d'analyser et quantifier *in situ* la fonctionnalité de la voie des protéines Smad chez souris déficientes ou non en ténascine-X. La genèse des animaux d'intérêt est actuellement en cours au laboratoire.</u> • <u>L'identification moléculaire des sites d'interaction du TGF- β latent avec le domaine FBG de la ténascine-X.</u> Des mutations ont été récemment identifiées dans le domaine FBG de la ténascine-X chez des patients comportant certaines manifestations cliniques du syndrome d'Ehlers-Danlos (Penisson-Besnier *et al.*, 2013; Morissette *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). La finalité consiste à déterminer si ces acides aminés mutés perturbent l'interaction du domaine FBG avec le TGF- β latent. Actuellement, six mutations ont été introduites, par mutagenèse dirigée, dans le domaine FBG. Après production et purification des protéines correspondantes, nous déterminerons si les protéines mutées conservent ou non leur capacité à interagir avec, et à activer, le TGF- β latent, et ce, en utilisant différentes approches biochimiques et cellulaires.

Références

Alcaraz L.B., Exposito J.Y., Chuvin N., Pommier R.M., Cluzel C., Martel S., Sentis S., Bartholin L., Lethias C., and <u>Valcourt U</u>. Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF-β. *J Cell Biol*. 2014, 205:409-428.

Bonod-Bidaud C., Beraud M., <u>Vaganay E.</u>, Delacoux F., Font B., Hulmes DJS and <u>Ruggiero F.</u> 2007. Enzymatic cleavage specificity of the $pro\alpha 1(V)$ chain processing analyzed by site-directed mutagenesis. Biochem. J., 405:299-306.

Chen W., Perritt A.F., Morissette R., Dreiling J.L., Bohn M.F., Mallappa A., Xu Z., Quezado M., and Merke DP. Ehlers-Danlos Syndrome Caused by Biallelic TNXB Variants in Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *Hum Mutat.* 2016, 37:893-897.

Fichard A., Tillet E, Delacoux F., Garonne R and <u>Ruggiero F.</u> 1997. Human recombinant a1(V) collagen chain. Homotrimeric assembly and subsequent processing, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272:30083-30087.

Lethias C., Carisey A., Comte J., Cluzel C., and Exposito JY. A model of tenascin-X integration within the collagenous network. *FEBS Lett.* 2006, 580:6281-6285.

Morissette R., Chen W., Perritt A.F., Dreiling J.L., Arai A.E., Sachdev V., Hannoush H., Mallappa A., Xu Z., McDonnell N.B., Quezado M., and Merke D.P. Broadening the Spectrum of Ehlers Danlos Syndrome in Patients With Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015, 100:E1143-1152.

Pénisson-Besnier I., Allamand V., Beurrier P., Martin L., Schalkwijk J., van Vlijmen-Willems I., Gartioux C., Malfait F., Syx D., Macchi L., Marcorelles P., Arbeille B., Croué A., De Paepe A., and Dubas F. Compound heterozygous mutations of the TNXB gene cause primary myopathy. *Neuromuscul Disord*. 2013, 23:664-669.

Symoens S, Renard M, Bonod Bidaud C, Syx D, <u>Vaganay E</u>, Malfait F, Ricard-Blum S, Kessler E, Van Laer L, Coucke P, <u>Ruggiero F</u>, De Paepe A. 2010. Identification of binding partners interacting with the α 1-N-propeptide of type V collagen. Biochem J, 433:371-81.