



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **29 juin 2018**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **TESSIER Agnès**

Titre de la thèse : « Procollagen C-Proteinase Enhancers dans la cicatrisation cutanée : expression, fonctions et potentiel thérapeutique »



Résumé

Au cours de la cicatrisation cutanée, la balance entre synthèse et dégradation des collagènes joue un rôle crucial dans la restauration et le maintien de l'intégrité structurale et mécanique de la peau. De fait, diverses pathologies de cicatrisation (plaies chroniques, cicatrices hypertrophiques et chéloïdes) affectant la santé et la qualité de vie des patients sont associées à des défauts dans la composition ou l'organisation des fibres de collagène. Les collagènes fibrillaires sont synthétisés et sécrétés sous forme de précurseurs solubles, principalement par les fibroblastes. Après sécrétion dans l'espace extracellulaire, leurs extrémités N- et C-terminales sont alors clivées par des protéases, appartenant notamment à la famille « BMP-1/Tolloid-like » (BTPs), ce qui permet la formation de fibres de collagène. Ce clivage protéolytique est stimulé de façon spécifique et efficace par une glycoprotéine, appelée « Procollagen C-Proteinase Enhancer-1 » ou PCPE-1 connue pour être impliquée dans différents processus de réparation tissulaire. Plus récemment, une deuxième isoforme de PCPE a été décrite : PCPE-2 serait également capable de stimuler la maturation des procollagènes *in vitro* et jouerait un rôle essentiel dans la synthèse du collagène chez la souris dans un modèle d'hypertrophie cardiaque. Ainsi, l'objectif de mon travail de recherche a été d'étudier les rôles de PCPE-1 et -2 dans la cicatrisation de la peau et d'évaluer leur potentiel thérapeutique pour améliorer la qualité des plaies.

Pour cela, l'expression et la distribution des BTPs et des PCPEs ont été étudiées dans différents modèles cellulaires et tissulaires par des approches de biologie moléculaire et de biochimie (qRT-PCR, Western blot, immunofluorescence et cytométrie en flux). En parallèle, un système d'expression de PCPE-2 a été mis en place afin de produire la protéine humaine recombinante dans le but d'évaluer son activité sur les procollagènes fibrillaires et de la comparer à celle de PCPE-1 déjà disponible dans l'équipe de C. Moali. Enfin, un modèle de souris déficientes en PCPE-2 a été utilisé afin d'étudier le rôle de PCPE-2 *in vivo* dans la peau et pendant la cicatrisation cutanée.

Nos résultats ont démontré que les BTPs sont exprimées à la fois par les fibroblastes et les kératinocytes dans la peau murine et humaine. Nous avons aussi étudié leur expression dans un modèle murin de cicatrisation. L'expression augmente de façon significative dans la peau de souris lésée, et plus particulièrement 7 jours après lésion, ce qui correspond à la phase de granulation, au cours de laquelle le nouveau tissu est formé. De façon intéressante, PCPE-1 et PCPE-2 ne sont pas exprimées par le même type cellulaire dans la peau. PCPE-1 est fortement exprimée par les fibroblastes situés au niveau du derme et son expression augmente de façon significative après une lésion cutanée. L'expression de PCPE-1 est fortement corrélée à celle des BTPs avec une forte augmentation 7 jours après lésion, ce qui suggère que PCPE-1 et les BTPs jouent un rôle important dans la formation du nouveau tissu au cours de la cicatrisation. A l'inverse, PCPE-2 est faiblement exprimée par les fibroblastes du

derme mais semble plus abondante dans les kératinocytes au niveau de la couche superficielle de la peau, l'épiderme. Le manque de spécificité des anticorps dirigés contre PCPE-2 a rendu difficile l'étude de l'expression et la distribution de PCPE-2 dans la peau pendant la cicatrisation et n'a pas donné de conclusion claire. Cependant, nous avons montré que PCPE-2, tout comme les BTPs, est fortement exprimée dans des lignées humaines de monocytes, THP-1 et U937 et que son expression augmente après différenciation des monocytes en macrophages.

Par différentes stratégies, nous avons pu inhiber de façon efficace l'action de PCPE-1 dans des fibroblastes de peau humaine. L'inhibition de PCPE-1 ne semble pas avoir d'effets majeurs sur la morphologie et la prolifération des cellules, ainsi que sur la synthèse protéique. Par une approche protéomique, nous avons mis en évidence que l'abondance des collagènes et d'autres protéines de la matrice extracellulaire n'était pas affectée par l'absence de PCPE-1, suggèrent que le rôle de PCPE-1 est spécifique de la maturation des collagènes et pourrait être envisagée comme une cible thérapeutique.

En parallèle, la protéine humaine recombinante de PCPE-2 a été exprimée et produite en cellules eucaryotes et plusieurs étapes de purification ont été nécessaires pour obtenir une protéine pure. Cette dernière a alors été testée *in vitro* dans le but d'évaluer son activité sur les procollagènes fibrillaires. De façon surprenante, nos résultats suggèrent que la protéine PCPE-2 purifiée a beaucoup moins d'effet que PCPE-1 sur la maturation des collagènes. Alors que PCPE-1 stimule d'un facteur 5 à 10 la maturation des procollagènes I et III, collagènes majoritaires dans la peau, PCPE-2 a un effet très faible voire nul sur leur maturation (facteur de 3 maximum), qui semble dépendant de la concentration en PCPE-2 et disparaît à forte concentration. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que PCPE-2 recombinante peut interagir avec les procollagènes, et ce avec une affinité similaire à PCPE-1 et prévenir l'action activatrice de PCPE-1. De plus, PCPE-2 recombinante semble inhiber de façon directe l'activité de BMP-1 sur d'autres substrats non collagéniques tels que la thrombospondine 1, la chordine et le bétaglycan. Ces résultats suggèrent un nouveau mode d'action de PCPE-2 : une fonction d'activateur de la maturation des procollagènes fibrillaires, combinée à une fonction d'inhibiteur de BMP-1.

Enfin, des travaux préliminaires ont été réalisés sur des souris C57BL/6 déficientes en PCPE-2 afin de comprendre le rôle de PCPE-2 *in vivo*. Bien que réalisés sur un faible nombre de souris, nos premiers résultats permettent déjà de conclure qu'il n'y a pas de défauts majeurs au niveau de la fermeture de la plaie, de l'infiltration des cellules inflammatoires et de la formation du nouveau tissu en l'absence de PCPE-2. Des échantillons de peau ont également été prélevés afin de réaliser des analyses structurales des fibres de collagène par microscopie électronique à transmission.

L'ensemble de ces résultats suggère que PCPE-1 et -2 auraient des rôles distincts dans la cicatrisation cutanée. Alors que nos résultats concernant PCPE-1 sont en accord avec son rôle dans la fibrillogenèse au niveau de la peau et pendant la cicatrisation, l'expression de PCPE-2 par les kératinocytes et les cellules immunitaires ainsi que nos résultats *in vitro* indiquent une fonction alternative de cette protéine. Ainsi, ce travail nous a permis de confirmer que PCPE-1 était la cible thérapeutique la plus adaptée pour réguler la formation des fibres de collagène dans le contexte de la cicatrisation cutanée et ouvre un nouveau champ d'investigation sur le rôle de PCPE-2. Des études plus approfondies permettront de mieux comprendre l'importance de PCPE-2 dans la peau et de déterminer si, comme PCPE-1, cette protéine pourrait être une cible thérapeutique pour les pathologies cutanées en contrôlant d'autres voies importantes.