



HAL
open science

Vers une meilleure caractérisation moléculaire des collagènes fibrillaires et de leurs mécanismes de maturation

Jean-Baptiste Vincourt

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Vincourt. Vers une meilleure caractérisation moléculaire des collagènes fibrillaires et de leurs mécanismes de maturation. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2022. tel-03687975

HAL Id: tel-03687975

<https://hal.science/tel-03687975>

Submitted on 10 Jun 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Ecole Doctorale BioSE
(Biologie, Santé, Environnement)**

DOSSIER
Présenté pour la candidature au diplôme
D'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

par
Jean-Baptiste VINCOURT

**VERS UNE MEILLEURE CARACTERISATION MOLECULAIRE
DES COLLAGENES FIBRILLAIRES ET DE LEURS
MECANISMES DE MATURATION**

Marraine scientifique :

Sylvie FOURNEL-GIGLEUX, DR INSERM UMR 7365 CNRS Université de Lorraine

Rapporteurs :

Laurence SABATIER, PR, UMR 7178 CNRS Unistra

Patricia ROUELLE, DR CNRS, UMR 5305 Université Lyon I

David MAGNE, PR, UMR 5246 CNRS Université Lyon I

Examineurs :

Halima KERDJOUJ, PR, EA 4691 BIOS Université de Reims

Stéphanie GRANDEMANGE, PR, UMR 7038 CNRS Université de Lorraine

Jean-Yves JOUZEAU, PU-PH, UMR 7365 CNRS Université de Lorraine

Soutenance le 21 Mars 2022

Section CNU : 64

UMR 7365 CNRS-UL IMoPA
BIOPÔLE de l'Université de Lorraine
Campus Brabois Santé
9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 20199
54505 Vandœuvre Les Nancy, France



Table des matières

Autorisation d'inscription à l'HDR.....	7
Curriculum vitae.....	9
Activité pédagogique formelle.....	11
Dossier Scientifique.....	13
Liste des Abréviations.....	14
1. Activités de recherche avant 2005.....	15
1.1 Caractérisation moléculaire des participants au métabolisme du sulfate dans le recrutement lymphocytaire par les organes lymphoïdes secondaires.....	15
1.1.1 recherche de nouveaux membres de la famille génique SLC26 exprimés dans les HEVECs.....	17
1.1.2 Caractérisation du transport de sulfate par SLC26A7 et SLC26A11.....	18
1.1.3 Caractérisation des localisations sub-cellulaires des PAPS synthétases humaines.....	18
1.2 Fonctions moléculaires de Moesin.....	19
1.2.1 Interaction Moesin/tubuline β 1.....	20
1.2.2 Interaction Moesin/Y14.....	20
2. Activités de recherche de 2005 à 2010.....	22
2.1 Marqueurs de la différenciation chondrocytaire.....	22
2.1.1 MATN3 comme marqueur de la dégénérescence du phénotype chondrocytaire.....	23
2.1.2 CPI et CPII, marqueurs différentiels des chondromes et chondrosarcomes.....	23
2.2 Régulation du phénotype cellulaire par Matriline-3, CPI et CPII. (Encadrement post-doctoral C. Bantsimba-Malanda ; subvention FRM 2010).....	25
2.2.1 Régulation différentielle du phénotype cellulaire par CPI et CPII.....	25
2.2.2 Notion de fonction intégrée des constituants de l'ECM.....	26
3. Activités de recherche depuis 2010.....	28
3.1 Nouveaux aspects des fonctions des CP dans la régulation des PTMs des procollagènes.....	28
3.1.1 Interaction physique entre CPII et la Lysyl Oxydase.....	29
3.1.2 CPII ne recrute pas PCPE1.....	30
3.2 Outils d'analyse protéomique.....	31
3.2.1 Quantification relative sans marquage des protéines sécrétées par LC-MALDI.....	31
3.2.2 Analyse quantitative relative des PTMs des collagènes.....	32
3.3 La lignée ATDC5 comme modèle d'étude des mécanismes	

de maturation des collagènes fibrillaires.....	33
3.4 Rôle du métabolisme du glucose dans la mise en place de l'hydroxylation du procollagène en absence d'ascorbate.....	34
3.5 Développement d'une stratégie thérapeutique anti-fibrotique.....	37
4 Perspectives de recherche.....	38
4.1 Caractérisation fonctionnelle des acteurs de la maturation des procollagènes fibrillaires.....	38
4.1.1 Caractérisation du rôle de la synthèse des glycosaminoglycanes dans l'assemblage de la matrice extracellulaire	39
4.1.2 Caractérisation fonctionnelle des lysyl oxidases individuelles dans l'établissement des crosslinks des collagènes.....	39
4.1.3 Caractérisation du mécanisme enzymatique des complexes prolyl-4-hydroxylase.....	40
4.2 Caractérisation exhaustive des PTMs du collagène de type I et de leurs spécificités tissulaires.....	41
4.3 Vers une meilleure compréhension du mécanisme séquentiel de maturation des propeptides carboxy-terminaux des procollagènes fibrillaires.....	43
5 Encadrement Scientifique.....	45
5.1 Encadrement de L3/M1.....	45
5.2 Encadrement de M2.....	46
5.3 Supervision de post-doctorant.....	47
5.4 Participation à des encadrements de thèse de Médecine ou de Science sans ACT.....	47
5.5 Co-encadrement de thèse avec ACT.....	47
6 Participation à des Jurys de Thèse.....	48
7 Production Scientifique.....	49
8 Rayonnement Scientifique.....	51
8.1 Expertises Scientifiques.....	51
8.1.1 Comités de suivi de thèse.....	51
8.1.2 Evaluation d'articles.....	51
8.2 Implication dans des Réseaux Scientifiques.....	51
9 Responsabilités scientifiques et administratives liées à la Recherche...52	52
9.1 Rédaction, Coordination et Participation à des Projets Scientifiques.....	52
9.2 Participation à l'Obtention d'un Contrat Doctoral	53
9.3 Comités de Recrutements de Personnels en CDI.....	53
9.4 Jurys d'attribution de subventions d'équipement.....	53
9.5 Autres Responsabilités Scientifiques et Administratives.....	53
10 Bibliographie.....	54

Direction de la Recherche et de
la Valorisation

Sous-Direction de l'Administration
de la Recherche

91 avenue de la Libération
BP 50454
54 001 NANCY Cedex

Personne chargée du dossier :
Isabelle VAILLANT -MARECHAL
Ligne directe :
03.72.74.04.55
drv-hdr@univ-lorraine.fr

Monsieur VINCOURT Jean-Baptiste
Laboratoire IMoPA
Campus Biologie-Santé
9 avenue de la forêt de Haye
BP 20199
54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex

Monsieur,

J'ai l'honneur de vous faire connaître que sur avis favorable du Conseil Scientifique réuni le 30 novembre 2021, je vous accorde l'autorisation de vous inscrire à l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR) en Sciences de la Vie et de la Santé.

A compter de la date de réception de ce courrier, vous disposez d'un an pour soutenir votre HDR.

Sept semaines au minimum avant la date prévue pour votre soutenance, je vous remercie de bien vouloir :

- Procéder au paiement de votre inscription auprès du service d'inscription administrative voulu (cf. annexe 2 de la procédure HDR jointe à ce courrier envoyé par email).
- Transmettre à l'adresse suivante : drv-hdr@univ-lorraine.fr :
 - Le formulaire de demande de soutenance de l'HDR (joint à ce courrier envoyé par email) dûment complété.
 - Votre manuscrit final.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, l'expression de mes salutations distinguées.

Le Président de l'Université de Lorraine,
Pour le Président et par délégation,
Le Vice-Président du Conseil Scientifique

Frédéric VILLIÉRAS



Curriculum vitae

Jean-Baptiste Vincourt

Ingénieur de Recherche en analyse protéomique

IMoPA - UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine & IBSLor UMS 2008/US40 Université de Lorraine-CNRS-INSERM

Email : jean-baptiste.vincourt@univ-lorraine.fr

Biopole du Campus Santé-Brabois, 9, Avenue Forêt de Haye, CS 50184, F-54500 Vandoeuvre cedex

Tel: +33 (0)3 72 74 66 82

Cursus Universitaire

L'ensemble de mon cursus universitaire a été réalisé à l'Université Toulouse III.

- 1999-2002 : **Doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire**
- 1998-1999 : **DEA de Biochimie et Biologie Moléculaire**
- 1997–1998 : **Maîtrise de Biochimie**
- 1996–1997 : **Licence de biochimie**
- 1994–1996 : **DEUG de Sciences de la Vie**

Expérience professionnelle

Expérience en Enseignement formel

- Depuis Septembre 2008 : Ponctuellement **vacataire** (2-4 h/an) d'enseignement en protéomique en L3, M1 et M2 des formations **de Licence professionnelle « protéines recombinantes », Master « Recherche en Biologie-Santé »**.
- Septembre 2000-Juin 2001 : **Vacataire** d'enseignement (60h) de Travaux pratiques en Deug de Sciences de la Vie, campus d'Albi de l'Université Toulouse III.

Expérience en Encadrement scientifique

- Depuis Mai 2005 : 4 L3, 14 M1, 7 M2, 2 ingénieurs, 1 doctorante (ACT), 1 post-doctorante, sur les thématiques du laboratoire IMoPA, UMR 7365, Université de Lorraine.
- Janvier 2000-Juin 2002 : 2 M1, 1 M2, sur mon sujet de thèse à l'IPBS, Toulouse III.

Expérience en Recherche

- Depuis Décembre 2010 : **Ingénieur de Recherche CNRS en analyse protéomique** à l'UMR 7365, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire, Université de Lorraine-CNRS et responsable de la plate-forme de protéomique de l'UMS 2008/US40 IBSLor, Université de Lorraine-CNRS-INSERM.
- Mai 2005 à Novembre 2010 : Bourse de **post-doctorant** ARC puis multiples CDD de **post-doctorants** et **d'Ingénieur de Recherche**, UMR 7561 Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, Université de Lorraine-CNRS.
- Octobre 2004 à Février 2005 : **Post-doctorant** HFSP à l'EMBL, Heidelberg, Allemagne.
- Mars 2003 à Aout 2004 : **Post-doctorant** National Cancer Institute au National institute of Health, Bethesda, Maryland.

□ Novembre 1999 à Octobre 2002 : **Doctorant MENR** à l'Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Toulouse III-CNRS.

□ Septembre 1998 à Janvier 1999 : **Stagiaire en DEA de Biochimie et Biologie Moléculaire** dans le Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, UMR 5100, Toulouse III-CNRS.

□ Février à Juin 1999 : **Stagiaire en DEA de Biochimie et Biologie Moléculaire** à l'Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Toulouse III-CNRS.

Publications Scientifiques

19 publications dans des journaux à comité de lecture dont 11 en rang utile

Selon le JCR, 353 citations, H-index 10

5 Publications les plus significatives :

ATDC5 cells as a model of cartilage extracellular matrix neosynthesis, maturation and assembly. Wilhelm D, Kempf H, Bianchi A, Vincourt JB*. J Proteomics. 2020 May 15;219:103718. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103718. PMID: 32097723

Label-free relative quantification applied to LC-MALDI acquisition for rapid analysis of chondrocyte secretion modulation. Riffault M, Moulin D, Grossin L, Mainard D, Magdalou J, Vincourt JB*. J Proteomics. 2015 Jan 30;114:263-73. doi: 10.1016/j.jprot.2014.10.026. PMID: 25464362

Chondrocalcin is internalized by chondrocytes and triggers cartilage destruction via an interleukin-1 β -dependent pathway. Bantsimba-Malanda C, Cottet J, Netter P, Dumas D, Mainard D, Magdalou J, Vincourt JB*. Matrix Biol. 2013 Oct-Nov;32(7-8):443-51. doi: 10.1016/j.matbio.2013.06.002. PMID: 23851124

Matrilin-3 switches from anti- to pro-anabolic upon integration to the extracellular matrix. Vincourt JB*, Etienne S, Grossin L, Cottet J, Bantsimba-Malanda C, Netter P, Mainard D, Libante V, Gillet P, Magdalou J. Matrix Biol. 2012 Jun;31(5):290-8. doi: 10.1016/j.matbio.2012.03.004. PMID: 22521401

C-propeptides of procollagens I alpha 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration. Vincourt JB*, Etienne S, Cottet J, Delaunay C, Malanda CB, Lionneton F, Sirveaux F, Netter P, Plénat F, Mainard D, Vignaud JM, Magdalou J. Cancer Res. 2010 Jun 1;70(11):4739-48. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0046. PMID: 20460531

Activité pédagogique formelle

Vacations d'enseignement pendant mon doctorat (60 h TP)

Pendant ma seconde année de thèse, soucieux d'expérimenter tous les champs des métiers de la Recherche, j'ai accepté la charge des enseignements de Travaux Pratiques de Biologie Moléculaire dispensés sur le campus d'Albi, antenne de l'Université Toulouse III, pour les étudiants en second semestre de Deug de Biologie. J'étais supervisé par le Pr. Gérard BOUCHE. Il faut préciser que ce type d'enseignement n'était pas dispensé sur ce campus auparavant, que le matériel était pour l'essentiel absent sur le campus et que le contenu pratique était à concevoir en adéquation avec l'enseignement théorique et les contraintes logistiques. J'ai finalement opté pour des expériences de clonage moléculaire, ce qui impliquait notamment le transport de presque tout le matériel nécessaire depuis Toulouse dans le respect des contraintes de disponibilité y compris sur le campus Toulousain.

Je ne peux pas dire que cette expérience m'ait dissuadé d'envisager une carrière d'enseignant. Le contact avec les plus jeunes, leur sensibilisation au questionnement scientifique, susciter leur intérêt n'étaient pas sans intérêt. Mais l'exercice de répétition, la distance nécessaire entre enseignant et étudiants, m'ont rapidement amené à y préférer l'enseignement par la recherche, qui présente plus de synergie avec la recherche elle-même.

Vacations d'enseignement à Nancy (± 20 h CM)

Après mon arrivée à Nancy, je suis devenu un des rares experts locaux en analyse protéomique et ai pris en charge au fil des changements de maquettes d'enseignement les cours correspondants, à raison de 2 à 4 heures de cours magistral en M1 et M2, notamment dans les cursus Santé. J'y traite les principes physiques de la spectrométrie de masse y compris en tandem, les raisonnements (reposant principalement sur la chimie) permettant l'identification des protéines, les outils permettant les mesures quantitatives, les points clés, les limites, les considérations budgétaires. Occasionnellement, je rédige à la demande des responsables d'UE une partie d'examen sur le thème.

A mon sens, dans une Université idéale, la plupart des enseignements seraient réalisés sous cette forme : chacun, quel que soit son statut, enseignerait ses spécialités les plus abouties dans une meilleure maîtrise du sujet et les Enseignants-Chercheurs ne seraient pas submergés par les heures de cours ni leur préparation. C'est en cohérence avec ce point de vue, par plaisir de se confronter aux plus jeunes, et parce que c'est l'occasion d'inciter les étudiants à considérer la pertinence de l'analyse protéomique, voire, à faire des stages sur notre plateforme, que je participe à ces enseignements que je remets à jour au gré des évolutions technologiques.

Dossier Scientifique

Abréviations peu courantes

(explicitées en langue Anglaise puisqu'issues de publications)

CP	procollagen Carboxy-Propeptide
CP I	Type I procollagen Carboxy-Propeptide
CP II	Type II procollagen Carboxy-Propeptide
ECM	Extracellular Matrix
HEVEC	High Endothelial Veinule Endothelial Cell
LOX	Lysyl Oxidase
MATN3	Matrilin-3
P4H	Prolyl-4-Hydroxylase
PAPS	3'-Phospho-Adenosine-5'-Phospho-Sulfate
PCPE1	ProCollagen Peptidase Enhancer 1
PDI	Protein Disulfide Isomerase
Phyl	Procollagen hydroxylation
PTM	Post-Translational Modification

1 Activités de recherche avant 2005

Mes sujets d'étude auront été divers tant d'un point de vue thématique que pratique avant mon implantation Nancéienne. C'est cette diversité d'expériences qui, je crois, me permet de bien cerner les problématiques des collaborateurs de la plate-forme de protéomique quels que soient leurs horizons. On pourrait aussi espérer que cette richesse me permette de mieux percevoir les interactions fonctionnelles entre les mécanismes que j'étudie et les processus biologiques dans leur ensemble.

Toutes mes thématiques de recherche passées ne seront pas développées dans cette partie, se concentrant sur les plus fondatrices et/ou significatives.

1.1 Caractérisation moléculaire des participants au métabolisme du sulfate dans le recrutement lymphocytaire par les organes lymphoïdes secondaires

DEA (Fev-Juin 2019) et **Doctorat** (1999-2002), Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Toulouse III.

Sujet : Incorporation et activation du sulfate dans les cellules endothéliales cuboïdales.

Résultats : Identification des transporteurs du sulfate exprimés dans les veinules postcapillaires des organes lymphoïdes secondaires ; démonstration et caractérisation partielle du transport nucléaire des PAPS Synthétases ; développement d'outils pour le criblage d'inhibiteurs pharmacologiques du métabolisme du sulfate.

Domaines de compétence : criblage moléculaire ; protéines recombinantes ; biologie cellulaire et moléculaire.

Le système immunitaire des mammifères repose notamment sur la circulation permanente des lymphocytes depuis la circulation sanguine vers le système et vice versa, à la recherche de leurs cibles antigéniques. Ce processus impose notamment que ces cellules, circulant à la vitesse du flux sanguin dans les vaisseaux, soient capable d'opérer la migration trans-endothéliale spécifiquement au niveau des vaisseaux irriguant les organes lymphoïdes secondaires, site principal de l'éventuelle détection antigénique aboutissant à leur amplification clonale. On peut noter que ce processus est en de nombreux points similaire à celui qui induit l'extravasation de l'ensemble des populations leucocytaires pour accéder aux sites d'inflammation chronique et il repose d'ailleurs largement sur les mêmes bases moléculaires. Le processus repose largement sur les fonctions spécialisées des cellules endothéliales tapissant les veinules postcapillaires (High Endothelial Venule Endothelial Cells, HEVECs) des organes lymphoïdes secondaires (figure 1).

Le processus est initié par une étape de ralentissement des leucocytes (« rolling »), due à l'interaction entre La sélectine-L, une récepteur qu'ils portent à leur surface, à la différence des autres cellules sanguines, et ses ligands spécifiques de haute affinité présentés spécifiquement par les HEVECs. Ces ligands sont des protéoglycanes membranaires présentant un arrangement osidique spécialisé, conférés notamment par l'expression de la fucosyltransférase VII ¹. De plus, ces ligands, pour être fonctionnels, sont abondamment sulfatés. Les niveaux d'expression et de sulfatation des ligands de la Sélectine-L sont tels qu'ils

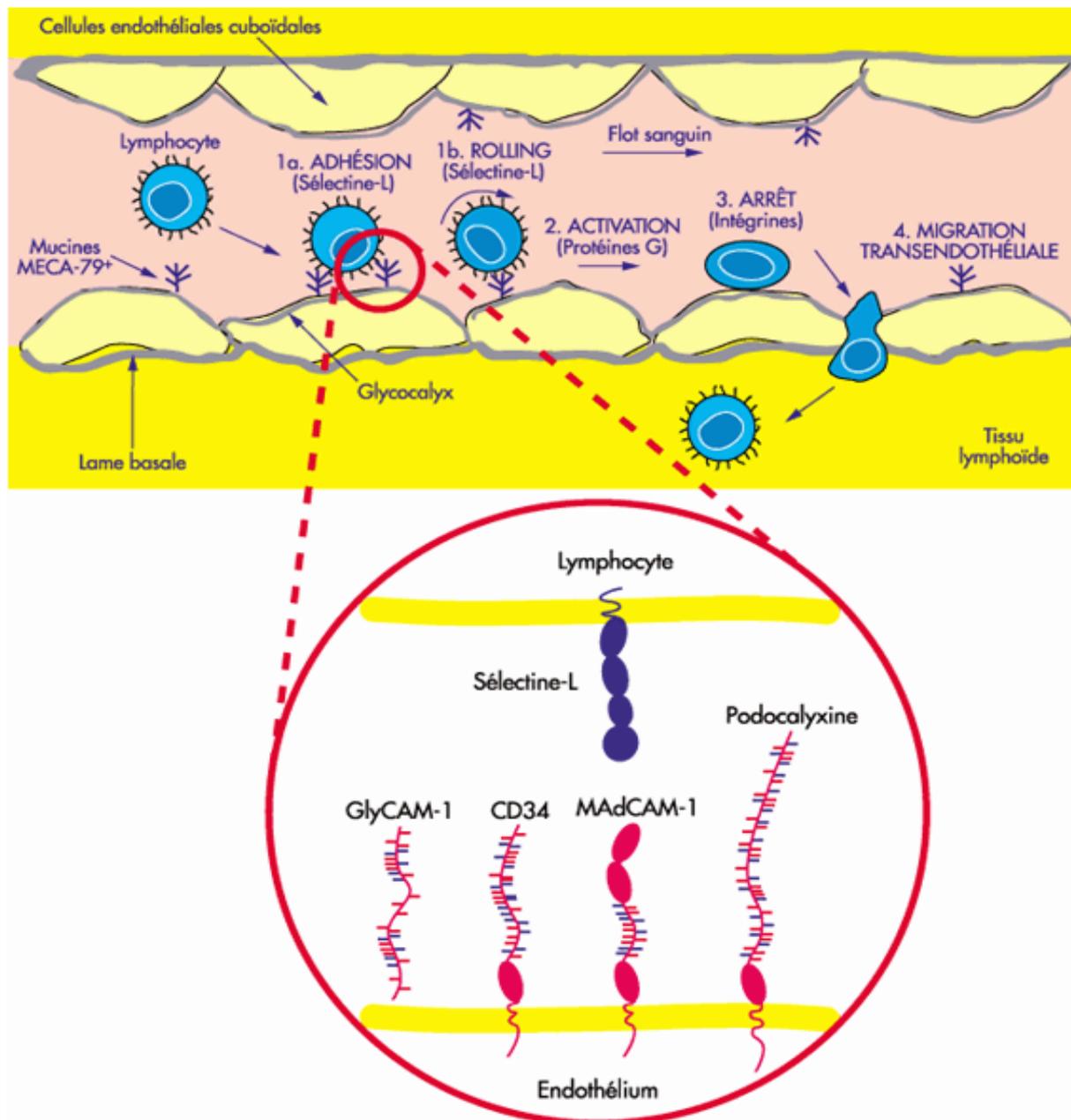


Figure 1. Schématisation du processus de recrutement lymphocytaire par les HEVECs (également appelées cellules endothéliales cuboidales). Le schéma original est issu de ².

imposent aux HEVECs une incorporation de sulfate parmi les plus élevées de tous les types cellulaires chez le rat ³.

Lors de mon arrivée à l'IPBS, le groupe de Jean-Philippe GIRARD s'attachait à mieux caractériser le phénotype des HEVECs et notamment à déterminer quels acteurs moléculaires leur conféraient un métabolisme général du sulfate aussi élevé. Une synthèse des connaissances sur le sujet à cette époque est résumée en figure 2.

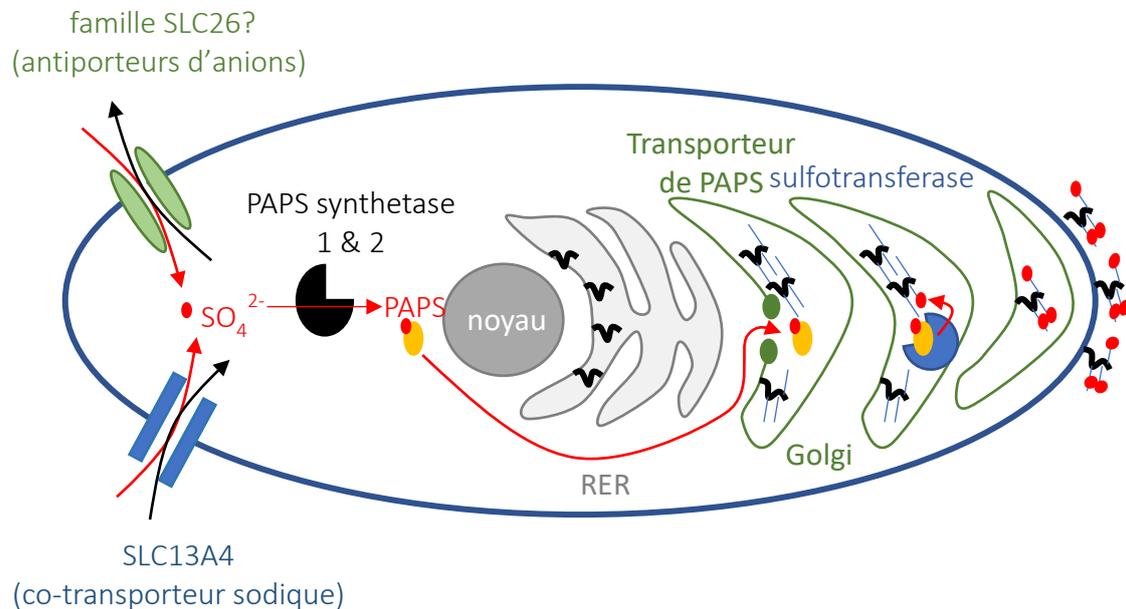


Figure 2. Synthèse des connaissances des mécanismes cellulaires du métabolisme du sulfate dans les HEVECs en 1999. Selon le modèle consensuel de l'époque, l'import de sulfate par les HEVECs dépendait de 2 classes fonctionnelles de transporteurs d'ions; le co-transporteur sodique était connu, mais le/les antiporteurs restaient à caractériser. La synthèse du PAPS, un nucléotide donneur de sulfate universel dans le monde vivant, était catalysée par les PAPS synthétase, qu'on supposait de localisation sub-cellulaire cytoplasmique; le PAPS était transloqué vers l'appareil de Golgi où il alimentait les réactions de sulfatation des ligands de sélectine-L pour présentation fonctionnelle à la surface des HEVECs.

1.1.1 recherche de nouveaux membres de la famille génique SLC26 exprimés dans les HEVECs

L'importation cellulaire de sulfate est réalisée chez tous les organismes par 2 familles fonctionnelles de transporteurs membranaires. D'une part la famille SLC26 d'échangeurs d'anions, d'autre part la famille SLC13 de co-transporteur anion/cation. Il faut noter qu'aucune de ces familles, dans leur globalité, n'a de spécificité pour le sulfate et que seuls certains de leurs membres le prennent en charge. De plus, il est difficile de prévoir leurs spécificités de substrat sur la base de leur séquence peptidique. Jean-Phillipe GIRARD avait démontré auparavant que ces 2 familles y contribuaient sensiblement à parts 2:1 au transport du sulfate dans les HEVECs et que la famille SLC13 y était représenté par SUT1/SLC13A4⁴. S'agissant de la famille SLC26, qui est beaucoup plus large, les membres impliqués restaient à identifier. Il faut concevoir qu'à l'époque, le séquençage des génomes était en cours et l'assemblage du génome humain balbutiait. Les données génomiques ne permettaient pas de rechercher l'ensemble des membres de la famille. J'ai donc travaillé principalement sur les

bases de données d'Expressed Sequence Tags (ESTs), à la recherche de tous les membres de la famille. J'ai ensuite cloné les ADNc correspondants à partir d'une banque d'ADNc d'HEVECs par des méthodes de biologie moléculaire aujourd'hui désuètes lorsqu'on travaille sur des organismes séquencés. J'ai ainsi mis en évidence 2 nouveaux membres de la famille SLC26, SLC26A7⁵ et SLC26A11⁶, exprimés dans les HEVECs.

1.1.2 Caractérisation du transport de sulfate par SLC26A7 et SLC26A11

Il s'agissait alors d'étudier leur activité de transport du sulfate radiomarqué, ce que j'ai fait en les exprimant dans des ovocytes de xénope. Il s'est avéré que SLC26A11⁶, mais pas SLC26A7⁵, transportait le sulfate. J'ai également pu montrer que parmi les autres transporteurs de sulfate de cette famille, seul SLC26A2, qui est quasi-ubiquitaire et avait été caractérisé auparavant en raison de son implication dans des pathologies de croissance, était exprimé dans les HEVECs, définissant ainsi l'ensemble des acteurs moléculaires du transport de sulfate dans ces cellules.

1.1.3 Caractérisation des localisations sub-cellulaires des PAPS synthétases humaines

Je dois souligner que ces travaux avaient été initiés par Steve Besset, mon prédécesseur en thèse sur ce sujet. Le sulfate est utilisé dans tout le monde vivant sous forme d'un nucléotide dont la synthèse coûte 2 ATP et nécessite deux activités enzymatiques : le 3' phospho- adénosine-5' phosphosulfate (PAPS). Cependant, chez les animaux, les deux activités sont portées par un même polypeptide nommé PAPS synthétase ; chez les mammifères, il existe 2 PAPS synthétases (PAPSS). La PAPSS1 avait été identifiée par JP GIRARD dans les HEVECs⁷. La PAPSS2 a été mise en évidence en raison de son rôle dans des maladies développementales. Les 2 enzymes sont exprimées dans les HEVECs. Il n'avait jamais été envisagé que ces enzymes puissent avoir une localisation subcellulaire autre que cytoplasmique.

Nous avons démontré que la PAPSS2 était bien localisée dans le cytoplasme, mais que la PAPSS1 était nucléaire⁸. Elle possède un signal de localisation nucléaire (NLS) relativement consensuel, dont certains résidus clés sont également impliqués dans le mécanisme enzymatique d'une de ses activités. De plus, lorsque les 2 enzymes sont coexprimées, les 2 adoptent une localisation nucléaire. Cette découverte a soulevé plus de questions qu'elle n'a apporté de réponses et les raisons fonctionnelles de ces propriétés restent une énigme. Une hypothèse est que la localisation de synthèse du PAPS influence sa biodisponibilité différenciellement pour ses diverses voies d'utilisation ; effectivement, les sulfotransférases opérant sur les protéoglycanes membranaires et sécrétés sont de localisation Golgienne mais celles opérant dans le métabolisme des xénobiotiques sont cytoplasmiques. C'est une hypothèse que j'aurais souhaité poursuivre dans le cadre d'un projet collaboratif avec Mickael SMIETANA, que j'ai soumis à l'ANR en 2013 et qui visait à définir le sulfoprotéome et ses régulations.

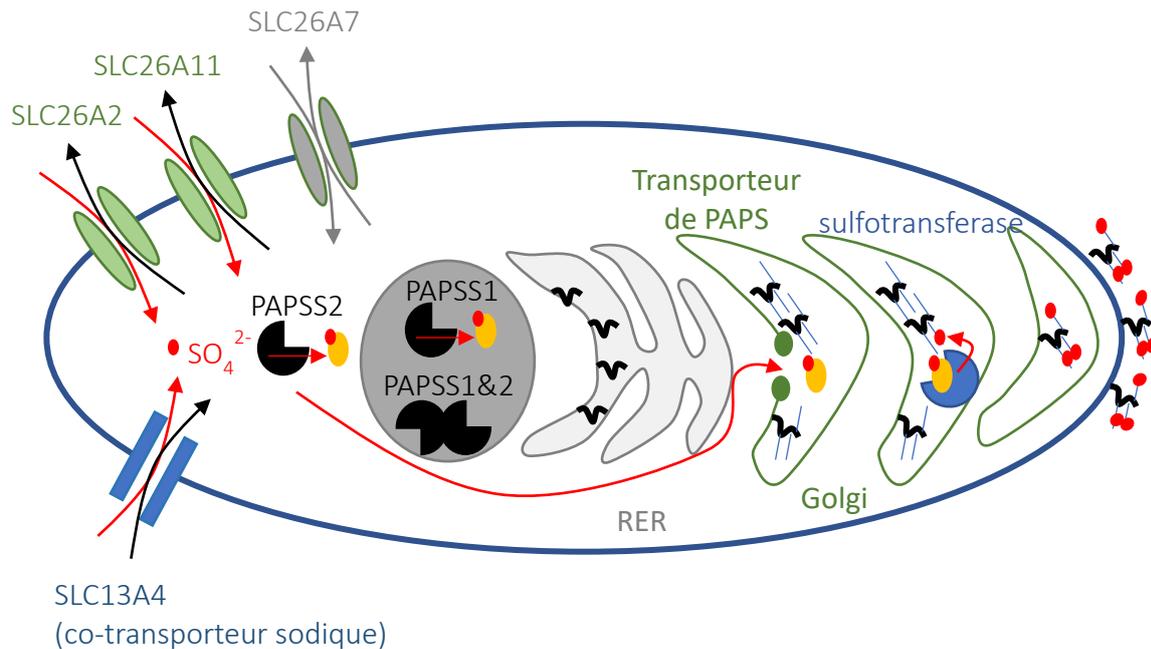


Figure 3. Contribution de mes travaux de thèse à la compréhension des mécanismes cellulaires du métabolisme du sulfate dans les HEVECs. L'identification et la caractérisation fonctionnelle des antiporteurs d'anions a permis d'établir que SLC26A2 et SLC26A11 étaient les seuls antiporteurs de sulfate exprimés dans les HEVECs, SLC26A7 ne prenant pas le sulfate en charge. La découverte de la localisation nucléaire de la PAPS Synthétase 1, ainsi que de sa capacité en entrainant, par interaction physique, la PAPS Synthétase 2 dans le noyau, ont amené à considérer de nouveaux mécanismes régulant la biodisponibilité du PAPS vis-à-vis des différentes réactions de sulfatation.

1.2 Fonctions moléculaires de Moesin

Post-doc NIH, Bethesda MD (Mar 2003-Aou 2004), post-doc EMBL, Heidelberg, Allemagne (Oct 2004-Fev 2005).

Sujet : Mécanismes de régulation des interactions fonctionnelles entre cytosquelette et membrane plasmique : rôle de Moesin.

Résultats : Identification d'interactions physiques de Moesin avec la tubuline-β1 et Y14.

Domaines de compétence : criblage double-hybride ; interactions *in vitro* ; ingénierie génétique chez la drosophile ; microscopie de fluorescence.

A l'issue de ma thèse, je souhaitais aborder les mécanismes lymphocytaires de leur recrutement par les HEVECs. Après un court passage dans une start-up de biotechnologies, j'ai eu la chance d'être recruté au NIH chez Steve SHAW, qui avait largement participé à l'établissement de la nomenclature des clusters de différenciation (classification CD) et travaillait alors sur l'adaptation de la biologie des lymphocytes à la migration trans-endothéliale. Il avait mis en évidence le rôle central de la protéine Moesin, sous l'influence du gradient cytokinique, dans la polarisation, la migration et la rigidification du cytosquelette

lymphocytaire^{9,10}, nécessaire à leur résistance aux forces de compression, qu'ils subissent en franchissant la paroi endothéliale. Moesin est une protéine dont on savait alors que, sous sa forme phosphorylée, elle interagissait d'une part avec le réseau d'actine et d'autre part avec certaines protéines membranaires possédant un domaine de type PDZ (¹¹, pour revue). Nous avons cherché ensemble quelles protéines lymphocytaires pouvaient constituer les partenaires de Moesin impliqués dans les remaniements induits par les cytokines.

Nous avons opté pour une approche de criblage double-hybride chez la levure, en utilisant comme appât une forme modifiée de Moesin portant 4 substitutions d'acides aminés lui conférant une activité constitutive. Le double-hybride est une approche qui a perdu de son attrait sensiblement à cette époque, en raison de ces nombreuses faiblesses selon les cas de figure. Une des faiblesses est son inefficacité à mettre en évidence des interactions impliquant des protéines membranaires ; dans notre cas, les domaines PDZ se situant en C-terminal des séquences peptidiques, nous avons pu montrer que le principe de double hybride fonctionnait pour ces interactions, en validant des interactions déjà connues. Le criblage pouvait fonctionner à conditions de travailler avec une banque d'ADNc relativement courts, n'incluant pas les parties codant les domaines transmembranaires. Cependant, une autre faiblesse du double-hybride est que les protéines dont les messagers sont sur-représentés au sein de la population sont également sur-représentées parmi les clones positifs. Moesin étant impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires, certains de ses partenaires sont très fortement exprimés et les nouvelles interactions que nous avons pu suggérer relevaient certainement de fonctions beaucoup plus générales que le recrutement lymphocytaire. Néanmoins, dans ce cadre plus général, elles permettaient de proposer de nouvelles fonctions de Moesin.

1.2.1 Interaction Moesin/tubuline β 1

On savait que Moesin participait à figer le réseau d'actine. Mais aucune fonction vis-à-vis du réseau de tubuline n'était connu. Notre criblage suggérait une interaction avec la tubuline β 1. Plus spécifiquement, en réalisant des troncations des clones originaux, nous avons abouti à l'idée que Moesin interagissait avec un domaine dont la perte de liberté de mouvement stabilise les microtubules. Nous avons donc supposé que Moesin était capable de stabiliser les microtubules, comme le réseau d'actine. Nous avons vérifié cette hypothèse dans des expériences de microtubulogénèse *in vitro*. Nous avons eu les plus grandes peines à faire accepter cette idée à la communauté sur des bases manquant de contexte biologique et cellulaire. Cependant, quelques années après, d'autres ont publié des travaux tout-à-fait concordants¹².

1.2.2 Interaction Moesin/Y14

Un autre candidat à l'interaction avec Moesin révélé par notre crible était Y14, une protéine identifiée par Anne Ephrussi à l'EMBL d'Heidelberg comme site d'ancrage de l'ARNm *oskar* pour induire sa localisation postérieure, nécessaire à l'oogenèse chez la drosophile¹³. Par

ailleurs, d'autres avaient montré que Moesin jouait également un rôle dans ce processus en adoptant une localisation postérieure^{13,14}. Nous avons donc supposé que Moesin pouvait être le déterminant de la localisation postérieure de Y14, permettant ainsi la polarisation. La formulation de cette hypothèse coïncidait dans le temps avec ma décision de quitter les Etats Unis afin de regroupement familial et c'est ainsi que nous avons mis en place une collaboration avec Anne Ephrussi qui m'a accueilli pendant 5 mois dans le cadre d'un contrat court Human Frontier Science Program pour poursuivre cette hypothèse. Notre stratégie a consisté à générer une lignée de drosophile surexprimant le seul domaine d'Y14 putativement impliqué dans l'interaction avec Moesin, afin qu'il entre en compétition avec Y14 endogène pour l'interaction avec Moesin. Nous avons ensuite analysé l'influence de cette manipulation génétique sur la fécondité de cette lignée de drosophiles et la localisation subcellulaire de Y14 et *oskar* par microscopie confocale de fluorescence. Cette approche n'était pas extrêmement robuste. Notamment, on pouvait craindre que la concentration locale de notre compétiteur, ne disposant pas de suffisamment de déterminants de localisation subcellulaire, soit insuffisante pour agir efficacement. Nos résultats n'ont pas été très concluants et à ma connaissance cette piste n'a pas été poursuivie. Le mécanisme de localisation d'Y14 reste inconnu.

2 Activités de recherche de 2005 à 2010

Lors de mon arrivée à Nancy, je me suis rapidement orienté vers le laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, alors dirigé par Patrick Netter, notamment considérant que mon expérience sur le métabolisme du sulfate pouvait être judicieuse dans les travaux sur le cartilage, dans lequel la sulfatation joue également un rôle clé.

A cette époque, le laboratoire se lançait dans un projet ambitieux de meilleure caractérisation des tumeurs cartilagineuses, afin de mieux diagnostiquer différemment les versions malignes, ou chondrosarcomes, particulièrement agressives et nécessitant intervention chirurgicale, des chondromes bénins. La démarche reposait en particulier sur l'analyse protéomique, pour laquelle des équipements avaient été acquis récemment dans cet objectif. C'est sur la base des découvertes faites dans ce contexte que s'est échauffée ma spécialisation en analyse protéomique orientée vers l'étude de la matrice extracellulaire (ECM) et plus spécifiquement des collagènes. L'ECM est souvent mal considérée par les biologistes qui lui attribuent une constitution simple, des fonctions principalement de comblement et qui négligent le coût métabolique de son homéostasie. La spectrométrie de masse révèle sa très grande hétérogénéité moléculaire. L'étude fonctionnelle de ses constituants et même de ses sous-produits met à jour ses fonctions architecturales et de signalisation complexes et intriquées dans les mécanismes les plus fins de différenciation et de métabolisme cellulaire.

2.1 Marqueurs de la différenciation chondrocytaire

Post-doc ARC (Mai 2005-Avr 2008).

Sujet : Recherche de marqueurs permettant le diagnostic différentiel des chondromes et chondrosarcomes chez l'homme.

Résultats : Mise en évidence Matrilin-3 et des propeptides Carboxyterminaux des procollagènes de type I et II comme indicateurs du phénotype tumoral.

Domaines de compétence : analyse protéomique de tissus complexes et matriciels ; immunohistochimie ; biologie du cartilage.

Bien que relativement rares, les tumeurs cartilagineuses sont parmi les plus fréquentes à affecter directement les os. Elles sont le plus souvent bénignes (chondromes), adoptant un programme de différenciation proche de celui observé dans le cartilage de croissance et ne nécessitent pas d'intervention curative ¹⁵. Cependant, elles peuvent également être, ou devenir, cancéreuses ¹⁶ et dans ce cas elles sont à la fois agressives localement, métastatiques et résistantes aux traitements chimiothérapeutiques, imposant une intervention chirurgicale souvent invasive et donc handicapante ¹⁷. Il est donc critique d'établir un diagnostic

différentiel qui puisse orienter de manière adaptée la prise en charge de cette pathologie. Cependant, ce diagnostic différentiel est considéré par les anatomopathologistes comme un des plus difficiles en l'absence de marqueurs spécifiques¹⁵. Nous ambitionnions de mettre à jour de tels marqueurs en comparant les protéomes de pièces opératoires sélectionnées plusieurs années après l'exérèse, afin de classer les tumeurs selon le devenir du patient. Parallèlement à cette ambition diagnostique, on pouvait considérer les tumeurs cartilagineuses comme des modèles *in vivo*, indépendants les uns des autres, de dégénérescence du cartilage, qui pourraient informer sur les mécanismes généraux régissant ce tissu. Ce projet était mené en collaboration avec les services d'Anatomie Pathologique, de Chirurgie Orthopédique et de Chirurgie de l'Appareil Locomoteur du CHU de Nancy. Les tumeurs congelées devaient être analysées selon les méthodes dont nous disposions alors, qui sont aujourd'hui totalement désuètes. Je dois remercier Frédéric LIONNETON et Gueorgui KRATASSIOUK, mes collègues de cette époque, qui m'ont soutenu scientifiquement et moralement dans le développement méthodologique, à la recherche d'un compromis acceptable pour analyser des tissus aussi complexes, car hétérogènes et riches à la fois en protéines sanguines et en matrice extracellulaire, 3 critères problématiques dans l'analyse protéomique. Il faut considérer qu'aucune méthode adaptée aux tissus cartilagineux n'avait été proposée jusque-là et notre premier succès aura été la présentation du développement méthodologique auquel nous avons abouti¹⁸.

2.1.1 MATN3 comme marqueur de la dégénérescence du phénotype chondrocytaire

Nos premières analyses ont révélé que Matrilin-3 (MATN3) est surexprimée dans la plupart des tumeurs par rapport au cartilage articulaire¹⁹. MATN3 est une protéine oligomérique considérée comme spécifique de la matrice extracellulaire du cartilage²⁰, pouvant former des fibrilles²¹ interconnectant les fibres de collagènes II et XI²², et s'accumulant en situation arthrosique chez l'homme²³. Dans l'ensemble, ces constats suggéraient que MATN3 pouvait être un marqueur assez général de la désorganisation des tissus cartilagineux. C'est ce qui nous a poussés à développer une méthode de dosage de MATN3 dans les fluides circulants et à l'envisager comme marqueur de la mise en place d'arthrose, sans résultats concluants²⁴.

2.1.2 CPI et CPII, marqueurs différentiels des chondromes et chondrosarcomes

S'agissant du diagnostic différentiel chondrome/chondrosarcome, nos analyses ont révélé que le propeptide carboxy-terminal du procollagène de type I (CPI) était préférentiellement accumulé dans les chondrosarcomes alors celui du procollagène de type II (CPII) l'était dans les chondromes^{25,26}. En soi, l'idée que les gènes correspondants suivent cette logique était en accord avec la notion de dédifférenciation liée à la cancérisation de ce groupe de tumeurs¹⁵. En revanche, la découverte de la possibilité pour ces polypeptides, issus des précurseurs des collagènes correspondant et considérés dans la communauté comme des déchets métaboliques (figure 4), de s'accumuler, parfois de manière agrégative²⁵, soulevait

l'hypothèse qu'ils pouvaient avoir des fonctions propres, y compris structurales au sein des tissus. Cette hypothèse était de plus cohérente avec des observations vieilles de plusieurs

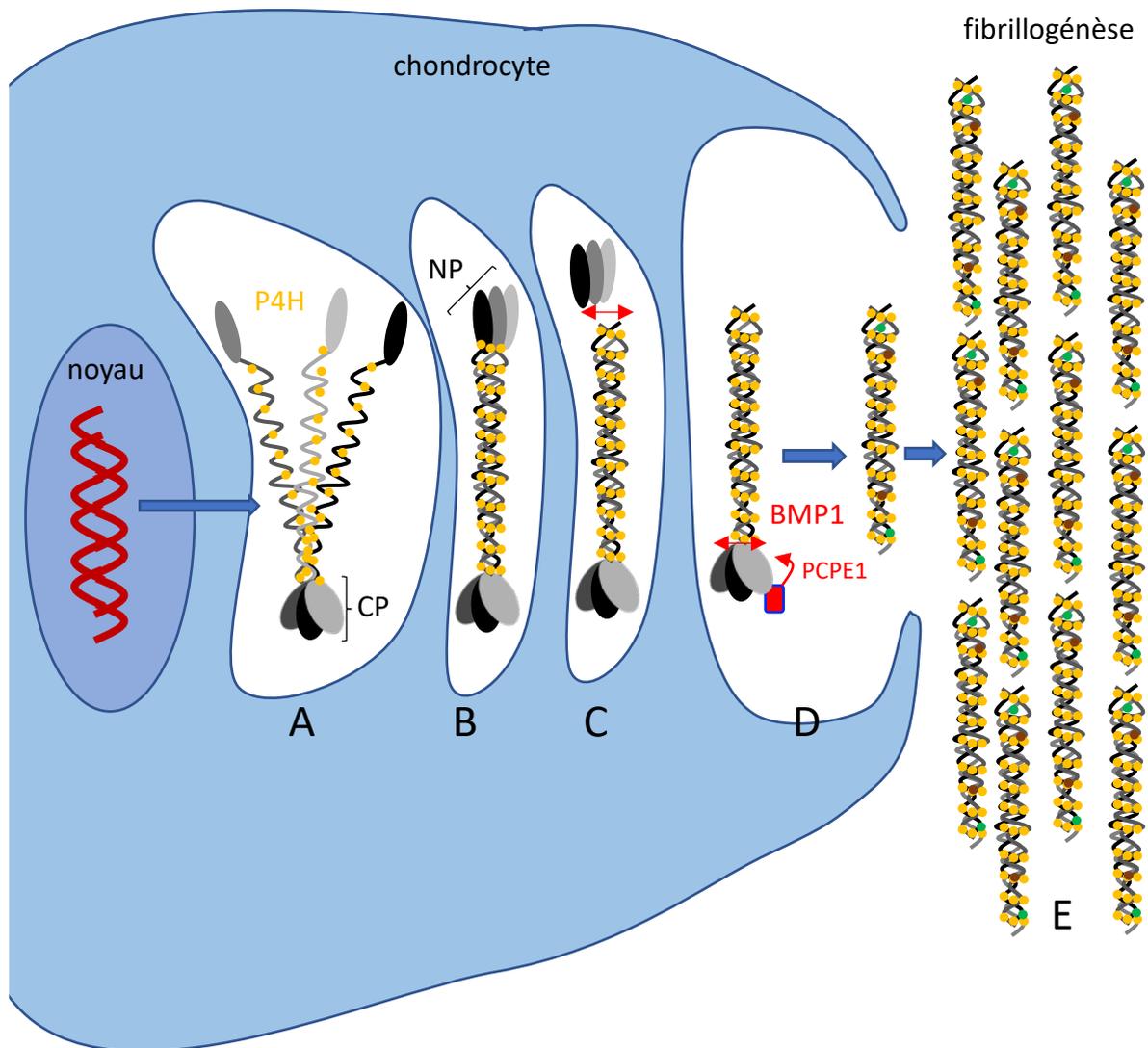


Figure 4. Modifications post-traductionnelles des procollagènes de type I et II et rôle de leurs propeptides carboxyterminaux (CPs). (A) l'expression des gènes correspondants conduit à la synthèse des procollagènes dans la lumière du réticulum endoplasmique. Les CP de 3 chaînes polypeptidiques α sont assemblés en trimères stabilisés par des ponts disulfure et les résidus Proline subissent d'abondantes hydroxylations principalement sous l'influence de la Prolyl-4-hydroxylase (P4H). L'assemblage est homotrimérique pour le type II, hétérotrimérique pour le type I (2 chaînes α_1 + 1 chaîne α_2 , produits de 2 gènes distincts). Les CP assurent non seulement la trimérisation mais aussi la sélectivité d'assemblage. (B) l'assemblage se propage du CP vers le N-propeptide (NP), en triple hélice stabilisée par les hydroxylations des prolines, puis le NP est clivé (C). (D) Tardivement dans le processus de sécrétion, la Bone Morphogenetic Protein 1 (BMP-1) clive le CP, sous l'influence de la Procollagen C-proteinase enhancer 1 (PCPE1) qui est lui-même recruté par interaction physique avec le CP. D'autres modifications chimiques, notamment de résidus lysines, ont lieu tardivement et de manière très régulée et sont en particulier à l'origine des crosslinks covalents s'établissant entre les triples hélices au sein de l'assemblage fibrillaire. Le CP est relargué dans l'espace extracellulaire. La libération du CP provoque l'assemblage fibrillaire spontané des triples hélices *in vitro* (E). Notons qu'en contexte cellulaire on pense la fibrillogénèse orchestrée par des machineries complexes, encore mal caractérisées, appelées fibripositeurs²⁸, impliquant notamment les intégrines, mais cet aspect du processus ne sera pas abordé ici.

décennies²⁷. Nous avons donc entrepris la caractérisation fonctionnelle de ces molécules.

2.2 Régulation du phénotype cellulaire par Matrilin-3, CPI et CPII. (Encadrement post-doctoral C. Bantsimba-Malanda ; subvention FRM 2010)

Post-doc CNRS (Mai 2008-Avr 2009) et **CDD IR CNRS** en analyse protéomique (Mai 2009-Nov 2010).

Sujet : Caractérisation fonctionnelle des marqueurs extracellulaires de la différenciation des tumeurs cartilagineuses.

Résultats : Mise en évidence des fonctions ambivalentes de MATN3 ; caractérisation des fonctions différentielles de CPI et CPII vis-à-vis de la viabilité et de la migration cellulaire.

Domaines de compétence : production et purification de protéines matricielles recombinantes ; survie, migration et différenciation chondrocytaires.

2.2.1 Régulation différentielle du phénotype cellulaire par CPI et CPII

Nous avons exploré les conséquences fonctionnelles de l'accumulation de CPI et CPII dans l'environnement chondrocytaire, en apport exogène sous forme recombinante ²⁵. Les 2 protéines induisent l'adhésion cellulaire et des remaniements cytoskelettiques via une intégrine comprenant la sous-unité $\beta 1$ mais nous n'avons pas pu identifier la sous-unité α . Cependant les conséquences cellulaires de leur interaction cellulaire sont très différentes : CPII induit la mort cellulaire programmée des chondrocytes et des cellules endothéliales, alors que CPI promeut la migration endothéliale. Les 2 protéines induisent l'expression de VEGF mais seul CPII induit celle de MMP-13, par les chondrocytes. Ces données suggéraient une fonction complexe de CPII, induisant globalement le catabolisme de l'ECM et une fonction plus franchement propice au développement cancéreux, de manière assez cohérente avec leurs accumulation différentielle dans les chondromes et chondrosarcomes. Nous nous sommes alors concentrés sur les fonctions de CPII dans le cartilage (sur explants de cartilage humains), vérifiant son rôle pro-catabolique et avons montré qu'au-delà d'interagir avec les cellules, il était internalisé par les chondrocytes, cette fois indépendamment de l'intégrine $\beta 1$. Nous avons identifié le domaine peptidique de CPII qui détermine cette propriété ²⁹.

Dans l'ensemble, ces données ont profondément remis en question l'idée que les CPs ne servaient que d'adaptateurs moléculaires dans la maturation des procollagènes et montrent la dualité des fonctions de signalisation (figure 5), dépendant de l'association à l'ECM, de ce qu'il faut désormais considérer comme des protéines à part entière.

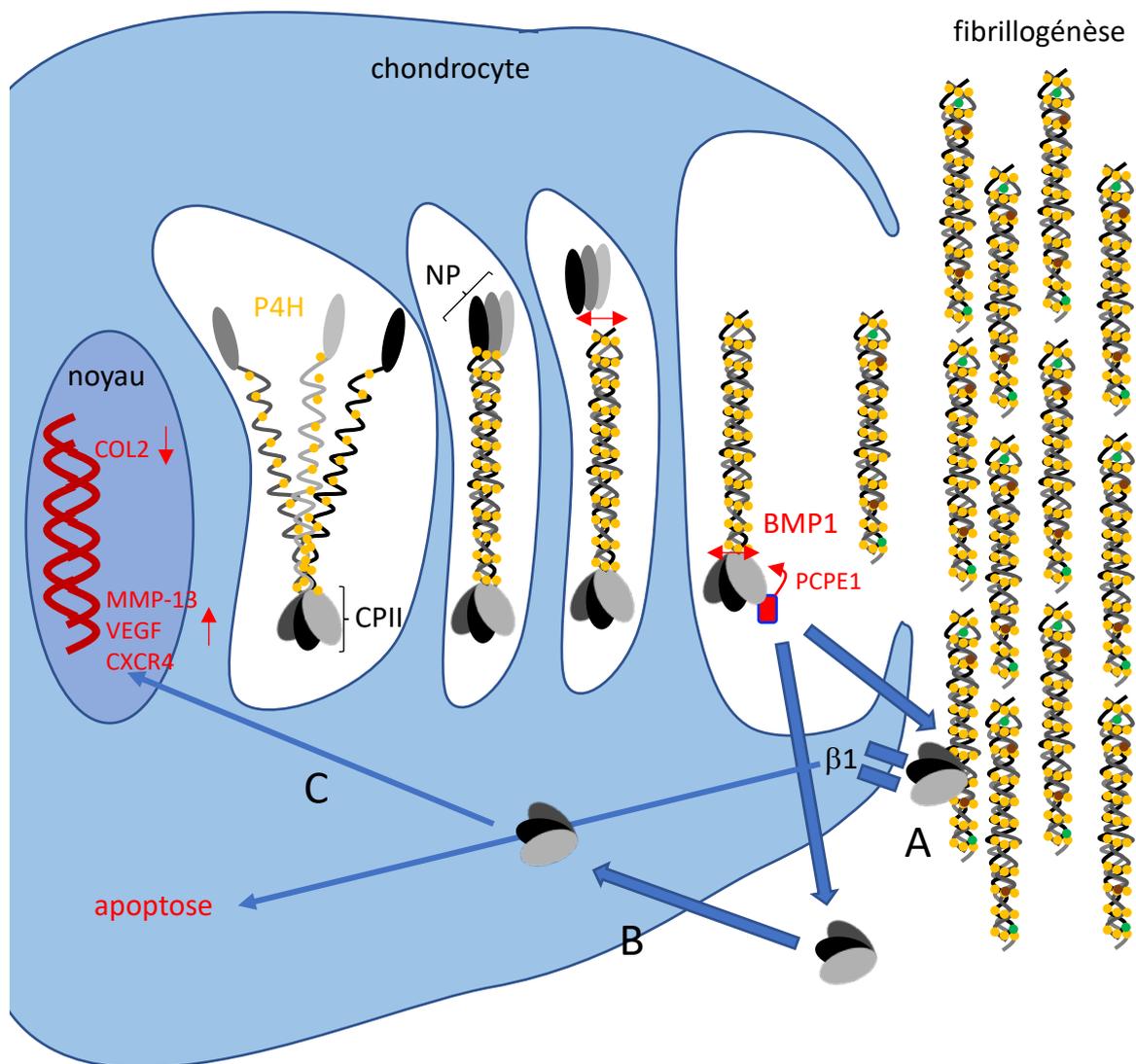


Figure 5. Révision du devenir de CII et de ses fonctions hors maturation du procollagène de type II. (A) CII est capable de s'accumuler dans l'ECM et signale via l'intégrine $\beta 1$ pour promouvoir l'apoptose chondrocytaire. Notons que CPI, dans le même contexte, promeut la migration de cellules endothéliales. (B) CII soluble est internalisé par les chondrocytes et y régule l'expression génique. Notons que d'après d'autres travaux, CPI et CII pourraient interagir avec un facteur transcriptionnel capable de les entrainer dans le noyau³⁰.

2.2.2 Notion de fonction intégrée des constituants de l'ECM : MATN3 est néfaste pour le phénotype chondrocytaire sous forme soluble mais le favorise si elle est ancrée à l'ECM.

Dans nos premières caractérisations fonctionnelles de MATN3, nous induisons l'expression des protéines par ingénierie génétique et bloquons sa biodisponibilité à l'aide d'anticorps. MATN3 exerçait clairement une fonction s'opposant au phénotype chondrocytaire¹⁹; accessoirement nous avons identifié un des déterminants structuraux de cette fonction (son domaine EGF-like I). Cette fonction s'opposant au phénotype chondrocytaire semblait contre-intuitive, car une protéine exprimée dans un tissu donné en situation physiologique est supposée y jouer un rôle favorable. Au fur et à mesure du développement de mon expertise en biologie du chondrocyte primaire, les méthodes de culture ont été optimisées pour

favoriser la synthèse d'ECM. Dans ces systèmes, nous avons montré que MATN3 exogène (recombinante) induisait l'adhésion cellulaire, incluant des remaniements cytosquelettiques, via leur récepteur intégrine $\alpha 5\beta 1$, que cette adhésion favorisait la survie des chondrocytes et leur production d'ECM. A l'inverse, l'exposition des chondrocytes à MATN3 sous forme soluble réduisait drastiquement l'expression d'ECM et induisait le catabolisme matriciel. Enfin, nous avons montré que s'ils étaient stimulés au TGF β 1, les chondrocytes intégraient MATN3 exogène dans leur ECM, permettant l'exercice de ses fonctions pro-anaboliques ³¹. Avec beaucoup de retenue, nous interprétons ces données comme traduisant la complexité des fonctions physiologiques et pathologiques des constituants de l'ECM : Dans un système global opérant, chaque constituant trouve sa place pour participer à l'homéostasie du tissu. Cependant, si, y compris pour des raisons indépendantes de la fonction d'un constituant donné, le réseau d'ECM est altéré, la mauvaise intégration dudit constituant peut modifier sa fonction y compris avec une résultante aggravante. On peut supposer, si ces mécanismes se vérifient, que lorsqu'ils sont modérés, ils servent de signaux régulant le système pour le restaurer, mais que leur exagération participe aux processus dégénératifs. D'autres mécanismes biologiques, comme les signaux apoptotiques et le stress du réticulum endoplasmique (qui par ailleurs sont liés entre eux et aux fonctions de nos sujets d'étude), sont conçus comme tels (^{32,33}, pour revue).

Nos données reposent sur des expériences s'éloignant trop de l'organisme intégré pour affirmer leur pertinence biologique. Ceci dit, des années après leur réalisation, leur exploration *in vivo* paraît toujours extrêmement complexe à mettre en œuvre, car les outils permettant d'y manipuler spécifiquement leur intégration matricielle manquent.

3 Activités de recherche depuis 2010

IR CDI CNRS en analyse protéomique (Déc. 2010 à aujourd'hui).

Sujet : L'analyse quantitative relative des protéines et de leurs modifications chimiques au service de l'étude de l'ECM.

Résultats : Développement de l'analyse quantitative relative des protéines en mélanges complexes par LC-MALDI. Caractérisation d'un modèle cellulaire de chondrogénèse. Mise en évidence du rôle du métabolisme énergétique dans la maturation des collagènes.

Domaines de compétence : spectrométrie de masse MALDI; analyse quantitative sur la base du signal LC-MS ; chondrogénèse ; maturation des collagènes ; anticorps thérapeutiques.

Après des années d'incertitude, mon recrutement au CNRS a été une libération dont je mesure encore chaque jour les bienfaits personnels et professionnels. La responsabilité de plateforme, me permettant de maintenir ma culture scientifique en me confrontant aux problématiques biologiques les plus diverses, a également permis de trouver des synergies entre développement méthodologique originalement destiné à servir la communauté et progression de mes propres sujet de recherche. Mon recrutement a coïncidé peu ou prou dans le temps avec l'installation de notre laboratoire au Biopôle du Campus Santé et l'acquisition de nouveaux équipements offrant la perspective d'analyses globales en protéomique faisant jusqu'alors défaut pour accéder à une meilleure compréhension des processus que nous étudions.

3.1 Nouveaux aspects des fonctions des CP dans la régulation des PTMs des procollagènes (subvention Ligue Régionale contre le Cancer 2015)

La poursuite de nos travaux montrant la complexité des fonctions de CPI et CPII semblait irréalisable : nos approches ne faisaient qu'effleurer les activités biologiques concernées et posaient des problèmes budgétaires, s'agissant en particulier des productions de protéines recombinantes en cellules de mammifères et je manquais d'interlocuteurs avisés dans ce domaine. Les interactions scientifiques avec David Hulmes, de l'IBCP à Lyon, expert mondial au long court de la géométrie du collagène et plus récemment, des mécanismes moléculaires impliquant les CP dans le clivage protéolytique du procollagène par BMP-1, m'ont cependant décidé à persévérer. J'interagis épisodiquement avec son groupe de recherche, maintenant dirigé par Catherine MOALI. Nous avons présenté plusieurs projets à l'ANR à l'interface de nos travaux, à la recherche de synergies. C'est dans ce cadre que nous avons accumulé des

évidences de nouvelles fonctions et de divergences de fonctions des CP des principaux collagènes fibrillaires, encore insoupçonnées.

3.1.1 Interaction physique entre CPII et la Lysyl Oxydase

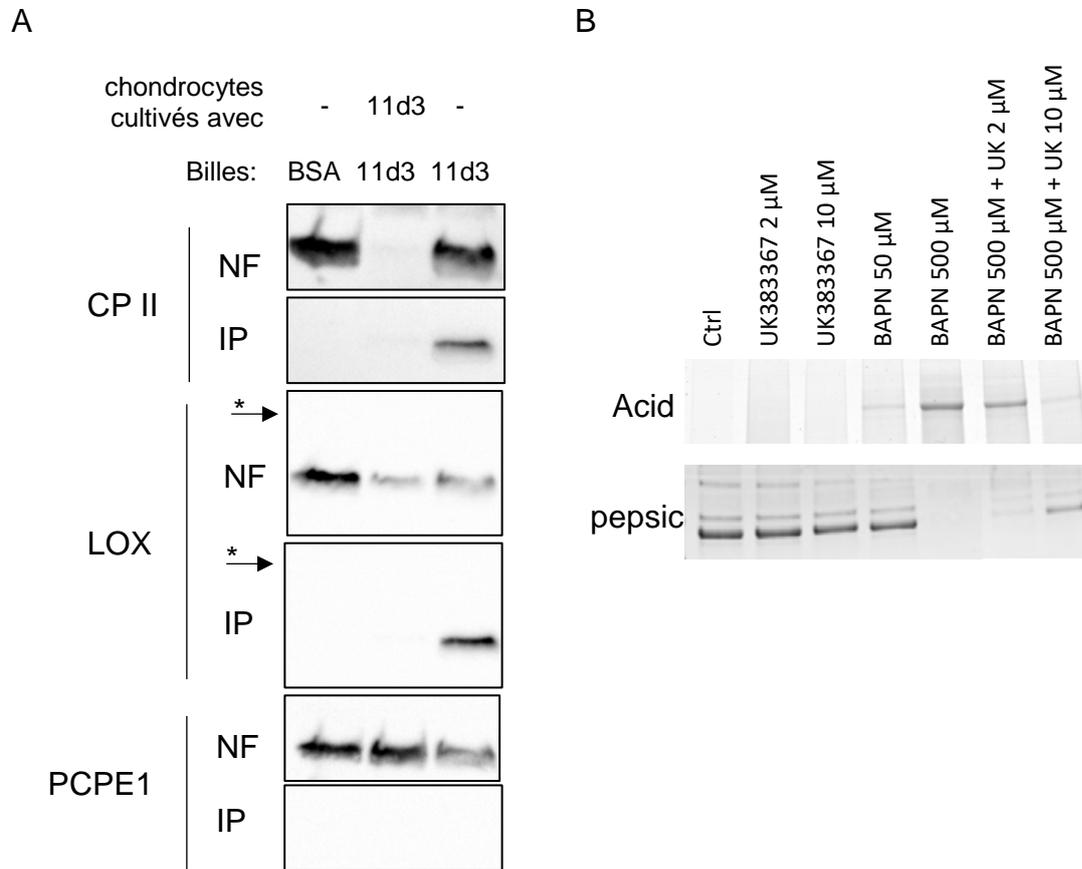


Figure 6. Interaction fonctionnelle entre clivage protéolytique de CPII et crosslinking du collagène. (A) A l'issue de la primoculture de chondrocytes humains, des billes d'agarose couplées à un anticorps dirigé contre CPII ou à de l'albumine servant de contrôle sont incubées avec le milieu de culture clarifié, lavées et l'immunoprécipitat est révélé par western blotting. NF: non fixé; IP: immunoprécipitat; * Indique le poids moléculaire attendu pour la LOX immature. (B) Des chondrocytes primaires humains sont cultivés jusqu'à confluence en présence des concentrations indiquées d'inhibiteurs pharmacologiques; à l'issue de la culture, un fractionnement des collagènes est réalisé et analysé par SDS-PAGE révélé au Bleu de Coomassie. Acid: extrait à l'acide acétique, révélant le collagène non crosslinké; pepsic: extrait à la pepsine, révélant le collagène crosslinké. BAPN: inhibiteur de l'activité LOX; UK383367: inhibiteur de BMP-1.

Des expériences de co-immunoprécipitation sur surnageants de cultures primaires de chondrocytes, datant de 2013, indiquent de manière assez robuste une interaction physique entre CPII et la lysyl oxydase (LOX), qui est l'enzyme dont l'exercice d'activité sur les collagènes ou procollagènes est à l'origine des crosslinks covalents. Dans les expériences préliminaires, c'est par spectrométrie de masse que la LOX a été identifiée comme partenaire, mais nous avons ensuite poursuivi par western blotting (figure 6. A).

Ces données non publiées suggèrent une nouvelle fonction de CII : il recruterait la LOX pour réguler la formation des crosslinks. Poursuivant cette hypothèse, durant le stage de M2 de Dafné Wilhelm réalisé en 2015, nous avons étudié la relation fonctionnelle entre clivage protéolytique de CII et formation de crosslinks (figure 6. B). Notre interprétation de ces données est la suivante : CII interagit avec la LOX et ainsi, son clivage protéolytique régule la proximité entre LOX et lysine du C-telopeptide et ainsi, régule l'exercice de l'activité LOX sur le procollagène. C'est à la recherche des fonctions biologiques (et notamment pathologiques) de cette interaction que j'ai obtenu une subvention de la Ligue Régionale contre le Cancer en 2015. A ce jour, ces travaux sont en suspens mais l'hypothèse reste très présente y compris dans mes autres travaux et par ailleurs elle a été plus ou moins soulevée dans la littérature ³⁴.

3.1.2 CII ne recrute pas PCPE1

L'idée d'une interaction de tous les CPs des procollagènes fibrillaires avec PCPE1, régulant le clivage protéolytique du procollagène est raisonnable considérant d'une part sa démonstration récurrente *in vitro* et sa caractérisation structurale s'agissant de CPI et CIII (le CP du procollagène de type III) et d'autre part la forte homologie de séquence peptidique des CPs en particulier au niveau des résidus impliqués dans cette interaction ³⁵⁻³⁷. CII n'échappe pas à ce constat. Cependant, dans nos expériences d'immunoprécipitation (figure 6), nous n'avons pas observé cette interaction. Nous supposons que cela pouvait s'expliquer par le fait que l'anticorps utilisé se fixe justement dans la région impliquée dans l'interaction avec PCPE1. De plus, nos résultats s'agissant de l'interaction CP/LOX méritaient d'être vérifiés dans un modèle permettant de meilleurs contrôles ; en particulier, il était intéressant d'étudier l'interaction de la LOX avec les autres CPs ; enfin, chaque culture de chondrocytes primaires ayant un phénotype spécifique dans les détails (les niveaux de synthèse de nos protéines d'intérêt sont très variables et assez indépendants les uns des autres), disposer d'un modèle plus stable aurait facilité les choses. C'est dans cette démarche que nous avons commencé à nous intéresser au modèle cellulaire ATDC5, qui sécrètent CPI, CII, CIII, PCPE1, LOX, entre autres, de manière endogène. Nous avons réalisé des constructions permettant l'expression recombinante et étiquetée des 3 CPs pour réaliser des pull-downs. Ces travaux sont présentés dans la thèse de Dafné Wilhelm accessible en ligne. S'agissant de la LOX, ces expériences n'ont pas été concluantes, ce qui a donné un coup d'arrêt à l'étude de cet aspect. En revanche, elles indiquent clairement que CPI (homotrimérique, 3 α 1) et CIII, mais pas CII, fixent PCPE1 (figure 7).

Ces données suggèrent un rôle moins général de l'interaction CP/PCPE1 qu'on ne l'avait supposé, ce qui pourrait être une piste pour mieux comprendre son rôle biologique, qui reste obscur, notamment parce que la déficience génétique de *PCPE1* n'a pas de phénotype majeur chez la souris ³⁸. Il faut préciser que nos collaborateurs de l'IBCP, dans des expériences strictement *in vitro*, observent une affinité similaire pour les 3 CP (donc, y compris CII) pour

PCPE1 et le clivage d'une version artificielle du procollagène de type II par BMP-1 induit par PCPE1. L'environnement cellulaire semble donc déterminant dans les différences fonctionnelles entre les CPs sur ce point.

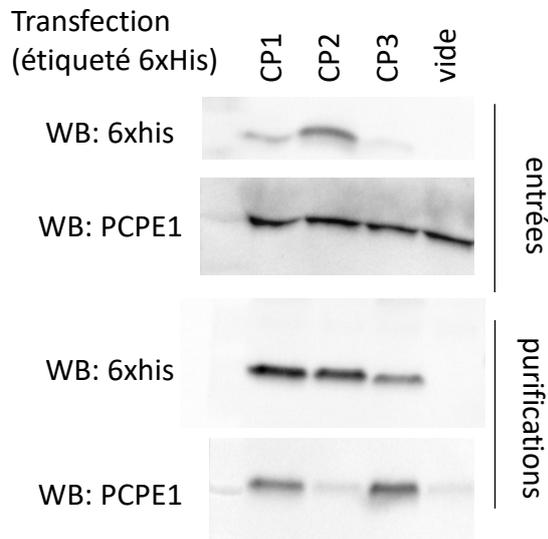


Figure 7. CPII n'interagit pas avec PCPE1 dans la lignée ATDC5. La lignée est transfectée avec des plasmides induisant la sécrétion des différents CPs recombinants en fusion traductionnelle avec l'étiquette 6xHis en N-terminal. Le sécrétome collecté dans du milieu sans sérum est utilisé dans des expériences de pull-down utilisant des billes magnétiques de nickel. Le tout est analysé par western blotting. PCPE1 est sécrété de manière endogène par cette lignée.

3.2 Outils d'analyse protéomique

Vers 2010, l'analyse quantitative a réellement pris son essor dans la communauté protéomiste. La plupart des plateformes conséquentes se sont dotées d'équipement permettant ces mesures sur la base de la LC-MS. Cependant, la technologie MALDI dont nous disposions était considérée comme inapte à de telles approches. Pourtant, nos utilisateurs comme les autres étaient demandeurs de données quantitatives et j'ai donc exploré les approches tentant de s'en approcher avec notre instrumentation. Le besoin local était identifié, notamment pour l'étude des sécrétomes de cellules en différenciation chondrocytaire dans le cadre d'un projet financé par l'Agence de Biomédecine porté par Astrid Pinzano. Les interactions avec la société Bruker ont été déterminantes dans ce développement, en particulier sur l'aspect logiciel. Nous avons réalisé des études pilotes sur des mélanges de sécrétomes originaires d'échantillons d'intérêt dans des proportions maîtrisées afin d'évaluer la faisabilité en conditions réelles.

3.2.1 Quantification relative sans marquage des protéines sécrétées par LC-MALDI

L'approche LC-MALDI, qui ne diffère de la LC-MS que par la méthode d'ionisation des analytes, s'est avérée moins sensible mais aussi qualifiée pour la mesure des quantités relatives des protéines individuelles en mélange de complexité intermédiaire³⁹. Nous avons ensuite utilisé cette méthode pour mieux décrire la réponse des chondrocytes primaires au TGF β . Nous avons ensuite montré l'efficacité améliorée de telles méthodes, en comparaison à la RT-PCR et à l'immunohistochimie, dans l'analyse de la différenciation chondrocytaire des cellules souches ; cette méthode a permis y compris d'affiner les méthodes de culture et même de

distinguer, au sein de réplicats biologiques, les plus aboutis ⁴⁰. Malgré la démonstration de l'utilité de cette approche, notre plateforme est la seule au monde à proposer ce type d'analyses à ce jour.

L'intérêt de ce développement a été décisif au cours des dernières années, à la fois pour la plate-forme et pour nos travaux : l'analyse quantitative relative des sécrétomes s'est révélée fort utile dans de nombreux projets en bioingénierie qui ont donc eu recours aux services de la plateforme, plus abordables que les concurrents parce que reposant sur la spectrométrie de masse MALDI. Dans la plupart des systèmes de culture, le sécrétome traduit à la fois la viabilité et le métabolisme cellulaire, la différenciation, en particulier s'agissant des tissus conjonctifs.

3.2.2 Analyse quantitative relative des PTMs des collagènes

La mesure des variations quantitatives relatives des protéines par spectrométrie de masse repose sur les signaux observés en LC-MS pour chaque ion, entre des groupes expérimentaux. Mais pour chaque protéine, on dispose de plusieurs peptides, dont chacun permet une mesure et une analyse statistique. Les statistiques disponibles pour chaque protéine sont donc consolidées en intégrant celles disponibles pour chacun des peptides correspondants. Quand il s'agit de mesurer les variations de PTMs, cette consolidation n'est plus possible, puisque par définition, une PTM donnée ne concerne qu'un des peptides de la protéine. La mesure quantitative, même relative, d'une PTM nécessite donc une robustesse instrumentale plus grande. Néanmoins, nos travaux sur ce point semblent montrer qu'y compris dans cette problématique les données obtenues sont fiables et permettent la caractérisation des taux des diverses PTM, au moins s'agissant des collagènes (figure 8).

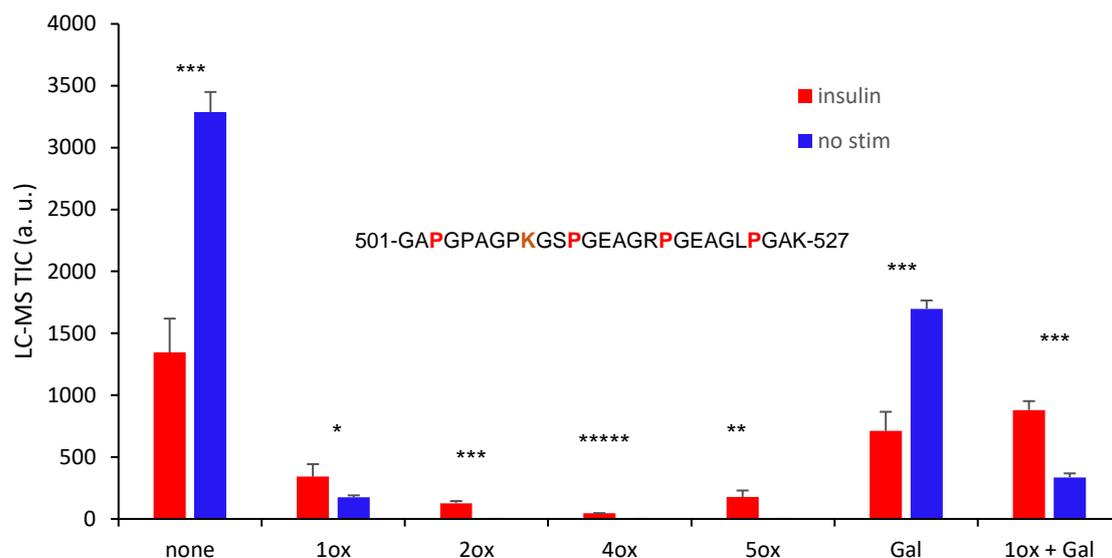


Figure 8. Exemple de mesure quantitative relative des PTM d'un peptide de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I. La séquence et les bornes du peptide en question ainsi que les positions portant les PTM sont indiquées. Ces données ont été obtenues dans le cadre de l'analyse des sécrétomes de cellules ATDC5 stimulées ou non à l'insuline pendant 3 jours. Il faut noter que le peptide en question est observé sous 7 formes différentes selon le nombre et la qualité des PTMs. Ox, hydroxylation; Gal, galactosylation. Les données montrent qu'en l'absence de stimulation, le peptide est observé uniquement sous les forme non hydroxylée et mono-hydroxylée. La stimulation induit l'apparition des formes pluri-hydroxylées; qui logiquement s'accompagne d'une baisse des formes non hydroxylées. Lorsque la stimulation est poursuivie au-delà de 3 jours, on constate la disparition totale des formes non hydroxylées et galactosylées, l'augmentation des taux de pluri-hydroxylations. Les étoiles indiquent la p-value du t-test entre les groupes insuline et non stimulés pour chaque version du peptide selon la formule suivante : $p < 0,5E^{-*}$.

3.3 La lignée ATDC5 comme modèle d'étude des mécanismes de maturation des collagènes fibrillaires (co-encadrement doctoral avec ACT, D. Wilhelm, lauréate du concours école doctorale BioSE 2016, thèse soutenue en 2019)

Le chondrocyte primaire est un outil à la fois lourd à mettre en œuvre et particulièrement variable, en particulier en terme de synthèse d'ECM (sur des critères à la fois qualitatifs et quantitatifs), malgré les nombreuses améliorations que nous avons apportées à nos protocoles au fil des années.

A la recherche d'un modèle reconnu de chondrogénèse, permettant l'ingénierie génétique, nous nous sommes tournés vers le modèle ATDC5. Cette lignée décrite initialement dans les années 90 est issue d'un tératocarcinome de souris ; cultivée dans son milieu d'expansion, elle conserve un phénotype centré sur la prolifération. En revanche, sous stimulation à l'insuline, dans le même milieu, elle s'engage dans un processus ressemblant de près à la chondrogénèse. Ce modèle est largement utilisé en biologie du cartilage de croissance, mais avant nos travaux, il n'était décrit que sur des bases d'expression génique et d'histologie. Une

présentation plus exhaustive en est donnée dans la thèse de Dafné Wilhelm qui, au cours de son travail, en a fait une description protéomique détaillée. Son approche a reposé sur les méthodes d'analyse quantitative relative par spectrométrie de masse sur sécrétomes, qu'elle a adapté également à l'analyse de l'ECM après fractionnement cellulaire. Pour synthétiser, ses conclusions sont que dans ce modèle, la machinerie de synthèse d'une ECM ressemblant de près au cartilage est mise en place ; les cellules deviennent en quelques jours, compétentes pour la synthèse d'un abondant collagène fibrillaire crosslinké, composé principalement de type I mais également de type II, III et XI. De plus les PTMs qu'elle a pu identifier sont très comparables à celles du cartilage articulaire, en termes d'hydroxylation, de glycosylation (mis en évidence figure 8), de crosslinks (sur ce point, la nature moléculaire des crosslinks n'a pas été caractérisée, mais ils sont bien dépendants de l'activité LOX). Le modèle ATDC5 se prête donc bien à caractériser les mécanismes régissant ces événements ⁴¹. C'est un point à souligner car les modèles cellulaires récapitulant même imparfaitement la globalité des mécanismes de maturation des collagènes manquent cruellement.

3.4 Rôle du métabolisme du glucose dans la mise en place de l'hydroxylation du procollagène en absence d'ascorbate

Notre analyse protéomique du modèle ATDC5 a notamment révélé que l'insuline induit dans ces cellules, préalablement à la chondrogénèse, l'hydroxylation du procollagène (PHyl), qui est fondamentale pour l'assemblage trimérique des chaînes de précurseurs (comme indiqué dans le schéma figure 4). Dans le collagène fonctionnel, 150 à 200 résidus Proline (soit environ 35% des résidus Proline de la triple hélice) sont hydroxylés sur chaque polypeptide. Ainsi, bien que cette modification concerne très majoritairement le collagène parmi l'ensemble du protéome, c'est la PTM la plus abondante, tous résidus considérés, chez les vertébrés.

Phyl est catalysée principalement par les prolyl-4-hydroxylases (P4H), dans le réticulum endoplasmique et consomme de l'oxygène et de l' α -kétoglutarate, qui est un intermédiaire du cycle de Krebs. Dans le modèle ATDC5, Phyl (ainsi que la chondrogénèse) est induite par stimulation à l'insuline, suggérant intuitivement une implication du métabolisme du glucose, de manière cohérente avec nos observations en analyse protéomique et métabolique, montrant une hausse drastique de la glycolyse ⁴¹. Nous avons donc exploité ce modèle afin de mieux comprendre le mécanisme cellulaire liant PHyl et métabolisme du glucose (figure 9). Nos manipulations métaboliques, reposant sur l'utilisation d'agents pharmacologiques complémentaires, suggèrent que la disponibilité de l' α -kétoglutarate n'est pas limitante pour l'hydroxylation dans les conditions habituelles de culture des ATDC5. Au contraire, le métabolisme du glucose doit s'orienter vers la voie de la biogénèse pour permettre l'hydroxylation du procollagène.

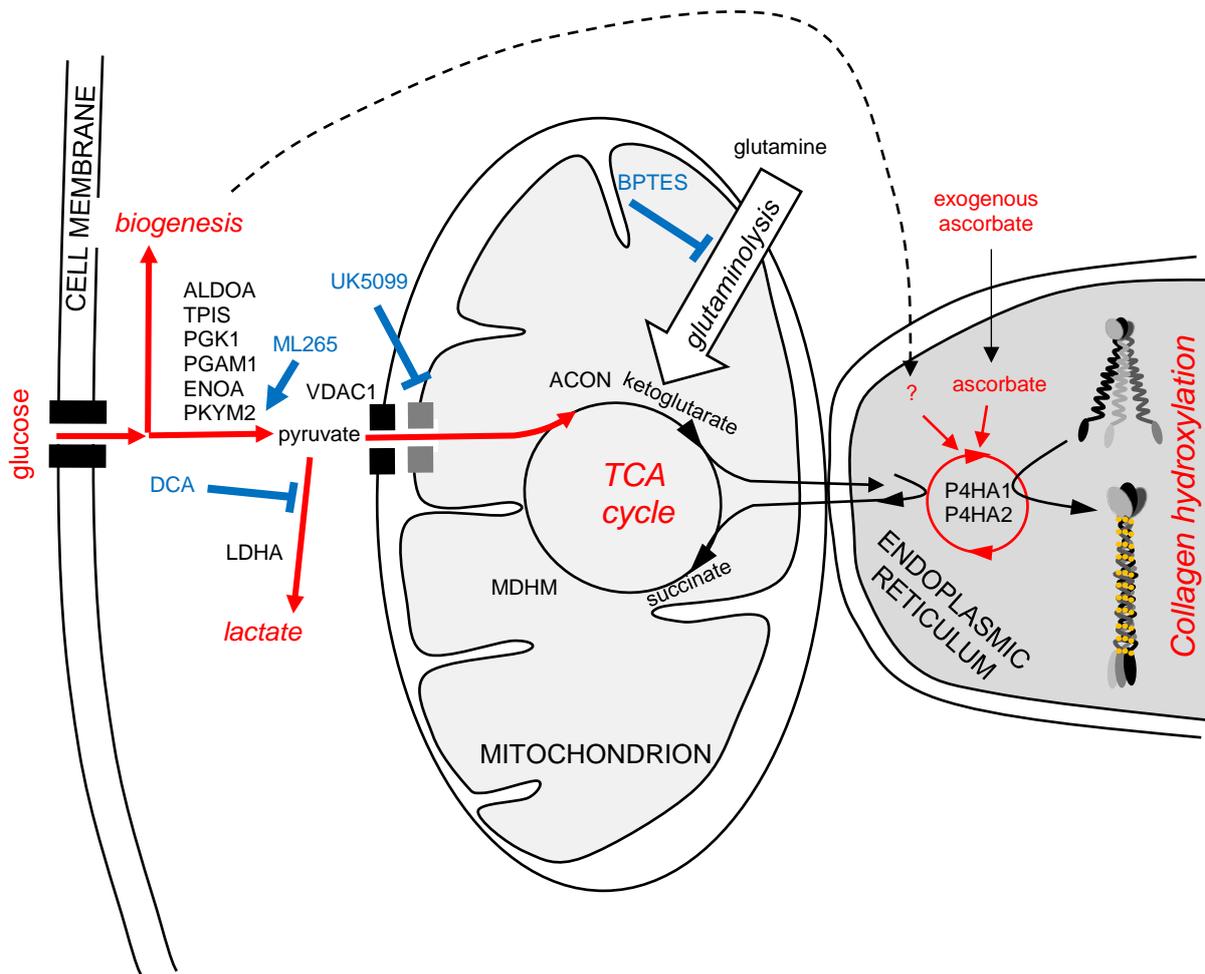


Figure 9. Rôle du métabolisme du glucose dans l'hydroxylation du collagène. La réaction catalysée par les prolyl-hydroxylases (P4HA1 & 2) consomme de l'oxygène (non schématisé ici) et de l' α -ketoglutarate qui peut provenir du métabolisme du glucose via le cycle de Krebs ou de la glutaminolyse. Cependant le maintien sous leur forme active des prolyl-hydroxylases consomme également de l'ascorbate selon l'hypothèse la plus consensuelle. Dans le modèle ATDC5, qui n'est pas pourvu en ascorbate, nous montrons que la mise en place de l'hydroxylation du procollagène est spécifiquement dépendante de la concentration disponible de glucose mais n'est pas affectée par une baisse modeste du cycle de Krebs (qui n'est, dans les conditions expérimentale utilisées pas limitant), ni de la glutaminolyse, mais au contraire, requiert l'orientation du métabolisme du glucose vers la voie de la biogénèse, suggérant que la néosynthèse d'un réducteur alternatif à l'ascorbate est le principal frein à l'hydroxylation dans ce modèle. Ces résultats reposent sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques à des doses affectant minimalement la prolifération cellulaire: BPTES: inhibiteur de la glutaminase; DCA: acide dichloroacétique, inhibiteur de la voie du lactate; UK5099: inhibiteur du transport mitochondrial du pyruvate; ML265, inducteur de l'activité enzymatique de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase. L'hydroxylation n'est pas affectée par BPTES, est stimulée par DCA et UK5099, mais inhibée par ML265, ce qui argumente notre hypothèse.

Il faut préciser que selon des caractérisations menées *in vitro*, sur enzymes partiellement purifiées, en plus des cosubstrats cités plus haut, la catalyse des réactions d'hydroxylation consomme de l'ascorbate (acide ascorbique ou Vitamine C) intervenant dans une réaction de réduction du site catalytique des hydroxylases ⁴². Cependant, d'autres données en culture

cellulaire ⁴³ et *in vivo* ⁴⁴ montrent que Phyl peut subvenir selon un mécanisme différent, non encore caractérisé, en absence d'ascorbate. Précisément, le modèle ATDC5 est dépourvu d'ascorbate et pourtant, on y constate l'hydroxylation et la néogénèse du collagène sous stimulation à l'insuline. Nous concluons donc à ce stade que la hausse et la réorganisation du métabolisme du glucose induites par l'insuline dans le modèle ATDC5, impliquant en particulier l'isoforme M2 de la Pyruvate Kinase, favorisent la néosynthèse d'un composé *via* la voie de la biogénèse (par opposition à la voie énergétique) qui permet Phyl en l'absence d'ascorbate.

D'autres données obtenues sur cellules souches humaines montrent que le même mécanisme est codé chez l'homme et que les cellules souches en disposent ou non selon leur potentiel prolifératif. A ce stade, nous n'avons pas identifié le composé remplaçant l'ascorbate. L'engagement du métabolisme du glucose vers la voie des pentoses phosphates (activée dans le modèle) génère de manière assez spécifique du NADPH. Il est concevable que celui-ci se substitue à l'ascorbate dans la réaction de réduction du noyau de fer des prolyl hydroxylases. Plus spécifiquement, il existe en fait 2 voies parallèles des pentoses phosphates ⁴⁵. La mieux caractérisée prend place dans le cytoplasme et est initiée par la Glucose-6-phosphate dehydrogenase ; le NADPH qu'elle génère n'est a priori pas disponible dans le système sécrétoire. Mais une seconde voie, initiée par l'hexose-6-phosphate dehydrogénase, génère du NADPH dans le réticulum endoplasmique ⁴⁶. Elle pourrait donc recycler directement le NADP+ issu de la réduction des P4H, synergisant prolifération et synthèse de collagène. Nous poursuivons actuellement cette hypothèse. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle de sauvetage du développement fœtal en situation de carence alimentaire, mais également participer à la transition épithélio-mésenchymateuse car il rompt la compétition entre hydroxylation du collagène et déméthylation de la chromatine, justement basée sur la disponibilité de l'ascorbate ⁴⁷.

3.5 Développement d'une stratégie thérapeutique anti-fibrotique (projet FIBRINHIB en maturation SATT SAYENS, 2021)

« Fibrose » est un terme générique qui décrit une accumulation anormale de collagène en contexte cicatriciel. La fibrose survient dans la plupart des contextes pathologiques associés à l'inflammation chronique, tels que la stéato-hépatite, les maladies inflammatoires chroniques intestinales, l'insuffisance respiratoire, ou l'arthrose. En tant que tel, la fibrose est une grave complication et un problème de santé majeur qui laisse démunis les cliniciens en raison de l'absence de traitement. Les causes de la fibrose sont multiples et sensiblement différentes selon les contextes pathologiques ⁴⁸; cependant, dans tous les cas, la fibrose consiste en une synthèse débordante de collagène. Une approche thérapeutique contre la fibrose consisterait à inhiber cette synthèse.

Au cours de la dernière décennie, mes travaux ont largement balayé les mécanismes de maturation des collagènes et m'ont amené à proposer une stratégie basée sur des anticorps bloquant la maturation du collagène. Ce projet fait l'objet d'un programme de maturation subventionné par la SATT SAYENS en 2021 et les détails ne peuvent figurer ici en raison de conflit avec la démarche de protection intellectuelle en cours. Nous évaluerons leur efficacité dans le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique, un problème de santé majeur associé à des maladies professionnelles, à la consommation tabagique, aux allergies respiratoires et aux infections pulmonaires chroniques. En particulier, cette pathologie est actuellement sous le feu de la rampe en raison de son émergence à la suite d'infections pulmonaires sévères d'origine virale.

Il est à vrai dire beaucoup trop tôt pour apprécier les chances de succès de cette approche. Il faut notamment considérer les nombreux effets secondaires qu'auront certainement de telles molécules, interférant également avec le renouvellement physiologique du collagène dans l'organisme. Cela imposera au mieux une optimisation des voies d'administration, voire des stratégies d'adressage sur les sites fibrotiques.

4 Perspectives de recherche

De par leur abondance au cours de la vie chez les vertébrés, leur composition biaisée en acide aminés, la spécificité de leurs mécanismes de maturation et l'hétérogénéité moléculaire qui en résulte, la suprastructure du réseau qu'ils constituent, les collagènes fibrillaires sont une famille protéique totalement à part, dont les coûts métaboliques sont remarquables à la fois quantitativement et qualitativement. Les méthodes expérimentales et analytiques requises pour leur étude sont radicalement spécifiques ⁴⁹. C'est sans doute pourquoi la biologie du collagène est très sous-représentée dans la recherche Mondiale et Française, en regard de leur intérêt conceptuel et biomédical. La spectrométrie de masse est un outil central, notamment pour l'étude des PTMs, extrêmement abondantes pour les collagènes fibrillaires. Ce sujet d'étude est du plus grand intérêt mais aussi un bon modèle pour le développement de méthodologies novatrices en analyse protéomique. Dans la continuité des dernières années, je poursuivrai l'étude de la maturation des procollagènes, à la recherche de leurs mécanismes les plus fondamentaux et de pistes applicatives dans le domaine médical. Mener à bien les projets suivants nécessitera l'implication de doctorants que je tenterai de recruter en particulier dans le cadre des concours de l'Ecole Doctorale BioSE pour l'attribution de bourses doctorales. Certains projets au moins devront faire l'objet de nouvelles demandes de subvention, notamment à l'ANR, impliquant les laboratoires historiques dans le domaine, notamment celui dirigé par Catherine Moali au LBTI à Lyon, avec lequel j'entretiens des contacts modérés mais au long cours et, je crois, une relation de confiance.

4.1 Caractérisation fonctionnelle des acteurs de la maturation des procollagènes fibrillaires

Comme évoqué au § 3.3, un frein majeur à la compréhension des mécanismes de maturation des collagènes est la quasi-absence de modèles cellulaires qui les récapitulent de manière fiable. Nos travaux montrent que la lignée ATDC5 est un modèle avantageux de ce point de vue ⁴¹. De nombreux acteurs hypothétiques ou aux fonctions mal définies dans la maturation des collagènes voient leur expression largement induite par la stimulation à l'insuline et leurs fonctions pourraient donc être caractérisées dans ce modèle. Longtemps, l'ingénierie génétique de cette lignée a été un frein à nos travaux ; nos premières stratégies, basées sur la transfection de plasmides ou sur l'infection par des lentivirus étaient trop peu efficaces et nécessitaient la sélection de clones transformés, ce qui induisait une dérive anarchique du phénotype original de la lignée.

Dans le cours de l'année 2020, nous avons développé une stratégie adénovirale qui s'avère très efficace y compris pour des approches d'inactivation génique (sur la base de la technologie Crispr/Cas9) et permet de s'affranchir de la sélection clonale, nous ouvrant les

portes d'une caractérisation fonctionnelle simple de mise en œuvre (puisque nous avons également développé les méthodes analytiques *ad equat*) pour des gènes isolés dans cette lignée. Il faut cependant considérer que les résultats obtenus dans ce modèle, qui reste simpliste, devront systématiquement être complétés de caractérisations *in vivo*.

4.1.1 Caractérisation du rôle de la synthèse des glycosaminoglycanes dans l'assemblage de la matrice extracellulaire

Les syndromes d'Ehlers-Danlos (EDS) sont un groupe de maladies génétiques rares touchant les propriétés mécaniques des tissus conjonctifs⁵⁰. La plupart des types d'EDS ont pour cause des mutations ponctuelles des gènes codant des collagènes ou des enzymes catalysant leurs PTMs. Cependant, l'EDS de type VI est dû à des mutations du gène *b3Galt6*, qui code une enzyme clé de la synthèse des glycosaminoglycanes. L'équipe 2, à laquelle j'appartiens, s'intéresse depuis plusieurs années à mieux comprendre le mécanisme pathologique liant défauts de O-glycosylation et assemblage de l'ECM. Courant 2020, j'ai co-encadré le stage de M2 d'Alison WURTZ, ayant pour objectif l'étude de la déficience en β 3Galt6 dans la lignée ATDC5. Elle a mis au point l'inactivation génique par transduction adénovirale de constructions Crispr/Cas9 sans sélection clonale, permettant l'obtention de populations hétérogènes mais invalidées de manière uniforme avec reproductibilité et rapidité. Elle a ensuite caractérisé les défauts de sécrétion et d'assemblage de l'ECM qui en résultent. Ses résultats suggèrent que la principale conséquence collagénique du défaut d'activité β 3Galt6 est l'absence de glycosylation du collagène de type XII. Ce collagène de type FACIT (collagène associé aux fibrilles avec triple hélices interrompues) porte effectivement 3 sites de O-glycosylation. Toujours d'après les travaux d'Alison, il en résulte une intégration accrue de cette molécule au réseau de collagène. Ces travaux méritent d'être approfondis et poursuivis, notamment par une meilleure caractérisation moléculaire des peptides portant ces glycosylations. Une perspective que nous envisageons de développer avec de proches collaborateurs de l'équipe^{51,52}, consisterait à construire un poisson zèbre modifié génétiquement, afin de substituer les 3 résidus glycosylés du collagène de type XII. Cela abrogerait la seule glycosylation de cette molécule et permettrait d'en évaluer l'importance fonctionnelle pour l'assemblage de la matrice extracellulaire *in vivo*.

4.1.2 Caractérisation fonctionnelle des lysyl oxydases individuelles dans l'établissement des crosslinks des collagènes

Il existe chez l'homme 5 enzymes de la famille fonctionnelle LOX : Le membre fondateur LOX et LOX-L (pour LOX-like) 1-4. Bien qu'étudiées de manière récurrente notamment dans le contexte du cancer, leurs fonctions moléculaires respectives détaillées restent très mal connues et notamment, les contributions des unes et des autres à l'établissement des crosslinks du collagène sont obscures. Dans le modèle ATDC5, les crosslinks du collagène sont strictement dépendants de l'activité lysyl oxydase⁴¹, suggérant que c'est un bon modèle pour

caractériser leurs fonctions respectives à cet égard. Au moins 4 des LOXs sont exprimées dans les cellules ATDC5 : nous détectons LOX et LOXL2 sécrétées dans le milieu de culture sans grande dépendance de la différenciation chondrogénique ; LOXL2 est décrite comme induite dans le modèle et importante pour le processus de différenciation génique⁵³, même si nos données ne le confirment pas. Surtout, nous trouvons une très forte accumulation dans l'extrait à la guanidine⁴¹ de LOXL4 spécifiquement lors de la différenciation. C'est d'ailleurs dans le modèle ATDC5 que le messenger LOXL4 a été mis en évidence pour la première fois au travers d'une approche de clonage différentiel et l'analyse de son expression *in situ*⁵⁴ suggère que c'est physiologiquement relevant de la chondrogenèse. Nous proposons donc dans un premier temps d'invalider le gène LOXL4 et de caractériser les modifications de l'ECM qui en résultent, en termes de quantités des protéines individuelles, de crosslinks et possiblement de déaminations oxydatives des lysines par spectrométrie de masse. Selon la pertinence des résultats obtenus, nous poursuivrons avec la caractérisation des autres LOXs, notamment en combinant les invalidations géniques de plusieurs d'entre elles afin de surmonter le problème de leur vraisemblable redondance fonctionnelle partielle.

4.1.3 Caractérisation du mécanisme enzymatique des complexes prolyl-4-hydroxylase

Comme évoqué largement au § 3.4, le fonctionnement des P4H reste imparfaitement compris, notamment en regard des co-substrats qu'elles consomment. Nos résultats suggèrent que l'ascorbate peut être substitué par un autre métabolite. Il est possible, mais relativement lourd, de reconstituer l'activité de ce complexe *in vitro*⁴² pour aborder cette question.

Au cours de nos manipulations métaboliques, nous avons mis en évidence des conditions de culture du modèle ATDC5 qui promeuvent la sécrétion abondante et fonctionnelle du complexe P4H. Cela permet d'envisager un système relativement simple de purification partielle de ce complexe, ne nécessitant pas d'ingénierie génétique, ce qui facilitera sa caractérisation fonctionnelle. Par ailleurs, (ce n'est pas évoqué en amont dans ce document) nous avons réalisé des constructions plasmidiques permettant la sécrétion de mini-procollagènes⁵⁵ étiquetés et donc purifiables, qui pourront servir de substrats dans nos essais enzymatiques. L'hydroxylation des prolines sera quantifiée (relativement) par spectrométrie de masse, sans nécessité de marquage métabolique. Nous devrions donc pouvoir, sur ces bases, montrer quels métabolites peuvent se substituer à l'ascorbate.

Par ailleurs, ces complexes enzymatiques consistent en réalité en un assemblage tétramérique⁵⁶ de 2 enzymes portant l'activité catalytique P4H et 2 Protéine Disulfide isoméras (PDI), dont l'activité est critique pour l'assemblage trimérique des CPs⁵⁷, qui comprennent 11 à 12 ponts disulfure. L'activité P4H consomme de l'ascorbate et produit du dehydroascorbate (deHAsc). A l'inverse, les PDI peuvent consommer du deHAsc et produire de l'ascorbate⁵⁸. Il est donc concevable que le couplage des 2 réactions catalytiques assure le recyclage de l'ascorbate dans le réticulum endoplasmique. Cela réduirait la dépendance de Phyl au pouvoir

réducteur disponible dans un compartiment sub-cellulaire dont l'environnement est considéré comme principalement oxydant ⁵⁹. Nous testerons cette hypothèse *in vitro* en présence de concentrations limitantes du couple oxydo-réducteur et de préparations de mini-procollagène partiellement réduit.

4.2 Caractérisation exhaustive des PTMs du collagène de type I et de leurs spécificités tissulaires

Le collagène de type I, largement majoritaire dans l'organisme, constitue l'essentiel de l'ECM dans des tissus aux propriétés mécaniques aussi radicalement opposées que l'os, la peau et le tendon. Il faut donc considérer que des PTMs différentielles participent à déterminer ses propriétés mécaniques. Certaines PTMs spécifiques de tel ou tel tissu ont été mises en évidence : dans l'os, les lysines déaminées des N- et C-telopeptides sont partiellement (sans précisions quant aux taux relatifs) hydroxylées ⁶⁰, ce qui modifie très significativement la stabilité des crosslinks et contribue très certainement à la rigidité extraordinaire des fibrilles dans ce tissu; la répétition (GPP)₅ en région C-terminale est spécifiquement hydroxylée en position X (en plus de l'être en position Y comme dans les autres tissus) dans le tendon ⁶¹; mais parmi les centaines de PTMs que subit le collagène, les spécificités tissulaires des unes et des autres sont très mal caractérisées. La raison centrale en est l'hétérogénéité des états de PTM, qui complique leurs identifications et a fortiori leurs quantifications. Cependant, les outils développés à partir du LC-MALDI semblent adaptés y compris à cette problématique, comme déjà évoqué au § 3.2.2. Nous avons donc entrepris une analyse comparative des PTMs du collagène extrait de tendon, de peau et d'os, afin d'appréhender nos capacités à mieux définir les spécificités tissulaires des PTMs. Il s'agit d'expériences préliminaires. Cependant, les résultats déjà obtenus sont remarquables ; Nous avons identifié un total de 12 peptides pour lesquelles nous trouvons un biais de représentativité des différentes PTMs entre les 3 tissus. 2 exemples sont décrits en figure 10.

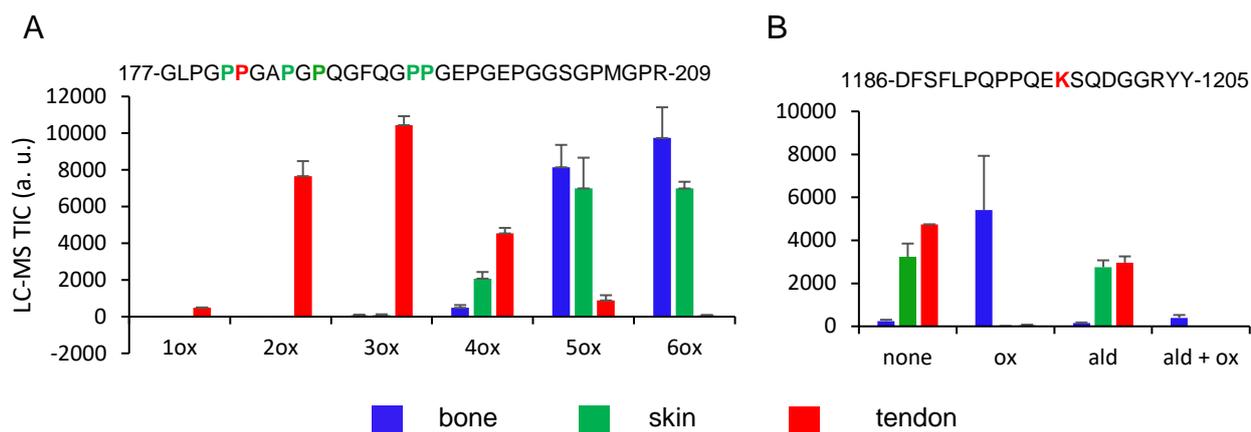


Figure 10. Exemples de résultats préliminaires dans la caractérisation différentielle des PTM de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I. La séquence et les bornes des peptides ainsi que les positions portant les PTM sont indiquées. ox, hydroxylation; ald: déamination oxydative. Les résidus concernés par les PTM sont indiqués en couleurs. (A) une zone proche de l'extrémité N-terminale présente des formes nettement moins hydroxylées dans le tendon que dans l'os et la peau. Noter l'hétérogénéité et la répartition Gaussienne des nombres d'hydroxylations dans le tendon. (B) Le C-télopeptide est, comme précédemment décrit, préférentiellement hydroxylé dans l'os, mais il est subit également moins la déamination oxydative dans ce tissu, suggérant que les crosslinks du collagène impliquent le C-télopeptide surtout dans la peau et le tendon.

Il faut considérer que dans cet exercice, les difficultés sont multiples. Entre autres, les méthodes de digestion destinées à générer les peptides analytiques doivent être adaptées, car certains peptides tryptiques sont de masse moléculaire trop importante pour être analysés en MALDI avec une résolution suffisante, l'interrogation des bases de données est complexe en raison du grand nombre de PTMs potentielles à considérer sur chaque peptide et, selon les PTMs considérées, il peut être nécessaire d'adapter y compris les conditions de nano-HPLC et la matrice d'ionisation. Tous ces aspects méritent encore des optimisations et notamment, à l'heure actuelle nous n'avons jamais pu observer les peptides crosslinkés, qui sont d'un intérêt central. L'acquisition qu'ambitionne la plateforme de protéomique, d'un spectromètre de masse de dernière génération, favoriserait nos progrès. Cependant, les résultats préliminaires démontrent déjà, d'une part, l'existence de plusieurs PTMs différentielles encore jamais décrites et d'autre part, l'intérêt de l'analyse quantitative relative pour mieux décrire cette diversité. Nous poursuivrons donc les développements méthodologiques afin de mieux caractériser à la fois l'éventail des PTMs et l'hétérogénéité de leurs taux respectifs à chaque position des polypeptides de collagènes. Cela constituera le point de départ d'une meilleure définition des rôles de ces PTMs dans l'établissement des propriétés mécaniques du collagène.

4.3 Vers une meilleure compréhension du mécanisme séquentiel de maturation des propeptides carboxy-terminaux des procollagènes fibrillaires

Comme j'ai tenté de le mettre en évidence dans les parties précédentes, les collagènes fibrillaires sont synthétisés et maturés au travers d'un processus particulièrement complexe, faisant intervenir un grand nombre d'acteurs moléculaires dont l'expression est finement régulée et dont le fonctionnement est intriqué dans le métabolisme cellulaire. Certains de ces aspects ne sont d'ailleurs pas directement traités ici, tels que le métabolisme oxydatif^{62,63} et l'autophagie^{64,65}.

Le propeptide carboxy-terminal (CP) joue plusieurs fonctions cruciales à des étapes successives du processus global (figure 5) et nos travaux en suggèrent de nouvelles (figure 6). De plus certaines de nos données préliminaires laissent supposer des différences fonctionnelles entre les CPs des différents procollagènes.

L'une des difficultés dans la progression de ces travaux est la difficulté de reconstituer les fonctions en question dans des modèles à la fois intégrés, manipulables et représentatifs de la physiologie. Le modèle ATDC5 apparaît comme un compromis acceptable et en tous cas inégalé de ce point de vue (§3.3 ; 4.1). Il permet également, pour partie, de considérer les aspects métaboliques (§3.4), mais il faut garder en tête l'origine cancéreuse de cette lignée et ses spécificités métaboliques vraisemblables.

Une autre difficulté est de disposer de méthodes analytiques robustes traduisant la globalité des PTMs et leur hétérogénéité, intrinsèque et certainement importante fonctionnellement s'agissant du collagène. Les développements technologiques auxquels je me suis attaché ces dernières années (§3.2 ; 4.2) et qu'il faudra poursuivre, constitueront des outils essentiels de ce point de vue.

Surtout, si ces mécanismes ne sont pas mieux décrits, c'est en particulier en raison de la dynamique du processus, qui complique l'isolement des états intermédiaires de maturation. Les anticorps développés dans le cadre de notre stratégie anti-fibrotique (§3.5) devraient également constituer des outils fondamentaux face à cette problématique : d'une part, en suivant des protocoles de marquage dédiés, ils révèlent spécifiquement des structures vésiculaires à l'interface cellule/matrice dans lesquelles sont organisées plusieurs des toutes dernières étapes de maturation avant assemblage fibrillaire. Ils pourraient permettre d'isoler ces structures afin de mieux caractériser leurs constituants fonctionnels. Ils pourraient permettre également la purification d'intermédiaires de maturation par immunoprécipitation et possiblement, la co-immunoprécipitation de certains acteurs de la maturation. De plus, comme ils bloquent les étapes ultimes lorsqu'administrés en culture cellulaire, ils pourraient permettre d'étudier les interactions fonctionnelles de ces dernières avec les précédentes,

mais également avec le fonctionnement général de la cellule. Ces aspects sont plus ou moins prévus dans le contrat de maturation en cours.

Ainsi, nous disposerons à la fois d'hypothèses de travail faisant sens, issues de travaux préliminaires, d'un modèle cellulaire adapté, d'outils analytiques performants et de nouveaux moyens de manipuler la machinerie de maturation qui nous aideront à lever des paliers dans la compréhension des mécanismes impliqués. Ultimement, on peut espérer, à travers ce travail intégré, mettre en évidence des événements moléculaires clés permettant de faire murir les stratégies anti-fibrotiques, qui seraient alors d'intérêt médical.

5 Encadrement Scientifique (30 stages de L3 à doctorat)

Bien que passant l'essentiel de mon temps de travail à la paillasse, de nombreux projets restent en suspens, notamment par manque d'implication. L'accueil de stagiaires est un moyen d'absorber ce problème. Par ailleurs, mon plus grand plaisir est la découverte scientifique, et il est d'autant plus grand quand je peux le partager. Enfin, au-delà de la formation professionnalisante, je crois que confronter les jeunes à la recherche scientifique est un bon moyen de favoriser chez eux d'une part l'introspection et d'autre part une analyse plus objective et plus pertinente du monde dans lequel ils devront évoluer. C'est pourquoi j'encadre autant d'étudiants qu'il m'est possible de le faire, soit en général 2 par an. L'analyse protéomique par spectrométrie de masse est un bon support de formation pratique : elle repose sur des principes tangibles, extrêmement objectifs et amenant à mieux comprendre les relations entre chimie et biologie. De plus, sa mise en pratique impose rigueur expérimentale et la familiarisation avec les outils informatiques modernes. De plus ses champs d'application sont universels en Biologie.

5.1 Encadrement de L3/M1 (18 étudiants au total)

Ces stages reposent sur des projets aux objectifs simples, en adéquation avec le niveau de formation et le temps imparti. Leurs principaux objectifs sont l'acquisition du raisonnement hypothético-déductif et de l'argumentation. En amont du stage, après présentation du sujet, je m'attache à amener l'étudiant à proposer des approches expérimentales. Après concertation, le premier quart du stage est en général consacré à une familiarisation avec les outils généraux en réalisant la partie maîtrisée du projet. Le second les confronte aux incertitudes quant aux approches choisies ; c'est souvent là que se révèle (ou pas) leur appréciation du métier. Le troisième est consacré à l'aboutissement de ce qui peut l'être, quitte à revoir les ambitions du projet original. Le quatrième est consacré à la rédaction de rapport, dans laquelle je les initie aux outils rédactionnels et les oriente sans participation active afin de développer leur autonomie dans cette tâche décisive pour la suite de leur cursus.

La plupart de ces stages portent sur nos objectifs scientifiques en cours. Il est arrivé, cependant, que des stagiaires soient accueillis sur des sujets sortant très largement de mon domaine de compétence, afin de répondre à des demandes d'équipes environnantes. On peut noter, notamment, un stagiaire de M1 en collaboration avec le Pr Iouri Motorine, de notre laboratoire, dont le stage consistait à évaluer la faisabilité de l'analyse des acides nucléiques par spectrométrie de masse MALDI, ainsi qu'un stagiaire de M1 puis de M2 en médecine légale, qui ambitionnait de dater les traces de sang par analyse des modifications chimiques des protéines.

Une tendance marquée dans la formation universitaire est la continuité thématique et d'équipe pour les stages du M1 à la thèse. C'est à mon sens extrêmement dommage, car cela appauvrit la culture scientifique des doctorants. Je m'attache donc à ne pas prendre en M2 les étudiants que j'ai eus en M1. Il arrive, cependant, que le contexte général (souhait des étudiants, opportunités de financement) amène à passer outre ce principe.

5.2 Encadrement de M2 (7)

Le M2 est réellement la période de l'adolescence scientifique. Il faut passer d'une longue phase d'assimilation des connaissances à celle de la création. Une année est souvent insuffisante à cette transition et c'est notamment dans l'aptitude à s'adapter promptement qu'on reconnaît ceux qui réussiront éventuellement une thèse. Parallèlement, le M2 est la seule réelle étape sélective dans le cursus moderne et il faut donc donner toutes les chances à l'impétrant de rédiger un rapport séduisant, ce qui est facilité par la richesse des résultats. Dans le cas où une thèse fait suite, il convient bien sûr que le M2 initie le travail de thèse. Aussi, les stages de M2 que je propose tentent d'être à la fois novateurs et bien rodés. Le mode organisationnel est assez similaire à celui des stages de M1, avec une plus grande part de discussion quant aux approches, une plus grande autonomie dans la réalisation, une plus grande exigence dans le raisonnement et la rédaction.

J'ai encadré 7 M2, dont 6 depuis 2005 à Nancy:

-Lamia AISSI (2005-2006). *Production et purification des propeptides carboxy-terminaux des procollagènes de type I et II.* Elle a ensuite fait une thèse à l'Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus du CHU de Nancy.

-Karima AIT HANIFA (2008-2009). *Caractérisation fonctionnelle des propeptides carboxy-terminaux des procollagènes de type I et II.* Elle a ensuite fait une thèse à l'Unité Inserm 1116, Défaillance cardiovasculaire aiguë et chronique.

-Anissa MADI (2011-2012). *Recherche de marqueurs protéiques des pathologies articulaires par une méthode dédiée d'analyse protéomique comparative des liquides synoviaux.* Elle a poursuivi en bio-informatique à ma connaissance.

-Dafné WILHELM (2015-2016). *Etude de la fonction biologique de l'interaction physique entre la Lysyl oxydase et le C-propeptide du procollagène de type II.* Elle a poursuivi en thèse sous la direction d'Arnaud Bianchi et moi-même.

-Thomas ROTH (2017-2018). *Etudes moléculaires et structurales des protéines pour l'estimation de l'âge des traces de sang.* Il poursuit ce projet, actuellement en Suisse au travers d'une thèse.

-Alison WURTZ (2021). *Etudes des conséquences moléculaires et fonctionnelles d'une déficience en β -1,3-Galactosyltransférase 6 dans un modèle cellulaire de synthèse de matrice extracellulaire.*

5.3 Supervision de post-doctorant (1)

En 2010, nous avons obtenu un financement de post-doctorat d'un an de la FRM sur mon projet au long court sur les fonctions des propeptides carboxy-terminaux des procollagènes de type I et II. Claudie BANTSIMBA-MALANDA a donc collaboré à ces travaux. Elle est co-auteure des références 8, 10, 13 de ma production scientifique.

5.4 Participation à des encadrements de thèse de Médecine ou de Science sans ACT

Ma position sur la plate-forme m'amène souvent à m'intéresser aux détails expérimentaux des utilisateurs pour répondre au mieux à leurs besoins. Lorsque cela implique des doctorants et que l'analyse protéomique a une place centrale dans leur projet, nos interactions s'apparentent facilement à de l'encadrement pratique, voire scientifique. On peut noter en particulier :

-Camille DELAUNAY. Thèse de Médecine soutenue en 2011. *Intérêt de l'analyse du niveau d'expression de C1CP et C2CP par technique immunohistochimique pour le diagnostic différentiel entre chondrome et chondrosarcome.* Elle est co-auteure des références 6 et 13 de ma production scientifique.

-Suzanne HABBAS. Thèse de Sciences soutenue en 2012. *Étude des propriétés de deux séries de substances d'origine naturelle : les cucurbitacines et les parabènes : analyse de leur biotransformation chez l'homme et mesure du pouvoir cytotoxique des cucurbitacines sur une lignée cellulaire de chondrosarcome humain.* Elle est première auteure de la référence 9 de ma production scientifique.

-Xu YANG. Thèse de Sciences soutenue en 2017. *La consommation tabagique comme facteur de risque environnemental de l'arthrose : rôle de la nicotine dans la prolifération et la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses humaines.* Il est premier auteur de la référence 4 de ma production scientifique.

5.5 Co-encadrement de thèse avec ACT (1)

-Dafné Wilhelm. Thèse soutenue le 4 Décembre 2019. Encadrée par Arnaud Bianchi et moi-même. *Utilisation du modèle cellulaire ATDC5 pour la caractérisation des mécanismes de maturation des procollagènes et de leurs relations fonctionnelles avec le processus de minéralisation matricielle.* Elle est première auteure de la référence 2 de ma production scientifique.

6 Participation à des Jurys de Thèse

Thèses d'Université :

-Suzanne ABBAS. Soutenance le 23/11/2012. Université de Lorraine. Étude des propriétés de deux séries de substances d'origine naturelle : les cucurbitacines et les parabènes : analyse de leur biotransformation chez l'homme et mesure du pouvoir cytotoxique des cucurbitacines sur une lignée cellulaire de chondrosarcome humain.

-Mathilde GUIBERT. Soutenance le 29/09/2016. Université de Lorraine. Altération du phénotype chondrocytaire : Rôle de l'homéostasie locale de facteurs modulant la balance Pi/PPi.

-Dafné WILHELM. Soutenance le 4/12/2019. Université de Lorraine. Utilisation du modèle ATDC5 pour la caractérisation des mécanismes de maturation des procollagènes et de leur relation avec le processus de minéralisation matricielle.

Thèse de Médecine :

-Camille DELAUNAY. Soutenance le 14/06/2011. Université de Lorraine. INTÉRÊT DE L'ANALYSE DU NIVEAU D'EXPRESSION DE C1CP ET C2CP PAR TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHIMIQUE POUR LE DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL ENTRE CHONDROME ET CHONDROSARCOME.

7 Production Scientifique (* auteur correspondant)

19 publications dans des journaux à comité de lecture dont 11 en rang utile

Selon le JCR, 353 citations, H-index 10

Les quartiles indiqués sont ceux de l'année de publication selon le JCR.

- 1 (Q1) **A versatile strategy to synthesize N-methyl-anthranilic acid-labelled glycoprobes for fluorescence-based screening assays.** Bertin-Jung I , Robert A , Ramalanjaona N , Gulberti S , Bui C , Vincourt JB , Ouzzine M , Jacquinet JC , Lopin-Bon C , Fournel-Gigleux S . Chem Commun (Camb). 2020 Sep 15;56(73):10746-10749. doi: 10.1039/d0cc03882b. PMID: 32789356. Q1
- 2 (Q2) **ATDC5 cells as a model of cartilage extracellular matrix neosynthesis, maturation and assembly.** Wilhelm D, Kempf H, Bianchi A, Vincourt JB*. J Proteomics. 2020 May 15;219:103718. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103718. PMID: 32097723
- 3 (Q1) **Label-free relative quantification of secreted proteins as a non-invasive method for the quality control of chondrogenesis in bioengineered substitutes for cartilage repair.** Henrionnet C, Gillet P, Mainard D, Vincourt JB*, Pinzano A. Tissue Eng Regen Med. 2018 Mar;12(3):e1757-e1766. doi: 10.1002/term.2454. PMID: 28485490
- 4 (Q4) **Effect of nicotine on the proliferation and chondrogenic differentiation of the human Wharton's jelly mesenchymal stem cells.** Yang X, Qi Y, Avercenc-Leger L, Vincourt JB, Hupont S, Huselstein C, Wang H, Chen L, Magdalou J. Biomed Mater Eng. 2017;28(s1):S217-S228. doi: 10.3233/BME-171644. PMID: 28372298
- 5 (Q3) **Albumin as a carrier for NO delivery: preparation, physicochemical characterization, and interaction with gold nanoparticles.** Luo M, Boudier A, Pallotta A, Maincent P, Vincourt JB, Leroy P. Drug Dev Ind Pharm. 2016 Dec;42(12):1928-1937. doi: 10.1080/03639045.2016.1182546. PMID: 27126574
- 6 (Q2) **In malignant cartilagenous tumors, immunohistochemical expression of procollagen PC1CP peptide is higher and that of PC2CP lower than in benign cartilaginous lesions.** Delaunay-Lemarie C, Vincourt JB, Marie B, Battaglia-Hsu SF, Etienne S, Sirveaux F, Nguyen Thi PL, Magdalou J, Vignaud JM, Gauchotte G. Virchows Arch. 2015 Sep;467(3):329-37. doi: 10.1007/s00428-015-1799-3. PMID: 26100916
- 7 (Q1) **Label-free relative quantification applied to LC-MALDI acquisition for rapid analysis of chondrocyte secretion modulation.** Riffault M, Moulin D, Grossin L, Mainard D, Magdalou J, Vincourt JB*. J Proteomics. 2015 Jan 30;114:263-73. doi: 10.1016/j.jprot.2014.10.026. PMID: 25464362
- 8 (Q2) **Chondrocalcin is internalized by chondrocytes and triggers cartilage destruction via an interleukin-1 β -dependent pathway.** Bantsimba-Malanda C, Cottet J, Netter P, Dumas D, Mainard D, Magdalou J, Vincourt JB*. Matrix Biol. 2013 Oct-Nov;32(7-8):443-51. doi: 10.1016/j.matbio.2013.06.002. PMID: 23851124
- 9 (Q1) **The cucurbitacins E, D and I: investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver.** Abbas S, Vincourt JB, Habib

L, Netter P, Greige-Gerges H, Magdalou J. *Toxicol Lett.* 2013 Feb 4;216(2-3):189-99. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.11.014. PMID: 23194827

10 (Q2) **Matrilin-3 switches from anti- to pro-anabolic upon integration to the extracellular matrix.** Vincourt JB*, Etienne S, Grossin L, Cottet J, Bantsimba-Malanda C, Netter P, Mainard D, Libante V, Gillet P, Magdalou J. *Matrix Biol.* 2012 Jun;31(5):290-8. doi: 10.1016/j.matbio.2012.03.004. PMID: 22521401.

11 (Q1) **Measurement of matrilin-3 levels in human serum and synovial fluid using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay.** Vincourt JB*, Gillet P, Rat AC, Guillemin F, Netter P, Mainard D, Magdalou J. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012 Jul;20(7):783-6. doi: 10.1016/j.joca.2012.03.017. Epub 2012 Mar 30. PMID: 22469847 No abstract available.

12 (Q1) **Alternative for anti-TNF antibodies for arthritis treatment.** Paquet J, Henrionnet C, Pinzano A, Vincourt JB, Gillet P, Netter P, Chary-Valckenaere I, Loeuille D, Pourel J, Grossin L. *Mol Ther.* 2011 Oct;19(10):1887-95. doi: 10.1038/mt.2011.156. PMID: 21811249

13 (Q1) **C-propeptides of procollagens I alpha 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration.** Vincourt JB*, Etienne S, Cottet J, Delaunay C, Malanda CB, Lionneton F, Sirveaux F, Netter P, Plénat F, Mainard D, Vignaud JM, Magdalou J. *Cancer Res.* 2010 Jun 1;70(11):4739-48. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0046. PMID: 20460531

14 (Q1) **Increased expression of matrilin-3 not only in osteoarthritic articular cartilage but also in cartilage-forming tumors, and down-regulation of SOX9 via epidermal growth factor domain 1-dependent signaling.** Vincourt JB*, Vignaud JM, Lionneton F, Sirveaux F, Kawaki H, Marchal S, Lomazzi S, Plénat F, Guillemin F, Netter P, Takigawa M, Mainard D, Magdalou J. *Arthritis Rheum.* 2008 Sep;58(9):2798-808. doi: 10.1002/art.23761. PMID: 18759284

15 (Q1) **Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage.** Vincourt JB*, Lionneton F, Kratassiouk G, Guillemin F, Netter P, Mainard D, Magdalou J. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Oct;5(10):1984-95. doi: 10.1074/mcp.T600007-MCP200. PMID: 16684764

16 (Q1) **Molecular and functional characterization of SLC26A11, a sodium-independent sulfate transporter from high endothelial venules.** Vincourt JB, Jullien D, Amalric F, Girard JP. *FASEB J.* 2003 May;17(8):890-2. doi: 10.1096/fj.02-0787fje. PMID: 12626430

17 (Q1) **Molecular cloning of SLC26A7, a novel member of the SLC26 sulfate/anion transporter family, from high endothelial venules and kidney.** Vincourt JB, Jullien D, Kossida S, Amalric F, Girard JP. *Genomics.* 2002 Feb;79(2):249-56. doi: 10.1006/geno.2002.6689. PMID: 11829495

18 (Q1) **Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in Escherichia coli.** Péral K, Capioux H, Vincourt JB, Louarn JM, Sherratt DJ, Cornet F. *Mol Microbiol.* 2001 Feb;39(4):904-13. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02277.x. PMID: 11251811

19 (Q1) **Nuclear localization of PAPS synthetase 1: a sulfate activation pathway in the nucleus of eukaryotic cells.** Besset S, Vincourt JB, Amalric F, Girard JP. *FASEB J.* 2000 Feb;14(2):345-54. doi: 10.1096/fasebj.14.2.345. PMID: 10657990

8 Rayonnement Scientifique

8.1 Expertises Scientifiques

8.1.1 Comités de suivi de thèse :

-CST de 1^{ère} et 2^{ème} année de Kevin CARASCO, école doctorale BioSE, Nancy, soutenue en 2018.

-CST de 1^{ère} et 2^{ème} année (en 2020 et 2021) de Mouna AMBLI, école doctorale SMRE, Lille.

8.1.2 Evaluation d'articles :

2 à 4 annuellement, principalement dans les revues Proteomics (IF 3,1), Journal of Proteomics (IF 3,5), Journal of Tissue engineering (IF 3,6), Matrix biology (IF 7,0), Matrix biology plus.

8.2 Implication dans des Réseaux Scientifiques

-Membre de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP) depuis 2018.

-Membre de la Société Française de la Matrice Extracellulaire (SFBMec) depuis 2018.

-Participation à la feuille de route pour la protéomique, sous l'égide de l'Infrastructure Française de Protéomique.

9 Responsabilités scientifiques et administratives liées à la Recherche

9.1 Rédaction, Coordination et Participation à des Projets Scientifiques

La liste suivante présente par ordre chronologique les différents projets dans lesquels je suis/étais impliqué en tant que rédacteur significatif et/ou coordinateur. Les financements de projet que j'ai obtenus ou participé à obtenir sont indiqués en **bleu** et ceux dont j'étais coordinateur sont indiqués par *****.

-Contrat short term Human Frontier Science Programm, Octobre 2004-Février 2005 (20 k€)*. Lors de mon retour en France, afin de prolonger les efforts de caractérisation de l'interaction fonctionnelle de Moesin avec Y14 (partie 3.2.2), nous avons financé mon travail à l'EMBL d'Heidelberg grâce au programme Human Frontier au travers d'un projet collaboratif.

-Contrat post-doctoral de l'Association pour la Recherche contre le Cancer sur la caractérisation différentielle protéomique des chondrosarcomes, Avril 2005-Mars 2008 (65 k€). Mon arrivée à Nancy et dans un des laboratoires dont est issu mon actuel laboratoire a été financée dans ce cadre. C'est ce travail (§ 2.1) qui a largement contribué au développement de la plupart des projets que je développe depuis.

-Projet « Caractérisation fonctionnelle des carboxypeptides des procollagènes de type I et II dans le phénotype des tumeurs cartilagineuses », financé par la Fondation pour la recherche Médicale, Septembre 2010-Aout 2012 (250 k€). Ce projet a notamment financé le recrutement de Claudie Bantsimba-Malanda comme post-doctorante (§ 2.2).

-Projet ANR blanc 2014, C-pro, « NEW FUNCTIONS OF THE PROCOLLAGEN C-PROPEPTIDES IN ARTICULAR DEGENERATIVE DISEASE: A STRUCTURAL AND CELL BIOLOGY APPROACH ». A l'issue des travaux relatifs aux fonctions de signalisation des CPs, David Hulmes, alors directeur de l'équipe « Métalloprotéases et Remodelage tissulaire » du LTBI, UMR5305 à Lyon et spécialiste au long court des collagènes, a proposé que nous collaborions, notamment à travers un projet ANR blanc.

-Projet « Régulation du remodelage matriciel par l'interaction entre la Lysyl Oxidase et les propeptides carboxy-terminaux des procollagènes : Vers le mécanisme central du rôle pro-cancéreux et pro-métastatique de la LOX* », financé par la Ligue Régionale contre le Cancer, Septembre 2015-Aout 2016 (28 k€). Ce projet a initié nos travaux sur les interactions fonctionnelles différentielles des CPs (partie 5.1).

-Les évolution du projet C-pro, respectivement C-pro-seed et COL-HEDGE ont été soumises en 2015 et 2016 à l'ANR blanc*.

-Projet Région Grand-Est HRMS-INFECT d'études protéomiques basées sur la spectrométrie de masse haute résolution dans le domaine de l'infectiologie, porté par Sarah CIANFERANI, IPHC, Strasbourg (1470 k€).

-Projet GLYCOLINK soumis à l'ANR blanc en 2021, « Deciphering Glycosyltransferases complexes orchestrating glycosaminoglycan-Linker assembly ».

-Projet de valorisation FIBRINHIB* de valorisation d'une stratégie d'anticorps anti-fibrotiques, financé par SAYENS sur 2021-2022 (175 k€ renouvelables).

9.2 Participation à l'Obtention d'un Contrat Doctoral

Après avoir encadré Dafné WILHELM en M2, Arnaud BIANCHI (IR, HDR IMoPA) et moi-même avons eu l'opportunité, avec le soutien de l'équipe 4 et de la direction de l'Unité, de la présenter au concours de l'école doctorale BioSE en 2016 en vue de l'attribution des contrats doctoraux. Le projet a été positivement évalué et Dafné a défendu ce projet avec maîtrise, lui permettant d'obtenir une bourse de thèse débutée en Octobre 2016 et soutenue le 4 Décembre 2019, que j'ai eu la chance de co-encadrer avec Autorisation de Co-encadrer une Thèse.

9.3 Comités de Recrutements de Personnels en CDI

-En 2018, Président de jury des concours internes CNRS pour l'accession au corps des IE n°811 et 812 (au total 16 postes à pourvoir en BAP A).

-En 2020, Président du jury du concours CNRS n°6 d'accès au corps des IR en BAP A.

9.4 Jurys d'attribution de subventions d'équipement

-En 2019, membre du Jury d'attribution des subventions d'équipement du Plan Cancer.

-En 2021, membre du Jury d'attribution des subventions d'équipement de l'ITMO Cancer.

9.5 Autres Responsabilités Scientifiques et Administratives

-Depuis 2012, directeur technique et scientifique de la plateforme de protéomique de la FR3209, puis de l'UMS 2008 IBSLor.

10 Bibliographie

- 1 Maly, P. *et al.* The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* **86**, 643-653, doi:10.1016/s0092-8674(00)80137-3 (1996).
- 2 Besset, S., Amalric, F. & Girard, J. P. La sulfatation : un rôle clé dans le contrôle des interactions entre leucocytes et endothélium au cours de l'inflammation. *Médecine thérapeutique* **7**, 82-87 (2001).
- 3 Andrews, P., Ford, W. L. & Stoddart, R. W. Metabolic studies of high-walled endothelium of postcapillary venules in rat lymph nodes. *Ciba Found Symp* **71**, 211-230, doi:10.1002/9780470720547.ch12 (1980).
- 4 Girard, J. P., Baekkevold, E. S., Feliu, J., Brandtzaeg, P. & Amalric, F. Molecular cloning and functional analysis of SUT-1, a sulfate transporter from human high endothelial venules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12772-12777, doi:10.1073/pnas.96.22.12772 (1999).
- 5 Vincourt, J. B., Jullien, D., Kossida, S., Amalric, F. & Girard, J. P. Molecular cloning of SLC26A7, a novel member of the SLC26 sulfate/anion transporter family, from high endothelial venules and kidney. *Genomics* **79**, 249-256, doi:10.1006/geno.2002.6689 (2002).
- 6 Vincourt, J. B., Jullien, D., Amalric, F. & Girard, J. P. Molecular and functional characterization of SLC26A11, a sodium-independent sulfate transporter from high endothelial venules. *FASEB J* **17**, 890-892, doi:10.1096/fj.02-0787fje (2003).
- 7 Girard, J. P., Baekkevold, E. S. & Amalric, F. Sulfation in high endothelial venules: cloning and expression of the human PAPS synthetase. *FASEB J* **12**, 603-612, doi:10.1096/fasebj.12.7.603 (1998).
- 8 Besset, S., Vincourt, J. B., Amalric, F. & Girard, J. P. Nuclear localization of PAPS synthetase 1: a sulfate activation pathway in the nucleus of eukaryotic cells. *FASEB J* **14**, 345-354, doi:10.1096/fasebj.14.2.345 (2000).
- 9 Brown, M. J., Hallam, J. A., Liu, Y., Yamada, K. M. & Shaw, S. Cutting edge: integration of human T lymphocyte cytoskeleton by the cytolinker plectin. *J Immunol* **167**, 641-645, doi:10.4049/jimmunol.167.2.641 (2001).
- 10 Brown, M. J. *et al.* Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood* **102**, 3890-3899, doi:10.1182/blood-2002-12-3807 (2003).
- 11 Wang, C. K., Pan, L., Chen, J. & Zhang, M. Extensions of PDZ domains as important structural and functional elements. *Protein Cell* **1**, 737-751, doi:10.1007/s13238-010-0099-6 (2010).
- 12 Carreno, S. *et al.* Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J Cell Biol* **180**, 739-746, doi:10.1083/jcb.200709161 (2008).
- 13 Hachet, O. & Ephrussi, A. Drosophila Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Curr Biol* **11**, 1666-1674, doi:10.1016/s0960-9822(01)00508-5 (2001).

- 14 Jankovics, F., Sinka, R., Lukacsovich, T. & Erdelyi, M. MOESIN crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocytes and is required for OSKAR anchoring. *Curr Biol* **12**, 2060-2065, doi:10.1016/s0960-9822(02)01256-3 (2002).
- 15 Aigner, T. Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton--biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants. *Virchows Arch* **441**, 219-230, doi:10.1007/s00428-002-0641-x (2002).
- 16 Rozeman, L. B., Hogendoorn, P. C. & Bovee, J. V. Diagnosis and prognosis of chondrosarcoma of bone. *Expert Rev Mol Diagn* **2**, 461-472, doi:10.1586/14737159.2.5.461 (2002).
- 17 Bovee, J. V., Cleton-Jansen, A. M., Taminiau, A. H. & Hogendoorn, P. C. Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. *Lancet Oncol* **6**, 599-607, doi:10.1016/S1470-2045(05)70282-5 (2005).
- 18 Vincourt, J. B. *et al.* Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1984-1995, doi:10.1074/mcp.T600007-MCP200 (2006).
- 19 Vincourt, J. B. *et al.* Increased expression of matrilin-3 not only in osteoarthritic articular cartilage but also in cartilage-forming tumors, and down-regulation of SOX9 via epidermal growth factor domain 1-dependent signaling. *Arthritis Rheum* **58**, 2798-2808, doi:10.1002/art.23761 (2008).
- 20 Deak, F., Wagener, R., Kiss, I. & Paulsson, M. The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* **18**, 55-64, doi:10.1016/s0945-053x(98)00006-7 (1999).
- 21 Klatt, A. R. *et al.* Molecular structure and tissue distribution of matrilin-3, a filament-forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development. *J Biol Chem* **275**, 3999-4006, doi:10.1074/jbc.275.6.3999 (2000).
- 22 Budde, B. *et al.* Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Mol Cell Biol* **25**, 10465-10478, doi:10.1128/MCB.25.23.10465-10478.2005 (2005).
- 23 Pullig, O., Weseloh, G., Klatt, A. R., Wagener, R. & Swoboda, B. Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 253-263, doi:10.1053/joca.2001.0508 (2002).
- 24 Vincourt, J. B. *et al.* Measurement of matrilin-3 levels in human serum and synovial fluid using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Osteoarthritis Cartilage* **20**, 783-786, doi:10.1016/j.joca.2012.03.017 (2012).
- 25 Vincourt, J. B. *et al.* C-propeptides of procollagens I alpha 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration. *Cancer Res* **70**, 4739-4748, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0046 (2010).
- 26 Delaunay-Lemarie, C. *et al.* In malignant cartilagenous tumors, immunohistochemical expression of procollagen PC1CP peptide is higher and that of PC2CP lower than in benign cartilaginous lesions. *Virchows Arch* **467**, 329-337, doi:10.1007/s00428-015-1799-3 (2015).
- 27 Poole, A. R., Pidoux, I., Reiner, A., Choi, H. & Rosenberg, L. C. Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation. *J Cell Biol* **98**, 54-65, doi:10.1083/jcb.98.1.54 (1984).

- 28 Canty, E. G. *et al.* Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *J Cell Biol* **165**, 553-563, doi:10.1083/jcb.200312071 (2004).
- 29 Bantsimba-Malanda, C. *et al.* Chondrocalcin is internalized by chondrocytes and triggers cartilage destruction via an interleukin-1beta-dependent pathway. *Matrix Biol* **32**, 443-451, doi:10.1016/j.matbio.2013.06.002 (2013).
- 30 Hayata, T., Nakamoto, T., Ezura, Y. & Noda, M. Ciz, a transcription factor with a nucleocytoplasmic shuttling activity, interacts with C-propeptides of type I collagen. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 205-210, doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.040 (2008).
- 31 Vincourt, J. B. *et al.* Matrilin-3 switches from anti- to pro-anabolic upon integration to the extracellular matrix. *Matrix Biol* **31**, 290-298, doi:10.1016/j.matbio.2012.03.004 (2012).
- 32 Connolly, P. F., Jager, R. & Fearnhead, H. O. New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol* **5**, 149, doi:10.3389/fphys.2014.00149 (2014).
- 33 Lai, E., Teodoro, T. & Volchuk, A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* **22**, 193-201, doi:10.1152/physiol.00050.2006 (2007).
- 34 Hulmes, D. J. S. Roles of the procollagen C-propeptides in health and disease. *Essays Biochem* **63**, 313-323, doi:10.1042/EBC20180049 (2019).
- 35 Vadon-Le Goff, S. *et al.* Procollagen C-proteinase enhancer stimulates procollagen processing by binding to the C-propeptide region only. *J Biol Chem* **286**, 38932-38938, doi:10.1074/jbc.M111.274944 (2011).
- 36 Bourhis, J. M. *et al.* Procollagen C-proteinase enhancer grasps the stalk of the C-propeptide trimer to boost collagen precursor maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6394-6399, doi:10.1073/pnas.1300480110 (2013).
- 37 Pulido, D. *et al.* Structural Basis for the Acceleration of Procollagen Processing by Procollagen C-Proteinase Enhancer-1. *Structure* **26**, 1384-1392 e1383, doi:10.1016/j.str.2018.06.011 (2018).
- 38 Steiglitz, B. M. *et al.* Procollagen C proteinase enhancer 1 genes are important determinants of the mechanical properties and geometry of bone and the ultrastructure of connective tissues. *Mol Cell Biol* **26**, 238-249, doi:10.1128/MCB.26.1.238-249.2006 (2006).
- 39 Riffault, M. *et al.* Label-free relative quantification applied to LC-MALDI acquisition for rapid analysis of chondrocyte secretion modulation. *J Proteomics* **114**, 263-273, doi:10.1016/j.jprot.2014.10.026 (2015).
- 40 Henrionnet, C., Gillet, P., Mainard, D., Vincourt, J. B. & Pinzano, A. Label-free relative quantification of secreted proteins as a non-invasive method for the quality control of chondrogenesis in bioengineered substitutes for cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med* **12**, e1757-e1766, doi:10.1002/term.2454 (2018).
- 41 Wilhelm, D., Kempf, H., Bianchi, A. & Vincourt, J. B. ATDC5 cells as a model of cartilage extracellular matrix neosynthesis, maturation and assembly. *J Proteomics* **219**, 103718, doi:10.1016/j.jprot.2020.103718 (2020).
- 42 Peterkofsky, B. & Udenfriend, S. Conversion of Proline to Collagen Hydroxyproline in a Cell-Free System from Chick Embryo. *J Biol Chem* **238**, 3966-3977 (1963).

- 43 Peterkofsky, B., Kalwinsky, D., Chauhan, U., Prather, W. & Assad, R. Regulation of prolyl hydroxylase activity in L-929 cells by mechanisms unrelated to glycolytic metabolism. *Coll Relat Res* **4**, 365-376, doi:10.1016/s0174-173x(84)80004-7 (1984).
- 44 Parsons, K. K., Maeda, N., Yamauchi, M., Banes, A. J. & Koller, B. H. Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E1131-1139, doi:10.1152/ajpendo.00339.2005 (2006).
- 45 Cossu, V. *et al.* Two high-rate pentose-phosphate pathways in cancer cells. *Sci Rep* **10**, 22111, doi:10.1038/s41598-020-79185-2 (2020).
- 46 Li, J. *et al.* Hexose-6-phosphate dehydrogenase blockade reverses prostate cancer drug resistance in xenograft models by glucocorticoid inactivation. *Sci Transl Med* **13**, doi:10.1126/scitranslmed.abe8226 (2021).
- 47 D'Aniello, C. *et al.* Collagen Prolyl Hydroxylation-Dependent Metabolic Perturbation Governs Epigenetic Remodeling and Mesenchymal Transition in Pluripotent and Cancer Cells. *Cancer Res* **79**, 3235-3250, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2070 (2019).
- 48 Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* **18**, 1028-1040, doi:10.1038/nm.2807 (2012).
- 49 Eyre, D. R., Weis, M. A. & Wu, J. J. Advances in collagen cross-link analysis. *Methods* **45**, 65-74, doi:10.1016/j.ymeth.2008.01.002 (2008).
- 50 Malfait, F. *et al.* The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **175**, 8-26, doi:10.1002/ajmg.c.31552 (2017).
- 51 Delbaere, S. *et al.* b3galt6 Knock-Out Zebrafish Recapitulate beta3GalT6-Deficiency Disorders in Human and Reveal a Trisaccharide Proteoglycan Linkage Region. *Front Cell Dev Biol* **8**, 597857, doi:10.3389/fcell.2020.597857 (2020).
- 52 Van Damme, T. *et al.* Biallelic B3GALT6 mutations cause spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mol Genet* **27**, 3475-3487, doi:10.1093/hmg/ddy234 (2018).
- 53 Iftikhar, M. *et al.* Lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) is a major isoform in chondrocytes and is critically required for differentiation. *J Biol Chem* **286**, 909-918, doi:10.1074/jbc.M110.155622 (2011).
- 54 Ito, H. *et al.* Molecular cloning and biological activity of a novel lysyl oxidase-related gene expressed in cartilage. *J Biol Chem* **276**, 24023-24029, doi:10.1074/jbc.M100861200 (2001).
- 55 Moali, C. *et al.* Substrate-specific modulation of a multisubstrate proteinase. C-terminal processing of fibrillar procollagens is the only BMP-1-dependent activity to be enhanced by PCPE-1. *J Biol Chem* **280**, 24188-24194, doi:10.1074/jbc.M501486200 (2005).
- 56 Koivu, J. *et al.* A single polypeptide acts both as the beta subunit of prolyl 4-hydroxylase and as a protein disulfide-isomerase. *J Biol Chem* **262**, 6447-6449 (1987).
- 57 Wilson, R., Lees, J. F. & Bulleid, N. J. Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *J Biol Chem* **273**, 9637-9643, doi:10.1074/jbc.273.16.9637 (1998).
- 58 Nardai, G. *et al.* Protein-disulfide isomerase- and protein thiol-dependent dehydroascorbate reduction and ascorbate accumulation in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **276**, 8825-8828, doi:10.1074/jbc.M010563200 (2001).
- 59 Margittai, E., Enyedi, B., Csala, M., Geiszt, M. & Banhegyi, G. Composition of the redox environment of the endoplasmic reticulum and sources of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **83**, 331-340, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.032 (2015).

- 60 Eyre, D. R. & Weis, M. A. Bone collagen: new clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta. *Calcif Tissue Int* **93**, 338-347, doi:10.1007/s00223-013-9723-9 (2013).
- 61 Eyre, D. R., Weis, M., Hudson, D. M., Wu, J. J. & Kim, L. A novel 3-hydroxyproline (3Hyp)-rich motif marks the triple-helical C terminus of tendon type I collagen. *J Biol Chem* **286**, 7732-7736, doi:10.1074/jbc.C110.195768 (2011).
- 62 Pozzer, D. *et al.* Endoplasmic Reticulum Oxidative Stress Triggers Tgf-Beta-Dependent Muscle Dysfunction by Accelerating Ascorbic Acid Turnover. *Sci Rep* **7**, 40993, doi:10.1038/srep40993 (2017).
- 63 Carne, N. A. *et al.* Reductive Stress Selectively Disrupts Collagen Homeostasis and Modifies Growth Factor-independent Signaling Through the MAPK/Akt Pathway in Human Dermal Fibroblasts. *Mol Cell Proteomics* **18**, 1123-1137, doi:10.1074/mcp.RA118.001140 (2019).
- 64 Kim, S. I. *et al.* Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)-beta1. *J Biol Chem* **287**, 11677-11688, doi:10.1074/jbc.M111.308460 (2012).
- 65 Nakamura, T. *et al.* Autophagy facilitates type I collagen synthesis in periodontal ligament cells. *Sci Rep* **11**, 1291, doi:10.1038/s41598-020-80275-4 (2021).

Résumé :

Les collagènes fibrillaires, principaux constituants organiques des vertébrés, constituent l'armature des matrices extracellulaires et déterminent largement les propriétés mécaniques des tissus conjonctifs. Leur élaboration est le siège de nombreuses pathologies développementales, mais aussi du vieillissement dans la plupart des tissus.

Les collagènes sont synthétisés à partir de précurseurs polypeptidiques subissant un nombre inégalé de modifications post-traductionnelles, les unes, ubiquitaires, essentielles à l'assemblage en un réseau fibrillaire, les autres, tissu-spécifiques, déterminant les propriétés mécaniques du réseau résultant.

Ma formation de biologiste cellulaire, puis mes travaux en analyse protéomique m'ont amené à étudier les fonctions non architecturales (notamment, de signalisation) des protéines de la matrice extracellulaire et en particulier des propeptides carboxy-terminaux des procollagènes fibrillaires. Au cours de la dernière décennie, à la lumière de l'intrication de ces fonctions dans le processus de maturation des collagènes, j'ai développé des outils analytiques intégrant phénotype cellulaire et maturation des collagènes, basés sur la spectrométrie de masse. Mes travaux ont balayé très largement les différentes étapes de la maturation des collagènes. J'ai abordé des aspects encore négligés de la maturation des collagènes et des rôles ambivalents des protéines matricielles, soulevant de nouvelles hypothèses fonctionnelles et mécanistiques liées à la pathologie. J'ai adapté un modèle cellulaire à l'étude des mécanismes de cette maturation.

Je propose dans les années qui viennent d'utiliser cet arsenal d'outils, d'approches et d'hypothèses argumentées pour mieux décrire à la fois la complexité des modifications chimiques des collagènes et les mécanismes détaillés qui les régissent, de la coordination des acteurs moléculaires directs au métabolisme au sens le plus général. Ces travaux pourraient ouvrir ou affiner des voies thérapeutiques, notamment dans le contexte des pathologies fibrotiques.