



HAL
open science

MECANISMES ENZYMATIQUES & ENVIRONNEMENTS MATRICELS ADAPTES POUR LA REPARATION/REGENERATION TISSULAIRE

Mourad Bekhouche

► **To cite this version:**

Mourad Bekhouche. MECANISMES ENZYMATIQUES & ENVIRONNEMENTS MATRICELS ADAPTES POUR LA REPARATION/REGENERATION TISSULAIRE. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université clude Bernard Lyon 1, 2023. tel-04920732

HAL Id: tel-04920732

<https://hal.science/tel-04920732v1>

Submitted on 30 Jan 2025

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.

ANNEE 2023

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES (HDR)

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1

Soutenue publiquement à Lyon le 24 juillet 2023

**TITRE : MECANISMES ENZYMATIQUES &
ENVIRONNEMENTS MATRICELS ADAPTES POUR
LA REPARATION/REGENERATION TISSULAIRE**

BEKHOUCHE Mourad

(PhD, MCF Biochimie et biologie moléculaire)

Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique

LBTI – UMR CNRS 5305

UFR Biosciences – Université Lyon 1

Membres du Jury :

Pr. BOUKPESSI Tchilalo (PU-PH, Université Paris Descartes) - Rapporteur

Pr. CHAUSSAIN Catherine (PU-PH, Université Paris Descartes) - Rapporteur

Pr. DUCRET Maxime (PU-PH, Université Lyon 1)

Dr. LE FLOCH-LELEU Nathalie (MCF, Université de Versailles Saint-Quentin-En-Yvelines)

Dr. MALLEIN-GERIN Frédéric (DR CNRS, Université Lyon 1)

Dr. MULLER Laurent (CRCN INSERM, Collège de France) - Rapporteur

Dr. ROUSSELLE Patricia (DR CNRS, Université Lyon 1)

TABLE DES MATIERES

Résumé du parcours professionnel	1
CV	3
I. INTRODUCTION	9
I. 1. LES ENZYMES	11
I. 1. A. Définition et propriétés	11
I. 1.b. Les enzymes en biocatalyse	12
I. 1.c. Réactions biocatalysées en liquides ioniques	13
I. 1.d. Réactions biocatalysées en biologie/physiologie	14
I. 2. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	15
I. 2. a. Les collagènes	15
I. 2. b. Les protéoglycanes	21
I. 2. c. Les glycoprotéines	23
I. 2. d. Les métalloprotéases	27
I. 3. ENVIRONNEMENTS MATRICIELS & INGENIERIE TISSULAIRE	33
I. 3. a. Contexte	33
I. 3. b. La pulpe dentaire	34
I. 3. c. Les pulpites réversibles et irréversibles	35
I. 3. d. Conséquences de la carie dentaire en santé publique	36
I. 3. e. Stratégies thérapeutiques pour le soin de la carie dentaire	37
I. 3. f. Les cellules souches de la pulpe dentaire	38
I. 3. g. La fibrine : une matrice 3D bioinspirée de choix pour les PRE	39
II. PROJETS DE RECHERCHE	43
II. 1. LES DESHYDROGENASES EN BIOCATALYSE	45
II. 1. a. Mécanisme d'inhibition de la FDH en liquide ioniques	45
II. 1. b. Modifications chimiques et évolution dirigées de la FDH	46
II. 1. c. Valorisation du projet de thèse et perspectives	49
II. 2. LES ADAMTS DANS LA FORMATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	51
II. 2. a. Identification des substrats des ADAMTS2, 3 et 14 <i>in vitro</i>	51
II. 2. b. Identification des substrats des ADAMTS2, 3 et 14 <i>in vivo</i>	55
II. 2. c. Valorisation du projet de post-doctorat et perspectives	58
II. 3. LES SIDEROFLEXINES	99
II. 1. a. Identification des partenaires d'interaction par coIP-MS	99
II. 3. b. Valorisation du projet d'ATER et perspectives	101
II. 3. ENVIRONNEMENTS MATRICIELS & L'INGENIERIE TISSULAIRE	105
II. 3. a. Contexte	105
II. 3. b. Développement d'un hydrogel antibactérien	106
II. 3. c. Développement d'hydrogels : conclusion et perspectives	115
II. 3. d. Mécanismes biomoléculaires initiés par les CSM en gel de fibrine.	116
II. 3. e. Valorisation du projet de recherche actuel	145
III. Conclusion et perspectives	147

RESUME DU PARCOURS PROFESSIONNEL

Les enzymes jouent un rôle primordial dans le remodelage physiopathologique du vivant notamment via la biocatalyse de modifications post-traductionnelles telle que la protéolyse. Leurs activités/fonctions sont intimement et réciproquement liées à leur environnement ; qu'il soit naturel (matrice extracellulaire, cellules) ou biomimétique (hydrogels, biomatériaux).

Lors d'une thèse en **enzymologie** appliquée à la biocatalyse, la relation structure/fonction d'une déshydrogénase a été étudiée dans un milieu non conventionnel ; les liquides ioniques (LIs) (Lyon, ICBMS, UMR CNRS 5246). Ces travaux ont permis de mieux comprendre l'influence de ces milieux dit "verts" sur l'activité enzymatique de type déshydrogénase.

Dans le domaine de la **matrice extracellulaire**, les fonctions des procollagènes N-protéinases (ADAMTS2, 3 et 14), participant à la maturation des collagènes fibrillaires, ont été étudiées par une méthode de **protéomique** spécifiquement adaptée à la protéolyse (N-terminomique) (LBTC, institut GIGA, Université de Liège, Belgique). Ces travaux ont conduit à l'identification de nombreux substrats autres que les collagènes fibrillaires, *in vitro* et *in vivo*, pour les ADAMTS2, 3 et 14 ^[1-2]. Ces études ont repoussé le dogme restreignant l'activité des procollagène N-protéinases aux collagènes fibrillaires et ouvert la possibilité de clivage de substrats impliqués dans la signalisation cellulaire, telle que la signalisation du TGF-beta.

Afin d'enrichir mon expertise en protéomique et avoir une expérience d'enseignement, des études d'**interactomique** ont été menées dans le cadre d'un ATER à l'Université de Versailles Saint-Quentin-En-Yvelines. Ces recherches ont conduit à l'identification de nouveaux partenaires d'interactions de protéines peu connues de la membrane interne des mitochondries : les sideroflexines (SFXNs). Ces interactions ont été validées par différents tests et notamment *in cellulo* (test de ligature de proximité).

Les recherches menées depuis 2018 au sein de l'équipe de Recherche Ostéoarticulaire et Dentaire (ROAD) du Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique (LBTI, UMR CNRS 5305) visent à étudier les **mécanismes enzymatiques** et à élaborer des **environnements matriciels** afin de conditionner la formation de tissus fonctionnels. Ces travaux ont pour modèle la régénération du tissu conjonctif vivant de la dent, la **pulpe dentaire (PD)**. Dans ce contexte, les procédures régénératives endodontiques (PRE), notamment celles basées sur l'utilisation d'un environnement matriciel associé à des cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire (CSM-PD), sont proposées pour le traitement des infections carieuses irréversibles. Cependant, les environnements matriciels proposés ne permettent pas de produire une PD entièrement fonctionnelle en raison du manque d'asepsie et du manque de contrôle des mécanismes de régénération tissulaire qui restent encore mal compris. Un hydrogel antibactérien à base de fibrine a été développé afin de constituer un environnement aseptique pour favoriser la régénération au sein de la dent préalablement infectée ^[4]. En parallèle de ces recherches, des études sont menées afin de mieux comprendre les mécanismes biomoléculaires initiés par les CSM conduisant au remplacement du biomatériau de fibrine par une PD humaine fonctionnelle. Ces investigations utilisent des approches à large spectre (**multi-omiques**) et s'intéressent plus particulièrement aux événements protéolytiques conduisant à la dégradation du biomatériau ainsi qu'à la néosynthèse de matrice extracellulaire.

CV

Nom : **BEKHOUCHE** Prénom : **Mourad**

Fonction : Maître de conférences – Classe normale (section Biochimie et biologie moléculaire)

Parcours professionnel :

- **Maître de Conférences Associé** à la faculté d'Odontologie (depuis septembre 2018)
- **ATER** – Université de Versailles (2017-2018)
- **Enseignant de SVT** – Collège Notre Dame de Bellecombe (Lyon 6^{ème}) (2016-2017)
- **Post-Doc** – Université de Liège (Belgique) – LBTC (2012 – 2015)
- **Post-Doc** – Université d'Oxford (Royaume-Uni) – KIR (2011-2012).
- **Etudiant en thèse** (soutenue le 19/10/2011) – Université Lyon 1/UMR CNRS 5246 (2008-2011)

Diplômes universitaires :

- **DIU** Formation réglementaire conception des **expérimentations animales** (Niveau I - B, 2021)
- **Thèse de doctorat en Biochimie** - Université Lyon 1 (oct. 2011)
- **Master de Biochimie** – UCBL (2006 – 2008)
- **Licence de Science – Spécialité : Biochimie** – UCBL (2003-2006)

Enseignement dans le supérieur :

- UFR Biosciences (Université Lyon 1) – MCF biochimie 2022-

1^{ère} année de Licences du domaine SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE

Biochimie des protéines et des acides nucléiques (TD - 30h)

Biochimie des glucides et des lipides (TD - 30h)

2^{ème} année de Licence Parcours LAS et Biologie

Enzymologie et Métabolisme (TP – 40,5h)

2^{ème} année de Licence Parcours Biochimie

Biochimie Expérimentale 1 (TP - 28h)

Enzymologie 1 (TP - 16h)

Projets Tutorés - ProBio (TD – 7,5h)

- Faculté d'Odontologie de Lyon – MCF associé au département de biologie orale 2018-2022
- Université de Versailles Saint-Quentin-En-Yvelines – ATER 2017-2018

Encadrement doctoral et scientifique

◇ GIROLET Camille : Master 2 Biotechnologies – Université Grenoble-Alpes - 01-07/2023 (6 mois)

Objectif : Investigation des mécanismes initiés par les CSM en hydrogel de fibrine.

◇ THIERRY Sean : Master 2 Biotechnologies – Université Grenoble-Alpes - 01-07/2023 (6 mois)

Objectif : Identification des événements protéolytiques des CSM en hydrogel de fibrine.

◇ REUZEAU Alicia : Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire – Université Lyon 1 - 01-07/2012 (6 mois)

Objectif : Analyse transcriptomique des événements initiés par les CSM en hydrogel de fibrine

- ◇ TONG David : Master 2 Biotechnologies – Université Grenoble-Alpes - 01-07/2021 (6 mois)
Objectif : Analyse protéomique des évènements initiés par les CSM en hydrogel de fibrine
- ◇ ROUBACHE Amal : Master 2 Sciences du médicament – Université Lyon 1 - 01-07/2020 (6mois)
Objectif : Analyse bibliographique concernant les PER (situation sanitaire de COVID)
- ◇ DANCOURT Axelle : 2^{ème} année de BTS – La Martinière Duchère – 01-02/2020
Objectif : Préparation d'échantillons pour des analyses omiques.
- ◇ BOLON Marie : Master 2 Sciences du médicament – Université Lyon 1 - 01-07/2019 (6mois)
Objectif : développement d'un hydrogel nanocomposite antibactérien.
- ◇ COSTANTINI Arthur : Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire – Université Lyon 1 - 01-07/2019 (6 mois)
Objectif : identification des récepteurs de type intégrine participant à l'interaction CSM/fibrine.

- ◇ LEDUC Cédric : Etudiant en thèse (co-encadrement) Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques (Belgique, 2013-2016)
Objectif : Identification des substrats des ADAMTS2, 3 et 14 dans des modèles murins.
- ◇ LEVEQUE Marianne : Etudiante en thèse (co-encadrement) – Ecole doctorale "Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire" – depuis 01/2022
Objectif : Développement d'hydrogels antibactériens et caractérisation du remodelage tissulaire.

Contrats de recherche :

- ◇ Accueil Enseignant Chercheur UCBL (Coordinateur, 12 k€, 2023). Obtenu afin d'étudier les mécanismes enzymatiques de régénération tissulaire. Ce financement inclus l'achat de petit matériels et la rétribution d'un étudiant de niveau M2.
- ◇ Projet inter-équipes LBTI (partenaire, LBTI, 12 k€, 2022-2023). Obtenu entre les équipes ROAD et l'équipe "Vecteurs colloïdaux et ingénierie thérapeutique ciblée" afin de développer un hydrogel structuralement stable. Financement incluant la rétribution d'une étudiante ingénieur (niveau M1)
- ◇ ANR JCJC TRIDENTOMIC (Coordinateur, 171 k€, 2021-2024). Financement obtenu afin de réaliser l'analyse multi-omique visant à identifier les mécanismes initiés par les cellules souches en hydrogel de fibrine. Ce financement inclut la rétribution d'un assistant ingénieur (Joévin BARRIER) pour une durée de 12 mois et de deux étudiants de niveau M2.
- ◇ ANR-JCJC ENDONANOBIOTIC, 2021-2024 (Partenaire en qualité de co-encadrant, 36 mois, 275 k€). Porté par le Pr. M DUCRET et obtenu pour développer des hydrogels antibactériens incluant le financement d'une étudiante en thèse (Marianne LEVEQUE).
- ◇ Fondation de l'Avenir (Partenaire, 36 k€, 2021). Obtenu pour évaluer la diffusion et toxicité de l'hydrogel nanocomposite dans des modèles murins.
- ◇ Institut Français en Recherche Odontologique (Partenaire, IFRO, 20 k€, 2021-2023). Obtenu entre l'équipe ROAD du LBTI et le laboratoire BIOTISS (INSERM U1026, Université de Bordeaux) incluant le financement de deux étudiants M2 pour le développement d'un hydrogel associé à de la matrice extracellulaire pour la régénération pulpaire.
- ◇ Projet inter-équipes LBTI (Coordinateur, LBTI, 10 k€, 2019-2020). Obtenu pour un projet entre les équipes ROAD et l'équipe "Vecteurs colloïdaux et ingénierie thérapeutique ciblée" afin de développer un hydrogel nanocomposite aux propriétés antibactériennes. Ce financement inclut la rétribution d'une étudiante M2.

Responsabilités collectives :

- Membre du conseil de laboratoire du laboratoire de biologie tissulaire et Ingénierie thérapeutique (LBTI, UMR CNRS 5305) nommé au sein du collège B (chercheurs et enseignants-chercheurs).
- Membre du conseil d'analyse numérique CAN de la SFR Biosciences (UAR3444/US8) depuis octobre 2021.

Publications :

Les articles sont présentés par ordre chronologique et non par ordre de significativité.

- Richert R, Ducret M, Alliot-Licht B, **BEKHOUCHE M**, Gobert S & Farges J-C. A critical analysis of research methods and experimental models to study pulpitis. *International Endodontic Journal (IEJ)* 2022. doi: 10.1111/iej.13683
- Leduc C, Dupont L, Joannes L, Monseur C, Baiwir D, Mazzucchelli G, Deroanne C, Colige A and **BEKHOUCHE M**. In vivo N-terminomics highlights novel functions of ADAMTS2 and ADAMTS14 in skin collagen matrix building. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2021: **8**:643178.
- Ducret M, Costantini A, Gobert S, Farges JC, **BEKHOUCHE M**. Fibrin-based scaffolds for dental pulp regeneration: from biology to nanotherapeutics. *European Cells and Materials* 2021: **41**, p. 1-14.
- **BEKHOUCHE M**, Bolon M, Charriaud F, Lamrayah M, Da Costa D, Primard C, Costantini A, Padeloup M, Gobert S, Mallein-Gerin F, Verrier B, Ducret M, Farges JC. Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. *Journal of Materials Chemistry B* 2020: **8**(36), p. 8422-8432.
- Rosell-Garcia T., Paradela A., Bravo G., Dupont L., **BEKHOUCHE M.**, Colige A. & Rodriguez-Pascual F. Differential cleavage of lysyl oxidase by the metalloproteinases BMP1 and ADAMTS2/14 regulates collagen binding through a tyrosine sulfate domain. *The Journal of Biological Chemistry* 2019. doi: **10.1074/jbc.RA119.007806**
- **BEKHOUCHE M.**, Leduc C., Dupont L., Janssen L., Delolme F., Vadon-Le Goff S., Smargiasso N., Baiwir D., Mazzucchelli G., Zanella-Cleon I., Dubail J., De Pauw E., Nusgens B., Hulmes D.J.S., Moali C.† and Colige A.† Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3 and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF-β signaling as primary targets. *The FASEB Journal* 2016: **30**(5), p. 1741-1756.
- Janssen L., Dupont L., **BEKHOUCHE M.**, Noel A., Leduc C., Voz M., Peers B., Cataldo D., Apte S., Dubail J., Colige A. ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. *Angiogenesis (AGEN)* 2016: **19** (1), p. 53-65.
- **BEKHOUCHE M.** & Colige A. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biology* 2015: **44-46**, p. 46-53. (Review).
- Carter J.L.L.*, **BEKHOUCHE M.***, Noiriél A., Blum L.J., Doumèche B. Directed evolution of a formate dehydrogenase for increased tolerance to ionic liquids reveals a new site for increasing the stability. *ChemBioChem* 2014: **15** (18), p. 2710-2718. **co-first authors*
- Abdellaoui S., **BEKHOUCHE M.**, Noiriél A., Henkens R., Bonaventura C., Blum L.J. and Doumèche B. Rapid electrochemical screening of NAD-dependant dehydrogenases in 96-well format. *Chemical Communications* 2013: **49**, p. 5781-5783.
- **BEKHOUCHE M.**, Blum L.J., Doumèche B. Contribution of dynamic and static quenchers for the study of protein conformation in ionic liquids by steady-state fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 2012: **116**(1), p. 413-423.
- **BEKHOUCHE M.**, Blum L.J. and Doumèche B. Ionic liquid-inspired cations covalently bound to FDH improve its stability and activity in IL. *ChemCatChem* 2011: **3**(5), p. 875-882.

● **BEKHOUCHE M.**, Doumèche B. and Blum L.J. Chemical modifications by ionic liquid-inspired cations improve the activity and the stability of formate dehydrogenase in [MMIm][Me₂PO₄]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2010: **65**(1-4), p. 73-78.

● **BEKHOUCHE M.**, Kronenberg D., Vadon-Le Goff S., Bijakowski C., Lim N.H., Font B., Colige A., Nagase H., Murphy G., Hulmes D.J.S. and Moali C. Role of the NTR domain of procollagen C-proteinase enhancer-1 in the control of metalloproteinase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2010: **285**(21), p. 15950-15959.

Chapitre d'ouvrage :

● **BEKHOUCHE M** & Virard F. Immunité du Parodonte. *Traité EMC Médecine buccale*. Elsevier. [28-080-G-50] - Doi : 10.1016/S1877-7864(22)45384-5

Communications scientifiques :

Communications orales :

- **Matrix Biology Europe congress (MBE)**. 28-30 Septembre 2022. Florence, Italie.
- **Annual Meeting of the European Tissue Repair Society**. 15-17 Septembre 2022. Lyon.
- **Joint Meeting of the French and German Societies for Matrix Biology**. 26-28 Mai, 2021 (en ligne).
- **UMR5305/LBTI**. Nov. 2018. Lyon France.
- **UMR1173/Infection et inflammation chronique (2IC)**. Décembre 2017. Versailles, France.
- **"GIGA-Research meeting"**: 28 Février 2014. Liège, Belgique.
- **Colloque CBSO** : 27-29 Juin 2012. Grenoble, France.
- **Colloque CBSO** : 25-28 Mai 2010. Royat, France.
- **UMR CNRS5246** : 30 Avril 2010. Villeurbanne, France.
- **Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science Santé (EDISS)** : 17 Mars 2010. Villeurbanne, France.

Communications par affiche :

● **BEKHOUCHE M.**, Bolon M., Charriaud F., Lamrayah M., Da Costa D., Costantini A., Gobert S., Mallein-Gerin F., Verrier B., Ducret M., Farges J-C. An injectable antibacterial fibrin-based hydrogel for dental pulp regeneration. **Biomat – MatSan** : 3-7 juin 2019. La Grande-Motte, France.

● Costantini A., Bolon M., Lamrayah M., Charriaud F., Da Costa D., Gobert S., Ducret M., Farges J.C., **BEKHOUCHE M.** Design of an antibacterial fibrin-based hydrogel for dental pulp regeneration and hydrogel-dependent activation of dental pulp mesenchymal stem cells. **Journée du LBTI : 13 février 2019. Prix du meilleur poster.**

● **BEKHOUCHE M.**, Leduc C., Dupont L., Janssen L., Delolme F., Vadon-Le Goff S., Smargiasso N., Baiwir D., Mazzucchelli G., Zanella-Cleon I., Dubail J., De Pauw E., Nusgens B., Hulmes D.J.S., Moali C. and Colige A. Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 reveals their integrated functions in extracellular matrix organization and TGF-beta signaling. **"41th FEBS Congress"** : 31 Août - 8 Septembre 2016. **Prix du meilleur poster FEBS OPEN BIO.**

● Leduc C., **BEKHOUCHE M.**, Dupont L., Janssen L., Delolme F., Vadon-Le Goff S., Smargiasso N., Baiwir D., Mazzucchelli G., Zanella-Cleon I., Dubail J., De Pauw E., Nusgens B., Hulmes D.J.S., Moali C. and Colige A. Unveiling the role of ADAMTS2, 3 and 14 in cell signalling using a N-terminomics approach. **"GIGA-Cancer day"** : 13 Mai 2015. Liège, Belgique. **Prix du meilleur poster.**

● **BEKHOUCHE M.**, Leduc C., Dupont L., Janssen L., Delolme F., Smargiasso N., Baiwir D., Mazzucchelli G., Vadon-Le Goff S., Zanella-Cleon I., Dubail J., De Pauw E., Nusgens B., Moali C. and Colige A. N-terminomics analysis of the substrate repertoire of the aminoprocollagen N-proteinases: ADAMTS-2, -3 and -14. **Congrès annuel**

de la **Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMEc)** : 11-13 Mars 2015. Lyon, France.

- **BEKHOUCHE M.**, Leduc C., Dupont L., Janssen L., Delolme F., Vadon-Le Goff S., Smargiasso N., Baiwir D., Mazzucchelli G., Zanella-Cleon I., Dubail J., De Pauw E., Nusgens B., Hulmes D.J.S., Moali C. and Colige A. N-terminomics analysis of the substrates repertoires of the aminoprocollagen N-proteinases: ADAMTS2, 3 and 14. "**The American Society for Matrix Biology Meeting**" : 12-15 Octobre 2014. Cleveland, USA.
- **BEKHOUCHE M.**, Leduc C., Janssen L., Delolme F., Vadon-Le Goff S., Zanella-Cleon I., Dubail J., Dupont L., Lim N.H., Nagase H., Nusgens B., Moali C. and Colige A. Unveiling new ADAMTS2 substrates related to its role in pathophysiology. "**1st Matrix Biology Europe Conference**" : 21-24 Juin 2014. Rotterdam, Pays-Bas.
- **BEKHOUCHE M.**, Leduc C., Dupont L., Janssen L., Delolme F., Smargiasso N., Baiwir D., Mazzucchelli G., Vadon-Le Goff S., Zanella-Cleon I., Dubail J., De Pauw E., Nusgens B., Moali C. and Colige A. *N-terminomic analysis of the substrate repertoire of the aminoprocollagen N-proteinases: ADAMTS-2, -3 and -14.* "**1st Matrix Biology Europe Conference**" : 21-24 Juin 2014. Rotterdam, Pays-Bas.
- **BEKHOUCHE M.**, Leduc C., Janssen L., Delolme F., Vadon-Le Goff S., Zanella-Cleon I., Dubail J., Dupont L., Lim N.H., Nagase H., Nusgens B., Moali C. and Colige A. Unveiling new ADAMTS2 substrates related to its role in pathophysiology. "**GIGA-Cancer Day**" : 19 Mai 2014. Liège, Belgique.
- **BEKHOUCHE M.**, Leduc C., Dupont L., Janssen L., Delolme F., Smargiasso N., Baiwir D., Mazzucchelli G., Vadon-Le Goff S., Zanella-Cleon I., Dubail J., De Pauw E., Nusgens B., Moali C. and Colige A. New ADAMTS2, 3 and 14 substrates related to cancer progression revealed by N-terminomics. "**GIGA-Cancer Day**" : 19 Mai 2014. Liège, Belgique.
- **BEKHOUCHE M.**, Vadon-Le Goff S., Delolme F., Zanella-Cleon I., Janssen L., Dubail J., Dupont L., Nusgens B., Moali C. and Colige A. Unveiling new substrates/properties of ADAMTS2 by iTRAQ-TAILS mass spectrometry. "**Gordon Research Conferences, Matrix Metalloproteinases**" : 19-24 Mai 2013. Barga, Italie.
- **BEKHOUCHE M.**, Noiriél A., Blum L.J. and Doumèche B. Dehydrogenases in ionic liquids: a method to enhance the FDH stability in MMIm][Me2PO4]. "**Trends in Enzymology (TinE)**" : 13-17 Juin 2010. Ascona, Suisse.
- **BEKHOUCHE M.**, Noiriél A., Blum L.J. and Doumèche B. Increasing activity and stability of the formate dehydrogenase from *Candida boidinii* in ionic liquids. "**Tomorrow... Towards a selected chemistry**" : 3-4 Juin 2010. Lyon, France.
- Kronenberg D., Vadon-Le Goff S., Bourhis J-M., Bijakowski C., **BEKHOUCHE M.**, Raynal N., Farndale R.W., Hulmes D.J.S. and Moali C. Don't forget the activators! Insight into the mechanism of action of Procollagen C-Proteinase Enhancers. "**Gordon research conference, Proteolytic enzymes and their inhibitors**" : 2-7 Mai 2010. Barga, Italie.
- **BEKHOUCHE M.**, Kronenberg D., Vadon-Le Goff S., Bijakowski C., Lim N.H., Font B., Colige A., Nagase H., Murphy G., Hulmes D.J.S. and Moali C. Role of the NTR domain of procollagen C-proteinase enhancer-1. **Congrès annuel de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMEc)** : 8-10 Mars 2010. Paris, France.
- Doumèche B., **BEKHOUCHE M.**, Pillot M., Santini C. and Blum L.J. Enzymatic anode in ionic liquids. **Journée du Cluster de Chimie** : 10 Octobre 2009. Lyon, France.
- **BEKHOUCHE M.**, François L., Doumèche B. and Blum L.J. Chemical modification of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by ionic liquids derives cations to improve its activity and structural stability in ionic liquids. "**Biotrans 2009**" : 5-9 Juillet 2009. Berne, Suisse.
- Vadon-Le Goff S., Moali C., **BEKHOUCHE M.**, Font B., Raynal N., Farndale R.W., Murphy G. and Hulmes D.J.S. Exploring the roles and interactions of procollagen C-proteinase enhancers : Do they show a dual face ? "**Cancer Symposium**" : 8-9 Octobre 2008. Londres, Royaume-Uni.
- Kronenberg D., **BEKHOUCHE M.**, Vadon-Le Goff S., Stöcker W., Hulmes D.J.S. and Moali C. Procollagen C-proteinase enhancement : towards a mechanism ? "**XXIst FECTS Meeting**" : 9-13 Juillet 2008. Marseille, France.

I. INTRODUCTION

I. 1. LES ENZYMES

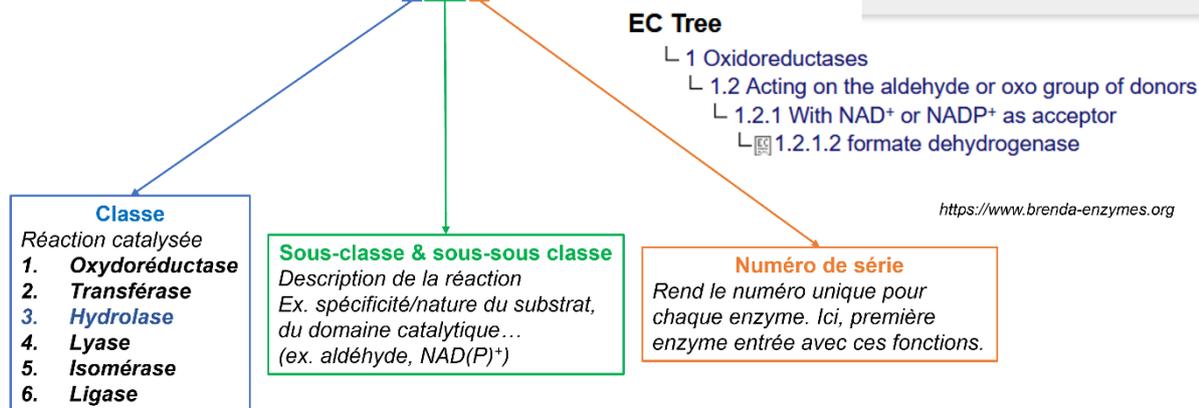
I. 1. A. Définition et propriétés

Le monde du vivant peut se définir par la capacité de se transformer au cours du temps. Les enzymes constituent les éléments responsables de l'amorçage de ces biotransformations. Les enzymes ou biocatalyseurs sont dans leur très très grande majorité de nature protéique (exception faite des ARN catalytiques). Ces biocatalyseurs vont augmenter la vitesse de biotransformation d'un substrat biologique en produit. Plus précisément, ils facilitent le passage de la barrière énergétique (énergie d'activation) présente entre ces deux états en diminuant l'énergie nécessaire à la formation de l'état de transition (1). En l'absence de biocatalyseurs, ces réactions sont possibles dans des temps difficilement appréciables. Les enzymes sont régénérées en fin de réaction. Les enzymes catalysent la biotransformation de substrats biologiques : protéines, acides nucléiques, glucides ou lipides. Les propriétés enzymatiques d'une protéine, qualifiée d'enzyme, sont directement liées à la capacité de cette protéine à interagir avec son substrat ainsi qu'à sa capacité de transformer ce substrat en produit. Dans le cas des enzymes Michaeliennes, des constantes sont déterminées afin d'apprécier ces propriétés catalytiques tel que la constante catalytique (k_{cat}), correspondant au nombre de molécule de substrat transformé par unité de temps et par molécule d'enzyme, ou le K_M (constante de Michaelis) qui n'est rien d'autre que la concentration de substrat nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale de réaction et qui dépend par conséquent de la capacité de l'enzyme à interagir avec son substrat. L'efficacité catalytique se définit alors par le rapport k_{cat}/K_M qui est d'autant plus importante que k_{cat} est grand et K_M petit (2,3).

Les enzymes sont classées par la commission internationale des enzymes selon un numéro EC ("Enzyme Commission"). Cette classification a été construite par l'Union Internationale de Biochimie et Biologie Moléculaire (IUBMB). La base de données est hébergée et maintenue par le serveur de protéomique ExPASy de l'institut Suisse de Bioinformatique (SIB). Elle est reliée à la base de données spécifique des enzymes BRENDA (BRAunschweig ENzyme DAtabase) (4,5). Le numéro EC se compose en 4 chiffres. Le premier définit la classe parmi les 6 classes existantes (Fig. 1). Le second et le troisième chiffre indiquent les sous-classes précisant la spécificité de substrat. Le dernier, et quatrième chiffre, n'est rien d'autre que le numéro de série permettant d'attribuer un numéro unique à chaque enzyme.

Nomenclature EC (Commission des Enzymes)

Formiate déshydrogénase : EC 1.2.1.2



<https://www.brenda-enzymes.org>

Classe
Réaction catalysée

1. **Oxydoréductase**
2. **Transférase**
3. **Hydrolase**
4. **Lyase**
5. **Isomérase**
6. **Ligase**

Sous-classe & sous-sous classe
Description de la réaction
Ex. spécificité/nature du substrat, du domaine catalytique...
(ex. aldéhyde, NAD(P)⁺)

Numéro de série
Rend le numéro unique pour chaque enzyme. Ici, première enzyme entrée avec ces fonctions.

Figure 1. Classification des enzymes

Les projets de recherches menées se sont intéressés aux oxydoréductases dans le domaine de la biocatalyse ainsi qu'aux protéases (hydrolases) dans la construction de la matrice extracellulaire.

I. 1.b. Les enzymes en biocatalyse

Les propriétés biocatalytiques des enzymes sont depuis longtemps, et aujourd'hui encore, utilisées dans des procédés de fabrication dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, de l'énergie et de l'environnement. Les enzymes sont notamment utilisées pour leur spécificité, leur sélectivité vis à vis d'un substrat donné ainsi que pour leur capacité de produire des molécules énantiopures réduisant ainsi les étapes de purification. Parmi les différentes enzymes utilisées on peut citer par exemple la collagénase utilisée comme anticellulite (6). Les enzymes les plus utilisées restent les déshydrogénases notamment pour leur activité de céto réductase (KRED) capables d'introduire des centres chiraux, par la réduction d'une fonction cétone en alcool énantiopure. Cette propriété est par exemple utilisée dans l'industrie pour produire un intermédiaire d'agent anti-cholestérol ; l'atorvastatin (Lipitor) (7). Ces enzymes utilisent un cofacteur, le NAD(P)⁺, plus coûteux que le produit et qui par conséquent nécessite d'être recyclé. Une seconde déshydrogénase est utilisée à cet effet comme la glucose déshydrogénase, l'alcool déshydrogénase ou encore la formiate déshydrogénase. Cette dernière est préférée car son produit de réaction, le dioxyde de carbone, est facilement retiré du milieu réactionnel (Fig. 2).

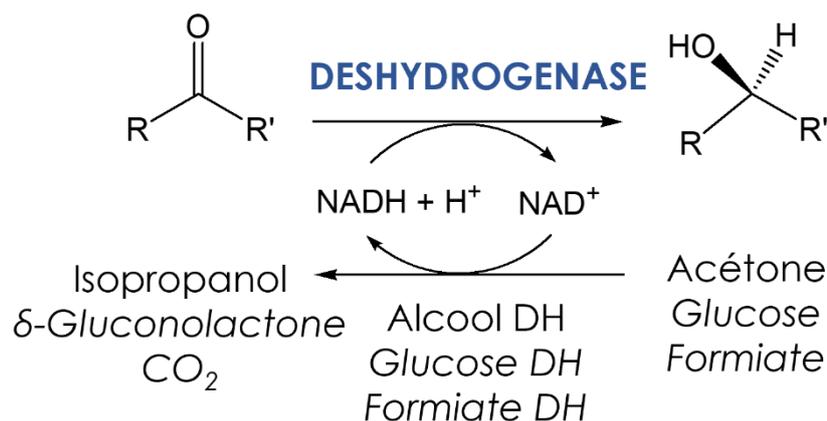


Figure 2. Recyclage du NAD⁺ lors de cétoréduction.

Ces réactions biocatalysées sont, dans certains cas, impossibles en raison de la faible solubilité de certains substrats tels que les acides gras et de la stabilité limitée des biocatalyseurs en milieux aqueux. Des milieux organiques sont donc utilisés (8). Ils ont pour avantages la meilleure solubilité des substrats et l'amélioration de la stabilité thermique et temporelle des biocatalyseurs (9). Cependant, ces solvants organiques libèrent des composés organiques volatiles (COV) toxiques pour l'organisme (10). Leur manipulation nécessite le respect des conseils de prudence et leur élimination nécessite un traitement particulier. Ces données vont à l'encontre des principes de la chimie verte qui vise à réduire la toxicité pour l'homme et l'environnement. Les liquides ioniques ont été proposés comme alternative aux milieux organiques.

I. 1.c. Réactions biocatalysées en liquides ioniques

Les liquides ioniques (Lis), constituent une famille de sels dont la température de fusion est inférieure à 100°C et pouvant ainsi être sous forme liquide à température ambiante. Les principaux ions utilisés sont de type imidazolium, pyridinium, ammonium, pyrrolidinium pour les cations alors que les anions les plus fréquents sont l'héxafluorophosphate, le tétrafluoroborate ou le diméthylphosphate (Fig. 3) (11). Les propriétés physico-chimiques des Lis sont variées et peuvent être adaptées selon la combinaison cation/anion. Ils peuvent être miscibles à l'eau, polaire ou apolaire. De nombreuses réactions biocatalysées ont été décrites en présence de Lis. Ainsi on retrouve des activités de type lipase (12,13), peptidase (14,15) et le groupe des oxydoréductases présentant un grand intérêt industriel (16). Cependant, l'activité des déshydrogénases est moins importante en présence de Lis en raison de leur faible activité dans ces milieux (16).

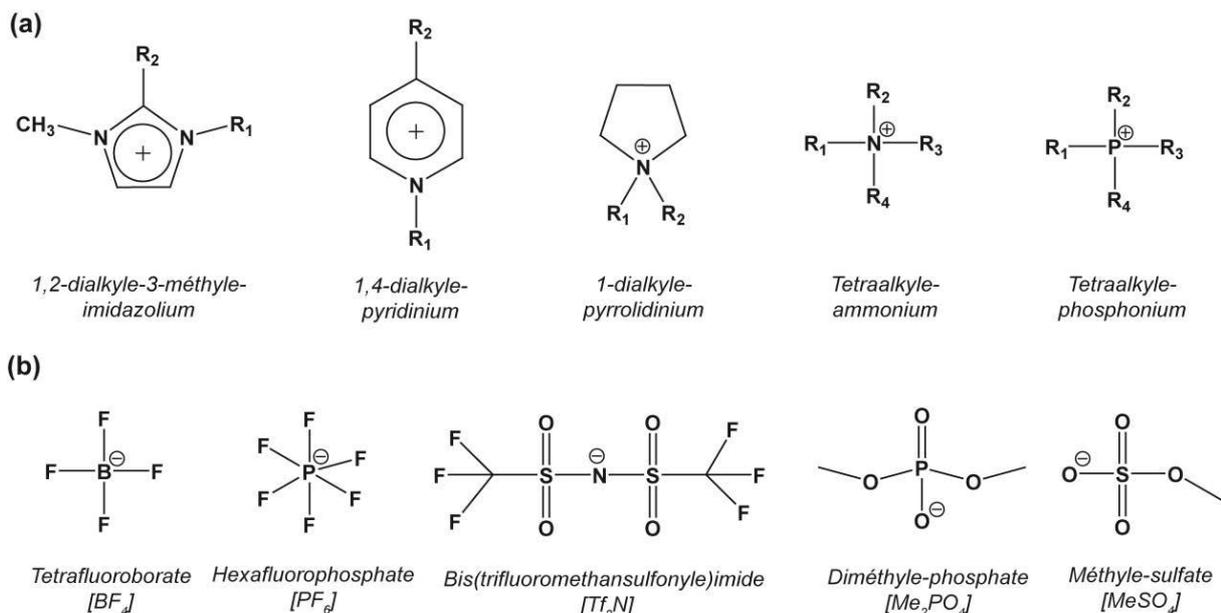


Figure 3. Principaux ions retrouvés dans les liquides ioniques

Le Projet de recherche développée durant ma thèse a visé à étudier les mécanismes d'inhibition des déshydrogénases en Lis afin de proposer des stratégies afin d'améliorer leur activité dans ces milieux.

I. 1.d. Réactions biocatalysées en biologie/physiologie

Les enzymes jouent un rôle essentiel en biologie. Elles biocatalysent les réactions dans le corps humain à maintiennent ainsi la vie. Chaque cellule contient des milliers d'enzymes différentes dont les activités vont déterminer les réactions ayant lieu au sein de la cellule (17). Elles vont catalyser la biotransformation des grandes familles de biomolécules (protéases/protéines ; nucléases/acides nucléiques ; osidases/glucides ; lipases/lipides) afin de permettre le fonctionnement des processus physiologiques variées tels que la digestion, la division cellulaires, l'immunité, la fourniture d'énergie, le flux sanguin et la formation / réparation tissulaire (17). Parmi les différentes enzymes du corps humain, on retrouve les protéases extracellulaires participant à la formation des tissus et notamment à la formation de la matrice extracellulaire (MEC), élément principal des tissus conjonctifs. La MEC participe au soutien mécanique des tissus et organes formant le corps humain et est composée en grande majorité de collagènes (18).

I. 2. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

La matrice extracellulaire (MEC) constitue un ensemble de biomolécules interconnectées formant l'environnement des cellules des tissus conjonctifs. Cette MEC forme un gel hydraté qui, en plus de ses fonctions mécaniques de support pour l'intégrité et l'élasticité tissulaire, fait preuve d'un remodelage dynamique et continu afin de contrôler l'homéostasie tissulaire (18). Elle est le siège de communications croisées entre les cellules et leur environnement local ou périphérique par l'action des systèmes circulatoires sanguins et lymphatiques. La MEC constitue un réservoir de signaux (facteurs de croissance, chémokines) ou de fragments bioactifs libérés par l'action de protéases (matrikines). Elle constitue ainsi le chef-lieu où s'organise le contrôle des mécanismes de formation et de réparation tissulaire (18,19).

La matrice extracellulaire est composée d'environ 300 biomolécules, également nommée le matrisome, incluant des protéines comme le collagène, des glycoprotéines et des protéoglycanes (20). Il est à noter que la composition de la matrice extracellulaire varie selon la localisation et les besoins fonctionnels et mécaniques de tissus. Par exemple, on peut distinguer la MEC interstitielle des membranes basales servant de support aux cellules épithéliales et donc de délimitation entre l'épithélium et le tissu conjonctif (18).

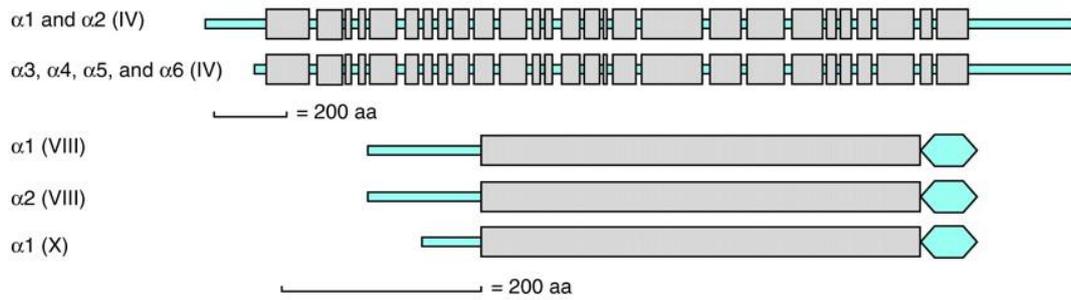
I. 2. a. Les collagènes

Les collagènes dans leur ensemble vont former l'architecture principale de la MEC par la formation d'un échafaudage tridimensionnel. Au nombre de 28, la superfamille des collagènes sont les protéines les plus abondantes du corps humain et représentent 30% de la masse de poids sec (21). Les collagènes sont des protéines présentant toutes au moins un domaine trimérique composé de trois chaînes α structurées en triple hélice (22). Cette structure en triple hélice, également nommée collagénique (COL), est composée de répétitions de triplets de glycine-X-Y où X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé mais souvent la proline et l'hydroxyproline sont respectivement retrouvées à ces positions (22) La glycine est primordiale dans cette répétition périodique car sa taille réduite, due à l'absence de chaîne latérale, va permettre le repliement et la structuration en triple hélice (23). L'auto-association de ces trois chaînes α en homo ou hétéro trimères, structurés en triple hélice, est stabilisée par des liaisons de faibles énergie (hydrogènes et électrostatiques) impliquant les fonctions amines et carboxyles des liaisons peptidiques ainsi que des résidus de lysine et d'acide aspartique (24,25).

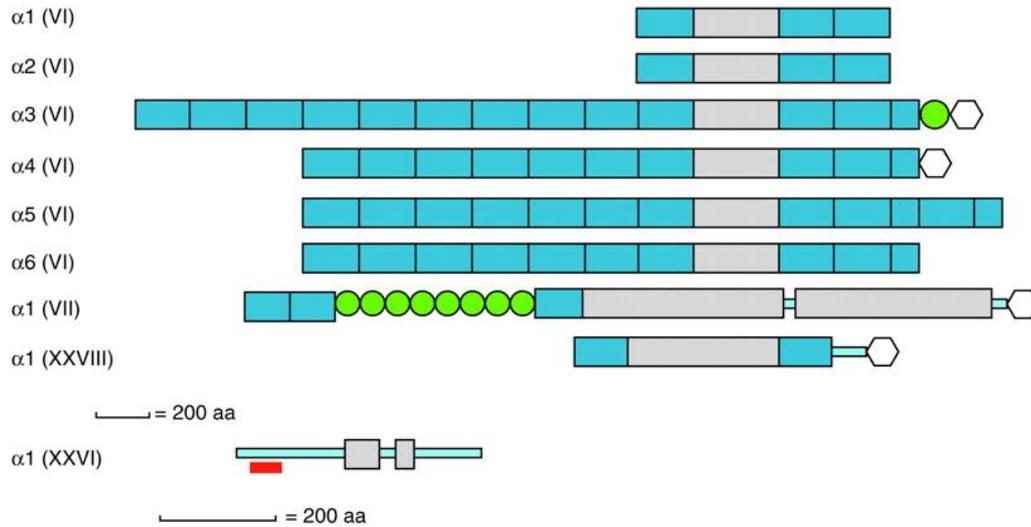
Parmi les différents types de collagènes existant on distingue notamment les collagènes fibrillaires (type I, II, III, V et VI), les collagènes associés aux fibres (IX, XII, XIV, XVI, XIX,

XX, XXI et le XXII), les collagènes formant des réseaux (IV, VI, VIII et X), les collagènes formant des suprastructures (VI et VII) et les collagènes membranaires (XIII, XVII, XXIII et le XXV). Les collagènes nommés multiplexines (XV et XVIII) présentent, quant à eux, la particularité de posséder un domaine thrombospondine (laminin-G-like thrombospondin-1, TSP-1) servant à l'attache de glycosaminoglycanes (21) (Fig. 4). Les multiplexines sont par conséquent des protéoglycanes à héparane sulfate pour le collagène de type XVIII et à chondroïtine sulfate pour le collagène de type XV (26). Les collagènes de type XV et XVIII sont impliqués dans le caractère souche des cellules (26). On peut également distinguer les collagènes fibrillaires retrouvés au cœur des tissus conjonctifs (type I, II, III, V et XI) des collagènes formant les membranes basales (type IV et VII).

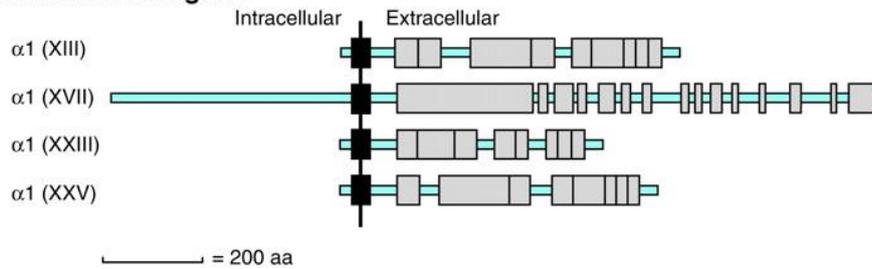
Network-forming collagens



Collagens VI, VII, XXVI, and XXVIII



Membrane collagens



Multiplexins (collagens XV and XVIII)

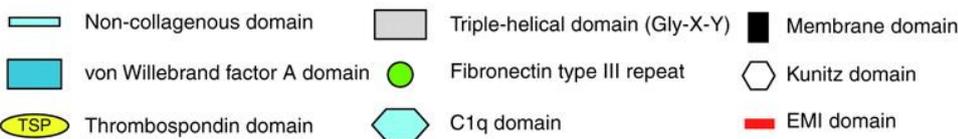
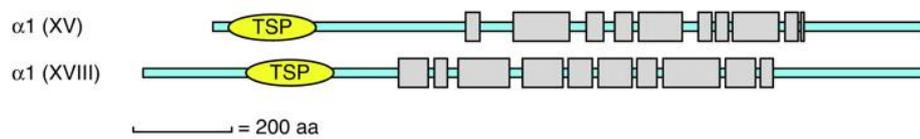


Figure 4. Représentation schématique de l'organisation en domaine des collagènes.

Les 28 membres de la famille des collagènes sont des protéines dites modulaire dont les domaines varient. Des sous-classes se distinguent selon que la composition en domaine des collagènes (Ricard-Blum S. 2011).

Les collagènes fibrillaires

Les collagènes fibrillaires sont les plus communs de par leur abondance dans l'organisme et leur rôle essentiel dans la formation de l'architecture de la MEC. Formés à partir de 12 chaînes α différentes, il existe sept collagènes fibrillaires (I, II ; III, V, XI, XXIV, XXVII) dont les plus employés par l'organisme pour former la MEC sont les collagènes de type I, II et III alors que les autres restent minoritaires, et participent à la formation des fibres issues des trois premiers (27,28). Le collagène de type V et XI forment des fibres hétérotypiques avec les collagènes I, II ou III régulant ainsi l'ultrastructure des fibres de collagènes (27). Alors que le collagène de type V est retrouvé dans la peau, la cornée, les muscles, les tendons, le collagène de type XI est coexprimé avec le collagène de type II au niveau du cartilage (29). Les collagènes minoritaires XXIV et XXVII ont été découverts plus récemment et semblent jouer un rôle durant le développement dans les processus d'ossification endochondrale (30,31). Les trois collagènes fibrillaires majoritaires présentent une localisation prédominante en fonction du tissu. Ainsi, le collagène I est retrouvé très majoritairement dans la peau et les os (environ 80-90%), le collagène de type III est présent en relative grande quantité dans les tendons, la pulpe dentaire et les vaisseaux sanguins (40-45%) alors que le collagène de type II est majoritaire et spécifique du cartilage (27,32,33).

Les collagènes fibrillaires peuvent être homotrimérique (trois chaînes α identiques) ou hétérotrimériques (trois chaînes α différentes). Le collagène de type I est hétérotrimérique composé de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$, également noté $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ alors que les collagènes de type II et III sont homotrimériques $[\alpha 1(II)]_3$ et $[\alpha 1(III)]_3$ (27).

Les chaînes α qui composent les collagènes fibrillaires sont synthétisées sous forme de précurseurs, au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, composés d'une peptide signal de sécrétion, d'un propeptide N-terminal (pN ou N-Pro), d'un domaine en triple hélice, et d'un propeptide C-terminal (pC ou C-Pro) (Fig. 5) (27,33,34). Nous pouvons également distinguer les régions qualifiées de telopeptides reliant les propeptides N- et C-terminaux à la chaînes alpha mature et pouvant inclure une portion structurée en triple hélice au niveau du propeptide N-terminal (34). Les chaînes α synthétisées font l'objet de différentes modifications post-traductionnelles telles que le clivage du peptide signal ; l'hydroxylation des résidus de proline et de lysine respectivement par les enzymes prolyl et lysyl hydroxylases suivie de glycosylation de ces résidus hydroxylés (hydroxyproline et hydroxylysine) par des résidus de glucose et galactose grâce aux glucosyl- et galactosyltransférases respectivement (33,35). Ces modifications sont notamment retrouvées du côté du propeptide N-terminal (33). Les chaînes α s'auto-assemblent à partir du propeptide C-terminal puis, notamment avec l'aide de la protéine chaperone Hsp47 (Heat shock protein 47 ou serpine H1), de proche en proche jusqu'à l'extrémité N-terminale pour former

un trimère de procollagène dont la partie centrale est en triple hélice (33,35,36). Les molécules de procollagènes sont sécrétées dans l'espace peri-cellulaire où les propeptides N- et C-terminaux seront clivés par les procollagènes N- et C-protéinases pour former des molécules de tropocollagène (34). Le clivage des propeptides induira une baisse de solubilité qui entraînera l'autoassemblage des molécules de tropocollagènes en fibre de collagène (35). L'auto agrégation latérale ménage un espace de 67 nm environ (gap) entre deux molécules de successives dans le sens longitudinal à l'axe de la fibre et qui sera le siège de l'initiation de la minéralisation dans le cas de tissus osseux (23,27). Ces espaces donneront l'aspect de striation périodique en microscopie électronique (27,33). Le diamètre des fibres de collagènes peut être régulé par l'association de collagènes de type V et XI régulant ainsi le diamètre des fibres et leur croissance (37). Ce processus complexe de fibrillogenèse est également régulé par différents protéoglycanes comme la décorine ou le lumican (38). Les propriétés mécaniques des fibres de collagène seront renforcées après réticulation catalysée par la lysyl-oxydase (39).

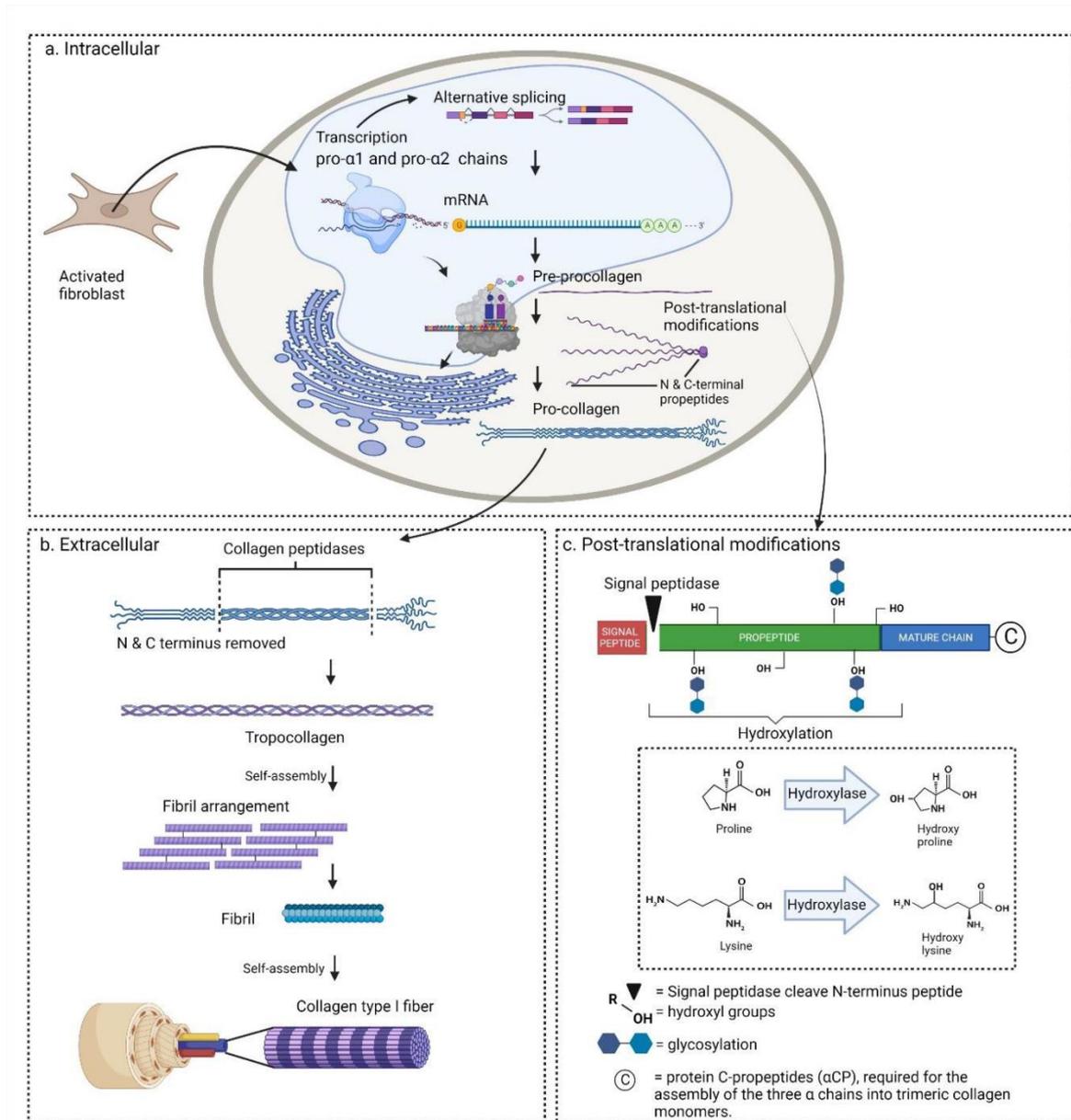


Figure 5. Biosynthèse des collagènes fibrillaires (Amirrah IN et al., 2022)

Les collagènes associés aux fibrilles avec triple hélice interrompue (FACIT)

Le groupe des FACIT est composé de 9 membres, les collagènes de type IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI ; XXII et XXVI. L'interruption de la triple hélice par des domaines non collagéniques démontre l'aspect modulaire des collagènes (Fig. 4). La présence de différents domaines au sein de ces collagènes : domaine du facteur A de von Willbrand, domaine thrombospondine, domaine fibronectine de type III, présuppose de nombreuses interactions protéine-protéine avec des composants de la matrice extracellulaire et semblent servir de ponts moléculaires pour l'organisation et la stabilité des MECs (40). L'aspect modulaire de ces collagènes non fibrillaire suppose également une libération potentielle de fragments bioactifs (maticryptines) et ainsi un rôle dans l'homéostasie des tissus (21,41).

Les collagènes associés aux membranes basales

Structuralement, les membranes bases constituent le support des cellules épithéliales et forment une barrière entre le compartiment épithélial et le tissu conjonctif sous-jacent (42). Par microscopie électronique 3 ultrastructures se distinguent nommées lucida. Du côté épithélial au tissu conjonctif on retrouve ; une zone claire, la lamina lucida, qui n'est rien d'autre qu'un artefact lié au décollement des cellules de la membrane basale (43). Au milieu, se trouve une zone dense en électrons, la lamina densa, formant une trame sur laquelle repose la surface basale des cellules épithéliales. Une troisième partie, la lamina fibroreticularis, est constituée de fibres de diamètres variables et qui vont venir plonger dans le tissu conjonctif sous-jacent également nommé lamina propria (42). Dans ce contexte, les collagènes de type IV et VII sont associés aux membranes basales car ils constituent les biomolécules formant ces ultrastructures. Le collagène de type IV est capable de s'auto-assembler en tétramères via ses domaines 7S et non-collagéniques respectivement en position N- et C-terminale formant ainsi un maillage polygonal qui constituera l'armature de la lamina densa en association avec certaines glycoprotéines et protéoglycans tels que les laminines, formant elles même des réseaux, et le perlecan qui participe à l'association de ces treillis polygonaux (42). Il existe 6 chaîne α différentes pour le collagène de type IV; cependant seules les hétérotrimères $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ ont été rapportés (44).

Le collagène de type VII forme les fibrilles d'ancrage de la membrane basale au sein du tissu conjonctif. Ce collagène présente également des domaines non-collagéniques à ses extrémités N- et C-terminales. Il interagit d'une part avec la lamina densa et d'autre part avec la lamina propria, ou tissu conjonctif (45). Une seule chaîne α a été répertoriée pour le collagène de type VII qui forme alors des homotrimères $\alpha 3(\text{VII})$.

I. 2. b. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes jouent un rôle essentiel dans la formation de la MEC et notamment dans les tissus cartilagineux ou osseux. Par définition, les protéoglycanes (PGs) sont composés d'une partie protéique et d'une partie glucidique associées de manière covalente par l'intermédiaire d'une liaison N- ou O-osidique respectivement sur les résidus de lysine/arginine ou de sérine/thréonine (46). La partie glucidique est composée de glycosaminoglycans (GAGs) consistant en des chaînes linéaires formées de répétitions de disaccharides consistant à un acide hexuronique (D-glucuronique ou L-iduronique) excepté pour le kératane sulfate où c'est un galactose, et d'un hexosamine N-acétylé (N-acétyl-D-glucosamine ou N-acétyl-D-galactosamine) (47). Six différents GAGs sont définis selon la nature des répétitions disaccharidiques et le degré de

sulfonylation : le chondroïtine Sulfate (CS), le kératane sulfate (KS), l'héparane et l'Héparane sulfate (HS), le kératane sulfate (KS) et l'acide hyaluronique (HA) (47). En ce qui concerne la partie protéique, il existe 43 gènes distincts pour les protéoglycanes. Ces derniers participent aussi bien au développement qu'au remodelage tissulaire physiopathologique, via différents mécanismes incluant la régulation de voies de signalisations ou la modification des propriétés mécaniques des tissus (46,48). Les PGs peuvent être classés selon leur localisation (49). La grande majorité des PGs est localisée dans la MEC, mais on en retrouve également dans les membranes basales, à la surface des cellules, ainsi que dans des vésicules intracellulaires. Au sein de la MEC on peut distinguer deux familles de PGs ; les petits protéoglycanes riches en leucine ("small leucine rich proteoglycans, SLRPs) et les hyalectans. Les SLRPs incluent 18 gènes et de nombreux variants. Dans cette famille on retrouve la décorine, le biglycan et le lumican qui participent notamment à la formation de la matrice collagénique en interagissant avec le collagène (50,51). A titre d'exemple, la décorine régule le diamètre et l'alignement des fibres de collagènes en empêchant l'agrégation latérale de ces dernières (50). Les hyalectans ont en commun un domaine globulaire N-terminal G1 ayant la capacité de se lier à l'acide hyaluronique par l'intermédiaire de protéines de liaisons (47). Dans cette famille on retrouve, l'agrécan, le versican, le neurocan et le brevican (49). Les hyalectans jouent un rôle important dans la formation de tissus résistants mécaniquement tel que le cartilage. Ainsi on retrouve l'agrécan dans la composition du cartilage ostéoarticulaire ou le versican dans la formation de la voûte palatine (52,53). Certains protéoglycanes sont des (co-)récepteurs retrouvés à la surface des cellules en qualité de protéine transmembranaire (syndecane ou betaglycane) ou associés à la membrane par une ancre Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (le glypicane). Le betaglycane, aussi connu comme le récepteur III du facteur de croissance transformant TGF-beta (TGF- β RIII), participe à la signalisation du TGF- β en agissant comme un co-récepteur des récepteurs RI et RII dans sa forme transmembranaire et séquestre le TGF- β dans la MEC dans sa forme soluble après clivage protéolytique juxtamembranaire (54). Des protéoglycanes sont également retrouvés dans les membranes basales (agrine, perlecan et collagène XVIII) ainsi que dans des vésicules intracellulaires (serglycine) (49).

I. 2. c. Les glycoprotéines

Les protéines extracellulaires peuvent présenter des O- et N-glycosylations de taille et de nature variables ; on parlera alors de glycoprotéines. Les glycoprotéines sont nombreuses et sont classifiées en familles selon leur composition en domaine. Quelques exemples de glycoprotéines, en lien avec les projets de recherche menées, seront brièvement décrits.

Ainsi, on peut noter la famille des **SIBLINGs** (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein) qui inclue trois sialoprotéines (la sialophosphoprotéine dentinaire, DSPP, la phosphoprotéine matricielle dentinaire-1 et la sialoprotéine osseuse), l'ostéopontine et la phosphoglycoprotéine extracellulaire matricielle. Les SIBLINGs sont impliquées and la formation des tissus minéralisés tels que l'os et les tissus dentaires (dentine, émail, ciment). Les sialoprotéines régulent la minéralisation positivement (DSPP) ou négativement (ostéopontine) en interagissant avec le calcium et les phosphates calciques tels que l'hydroxyapatite (55).

La fibronectine est une glycoprotéine qui existe sous deux formes ; globulaire plasmatique et matricielle de structure allongée capable de former un réseau fibrillaire (56). La fibronectine est composée de trois types de domaines dit « fibronectine » (FNI, FNII et FNIII) (Fig. 6). Elle forme des dimères reliés par l'extrémité C-terminale. Son organisation en domaine peut se classifier en trois parties, le domaine N-terminal de 70 kDa (FNI1-9), le domaine central de liaison de 120 kDa qui participe à la formation du réseau de fibronectine (central binding domain, CBD FNIII1-12) et le domaine de liaison à l'héparine (HepII, FNIII12-14) (Fig. 6) (56). La formation des fibres de fibronectine est un processus actif nécessitant l'interaction de la fibronectine à des récepteurs de surface de type intégrine, protéoglycanes à héparane sulfate et syndecane(-4). Cette étape d'initiation va induire le déploiement et l'assemblage des molécules de fibronectine (56). Le domaine N-terminal joue ici un rôle essentiel dans la structuration en forme globulaire qui résulte d'un ensemble d'interactions de faible énergies entre ce domaine et les autres domaines de la fibronectine (56).

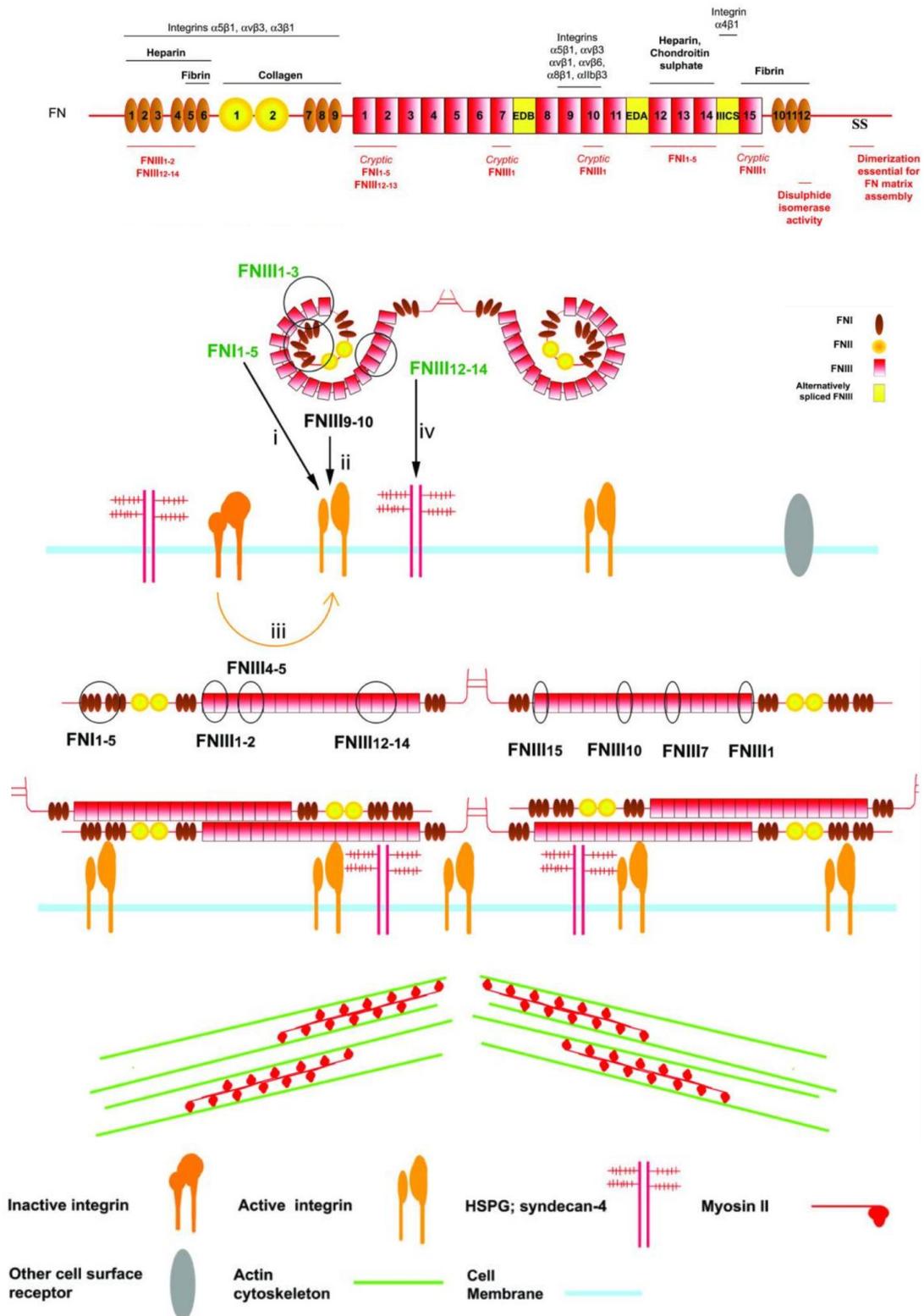


Figure 6. Structure de la fibronectine et mécanisme de fibrillogenèse.

Le fibronectine est composée de domaines de type fibronectine (FN) de type I (ovales oranges), type II (ronds jaunes) et de type III (carrés roses). Trois domaines de type FNIII présents dans la partie centrale (domaine central de liaison, CBD) de la protéine sont sujets à épissage alternatif (carrés jaunes). Le domaine N-terminal de 70 kDa participe à la formation de la forme globulaire. Il inclut les domaine FNI 1 à 9 ainsi que les deux domaine FNII. Ce domaine forme des liaisons ioniques intramolécule avec le domaine CBD. Ce dernier interagit avec les intégrines et protéoglycans (syndecan-4, HSPG) de surface pour conduire à un dépliement des molécules de fibronectine et ainsi induire une fibrillogenèse médiée par les cellules (Images extraites de To & Midwwood 2011).

Les thrombospondines sont retrouvées dans les tissus conjonctifs et jouent un rôle dans l'organisation et l'architecture de la MEC via leurs domaines de type thrombospondine (TSP) présentant différents sites d'interaction notamment pour les GAGs et les protéoglycans tels que la décorine (57,58).

Le fibrinogène (Fig. 7) est une glycoprotéine dimérique de 340 kDa composée de trois chaînes (α , β et γ) stabilisées par 29 ponts disulfures qui s'auto-polymérisent par agrégation latérale après clivage par la thrombine, conduisant ainsi à un caillot de fibrine *in vivo* et à un hydrogel de fibrine *in vitro* (59). Dans des conditions physiologiques, la fibrine forme un réseau fibreux important pour l'hémostase et la cicatrisation cellulaire ultérieure (60). L'interaction des cellules avec la fibrine est un mécanisme principalement piloté par les intégrines et médié par des séquences Arg-Gly-Asp (RGD). La fibrine se lie aux intégrines α IIb β 3 des plaquettes (61), α M β 2/Mac-1 des leucocytes (62) et α V β 3 des fibroblastes (Fig. 7) (63). La liaison fibrine/intégrine entraîne l'activation des cellules et conduit à la formation du caillot sanguin, à la réponse inflammatoire et au remodelage de la MEC. D'autres biomolécules interagissant avec la fibrine, telles que les protéines de la MEC, comme la vitronectine et la fibronectine, pourraient également servir de médiateur à l'adhésion cellulaire à la fibrine et réguler la réponse cellulaire par le biais d'un mécanisme dynamique impliquant le regroupement des récepteurs de la surface cellulaire et les échanges croisés (64–66). La fibrine est biologiquement dégradée par la cascade fibrinolytique médiée par la plasmine (67) impliquant principalement les cellules endothéliales (68,69). L'activité de la plasmine est également au centre de multiples événements protéolytiques qui favorisent le remodelage tissulaire, comme l'activation des pro-métalloprotéinases matricielles (proMMP) en MMP actives (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14) qui, à leur tour, clivent la fibrine (MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14) (70,71) mais aussi des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance latents (72). De plus, la plasmine est impliquée dans l'activation de la signalisation uPA/uPAR dans les plaquettes, les monocytes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les CSM dérivées de la moelle osseuse (68,73). Cette activation favorise le remodelage de la matrice, l'invasion des monocytes et leur différenciation en macrophages par le biais de multiples voies de signalisation dont RAS-ERK1/2, p38 MAPKK, RhoA-ROCK (68,69).

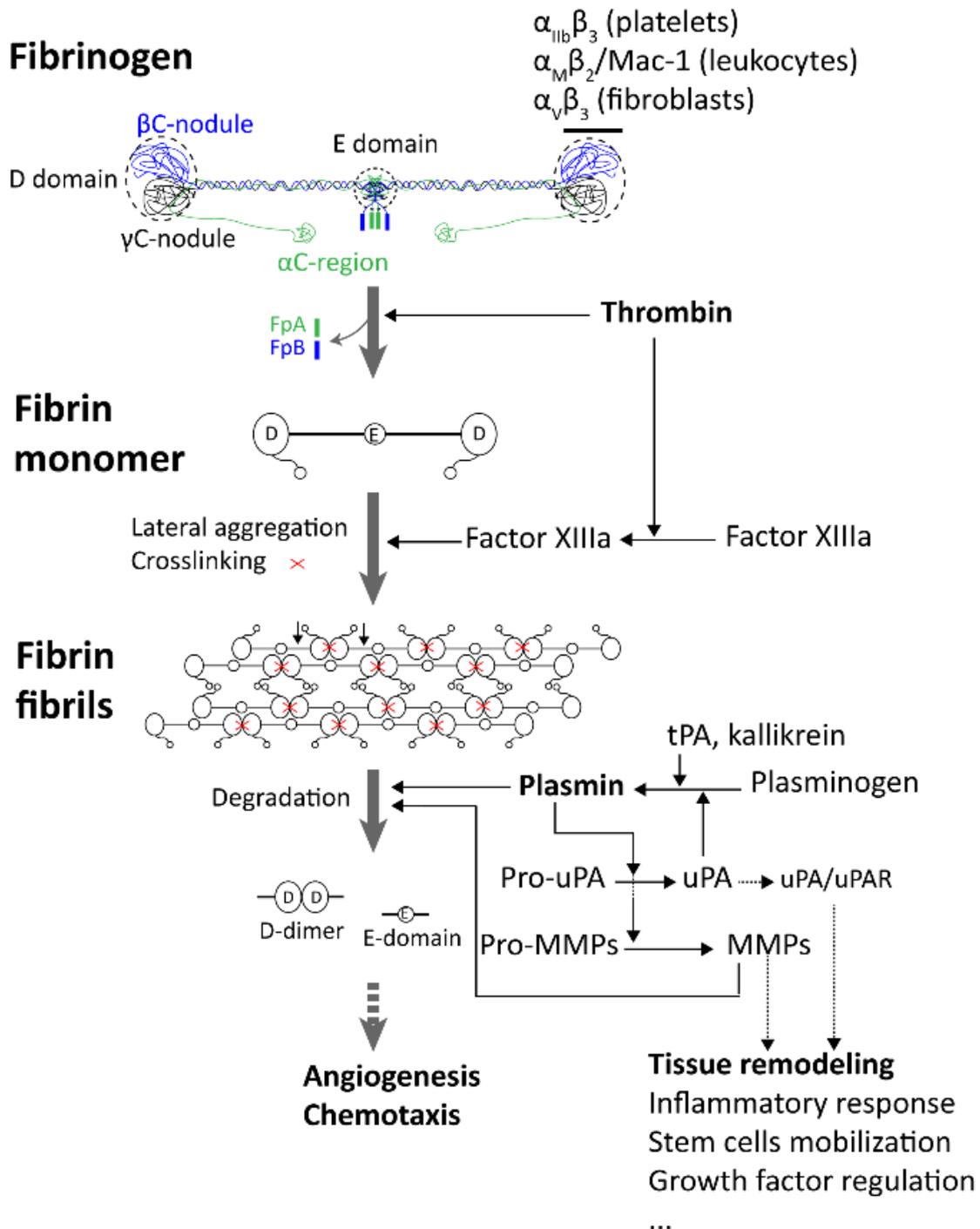


Figure 7. Formation de polymère de fibrine.

Le fibrinogène plasmatique circulant est une molécule dimérique où chaque monomère est un hétérotrimère formé de trois chaînes α (vert), β (bleu) et γ (rouge). Les hétérotrimères sont associés par leur extrémité N-terminale formant le domaine E. Un domaine D est retrouvée à l'extrémité C-terminale et est séparée du domaine E par une région en bobine spiralee (coiled coil) impliquée dans la capacité d'élongation de la fibrine sous l'influence de force mécanique. Le domaine D participe à l'interaction médiée par les intégrines de la fibrine (du fibrinogène) aux fibroblastes, leucocytes et plaquettes. Les peptides présents à l'extrémité N-terminale (fibrinopeptides A et B, FpA et FpB) sont clivés par la thrombine produite par la cascade de coagulation afin de générer des monomères qui s'auto-assemblent en fibre de fibrine réticulées par le facteur XIIIa. Le polymère de fibrine est clivé par la plasmine à travers un mécanisme orchestré qui associe événements protéolytiques et signalisation cellulaire, favorisant ainsi le remodelage tissulaire, l'angiogenèse et la chimiotaxie.

I. 2. d. Les métalloprotéases

Les familles de métalloprotéases

Les protéases extracellulaires sont des biomolécules essentielles entrant dans la composition de la MEC. Elles participent à la maturation et à la dégradation des molécules formant la MEC mais également dans la signalisation cellulaire par la libération de facteurs de croissance par exemple.

Il existe différentes familles de protéases extracellulaires selon la nature de leur domaine catalytique, leur homologie de séquence et la nature de leur substrat. Les protéases peuvent se distinguer en fonction des résidus présents au sein de leur site catalytique. Ainsi nous pouvons distinguer les protéases à sérine tels que la trypsine, la plasmine ou la thrombine... qui participent à la digestion, la coagulation/fibrinolyse, au développement et à l'immunité (74) ; les protéases à cystéine (cathepsines, papaïnes...) ou encore les métalloprotéases (Fig. 8) (74,75).

Je me suis particulièrement intéressé aux métalloprotéases à zinc, également nommées metzincines. Elles présentent toutes un domaine catalytique N-terminal homologue de 120 à 130 résidus caractérisé par la présence d'un motif consensus de fixation du zinc (HEXXHXXGXX(H/D)) et d'une boucle-méthionine (met-turn) (76). Du côté C-terminal du domaine catalytique, les extra-domaines vont définir la spécificité de substrats et la famille de protéases (47). Parmi les metzincines on retrouve les adamalysines (ADAM(TS)) présentant toutes un domaine désintégrine ; et les métalloprotéases ((MT)-MMPs) ayant, pour leur grande majorité, un domaine hemopexine (Fig. 8) (47). Toutes ces métalloprotéases sont synthétisées sous forme inactive en raison de la présence d'un propeptide du côté C-terminal et qui est libéré par clivage protéolytique.

Les (MT)-MMPs

Il existe 28 MMPs classifiées en sous-familles (77) : - les collagénases (MMP1, 8, 13, 18) - les gélatinases (MMP2 et 9) - les stromélysines (MMP3, 10 et 11) - les matrilysines (MMP7, 12 et 26) - les MMPs membranaires (transmembranaires MT1-MMP/MMP14, MT2-MMP/MMP15, MT3-MMP/MMP16, MT5-MMP/MMP24 ; à ancre GPI MT4-MMP/MMP17, MT6-MMP/MMP25). Les autres MMPs sont retrouvées dans des situations physiopathologiques, ou des tissus, spécifiques telle que la MMP20 (enamalyse) retrouvée dans les tissus calcifiés de la dent et qui participe à la libération protéolytique de la sialoprotéine dentinaire et de la glycoprotéine dentinaire à partir de la sialophosphoprotéine dentinaire (77,78).

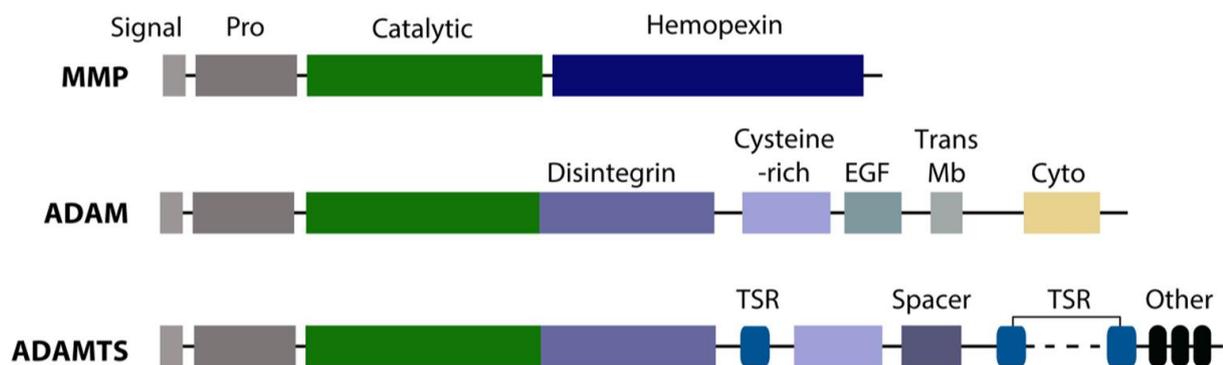


Figure 8. Composition en domaines des protéases MMPs et ADAM(TS).

Toutes les métalloprotéases contiennent un peptide signal, un propeptide de latence clivé durant la maturation ainsi qu'un domaine catalytique conservé de type métalloprotéinases présentant le motif consensus HEXXHXXGXX(H/D). Elles diffèrent par leurs domaines auxiliaires régulant la spécificité de substrat et la localisation. Les MMPs présentent des domaines de type hemopexine; certaines sont associées à la membrane via un domaine transmembranaire. Les ADAM(TS) présentent toutes un domaine désintégrine adjacent au domaine catalytique suivi par des domaines riches en cystéines. Alors que les ADAMs sont associées à la membrane via un domaine transmembranaire, les ADAMTS présentent un nombre variable de domaines en position C-terminale qui définissent les différentes sous-familles (image extraite de *Karamanos NK et al., 2021*).

Les ADAMTS

La famille de protéases ADAMTS "A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type I domain" est composée de 19 membres qui peuvent être classés en sous-groupes en fonction de leur activité protéolytique (79). Les agrécanases (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9 et 15) sont capables de cliver des protéoglycanes tels que l'aggrécane. Les ADAMTS2, 3 et 14 forment le sous-groupe des procollagène N-protéinases car ce sont les seules enzymes capables de cliver l'aminopropeptide des collagènes fibrillaires (34). L'ADAMTS13 est l'enzyme responsable du clivage du facteur de von Willebrand. Enfin, les protéases restantes sont collectivement appelées les ADAMTS orphelines (ADAMTS6, 7, 12, 10, 16, 17, 18 et 19) pour lesquelles aucun substrat spécifique n'est actuellement connu (80).

J'ai étudié les procollagène N-protéinases dans le cadre de ma recherche post-doctorale (Université de Liège, Belgique). En plus de leur domaine catalytique, ces protéases sont caractérisées par la présence de quatre domaines thrombospondine de type I (TSR1) et d'un domaine procollagène N-protéinase (PNP) C-terminal, ce dernier incluant un domaine "Protease and LACunin" (PLAC) (34). Les procollagène N-protéinases diffèrent par leur distribution spatio-temporelle. En effet, les ADAMTS2 et 14 sont principalement retrouvées dans les tissus riches en collagène de type I comme la peau ou les os. L'ADAMTS14 est co-exprimée, à faible taux, suggérant une redondance de fonction avec l'ADAMTS2 (34). L'ADAMTS3 est, quant à elle, principalement exprimée dans le cartilage, ce qui suggère une certaine spécificité pour le collagène de type II, ainsi que dans le système nerveux central (34).

Les ADAMTS2, 3 et 14 clivent le propeptide N-terminal des molécules de procollagènes entre la petite triple hélice et l'hélice principale des chaînes α des collagènes de type I, II et III. Ces protéases sont rapportées pour cliver selon un site relativement conservé entre espèces impliquant un acide aminé aliphatique en position P1 et un résidu de glutamine en position P1' (Fig. 9). L'ADAMTS2 est également capable de cliver le collagène minoritaire de type V. Le site de clivage rapporté diffère des sites classiques car il est situé en amont de la petite hélice N-terminale et au niveau d'un site présentant une proline en P1 et une alanine en P1'. Des sites plus conventionnels, en amont de la triple hélice principale, sont observés mais pas rapportés (Fig. 9) (34,81).

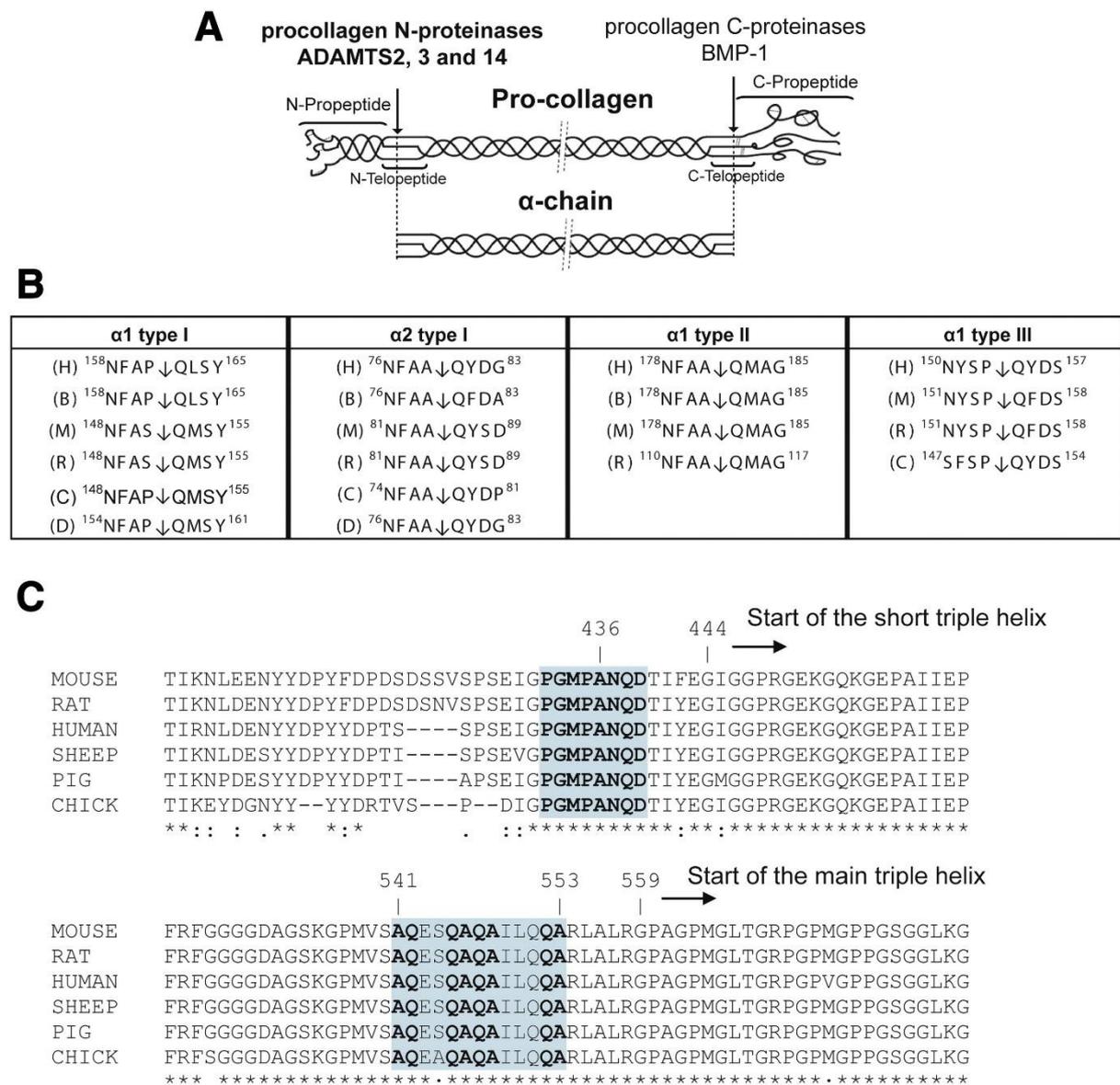


Figure 9. Sites de clivage des aminopeptidases au sein du procollagène.

(A) Maturation du procollagène par les procollagènes N-protéinases (ADAMTS2, 3 et 14) et C-protéinases. (B) Homologie de séquence des sites de clivage de l'ADAMTS2 dans les collagènes fibrillaires de types I-III de différentes espèces : (H) humain, (B) bovin, (M) souris, (R) rat, (C) poulet et (D) chien. (C) Alignement des séquences du collagène $\alpha 1$ de type V de différentes espèces. Résidu (*) identique, (:) fortement similaire, (.) faiblement similaire. (Image extraite de Bekhouche M et al., 2015)

Le clivage du propeptide N-terminal des collagènes fibrillaires semble être spécifique des ADAMTS2, 3 et 14. En effet l'absence d'ADAMTS2 chez des souris KO entraîne la rétention du propeptide N-terminal ce qui conduit à la désorganisation de la matrice collagénique et entraîne la formation de collagènes déstructurées ayant un aspect caractéristique dit hiéroglyphique (Fig. 10). Il est à noter que des études protéomiques rapportent le clivage du propeptide N-terminal des collagènes fibrillaires par des métalloprotéases de la sous-famille des méprines $\alpha \beta$; deux protéases surexprimées par les fibroblastes de peau en situation de fibrose. Les méprines participeraient, entre autre, à la formation excessive de collagène en condition pathologique comme dans le cas de chéloïdes (82). Les souris déficientes pour l'ADAMTS2 présentent une peau fragile principalement en raison des défauts de formation de la matrice collagénique. Ces souris présentent également des défauts de fertilité avec l'absence de production de spermatozoïde chez le mâle adulte (34). L'absence d'ADAMTS14 seule ne semble pas avoir d'effet significativement délétère. Par contre la déficience en ADAMTS2 et en ADAMTS14 induit une fragilité beaucoup plus importante de la peau ainsi que des phénomènes de d'inflammation du derme (dermatite atopique) chez la souris (83). L'absence d'activité ADAMTS2 conduit à la dermatosparaxie chez l'animal (le veau) et au syndrome d'Ehlers-Danlos dermatosparactique ou de type VIIC chez l'homme (84,85). La principale caractéristique de cette maladie génétique rare est la fragilité de la peau. Les patients atteints d'EDS de type VIIC présentent également des défauts de développement oro-faciaux, des risques de ruptures d'organes internes en raison de la fragilité des tissus mous ainsi que des hématomes de taille importante suite à un traumatisme mineur (85).

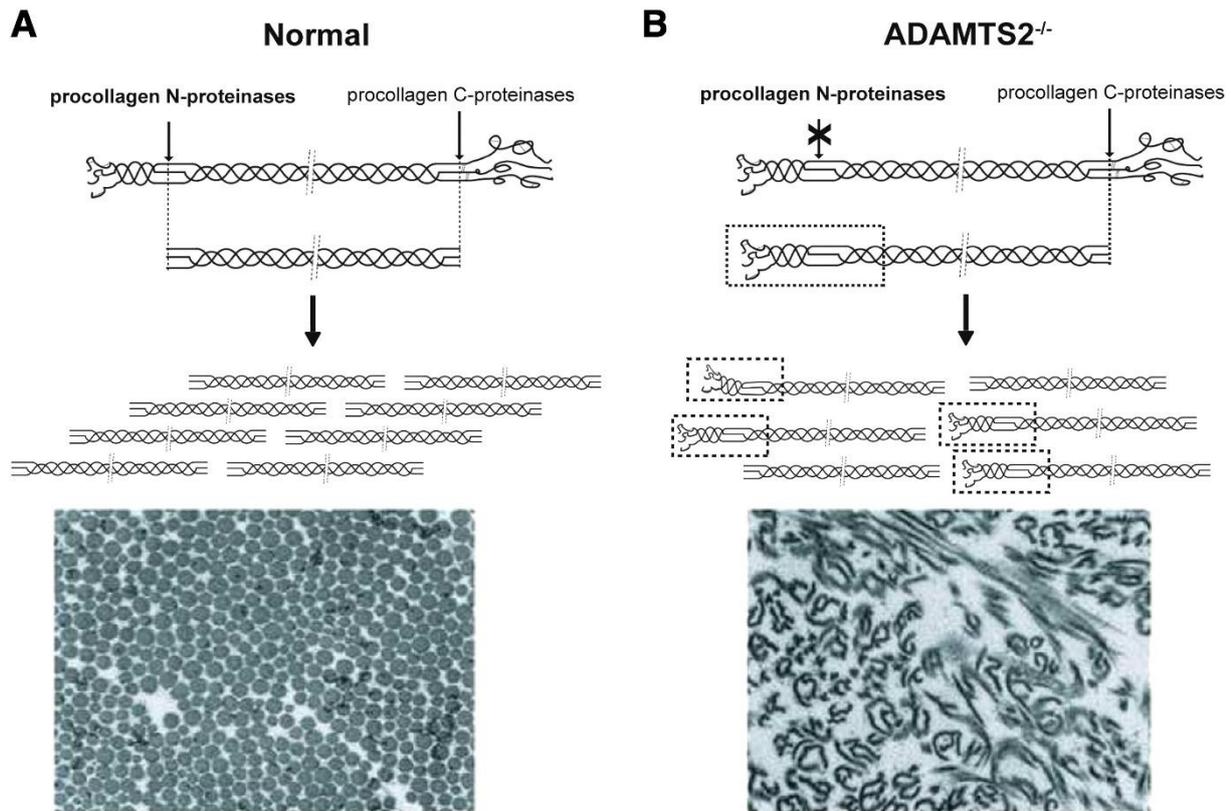


Figure 10. ADAMTS2 : une protéase essentielle pour l'organisation des collagènes fibrillaires. (A) Les fibrilles de collagène sont formées par l'assemblage progressif de chaînes α matures après clivage des propeptides par les N- et C-protéinases du procollagène. Ces fibrilles sont allongées et cylindriques en coupe transversale, comme visualisé par microscopie électronique à transmission dans une peau de souris normale. (B) En l'absence d'activité ADAMTS2, l'aminoprocollagène s'accumule. Cela conduit à la formation de structures collagéniques en forme de rubans (hiéroglyphes) aux propriétés mécaniques médiocres et responsables de la fragilité de la peau observée chez les patients atteints du syndrome d'Ehlers-Danlos de type dermatosparactique ou dermatosparaxie chez les animaux. (Image extraite de Bekhouche M et al., 2015)

Les ADAMTS2, 3 et 14 présentent différentes fonctions biologiques qui ne peuvent s'expliquer par la seule activité de maturation des collagènes fibrillaires. En effet, les embryons de souris déficientes pour l'ADAMTS3 meurent avant la naissance, après 15 jours de gestation. Les embryons présentent des défauts de formation des vaisseaux sanguins et lymphatiques (86). Ce rôle potentiel des procollagène N-protéinases dans le système cardiovasculaire est en accord avec des études rapportant l'association du gène ADAMTS2 à la prédisposition aux accidents vasculaires cérébraux pédiatriques (87), l'enrichissement en ADAMTS2 et ADAMTS3 dans les plaques de patients présentant un infarctus aigu du myocarde (88) ou encore l'association du gène de l'Adamts14 à la prédisposition à la sclérose en plaque (89).

L'ensemble de ces données suggère que le répertoire de substrat des ADAMTS2, 3 et 14 n'est pas restreint aux seuls collagènes fibrillaires. L'objectif des recherches post-doctorales était de déterminer les substrats de ces protéases par protéomique.

I. 3. ENVIRONNEMENTS MATRICIELS & INGENIERIE TISSULAIRE

« de la biologie de la matrice à une matrice biologique »

I. 3. a. Contexte

L'ingénierie tissulaire vise à réparer/régénérer un tissu à partir d'un échafaudage ou matrice tridimensionnelle qui sera utilisée pour remplacer temporairement le tissu lésé et qui sera remplacée par un tissu néoformé présentant les mêmes fonctions que celui d'origine. L'ingénierie tissulaire est caractérisée par une triade associant un échafaudage tridimensionnel, des cellules (souches mésenchymateuses) et des protéines/peptides bioactifs (peptides, facteurs de croissances...) (Fig. 11) (90).

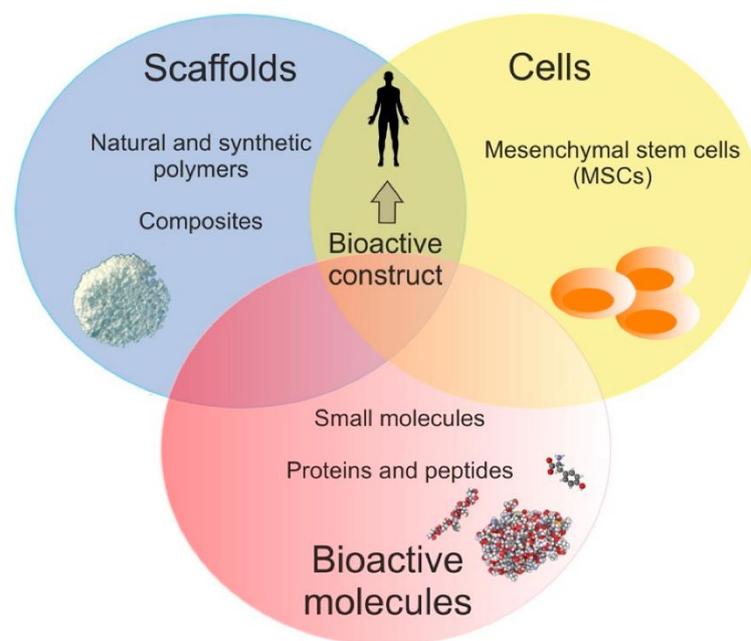


Figure 11. Triade de l'ingénierie tissulaire. Cette triade comprend trois éléments : un échafaudage tridimensionnel, des cellules souches mésenchymateuses et de molécules bioactives afin de réparer/régénérer le tissu choisit (image extraite de Klimek K & Ginalska G, 2020).

Il existe un grand nombre de publications rapportant différentes combinaisons de matrices 3D naturelles, synthétiques ou hybrides plus ou moins adaptées au tissu à réparer/régénérer (91). La régénération tissulaire à partir d'hydrogel et de cellules souches nécessite différentes étapes qui restent peu caractérisées ce qui constitue un réel verrou scientifique à ce type d'approche pouvant conduire à des échecs à des étapes précliniques. En effet, la réparation du tissu va nécessiter des interactions cellules-matrice 3D favorisant une réponse cellulaire pro régénérative et le remplacement contrôlé de la matrice 3D temporaire par une MEC semblable à celui d'origine. En effet, à l'instar des mécanismes pathophysiologique, la matrice 3D va constituer un environnement

qui conditionnera les fonctions des cellules. Cette matrice 3D sera également en lien avec un environnement hôte qui nécessite des relations réciproquement favorables à la régénération tissulaire et nécessitera, entre autres, l'établissement d'une réponse immunitaire pro-régénérative (92). L'absence de contrôle peut conduire à la formation de tissus dysfonctionnels tels que la formation de tissus cicatriciels fibrosés ou de minéralisation ectopique (93). La réussite de ce type d'approches nécessite une collaboration étroite entre cliniciens et chercheurs de différents domaines (biochimie, biologie cellulaire et chimie).

Les recherches que je mène aujourd'hui s'intéressent particulièrement à ces environnements matriciels bio-inspirés sous forme de gel hydratés (hydrogels). Ces recherches visent à décrypter les mécanismes enzymatiques et biomoléculaires de régénération tissulaire à base d'hydrogels afin de créer des environnements spécifiquement adaptés aux tissus à régénérer. Je mets à profit mon expérience dans l'étude des mécanismes enzymatiques et de la matrice extracellulaire pour contrôler le remplacement de l'environnement matriciel temporaire par un tissu fonctionnel. Depuis 2018, ces recherches se concentrent sur la régénération/réparation de la pulpe dentaire humaine, en collaboration de deux praticiens dentaires (Pr Jean-Christophe FARGES et le Pr Maxime DUCRET), afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des infections carieuses.

I. 3. b. La pulpe dentaire

La pulpe dentaire (PD) est un tissu conjonctif lâche situé dans l'espace endodontique présent au centre de la dent (Fig. 12). Elle est principalement composée de fibroblastes et de cellules souches mésenchymateuses (CSM) incluses dans une matrice extracellulaire principalement constituée des collagènes fibrillaires I et III. Comparativement, la dentine ou la peau contiennent une proportion importante de collagène de type I (80 à 98%), alors que la matrice collagénique de la PD contient 56% de collagène de type I, 41% de collagène de type III, 2% de collagène de type V et 0.5% de collagène de type VI (94). La PD contient également de la fibronectine, de nombreux protéoglycanes tels que la décorine, le biglycane, le lumican et le versicane, ainsi que des glycosaminoglycanes tel que l'acide hyaluronique (94,95). Ces protéoglycanes et glycosaminoglycanes régulent l'hydratation du tissu et participent à la fibrillogenèse du collagène (96). Ils participeraient également à la formation d'un environnement viscoélastique pouvant agir comme support à la minéralisation. La dentine entourant la PD est quant à elle produite par des cellules spécialisées, alignées à l'interface dentine-pulpe, les odontoblastes. Ces cellules présentent des prolongements logés dans des structures tubulaires traversant la dentine, les tubules

dentinaires (Fig. 13). En dessous de cette couche de cellule odontoblastique, on peut distinguer une zone acellulaire et riche en capillaires sanguins, fournissant des cellules immunitaires en cas d'infection, suivie d'une zone sous odontoblastique riche en cellules progénitrices et cellules souches mésenchymateuses. La pulpe dentaire sous-jacente est principalement formée par des fibroblastes (Fig. 13). A l'extrémité des racines dentaires, la PD communique avec les tissus parodontaux à travers une ouverture de taille réduite, le foramen apical, qui permet le passage des vaisseaux sanguins et fibres nerveuses. **Le PD est responsable de la vitalité et de la santé de la dent, de la sensation de douleur, ainsi que de la défense immunitaire et de la réparation/régénération après lésion.**

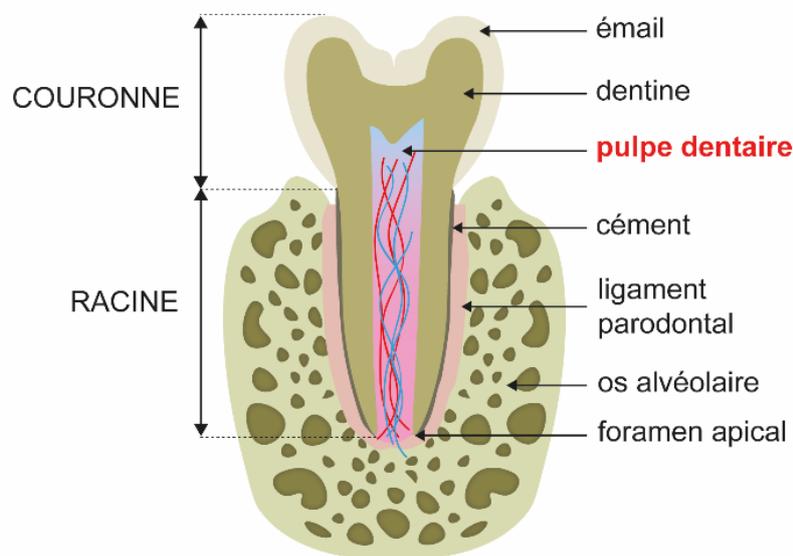


Figure 12. Organisation tissulaire de la dent

I. 3. c. Les pulpites réversibles et irréversibles

La carie est caractérisée par la pénétration progressive de bactéries de la flore orale dans les tissus minéralisés dentaires, émail puis dentine. Ces bactéries causent l'inflammation de la PD (Fig. 13) (97,98). A un stade précoce, l'inflammation résulte principalement de motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes ou PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) localisées dans la dentine et qui vont induire une réponse immunitaire au sein de la pulpe dentaire et notamment via les odontoblastes (97,98). A ce stade, l'inflammation de la PD (pulpite) est caractérisée par une hyperémie légère qui pourra régresser si le praticien supprime la lésion carieuse et les bactéries qu'elle contient. La pulpite est réversible et est accompagnée d'une douleur légère à modérée. A un stade plus avancé, les bactéries peuvent s'infiltrer dans le tissu pulpaire et induire l'augmentation des processus inflammatoires (Fig. 13). Cette inflammation exacerbée conduit à une pulpite aiguë, irréversible, accompagnée d'une douleur irradiante sévère

de longue durée. Du fait de l'incapacité de l'espace pulpaire à se dilater sous l'effet de l'inflammation, la pulpite irréversible conduit inévitablement à la nécrose du tissu pulpaire (98,99). Il est important de noter ici que la position des bactéries au sein de la dent (intradentinaire ou intrapulpaire) ne préjuge pas du caractère réversible/irréversible de la pulpite. A ce jour, aucun test ne permet de discriminer le caractère réversible/irréversible une pulpite d'autant plus que cette notion même de pulpite irréversible reste discuté (98).

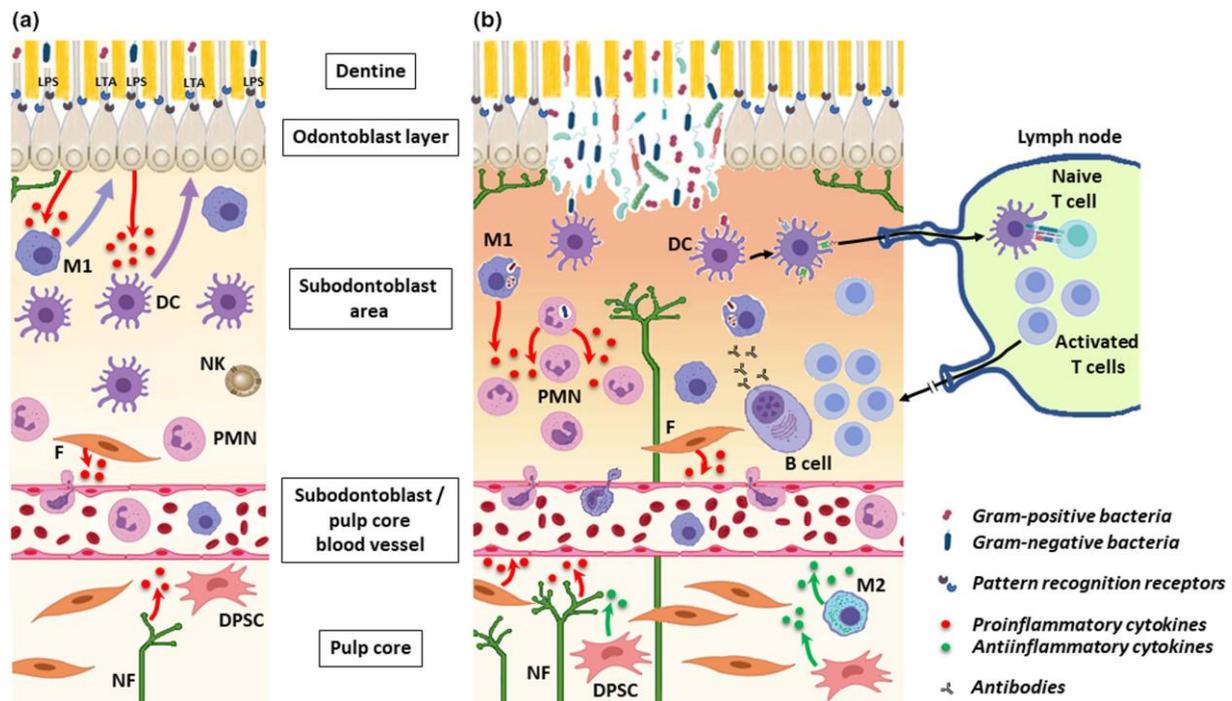


Figure 13. Principaux mécanismes cellulaires impliqués dans la pulpite induite par les caries. (a) Réponse cellulaire inflammatoire initiale à la présence de PAMP intradentaires un stade précoce de pulpite. (b) Réponse cellulaire inflammatoire à la présence de bactéries intrapulpaire à un stade avancé de pulpite. LPS, lipopolysaccharide ; LTA, acide lipoteichoïque ; M1, macrophage pro-inflammatoire de type 1 ; DC, cellule dendritique ; NK, cellule tueuse naturelle ; F, fibroblaste ; PMN, neutrophile polymorphonucléaire ; DPSC, cellule souche de la pulpe dentaire ; NF, fibre nerveuse ; M2, macrophage anti-inflammatoire de type 2. (image extraite de Richert R et al., 2022).

I. 3. d. Conséquences de la carie dentaire en santé publique

La carie dentaire est une infection chronique largement répandue qui affecte plus de la moitié de la population mondiale (100). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la carie des dents définitives est l'affection bucco-dentaire la plus répandue ; elle touche près de 2.3 milliards de personnes à travers le monde (101). Dans un rapport datant de 2010, la Haute Autorité de Santé (HAS) estimait que 33% à 50% de la population française adulte avait au moins une dent cariée à traiter. L'absence de traitement des caries peut conduire à un développement de l'infection au niveau parodontal, et plus tard, à des maladies systémiques (polyarthrite rhumatoïde, maladies cardiovasculaires...) (102,103). Plus récemment, la maladie parodontale a même été liée à la maladie d'Alzheimer (104).

I. 3. e. Stratégies thérapeutiques pour le soin de la carie dentaire

Traitement actuel des caries dentaires

Dans le cas de pulpite irréversible, le praticien élimine la PD nécrosée, désinfecte l'espace endodontique et l'obture avec un matériau isoprénoïde inerte dérivé du latex, la gutta percha, afin de prévenir une future colonisation bactérienne (Fig. 14). Ce traitement endodontique conduit à une dent fonctionnelle mais morte (« dévitalisée ») (59,105). **La dévitalisation systématique des dents cariées fait face à de nombreuses critiques en raison de la perte de vitalité et d'immunosurveillance augmentant le risque de fractures et réinfections (59,105).**

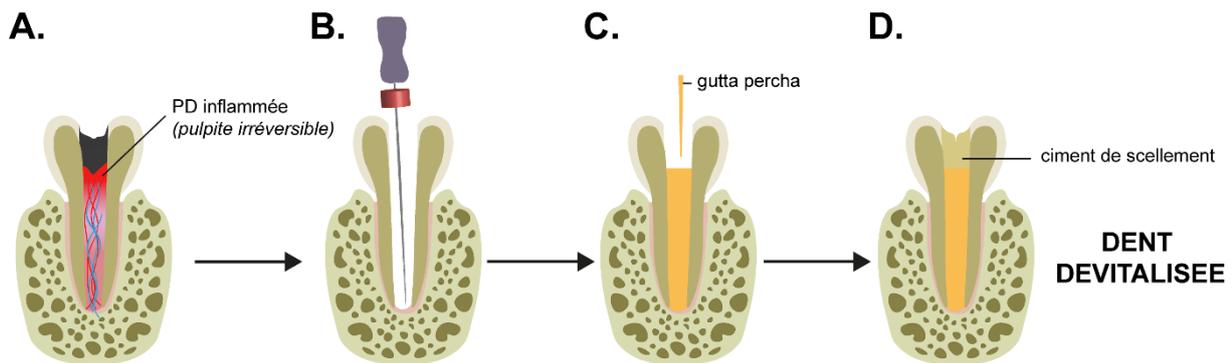


Figure 14. Traitement actuel de la pulpite irréversible. (A) Pulpite irréversible. (B) Extraction de la PD et désinfection. (C) Obturation de l'espace endodontique par de la gutta percha. (D) Scellement de la dent.

Stratégies thérapeutiques alternatives innovantes

Les associations américaine et européenne d'endodontie pointent l'importance de développer des stratégies thérapeutiques afin de maintenir ou de rétablir la vitalité pulpaire (106). Deux types de stratégies sont envisagées afin de maintenir la vitalité pulpaire en fonction de la situation clinique. Les stratégies dites bioconservatrices, basées sur l'amputation partielle de la pulpe dentaire, sont proposées en cas de pulpites légères à modérées également qualifiées de pulpites irréversibles localisées (107,108). D'autre part, les procédures de régénération endodontique (PRE), notamment à partir de cellules souches associées à un hydrogel hydraté, sont quant à elles proposées en cas de pulpites irréversibles afin de remplacer le tissu pulpaire nécrosé (107).

Procédures de régénération endodontique (PRE)

Les procédures de régénération endodontique (PRE) sont basées sur l'association d'un support matriciel hydraté servant de matrice tridimensionnelle aux cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire (CSM-PD) (59,107,109,110). En cas de pulpites irréversibles, et au lieu de dévitaliser la dent, le praticien remplacerait la pulpe dentaire par cette matrice tridimensionnelle associée ou non à des CSM-PD (Fig. 15). Différents types matrice tridimensionnelles ont été testés incluant des polymères/copolymères synthétiques, des poudres d'hydroxyapatite/phosphate

tricalciques, des peptides auto-assemblants et du plasma riche en plaquettes (111–115). Cependant, aucune de ces matrices tridimensionnelles ne permet d’obtenir un tissu pulpaire entièrement fonctionnel. Elles induisent plutôt la formation de tissus cicatriciels fibrotiques ou minéralisés en raison du remplacement inapproprié de l’hydrogel par les CSM-PD (59,116). En effet, **la régénération tissulaire nécessite une régulation fine dans le temps du comportement des CSM-PD pour permettre la dégradation de l’échafaudage et la synthèse coordonnée d’une MEC similaire à celle de la PD**. A ce jour, les mécanismes biomoléculaires impliqués dans ces phénomènes sont totalement inconnus. L’analyse de la littérature révèle que **ce manque de connaissances fondamentales est un verrou clinique majeur**. Le défi scientifique pour les années à venir est par conséquent l’investigation des mécanismes qui président à la dégradation de l’hydrogel et à son remplacement par une matrice produite par des CSM, typiques du tissu original. Cette recherche permettrait d’identifier des points de contrôles pour guider la régénération tissulaire, plutôt que la réparation cicatricielle ou la minéralisation ectopique, et ce, dans différents contextes ou selon différentes indications (59,93,116,117).

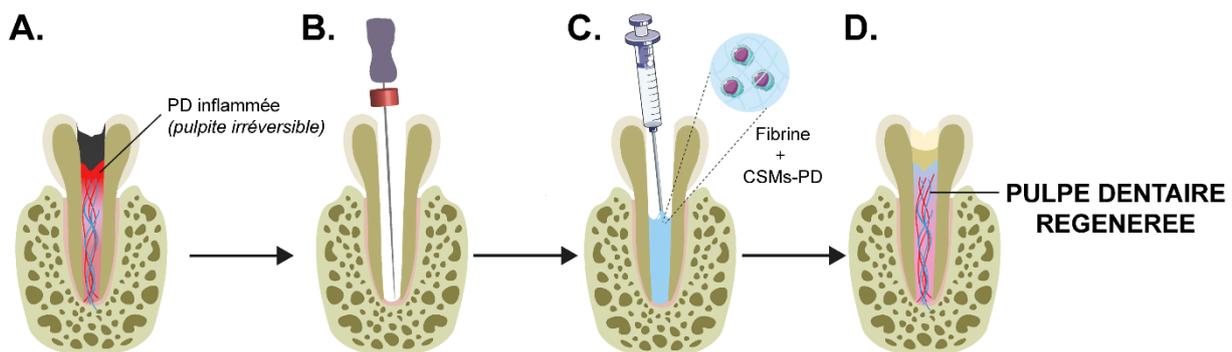


Figure 15. Procédure de régénération endodontique. (A) Pulpite irréversible. (B) Extraction de la PD et désinfection. (C) Injection de l’échafaudage tridimensionnel cellularisé. (D) Remplacement de l’hydrogel par un tissu semblable à la PD.

I. 3. f. Les cellules souches de la pulpe dentaire

Les odontologues hospitaliers du LBTI ont un accès privilégié à la pulpe dentaire humaine issue de troisièmes molaires extraites pour des raisons orthodontiques. Les dents sont extraites chez des donneurs de 12-16 ans avant que la racine se développe afin retirer facilement la pulpe dentaire sans outiller la procédure et de bénéficier d’une proportion importante de cellules souches progénitrices à ce stade (118,119). De nombreuses études et essais cliniques ont montré que ces cellules, de par leur origine, sont les meilleures candidates pour régénérer le tissu pulpaire (110,120–123). L’utilisation des CSM-PD pour des approches d’ingénierie tissulaire est particulièrement bénéfique car elles présentent des propriétés anti-inflammatoires via l’inhibition de la réponse cellulaire dépendante des lymphocytes T, et leur capacité de moduler le ratio M1/M2

en faveur des M2 anti-inflammatoires et pro-régénératifs (124). Les CSM-PD présentent un aspect fibroblastique en culture 2D et un profil immunophénotypique mésenchymateux caractérisé par l'expression des marqueurs CD217, Stro-1, CD146 et/ou MSCA1 (97,125). Leur caractère souche a été confirmé par leur capacité à se différencier *in vitro* en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes (Fig. 16) (126). Les données de la littérature montrent que les CSM-PD expriment les métalloprotéases MMP2, MMP9, MMP7, MMP23 et MMP25 (127–129). Cependant, l'investigation détaillée de la réponse cellulaire des CSM-PD à la fibrine structurée sous forme d'hydrogel est manquante.

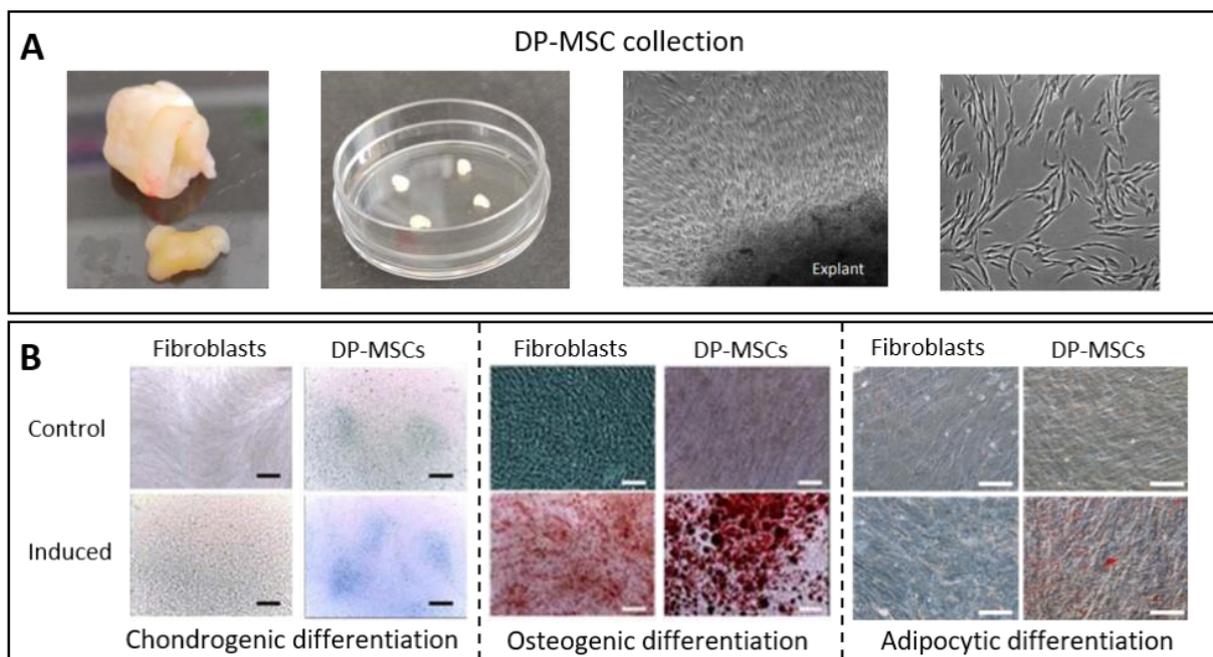


Figure 16. Collecte et différenciation des CSM-PD. (A) CSM-PD isolées par la méthode d'explant à partir de troisièmes molaires avulsées pour des raisons orthodontiques. (B) Expérience montrant la capacité des CSM-PD à suivre une différenciation chondrogénique (coloration au bleu Alcian), ostéogénique (coloration à l'Alizarine Rouge S) et adipocytaire (coloration au Rouge huile O). Les fibroblastes sont utilisés comme contrôle négatif (Images de l'équipe ROAD et extraites de Fabre *et al.*, 2019).

I. 3. g. La fibrine : une matrice 3D bioinspirée de choix pour les PRE

La fibrine est utilisée en thérapeutique humaine en tant que colle biologique. Sa validation par les agences européennes et américaines du médicament facilitera le transfert en clinique d'hydrogels de fibrine formulés pour la régénération de la pulpe dentaire (59). **Les hydrogels de fibrine sont particulièrement adaptés pour la régénération du tissu pulpaire** car plusieurs études ont démontré qu'ils favorisent la néoformation d'une matrice collagénique semblable à celle de la PD *in vitro* et *in vivo* (59,111,130,131). En qualité de matrice biologique temporaire, ses avantages incluent une excellente cytocompatibilité et la non-toxicité de ses produits de

dégradation (132). Les produits de dégradation de la fibrine sont, depuis longtemps, connus pour promouvoir l'angiogenèse (133) et la chimiotaxie (134), deux étapes cruciales pour la régénération tissulaire. De plus, les propriétés mécaniques des échafaudages de fibrine peuvent être facilement régulées en contrôlant la concentration en fibrinogène et la force ionique, ce qui permet d'obtenir (i) des propriétés viscoélastiques similaires à la MEC du tissu conjonctif étudié, (ii) une diffusion rapide des nutriments et métabolites, et (iii) une incorporation homogène des cellules (132). La fibrine apparaît ainsi comme un échafaudage idéal pour la régénération tissulaire. Cependant, l'interaction des CSM-PD avec la fibrine ainsi que sa dégradation et son remplacement restent inconnus et doivent être investigués afin d'optimiser l'utilisation de la fibrine comme biomatériau pour les PRE.

Un hydrogel de fibrine injectable a été développé au LBTI dont le temps de prise de quelques minutes est adapté à une utilisation clinique. Les résultats obtenus montrent clairement que la fibrine, sous forme d'hydrogel, favorise la viabilité et la différenciation des CSM-PD en fibroblastes pulpaire ; et permet la néoformation *in vitro* d'une matrice extracellulaire à base de collagènes de type I et III (Fig. 17) (131).

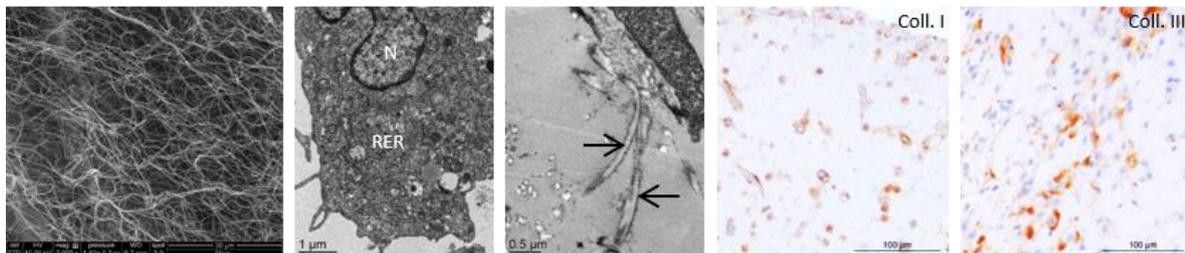


Figure 17. Comportement des CSM-PD au sein de l'hydrogel de fibrine. De gauche à droite : hydrogel observé au MEB, ultrastructure des CSM-PD au sein de l'hydrogel (RER : réticulum endoplasmique granuleux ; N : noyau), agrandissement sur les fibres de collagènes produites par les DP-CSM (indiqués par des flèches), immunomarquage des collagènes de type I et III. (Images extraites en partie de *Ducret M et al., 2019*)

Des études du laboratoire, réalisées dans un modèle murin de racines dentaires implantées en sous-cutané dans le dos de souris immunodéficientes (souris *nude*) (Fig. 18), montrent que l'hydrogel de fibrine formulé permet la vascularisation de l'implant ainsi que la polarisation des macrophages pro-régénératif et anti-inflammatoires de type M2 dans la région proche de l'implant (59,135).

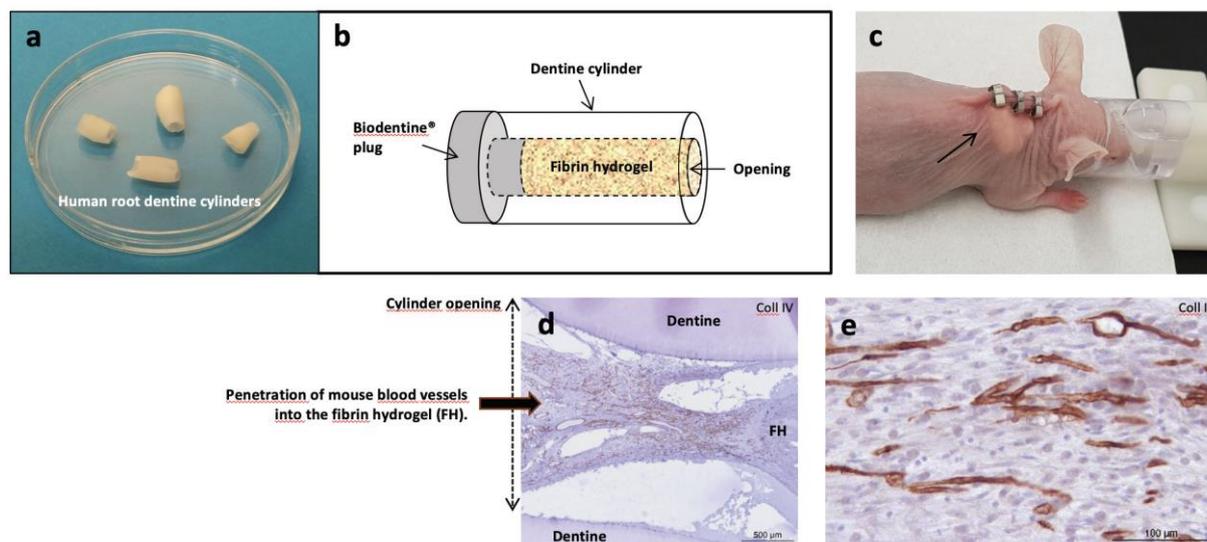


Figure 18. Implantation sous-cutanée d'un cylindre de dentine contenant l'hydrogel de fibrine chez la souris *nude* durant 7 jours. (a) Cylindres de dentine. (b) Représentation schématique du cylindre contenant l'hydrogel de fibrine cellularisé. (c) Photo de l'implant chez la souris (cylindre indiqué par une flèche). (d-e) Immunomarquage du collagène de type IV. FH : hydrogel de fibrine.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'hydrogel ainsi formulé n'affecte pas la viabilité des CSM-PD et n'induit pas de réponse inflammatoire délétère. Il permet une synthèse de matrice par les CSM et n'empêche pas la mise en place d'une vascularisation au sein de l'implant. Des études complémentaires sont nécessaires afin de caractériser les mécanismes initiés par les CSM-PD au sein de cet hydrogel ainsi que la nature de la matrice néosynthétisée.

Le projet actuellement mené vise à mieux comprendre les mécanismes et notamment enzymatiques conduisant au remplacement de ces matrice extracellulaires temporaires par des tissus fonctionnels.

II. PROJETS DE RECHERCHE

II. 1. LES DESHYDROGENASES EN BIOCATALYSE

Projet de Thèse - Université Claude Bernard Lyon 1

Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaires (ICBMS - UMR5246)

Equipe : Génie Enzymatique Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS)

Direction : Pr. L.J. BLUM et Dr. B. DOUMECHE

Titre : étude de la relation structure/fonction de la formiate déshydrogénase (FDH) de *Candida boidinii* en liquide ionique.

II. 1. a. Mécanisme d'inhibition de la FDH en liquide ioniques

L'objectif du projet de thèse était de comprendre les phénomènes responsables de l'inactivation de la formiate déshydrogénase de *Candida boidinii* dans les LIs. Dans un premier temps, une méthode simple, basée sur l'atténuation de fluorescence, a été adaptée pour étudier de la structure des protéines en LIs, et apporter une explication quant à la controverse liée à l'utilisation des méthodes spectroscopiques en LIs (136). Cette étude a montré que les LIs absorbent la lumière ce qui explique l'impossibilité pour certains auteurs d'utiliser des méthodes spectroscopiques en LIs. Ces travaux montrent qu'en présence de LIs, la constante de Stern-Volmer (K_{SV}) augmente de manière significative indiquant une dénaturation de l'enzyme et l'exposition de ses fluorophores à l'agent atténuateur (Fig. 19). La dénaturation protéique expliquerait donc l'inactivation des déshydrogénases en présence de LIs.

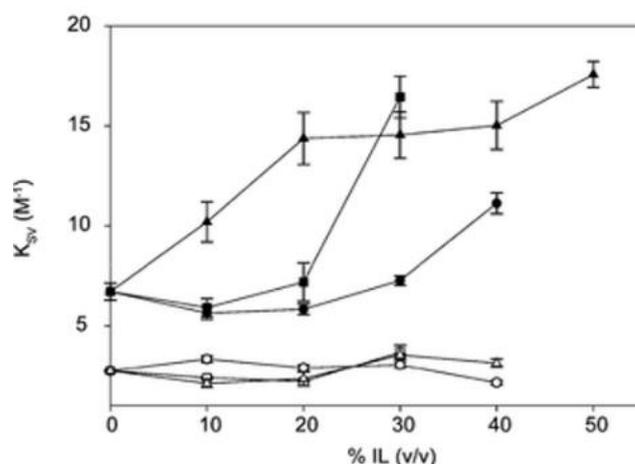


Figure 19. Evolution de la constante de Stern-Volmer (K_{SV}) d'atténuation de fluorescence de la FDH (noir) par de l'acrylamide en présence de concentrations croissantes de 3 différents liquides ioniques (ronds, carrés et triangles noirs). Des tryptophanyles sont utilisés comme contrôles négatifs (ronds, carrés et triangles blancs).

Image extraite de Bekhouche M et al., 2012.

II. 1. b. Modifications chimiques et évolution dirigées de la FDH

Deux approches ont été développées afin d'obtenir des enzymes actives en LIs (Fig. 20). La première approche était basée sur la modification chimique des enzymes par des cations analogues à ceux composant les LIs afin d'empêcher les interactions délétères et de préserver la couche d'hydratation du biocatalyseur.

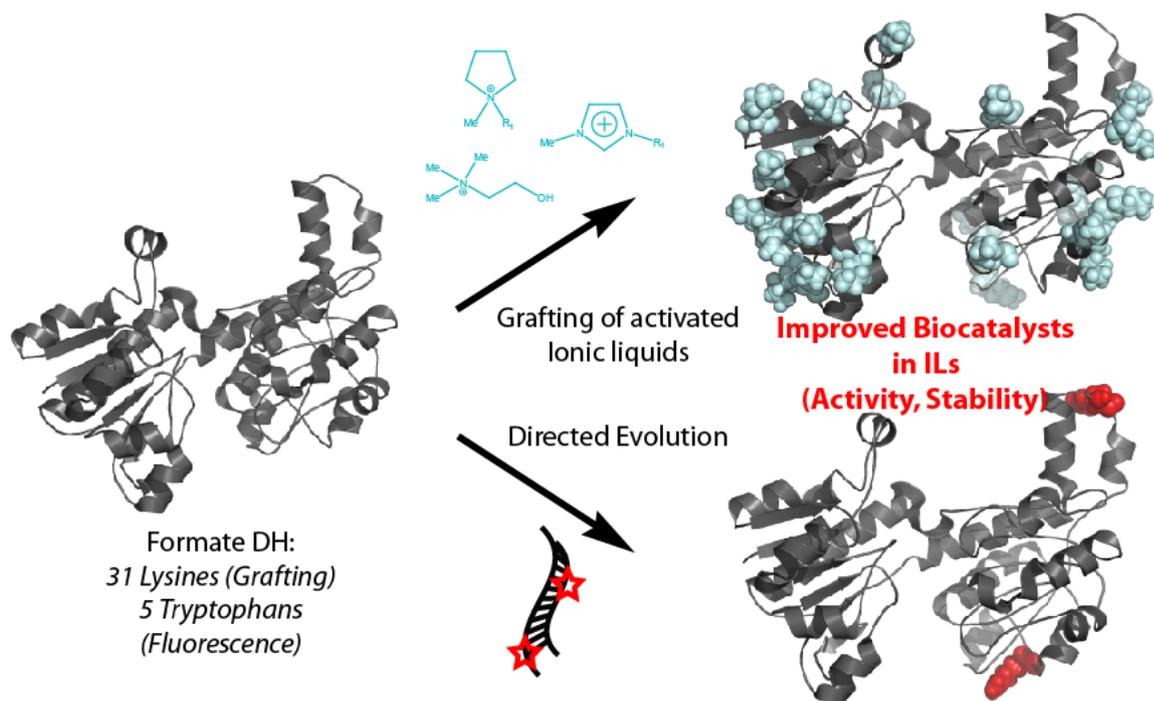


Figure 20. Approches utilisées afin d'améliorer les performances de la FDH en présence de LIs

Le nombre de modification a été déterminé par **spectrométrie de masse MS1**. L'**interaction** de l'enzyme avec son substrat (K_D) ainsi que les **paramètres cinétiques** ont également été déterminés par **spectroscopie de fluorescence**. Les résultats ont montré que plus le cation greffé présente un coefficient de viscosité important, en lien avec sa taille et sa chaotropie, et plus l'enzyme est inactive, déstructurée, et présente une affinité réduite pour son substrat (K_D) (Fig. 21). Inversement, le greffage de cations de petites tailles, kosmotropes, réduit les effets déstructurants des LIs. Ces travaux ont donc permis de mieux comprendre l'inactivation des biocatalyseurs en présence des LIs en fonction de la nature de ces derniers (137,138).

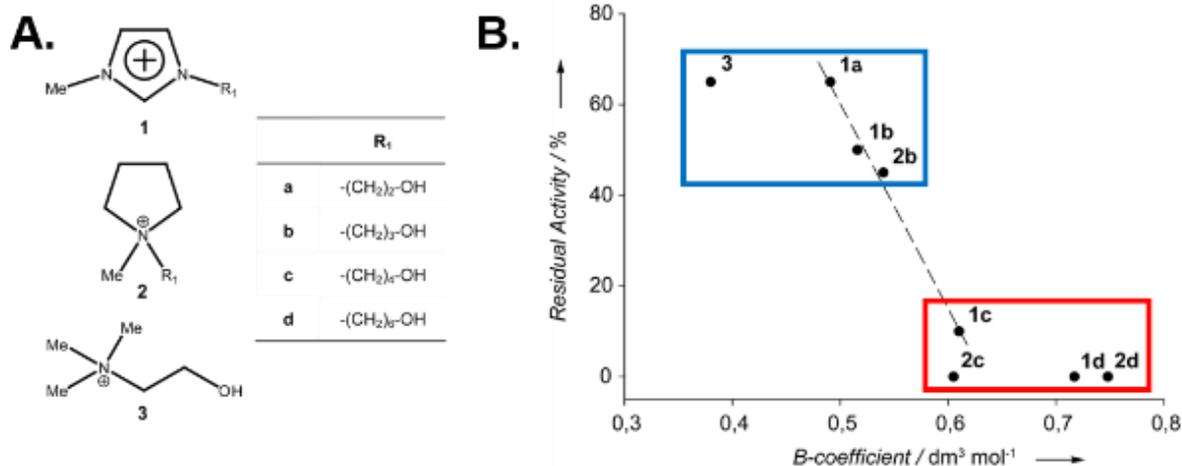


Figure 21. Activité résiduelle de la FDH après greffage de cations inspirés des LIs à sa surface. (A) Nature des différents cations greffés. (B) Activité résiduelle de la FDH en fonction du coefficient de viscosité B du cation greffé.

La seconde approche était l'évolution dirigée de l'enzyme basée sur le criblage d'une **bibliothèque de mutants créés par PCR de basse fidélité**. Ces travaux ont nécessité la mise au point des conditions de mutations ainsi qu'un test de criblage d'activité en deux étapes. Un premier test bleu/blanc, sur agar, afin de sélectionner les bactéries exprimant une enzyme active suivi d'un test en présence de LIs (Fig. 22). Dans ces conditions, 88 enzymes actives ont été sélectionnées à partir d'une banque de 987 clones dont une présentant une activité et une stabilité plus importante en présence de LIs. Ce mutant porte deux mutations N187S et T321S localisées à l'interface du dimère catalytique et qui augmenteraient l'interaction entre les deux sous-unités (139). La bibliothèque de mutants a également été utilisée pour la mise au point d'une méthode de criblage électrochimique d'activité enzymatique (140).

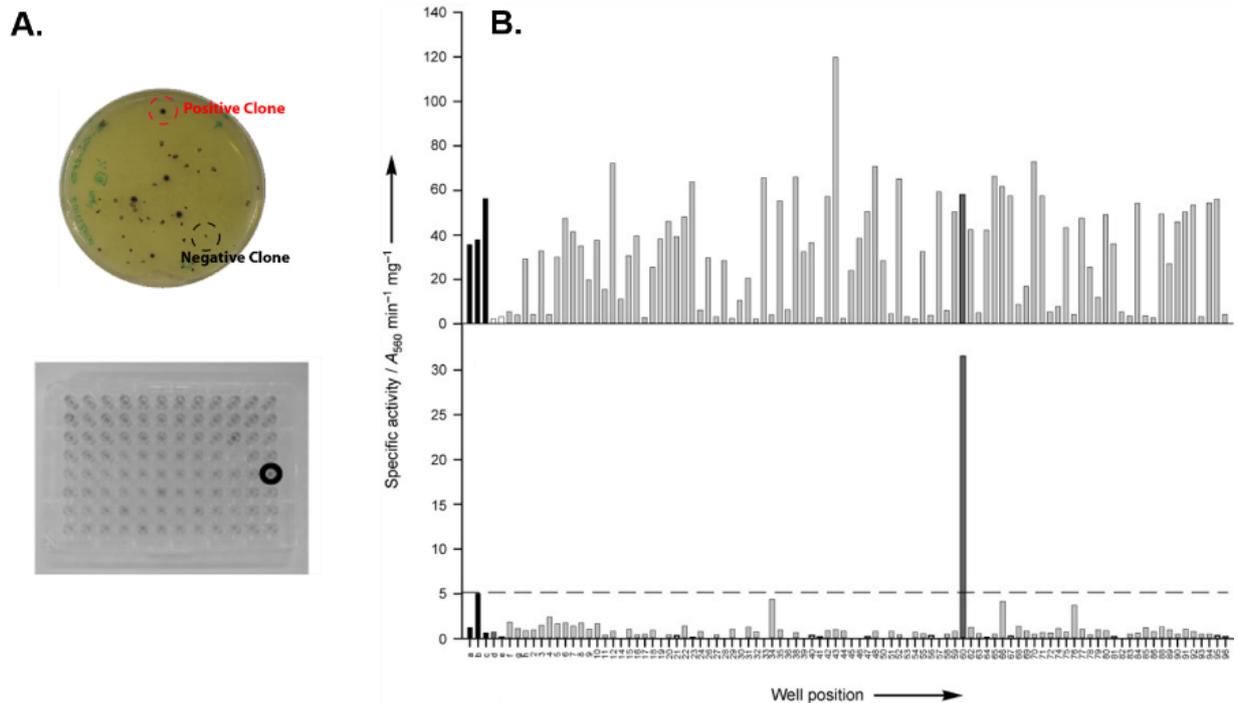


Figure 22. Criblage de la banque de mutants de la FDH pour une amélioration de l'activité en présence de LIs. (A) Criblage bleu/blanc à base de formazan sur agarose (haut) ou en présence de LIs (bas). (B) Criblage de la FDH en absence ou en présence de LIs. Les trois premières barres correspondent à la FDH non mutée.

En plus de l'obtention de biocatalyseurs plus actifs, ces travaux ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'inactivation des enzymes en LIs en lien avec les propriétés physico-chimiques (viscosité, composition en ions, kosmotropie / chaotropie) de ces derniers. Cette thèse a été supportée par une bourse fléchée sur thématique prioritaire du Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche attribuée par la région Rhône-Alpes.

II. 1. c. Valorisation du projet de thèse et perspectives

Points forts du projet (atouts) :

- Ce projet de thèse en biocatalyse a rapporté des données permettant de mieux comprendre les mécanismes biomoléculaires mis en jeu lors de réactions biocatalysées par des oxydoréductases en LI.
- Ce projet m'a permis d'acquérir une expérience technico-scientifique en enzymologie et en biologie moléculaire.
- Des communications orales (#4) et par poster (#4) ont été réalisées dans différents congrès nationaux et internationaux
- Cinq publications ont directement découlées de ce projet :

◇ **BEKHOUCHE M., Doumèche B. and Blum L.J.** Chemical modifications by ionic liquid-inspired cations improve the activity and the stability of formate dehydrogenase in [MMIm][Me₂PO₄]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2010: **65**(1-4), p. 73-78.

◇ **BEKHOUCHE M., Blum L.J. and Doumèche B.** Ionic liquid-inspired cations covalently bound to FDH improve its stability and activity in IL. *ChemCatChem* 2011: **3**(5), p. 875-882.

◇ **Carter J.L.L.*, BEKHOUCHE M.*, Noiriél A., Blum L.J., Doumèche B.** Directed evolution of a formate dehydrogenase for increased tolerance to ionic liquids reveals a new site for increasing the stability. *ChemBioChem* 2014: **15**(18), p. 2710-2718. * co-premiers auteurs

◇ **Abdellaoui S., BEKHOUCHE M., Noiriél A., Henkens R., Bonaventura C., Blum L.J. and Doumèche B.** Rapid electrochemical screening of NAD-dependant dehydrogenases in 96-well format. *Chemical Communications* 2013: **49**, p. 5781-5783.

◇ **BEKHOUCHE M., Blum L.J., Doumèche B.** Contribution of dynamic and static quenchers for the study of protein conformation in ionic liquids by steady-state fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 2012: **116**(1), p. 413-423.

Points à améliorer (faiblesses) :

- L'expérience en enseignement et encadrement n'a pas été initiée.
- Manque de mobilité nationale ou internationale
- Souhaitant étudier les mécanismes physiopathologiques, ce sujet ne m'a pas permis d'acquérir des connaissances/compétences pour l'études de ce type de mécanismes.

II. 2. LES ADAMTS DANS LA FORMATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Post-doc - Université de Liège (Liège, Belgique)
Institut GIGA-Cancer – Laboratoire de Biologie des tissus conjonctifs (LBTC)
Direction : Pr. A. COLIGE

Titre : Fonctions des ADAMTS2, 3 et 14 dans la construction de MEC

II. 2. a. Identification des substrats des ADAMTS2, 3 et 14 *in vitro*

J'ai étudié les protéases de la famille des ADAMTS dans le cadre de mes recherches postdoctorales à l'étranger. Des premières expériences ont été réalisées au sein de l'Institut Kennedy de Rhumatologie (Université d'Oxford) pour étudier les mécanismes d'inhibition des ADAMTS4 et ADAMTS5. En parallèle, un financement européen (Marie Curie, FP7-People-COFUND) a été obtenu afin d'étudier les procollagène N-protéinases (ADAMTS2, 3 et 14) et implanter une technique de protéomique au sein du Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs (Pr A COLIGE, LBTC, GIGA-Cancer, Liège, Belgique). Cette technique spécifiquement adaptée pour l'identification de substrats protéiques ("N-Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates", N-TAILS) consiste en la quantification relative multiplexée des neo N-termini générées par protéolyse. L'analyse des données a nécessité la maîtrise du pipeline d'analyse bioinformatique, Trans-Proteomic-Pipeline. La technique N-TAILS a été appliquée pour identifier les substrats potentiels des ADAMTS2, 3 et 14. Dans un premier temps, un modèle de co-culture de fibroblastes déficients pour l'ADAMTS2 (EDS) et de cellules surexprimant les protéases a été utilisé. **Des dizaines de nouveaux substrats potentiels ont été identifiés**, étendant ainsi très largement le répertoire de substrats des ADAMTS2, 3 et 14 (Fig. 23A). L'analyse fonctionnelle conforta leur implication dans la **formation de la matrice extracellulaire** et mit en avant **leur implication dans la régulation de la signalisation du TGF- β** (Fig. 23B).

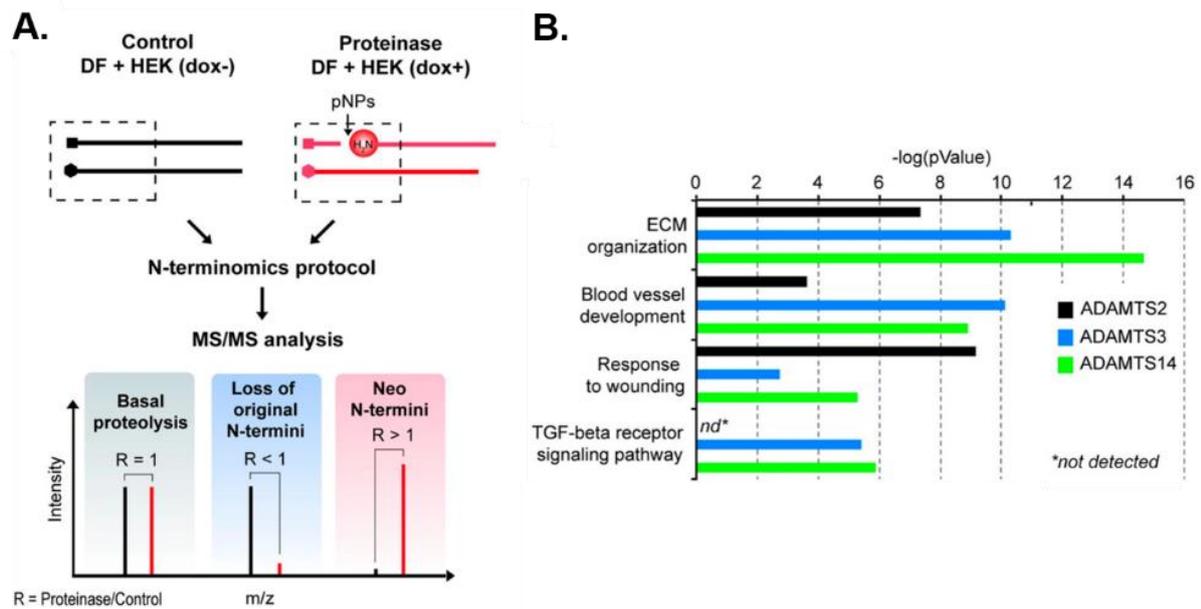


Figure 23. Protocole de N-terminomique mis en place au sein de l'institut GIGA (Liège) et appliqué aux ADAMTS2, 3 et 14. (A) schéma de la technique de N-TAILS appliqué au milieu de culture de fibroblastes humains d'une personne atteinte du syndrome d'Ehlers-Danlos de type dermatosparactique (DF) co-cultivés avec des cellules exprimant les ADAMTS2, 3 ou 14 de manière inducible. (b) Processus biologiques liés aux répertoires de substrats des ADAMTS2, 3 et 14 identifiés par BiNGO, une application de Cytoscape (version 2.8.2).

Parmi les substrats identifiés par protéomique, nous avons validé certains par différentes techniques. Les ADAMTS2, 3 et 14 clivent le domaine d'assemblage N-terminal de la fibronectine qui participe à la structuration de la forme globulaire plasmatique (Fig. 24A). Elles clivent également le LTBP1 ("Latent TGF-beta Binding Protein 1) (Fig. 24B) et le récepteur III du TGF- β (TGF- β RIII) impliqués dans la signalisation du TGF- β (Fig. 24C).

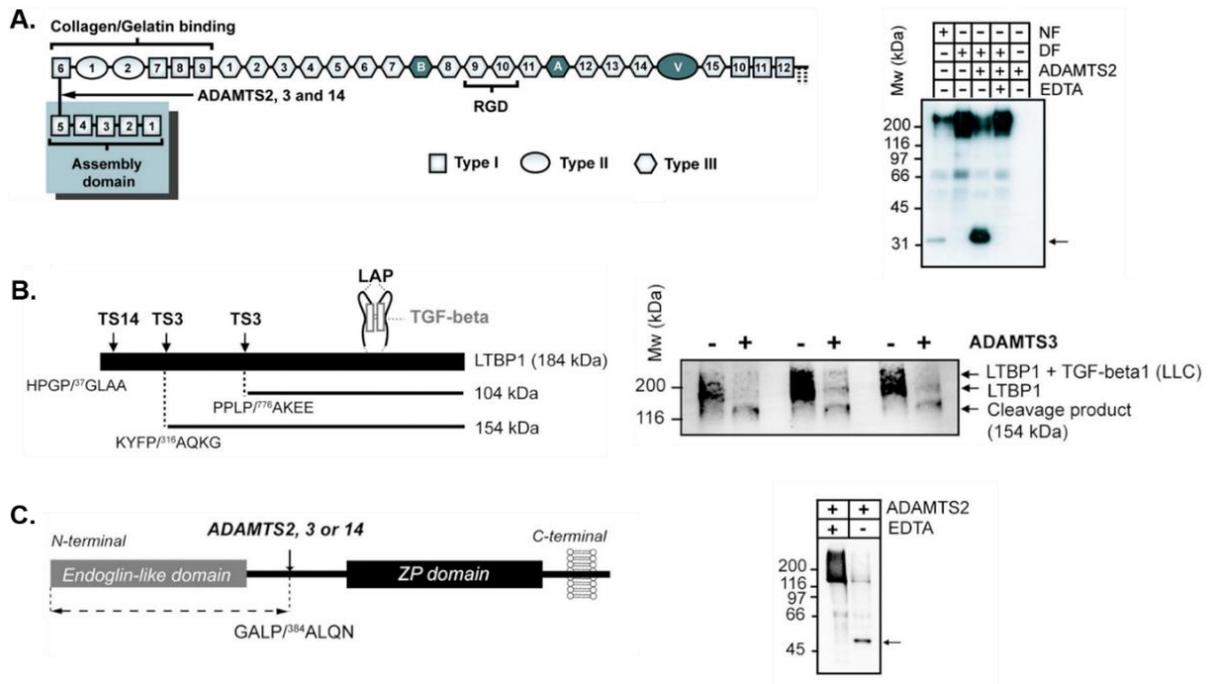


Figure 24. Validation des clivages de la fibronectine, du LTBP1 et du TGF- β RIII. (A) Schéma de la fibronectine montrant le site de clivage. Le Western blot du milieu conditionné par des fibroblastes humain normaux (NF) ou déficients pour l'ADAMTS2 (DF) en présence ou non d'ADAMTS2 et d'EDTA est rapporté sur la droite. (B) Schéma du LTBP1. Le Western blot dirigé contre LBTP1 du milieu conditionné par des cellules surexprimant l'ADAMTS3 est rapporté sur la droite. (C) Schéma du TGF- β RIII (ou bétaglycan) indiquant le site de clivage. Digestion *in vitro* du TGF- β RIII par l'ADAMTS observé par Western blot.

L'activité de la voie du TGF- β a été évaluée par la quantification des gènes rapporteurs α -SMA (" α Smooth Muscle Cells Actin") et CTGF ("Connective Tissue Growth Factor") par RT-PCR ainsi que par immunofluorescence. **Ces résultats montrent clairement que l'ADAMTS2 participe à l'activation de la voie du TGF- β** (Fig. 25). L'ensemble des substrats identifiés a également permis d'estimer un site de clivage préférentiel pour les ADAMTS2, 3 et 14 qui favorise les petits acides aminés non polaires ou faiblement hydrophobes (G, P, A, M, F et V) en position P1 et P1' du site de clivage.

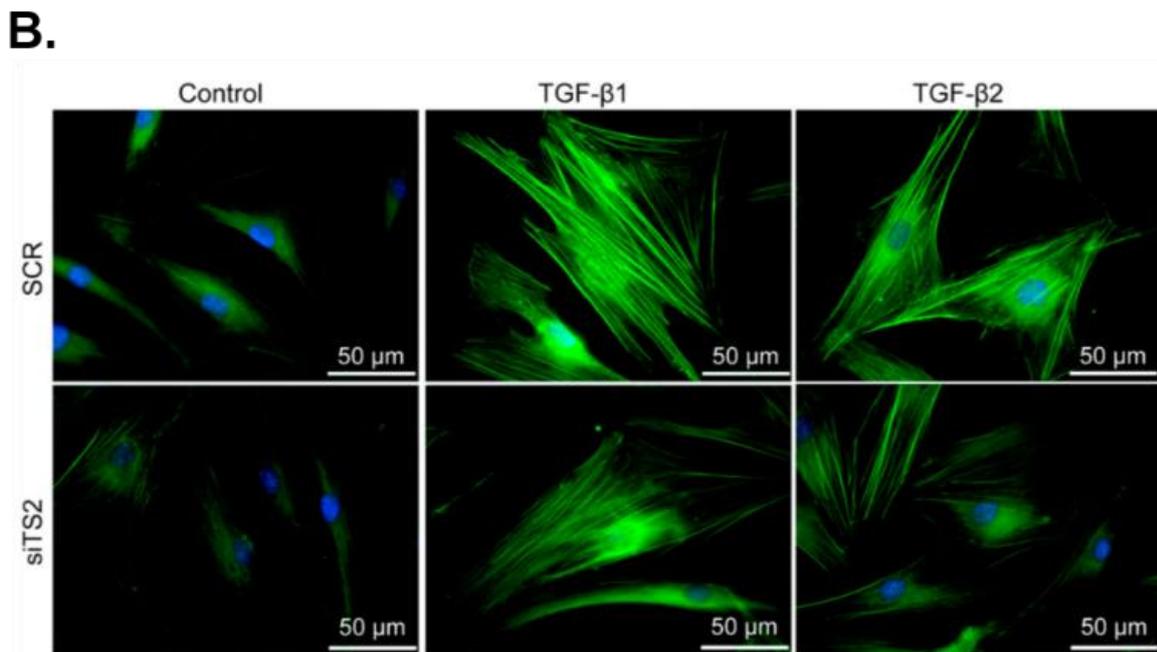
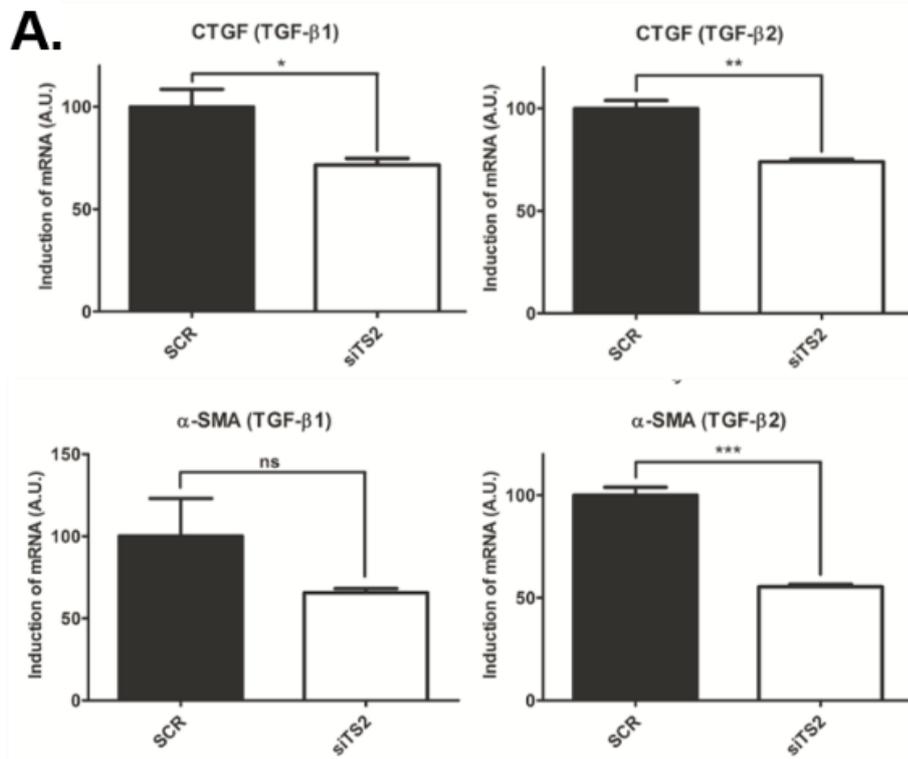


Figure 25. Rôle de l'ADAMTS2 dans la signalisation du TGF- β . (A) Quantification des gènes rapporteurs (α -SMA et CTGF) par RT-PCR après traitement de fibroblastes par du TGF- β 1 ou du TGF- β 2. L'ADAMTS2 est inactivé par un siRNA (siTS2), un siRNA non spécifique est utilisé comme contrôle (SCR). (B) Immunofluorescence montrant l' α -SMA.

II. 2. b. Identification des substrats des ADAMTS2, 3 et 14 *in vivo*

En parallèle, j'ai encadré un étudiant en thèse (Dr. Cédric LEDUC) dans le but de rechercher les substrats des ADAMTS2 et 14 *in vivo* afin de mieux comprendre le phénotype observé au niveau des peaux de souris déficientes pour les ADAMTS2 et/ou 14. **L'objectif a été de comparer les évènements protéolytiques à partir d'extraits protéiques de peaux de souris** (Fig. 26), ce qui a constitué un réel challenge d'utiliser une technique aussi sensible que la N-terminomique sur des échantillons aussi complexes.

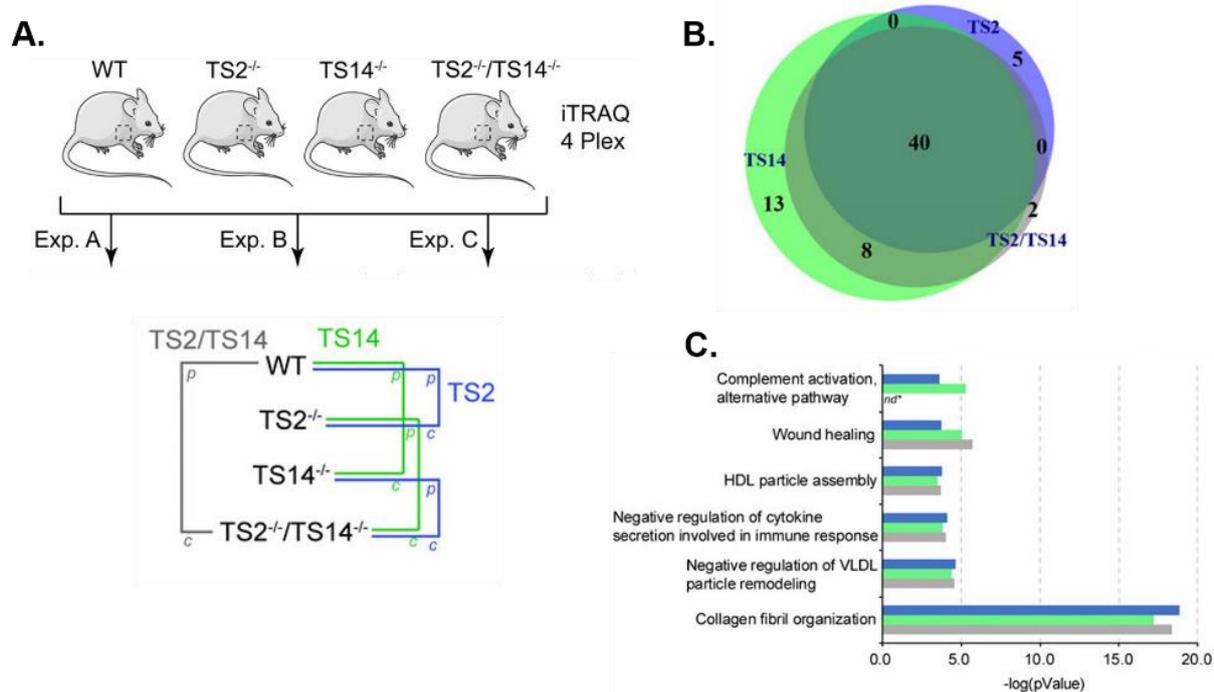
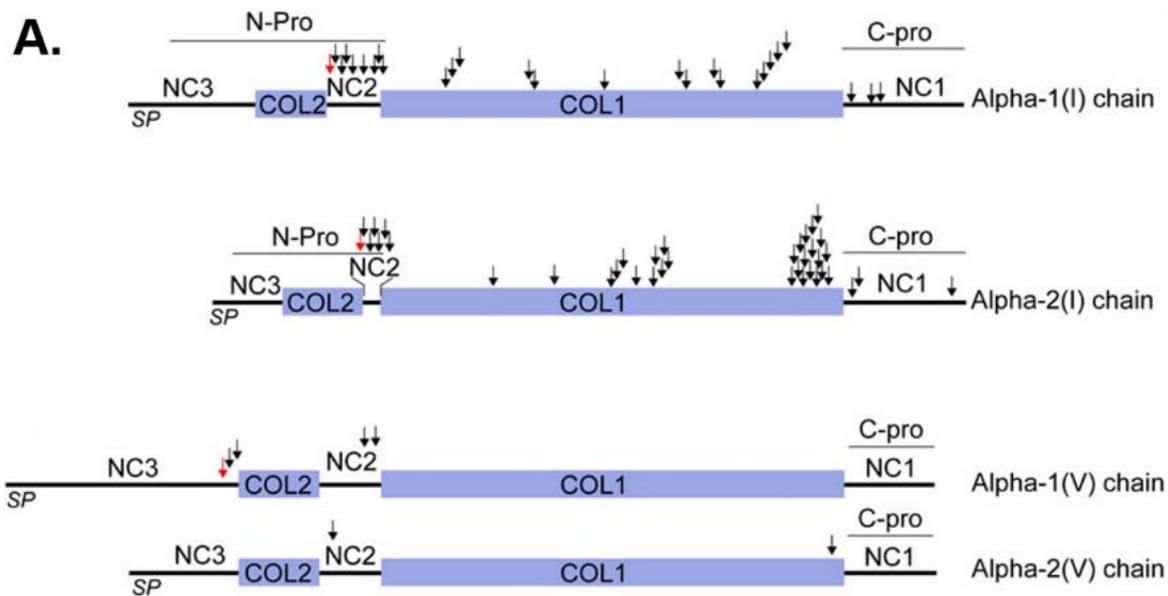


Figure 26. Investigation des substrats des ADAMTS2 et ADAMTS14 *in vivo*. (A) représentation schématique du protocole utilisé comprenant les rapports établis afin d'identifier les substrats potentiels exclusifs ou communs des ADAMTS2 (TS2) et 14 (TS14). (B) Diagramme de Venn montrant le nombre de substrats extracellulaires spécifiques ou communs aux ADAMTS2 et 14. (C) Processus biologiques associés aux ADAMTS2 et 14 dans la peau de souris identifiés en utilisant le logiciel Panther.

Néanmoins, ces travaux ont mis en évidence de nombreux substrats pour les ADAMTS2 et 14, ainsi qu'une redondance d'activité (Fig. 26B). L'annotation fonctionnelle indique un rôle prédominant dans l'organisation des collagènes fibrillaires mais également dans la cicatrisation et l'immunité innée en lien avec l'activation du complément (Fig. 26C). De manière surprenante, de nombreux sites de clivages sont observés au sein des collagènes fibrillaires chez les souris sauvages. Ces données suggèrent que les ADAMTS2 et ADAMTS14 participent à la dégradation protéolytique des collagènes fibrillaires *in vivo* (Fig. 27A). Des extraits de collagènes obtenues à partir de peaux de veaux normaux ou dermatosparactiques ont été incubés en présence d'ADAMTS2 recombinante. Les résultats confirment la dégradation des collagènes à différents sites (Figure 27B).



B.

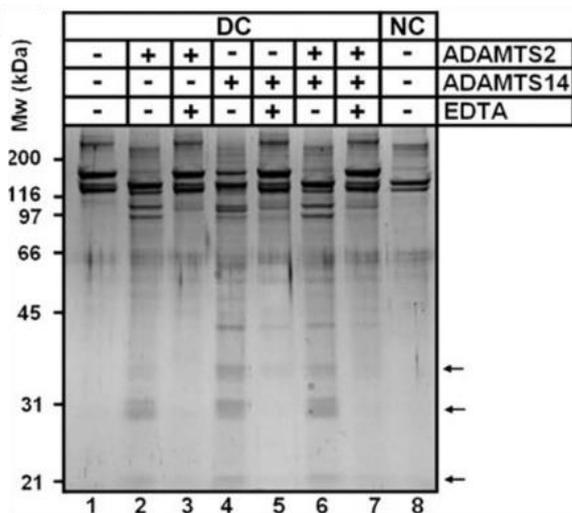


Figure 27. Dégradation des collagènes I et V par les ADAMTS2 et 14. (A) Représentations schématiques des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des collagènes de type I et V. NC, domaines non collagéniques ; COL, domaines collagéniques ; SP, peptide signal ; N- et C-Pro, N- et C-propeptides. Les sites de clivage rapportés dans la littérature sont indiqués par des flèches rouges. Les flèches noires indiquent les sites de clivages identifiés par protéomique dans les peaux de souris. (B) Digestions *in vitro* de collagène de veaux normaux (NC) ou dermatosparactiques (DC) observés par SDS-PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie. Les propeptides N-terminaux sont indiqués par des flèches. La présence d'ADAMTS2 ou 14 produit des fragments de différentes tailles confirmant la dégradation des collagènes à différents sites.

Ces investigations suggèrent que les ADAMTS2 et 14 présentent une activité de relecture conduisant à la dégradation des collagènes défectueux pour permettre la formation d'une matrice extracellulaire bien structurée (141).

L'ensemble de ces études protéomiques ont mis en évidence le rôle essentiel de ces protéases dans la formation de la matrice extracellulaire et le renouvellement des collagènes fibrillaires. Ils permettent de mieux comprendre les rôles pathophysiologiques de ces protéases. En effet, l'altération de la voie du TGF- β a également été observée dans le foie des embryons ADAMTS3^{-/-} mourant avant leur naissance (86). Ils apportent également des données pour mieux comprendre la destruction de la matrice dermique et la dermatite atopique observée chez les souris déficientes en ADAMTS2 et 14 (83). Ces recherches ont conduit à des collaborations locales et internationales. Le clivage de la lysyl oxydase par les ADAMTS2 et 14, rapporté par ces études, a été investigué par le Dr Rodriguez-Pascual (Centro de Biología Molecular, Madrid). Ce clivage a été validé *in vitro* et l'analyse des modifications post-traductionnelles par protéomique a mis en évidence la présence de sulfatations à proximité du site de clivage (142). Ces résultats rompent avec le dogme d'une activité enzymatique des ADAMTS2, 3 et 14 strictement restreinte aux collagènes en ouvrant la voie au clivage de substrats impliquées dans la signalisation cellulaire. Ainsi, plus récemment, une étude montre le clivage du facteur de croissance VEGF par ces protéases apportant ainsi une donnée expérimentale supplémentaire permettant de mieux comprendre leur(s) rôle(s) dans la formation des vaisseaux (143,144).

II. 2. c. Valorisation du projet de post-doctorat et perspectives

Points forts du projet (atouts) :

- Ce projet de post-doctorat a été réalisé dans un laboratoire fondateur dans le domaine de la MEC. Ce post-doctorat m'a donc permis de consolider des bases fondamentales en biologie de la matrice extracellulaire.
- Ce post-doctorat a été l'occasion d'une mobilité internationale enrichissante aussi bien au niveau professionnel qu'au niveau humain.
- L'expérience post-doctorale m'a initié à la rédaction de projets ainsi qu'à la recherche de financements.
- Ces projets post-doctoraux m'ont permis d'acquérir une première expérience dans la gestion de projets de recherche (planification des tâches, commandes de réactifs...).
- J'ai eu l'opportunité d'avoir une première expérience dans le co-encadrement d'un étudiant en thèse.
- A travers ce post-doc, j'ai implémenté une technique de protéomique avancée en collaboration de la plateforme de protéomique. J'ai, par conséquent, acquis une certaine expertise en protéomique incluant la préparation des échantillons issus de différentes sources (cellules, milieu de culture et réactionnels, tissus...) et l'analyse de données omiques.
- Au niveau recherche, ces travaux sont pionniers dans l'identification à large spectre de substrat des ADAMTS.
- Des communications orales (#2) et par poster (#9) ont été réalisées dans différents congrès nationaux et internationaux. Deux prix du meilleur poster ont été obtenus.
- Cinq publications ont directement découlées de ce projet :
L'article Bekhouche M et al., 2016 a obtenu le prix de l'article du mois d'octobre 2016 de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM, Octobre 2016)
 - ◇ Leduc C, Dupont L, Joannes L, Monseur C, Baiwir D, Mazzucchelli G, Deroanne C, Colige A and **BEKHOUCHE M.** In vivo N-terminomics highlights novel functions of ADAMTS2 and ADAMTS14 in skin collagen matrix building. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2021; **8**:643178.
 - ◇ Rosell-Garcia T., Paradela A., Bravo G., Dupont L., **BEKHOUCHE M.**, Colige A. & Rodriguez-Pascual F. Differential cleavage of lysyl oxidase by the metalloproteinases BMP1 and ADAMTS2/14 regulates collagen binding through a tyrosine sulfate domain. *The Journal of Biological Chemistry* 2019. doi: **10.1074/jbc.RA119.007806**

◇ **BEKHOUCHE M.**, Leduc C., Dupont L., Janssen L., Delolme F., Vadon-Le Goff S., Smargiasso N., Baiwir D., Mazzucchelli G., Zanella-Cleon I., Dubail J., De Pauw E., Nusgens B., Hulmes D.J.S., Moali C.[†] and Colige A.[†] Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3 and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets. *The FASEB Journal* 2016: **30**(5), p. 1741-1756.

◇ Janssen L., Dupont L., **BEKHOUCHE M.**, Noel A., Leduc C., Voz M., Peers B., Cataldo D., Apte S., Dubail J., Colige A. ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. *Angiogenesis (AGEN)* 2016: **19** (1), p. 53-65.

◇ **BEKHOUCHE M.** & Colige A. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biology* 2015: **44-46**, p. 46-53. (Review).

Points à améliorer (faiblesses) :

- Manque d'encadrement d'étudiants stagiaires (Master...).
- Je n'ai pas eu l'opportunité de dispenser des enseignements.

PUBLICATIONS

Issues des travaux encadrés

Domaine de recherche :

LES ADAMTS DANS LA FORMATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets

Mourad Bekhouche,^{*,1,2} Cedric Leduc,^{*,1} Laura Dupont,^{*} Lauriane Janssen,^{*} Frederic Delolme,^{†,‡} Sandrine Vadon-Le Goff,[†] Nicolas Smargiasso,[§] Dominique Baiwir,[†] Gabriel Mazzucchelli,[§] Isabelle Zanella-Cleon,[†] Johanne Dubail,^{*,3} Edwin De Pauw,[§] Betty Nusgens,^{*} David J. S. Hulmes,[†] Catherine Moali,^{†,4} and Alain Colige^{*,2,4}

^{*}Laboratory of Connective Tissues Biology, [§]Mass Spectrometry Laboratory, GIGA Proteomics, and [†]GIGA Proteomic Facility, GIGA-Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics, University of Liège, Liège, Belgium; [†]Tissue Biology and Therapeutic Engineering, Centre National de la Recherche Scientifique/University of Lyon Unité Mixte de Recherche 5305, Lyon, France; and [‡]Protein Science Facility, Institute for the Biology and Chemistry of Proteins, Unité Mixte de Service 3444, Lyon, France

ABSTRACT A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif (ADAMTS)2, 3, and 14 are collectively named procollagen *N*-proteinases (pNPs) because of their specific ability to cleave the aminopropeptide of fibrillar procollagens. Several reports also indicate that they could be involved in other biological processes, such as blood coagulation, development, and male fertility, but the potential substrates associated with these activities remain unknown. Using the recently described N-terminal amine isotopic labeling of substrate approach, we analyzed the secretomes of human fibroblasts and identified 8, 17, and 22 candidate substrates for ADAMTS2, 3, and 14, respectively. Among these newly identified substrates, many are components of the extracellular matrix and/or proteins related to cell signaling such as latent TGF- β binding protein 1, TGF- β RIII, and dickkopf-related protein 3. Candidate substrates for the 3 ADAMTS have been biochemically validated in different contexts, and the implication of ADAMTS2 in the control of TGF- β activity has been further demonstrated in human fibroblasts. Finally, the cleavage site specificity was assessed showing a clear and unique preference for non-polar or slightly hydrophobic amino acids. This work shows that the activities of the pNPs extend far beyond the classically reported processing of the aminopropeptide of fibrillar collagens and that they should now be considered as multi-level regulators of matrix deposition and remodeling.—Bekhouche, M., Leduc, C., Dupont, L., Janssen, L., Delolme, F., Vadon-Le Goff, S., Smargiasso, N., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., Zanella-Cleon, I., Dubail, J., De Pauw, E., Nusgens,

B., Hulmes, D. J. S., Moali, C., Colige, A. Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets. *FASEB J.* 30, 000–000 (2016). www.fasebj.org

Key Words: *N-TAILS* • *betaglycan* • *LTBP1* • *DKK3*

Extracellular matrix (ECM) remodeling is a crucial step in many pathophysiological events such as development, wound healing, fibrosis, and cancer. This complex and well-orchestrated process is constantly regulated through a dynamic crosstalk between cells and their environment. Extracellular proteinases and their respective networks are essential to this process through the degradation of matrix components, release of trapped cytokines and growth factors, generation of cryptic bioactive peptides from larger molecules, and maturation of procollagens. Fibrillar collagens are the most abundant proteins in connective tissues. They are synthesized as trimeric procollagen molecules encompassing the typical central triple-helical domain and terminal propeptides at each extremity. The cleavage of these N- and C-terminal propeptides is required to allow the spontaneous assembly of mature trimers into perfectly organized collagen fibrils and fibers. The procollagen *N*-proteinases (pNPs), a disintegrin and

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: Laboratory of Connective Tissues Biology, Tour de Pathologie B23/3, Avenue de l'Hôpital, 3, 4000 Sart Tilman, Belgium. E-mail: mouradbekhouche2@gmail.com (M.B.); acolige@ulg.ac.be (A.C.)

³ Current affiliation: Department of Biomedical Engineering, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA.

⁴ These authors contributed equally to this work.
doi: 10.1096/fj.15-279869

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

Abbreviations: ADAMTS, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif; ATOMS, amino-terminal-oriented mass spectrometry of substrate; BiNGO, Biological Networks Gene Ontology; BMP, bone morphogenetic protein; CP-III, C-propeptide of procollagen III; CTGF, connective tissue growth factor; DF, dermatosparactic fibroblast; (continued on next page)

metalloproteinase with thrombospondin type I motif (ADAMTS)2, 3, and 14, are principally known for their ability to cleave the aminopropeptide of fibrillar collagen precursors (types I, II, III, and V) (1). The critical role of ADAMTS2 in this process is illustrated in the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome, a genetic disease caused by mutations in the *Adams2* gene. In the absence of ADAMTS2 activity, pN-procollagen (collagen still retaining its N-terminal extension) accumulates, leads to the formation of highly disorganized collagen fibers, and ultimately, causes the extreme skin fragility that is the hallmark of the disease (2).

Additional reports showing the sterility of *Adams2*-deficient male mice (3), expression of ADAMTS2 by macrophages (4), and recently described genetic association between the *Adams2* gene and pediatric stroke (5) indicate that the functions and substrate repertoire of ADAMTS2 are probably not limited to fibrillar procollagens. Other genetic studies have linked the *Adams14* gene to a predisposition to multiple sclerosis (6) or female knee osteoarthritis (7, 8), and the expression of ADAMTS2 and 3 was also shown to be increased in culprit plaques from patients presenting with acute myocardial infarction *vs.* stable angina (9). Finally, it was recently shown that ADAMTS3 is capable of cleaving and activating pro-VEGF-C in experimental models (10). Taken together, these reports suggest that this subfamily of ADAMTS enzymes has functions that are not related to collagen biology, and this prompted us to search additional potential substrates. We used a proteome-wide strategy, named terminal amine isotopic labeling of substrates (TAILS), which specifically identifies the natural N termini of proteins together with the N termini of their cleavage products (11). This approach was successfully used to identify novel substrates of matrix metalloproteinases (MMPs) (12), meprins α and β (13), but has not yet been applied so far to ADAMTS proteinases.

This study aimed at the identification of new substrates of ADAMTS2, 3, and 14. The rationale for studying these 3 ADAMTS in parallel was to increase the likelihood of identifying new substrates of these highly similar enzymes and to better evaluate the extent to which they have overlapping functions. Tens of new substrates were identified, many of them being ECM components and/or regulators of the Wnt or TGF- β pathways, such as latent TGF- β binding protein (LTBP)1 and TGF- β RIII. Additional characterizations confirmed the reliability of the TAILS approach to identify new substrates and demonstrated the functional significance of ADAMTS2 for TGF- β signaling.

(continued from previous page)

DKK, dickkopf-related protein; dpc, days postconception; ECM, extracellular matrix; HEK, human embryonic kidney; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HLA, human leukocyte antigen; iTRAQ, isobaric tag for relative and absolute quantitation; LAP, latency-associated peptide; LLC, large latent complex; LTBP, latent TGF- β binding protein; MEF, mouse embryonic fibroblast; mini-III, miniprocollagen III; MMP, matrix metalloproteinase; MS/MS, tandem mass spectrometry; P:C, proteinase:control; PCPE, procollagen C-proteinase enhancer; pNP, procollagen N-proteinase; siRNA, small interfering RNA; SMA, smooth muscle actin; TAILS, terminal amine isotopic labeling of substrates; TMT, tandem mass tag; TPP, Trans-Proteomic Pipeline; WT, wild-type

All these data completely modify the current paradigm about ADAMTS2, 3, and 14 by considerably extending their substrate repertoire.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies

The LF-69 rabbit antiserum for the human pro α 1 (III) C-propeptide has been described elsewhere (14) and was kindly provided by Dr. Larry Fisher (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Mouse anti-human fibronectin N-terminal antibody was purchased from Merck Millipore (MAB1936; Darmstadt, Germany). The antibody directed against human LTBP1 was from R&D Systems (MAB388; Minneapolis, MN, USA). The goat antibody against the extracellular domain of human TGF- β RIII was from R&D Systems (AF-242-PB).

Cell lines

For inducible cell lines, human embryonic kidney (HEK)293 cells were transfected (Novagen GeneJuice Transfection Reagent; EMD Millipore, Billerica, MA, USA) with the pcDNA6/tetracycline repressor expression vector (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and selected using blasticidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Clones expressing a high level of the tetracycline repressor protein were identified by Western blotting (rabbit polyclonal #TET01; MoBiTec, Antwerpen, Belgium) and further transfected by the pcDNA4/TO expression vector (TetOn System; Invitrogen-Life Technologies) containing the complete coding sequence of ADAMTS2, ADAMTS3, or ADAMTS14 inserted in the multiple cloning site (*NotI-XbaI* sites for ADAMTS2 and ADAMTS14, and *PmaI-PmaI* sites for ADAMTS3). After selection (Zeocin, 300 μ g/ml; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), subcloning was performed to identify clones producing ADAMTS2, ADAMTS3, or ADAMTS14 only in the presence of doxycycline (1 μ M; Sigma-Aldrich).

For cell lines expressing constitutively the enzymes, HEK293 cells were transfected (Novagen GeneJuice Transfection Reagent) with the pcDNA4/TO expression vector containing the complete coding sequence of ADAMTS2, ADAMTS3, or ADAMTS14, which were inserted in the multiple cloning site (*NotI-XbaI* sites for ADAMTS2 and ADAMTS14, or *PmaI-PmaI* sites for ADAMTS3). Stably transfected cell populations were selected using Zeocin (500 μ g/ml).

Recombinant proteins

Production and purification of bone morphogenetic protein (BMP)1, procollagen C-proteinase enhancer (PCPE)1, and recombinant miniprocollagen III (mini-III) were described elsewhere (15). Human plasma fibronectin was purchased from Sigma-Aldrich (#F0895). Recombinant human dickkopf-related protein (DKK)3 and TGF- β RIII were purchased from R&D Systems (#1118-DK and #242-R3, respectively). Recombinant ADAMTS2, its inactive mutant, or ADAMTS14 was produced in HEK cells and purified according to the reported procedure (16). Recombinant human TGF- β 1 and TGF- β 2 were from PeproTech (#100-21; PeproTech France, Neuilly-Sur-Seine, France) and Sigma-Aldrich (#T2815), respectively.

Reagents

The hyperbranched polyglycerol-aldehyde polymer was purchased from Flintbox (University of British Columbia, Vancouver,

BC, Canada). Isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) labels are from AB Sciex (Concord, ON, Canada). Porcine trypsin was purchased from Promega (#V511A; Madison, WI, USA). Ultrafiltration devices were purchased from Merck Millipore. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich. The procollagen C-proteinase-specific inhibitor (UK-383, 367) was from Sigma-Aldrich.

Secretome preparation

Dermatoparacitic fibroblasts (DFs) from a patient suffering from the dermatoparacitic type of Ehlers-Danlos syndrome (17) and HEK cells constitutively or conditionally (in a doxycycline-dependent manner) expressing ADAMTS2, ADAMTS3, or ADAMTS14 were cocultured in a 4:1 ratio (DF:HEK) (Fig. 1). The ADAMTS2 analysis is the sum of 2 experiments. In a first experiment, DFs were cocultured with HEK cells constitutively expressing the inactive (labeled iTRAQ115) or the active ADAMTS2 (labeled iTRAQ117), named TS2_A in proteomeXchange. In this experiment, collagen synthesis was stimulated by the addition of ascorbic acid to the culture medium (25 μ M). The sample before negative selection was also analyzed (named TS2_B in proteomeXchange). In a second experiment, the HEK cells expressed ADAMTS2 in a doxycycline-dependent manner (labeled iTRAQ114 and iTRAQ115, respectively, without and with doxycycline). A third condition was made by the addition of recombinant ADAMTS2 to the control secretome obtained in the absence of doxycycline (labeled iTRAQ116). There were 2 proteinase:control (P:C) ratios calculated from the latter experiment: iTRAQ115/iTRAQ114 and iTRAQ116/iTRAQ114 (named TS2_C in proteomeXchange).

The ADAMTS3 secretome was collected from HEK cells that over-express the proteinase in a doxycycline-dependent manner alone (iTRAQ115/iTRAQ114) or cocultured with DFs (iTRAQ117/iTRAQ116; named TS3_A). A second experiment was done using HEK cells alone (iTRAQ117/iTRAQ116; named TS3_B). A single experiment was performed for ADAMTS14 using the secretome of DFs cocultured with HEK cells over-expressing the proteinase in a doxycycline-dependent manner (iTRAQ117/iTRAQ116; named TS14 in proteomeXchange).

Proteinase expression was induced by adding 1 μ M doxycycline 24 h before and during the 48 h of conditioned medium preparation. The secreted medium was collected after 48 h according to the reported procedure (11). Protein concentration was estimated using the optical density at 280 nm and the Bradford assay and was adjusted to 2 mg/ml. A total of 500 μ g protein was processed for TAILS in each condition. When present, recombinant ADAMTS2 (23 nM) was added overnight at 37°C to the concentrated secretome.

Sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry

As a general guideline, iTRAQ-TAILS sample preparation was done according to the reported procedure (18). For the first N-terminomics analysis of ADAMTS2 (TS2_A), the sample was fractionated on a strong cation exchange column. A linear gradient of KCl in 10 mM KH_2PO_4 was applied to elute the peptides in 10 fractions. Each fraction was injected in the mass spectrometer QStar ESI-Tof (AB Sciex) at the Protein Science Facility of the Structure Fédérative de Recherche Biosciences (Lyon, France). The sample before negative selection was also analyzed on the ESI-Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer (TS2_B). For all the other samples, peptides were injected into the ESI-Q Exactive mass spectrometer at the GIGA Proteomic Facility of the University of Liège. The mass spectrometer was coupled to a 2D-RP/RP NanoAcquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) for the peptide fractionation in 3 fractions. The mass spectrometry

proteomic data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (19) via the Proteomics IDentifications partner repository with the data set identifier PXD002354 and digital object identifier 10.6019/PXD002354.

Analysis of mass spectrometry results

In a first step, peptides were identified using Mascot (version 2.2.06; Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) and allowing semityptic cleavages and 2 missed cleavages/peptide. Carbamidomethyl cysteine was set as a fixed modification, and other modifications were set as variable: N-terminal acetyl, deamidation (NQ), Pyro-glu (N-term E), Pyro-Gln (N-term Q), Oxidation (M), iTRAQ (K), iTRAQ (Y) and iTRAQ (N-term). Peptide tolerance was set at 0.02 Da.

The tandem mass spectrometry (MS/MS) data were analyzed using the Trans-Proteomic Pipeline (TPP) and Proteome Discoverer software (Thermo Fisher Scientific). For the TPP analyses, the PeptideProphet and ProteinProphet software programs, embedded into TPP, used to validate protein and peptide assignment. The nontypic model was omitted in the PeptideProphet parameters. The error rate to validate proteins or peptides was respectively set at 2 and 5%. Then, Clipper software was used to determine the upper and lower cutoffs corresponding to 3σ calculated from the normal distribution of the $\log_2(\text{P:C ratio})$ from natural mature N termini. A Gaussian error function was used to calculate a P value that reflects the probability of a peptide to be a false positive. A peptide with a P:C ratio above or below the 3σ cutoff has $\geq 99.8\%$ chance to be dependent on the studied protease (20). For data analyses with the Proteome Discoverer software, peptide assignment was validated using Percolator (embedded in the Proteome Discoverer package). Only high-confidence peptides were considered ($>95\%$ confidence). The intensity of the reporter ions was integrated using a window of 20 ppm. Clipper results were manually complemented by Proteome Discoverer data by adding missing peptides above or below the 3σ cutoff.

Biological process analysis

The proteins showing P:C ratios above or below the cutoffs were submitted to Biological Networks Gene Ontology (BiNGO), an add-on of Cytoscape (version 2.8.2), for Gene Ontology search (21). The significance level was set at 0.005. The categories visualized are overrepresented after the Benjamini and Hochberg false discovery rate correction using the whole annotation for *Homo sapiens* in the Gene Ontology database as reference set.

Biochemical validation of the C-propeptide cleavage of type III collagen

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were extracted from wild-type (WT) or ADAMTS-2 null embryos at 14.5 d postconception (dpc) and cultured under hypoxic conditions (3% O_2), and collagen expression was stimulated as described above. The secretome was collected according to the reported procedure (11). For Western blot analysis with the LF-69 antibody (against the C-propeptide of type III procollagen), 2.5 μ g protein was loaded in each lane. Analyses of mini-III cleavage *in vitro* were all performed in 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 10 mM CaCl_2 (HEPES buffer). ADAMTS2 or BMP1 was incubated for 16 h in the presence of 2.5 μ g mini-III at 37°C in the presence or absence of 200 nM PCPE or of 250 nM UK-383,367. For N-terminal Edman sequencing (L-ProBE; Ghent University, Ghent, Belgium) of the band corresponding to the C-propeptide, proteins were electrotransferred onto a PVDF membrane and stained with Coomassie blue.

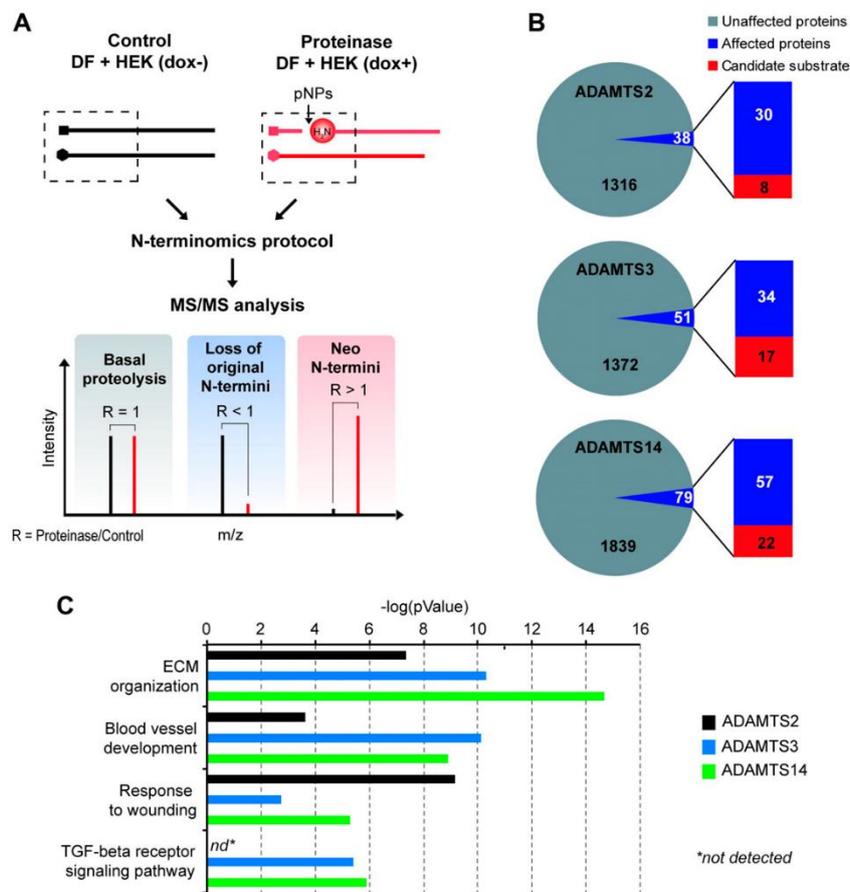


Figure 1. N-terminomics networks and biological processes related to ADAMTS2, 3, and 14. *A*) Schematic view of the N-terminomics workflow used for the analysis of the pNPs. Dashed lines show the N-terminal peptides analyzed. DFs were cocultured with HEK cells over-expressing the pNPs in a doxycycline-dependent manner (dox^{-/+}). *B*) Numbers of proteins observed after data analysis and affected cell surface or extracellular proteins showing at least a peptide with a ratio above or below the 3 σ cutoff of the experiment. Direct candidate substrates were defined by internal nontryptic-like peptides. *C*) Biological processes related to the pNP networks using BiNGO (21).

ADAMTS2 cleavage of fibronectin

The conditioned media of human fibroblasts were collected as described above and were then incubated with recombinant ADAMTS2 (200 nM for 16 h at 37°C) in the presence or absence of 20 mM EDTA in HEPES buffer. Western blotting was performed using the mouse anti-human fibronectin N-terminal antibody using these media or on the secretome of HEK cells expressing ADAMTS3 or 14 in a doxycycline-dependent manner. For the *in vitro* digestion, 2 μ g human plasma fibronectin was incubated with recombinant ADAMTS2 (200 nM) for 16 h at 37°C in HEPES buffer. Proteins were separated using SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The 33 kDa cleavage product was extracted from the gel and analyzed by MS/MS. The cleavage site was determined by amino-terminal-oriented mass spectrometry of substrate (ATOMS) according to the reported procedure (22) with slight modifications developed at the GIGA Proteomic Facility: the tryptic digestion being replaced by a multienzymatic digestion based on a

mix of trypsin, chymotrypsin and GluC, and peptides being labeled with tandem mass tags [(TMTs); #90065; Life Technologies].

Analysis of DKK3 cleavage

DKK3 (2.5 μ g) was incubated in the presence of ADAMTS2 (50 nM) or ADAMTS14 (100 nM), with or without 20 mM EDTA in HEPES buffer for 16 h at 37°C. Proteins were separated using SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The cleavage site was determined by iTRAQ-ATOMS according to the reported procedure (23). Investigation of testis morphology of WT or *Adams2*^{-/-} males was performed by hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded transversal sections.

Analysis of LTBP1 cleavage

LTBP1 cleavage was investigated in the secretome of HEK293 cells in the presence or absence of doxycycline for the induction

of ADAMTS expression. Proteins (2.5 μ g) were separated using SDS-PAGE under nonreducing conditions to preserve the complex formed by LTBP1, latency-associated peptide (LAP), and TGF- β .

Analysis of TGF- β RIII cleavage

TGF- β RIII cleavage was assessed by Western blotting on the secretome of HEK293 cells, expressing the proteinases in a doxycycline-dependent manner, or on the secretome of human skin fibroblasts. For the *in vitro* digestion, recombinant TGF- β RIII (2.5 μ g) was incubated with recombinant-purified ADAMTS2 or 14 (50 nM), in the presence or absence of 20 mM EDTA, in HEPES buffer for 16 h at 37°C. TGF- β RIII cleavage pattern was analyzed by Western blotting. For the MS/MS analysis of the cleavage products, the gel was stained with Coomassie blue, and the 50 kDa protein band observed after cleavage was extracted, digested with trypsin, and submitted to MS/MS using the ESI-Q Exactive mass spectrometer. Nontryptic peptides were also evaluated in the analysis.

Evaluation of the TGF- β response in dermal skin fibroblasts

The response to TGF- β was assessed after treatment of human normal fibroblasts with 1 ng/ml TGF- β 1 or TGF- β 2 for 48 h in complete medium. RNA was extracted using the RNA Isolation Kit from Roche Diagnostics (#11828665001; Meylan, France). There were 2 TGF- β target genes evaluated by RT-PCR, α -smooth muscle actin (SMA) and connective tissue growth factor (CTGF), using the RNA oligos 5'-CTAGAGACAGAGAGGAGCAGGAAA-3' and 5'-GGCATTGCCGACCGAATGCAGAA-3', or 5'-CCTC-GCCGTCAGGGCAGCTTGAA-3' and 5'-TCCACCCGGGTTC-CAATGACAA-3', respectively. The RT-PCR-amplified products were quantified with GelQuant (*biochemlabsolutions.com*) and

corrected by the 28S housekeeping gene signal. Experiments were done in triplicate, errors bars are the SEMs, and the *P* values were determined using the 1-tailed unpaired Student's *t* test and GraphPad Prism (version 5.00; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Silencing of ADAMTS2 was done using a small interfering (si)RNA (siRNA) designed between the exons 13 and 14 of ADAMTS2 mRNA (NM_014244.4; National Center for Biotechnology Information; Bethesda, MD, USA) using the RNA oligos 5'-GAAGCAUGGUUCAUCAAGTT-3' and 5'-CUUGAUGUAACCAUGCUUCTT-3'. Cells were transfected with siRNA (20 nM), either control (scrambled, 5'-UUGCAUACAGGACUCGUUATT-3' and 5'-UAACGAGUCCUGUAUGCAATT-3') or specific to ADAMTS2, using the calcium phosphate precipitation procedure. After 18 h, cells were trypsinized, replated for 6 h, and treated with TGF- β 1 or TGF- β 2 (1 ng/ml) in complete medium. The siRNA efficiency was controlled by RT-PCR after 24 or 48 h after trypsinization using the RNA oligos 5'-GGATCTCAAACATCTTGATGTAACCA-3' and 5'-CTACAA-GGACGCCCTCAGCCTCT-3'.

α -SMA levels were also evaluated by immunofluorescence. Cells were treated with TGF- β 1 or TGF- β 2 as described above. α -SMA was stained with an antibody coupled to FITC 488 (green), and nuclei were stained with DAPI (blue) (both from Sigma-Aldrich). Photographs were taken using an inverted microscope (Eclipse TS; Nikon, Tokyo, Japan).

Determination of cleavage site specificity

Heat maps and amino acid sequence logos, corrected by the natural abundance of amino acids in the human proteome, were generated using the iceLogo software package (24). Analyses were based on the cleavage sites determined by proteomics for the candidate substrates (Table 1 and Supplemental Table 1).

TABLE 1. Candidate substrates of ADAMTS2, 3, and 14 revealed by N-terminomics

ADAMTS2		ADAMTS3		ADAMTS14	
Name	P:C (PSMs)	Name	P:C (PSMs)	Name	P:C (PSMs)
<i>Collagen α-1(I) chain</i>	20.1 (1)	<i>ADAM10</i>	5.7 (3)	<i>C3a-R</i>	2.5 (1)
<i>Collagen α-2(I) chain</i>	35.0 (1)	<i>ADAMTS1</i>	35.0 (3)	<i>Calsyntenin-1</i>	6.4 (1)
<i>Collagen α-1(III) chain</i>	1.7 (3)	<i>Clusterin</i>	35.0 (1)	<i>Collagen α-1(I) chain</i>	9.1 (2)
<i>Collagen α-2(V) chain</i>	35.0 (3)	<i>Collagen α-1(I) chain</i>	35.0 (8)	<i>Collagen α-2(I) chain</i>	35.0 (3)
<i>Collagen α-2(VI) chain</i>	2.0 (1)	<i>Collagen α-2(II) chain</i>	35.0 (6)	<i>Collagen α-1(II) chain</i>	4.4 (1)
<i>Collagen α-3(VI) chain</i>	2.0 (3)	<i>Collagen α-1(III) chain</i>	2.0 (3)	<i>Collagen α-1(III) chain</i>	2.7 (2)
<i>Decorin</i>	35.0 (1)	<i>Collagen α-1(V) chain</i>	4.4 (1)	<i>Collagen α-2(IV) chain</i>	3.6 (1)
<i>DKK3</i>	4.7 (3)	<i>CTGF</i>	7.9 (1)	<i>Collagen α-1(V) chain</i>	5.4 (4)
		<i>Fibronectin</i>	35.0 (1)	<i>Collagen α-2(V) chain</i>	2.7 (4)
		<i>Fibulin-3</i>	35.0 (1)	<i>Collagen α-1(XVIII) chain</i>	7.2 (2)
		<i>Granulins</i>	35.0 (3)	<i>Decorin</i>	3.7 (1)
		<i>HLA-A</i>	35.0 (1)	<i>DKK3</i>	7.0 (1)
		<i>LTBP1</i>	18.7 (2)	<i>Fibronectin</i>	4.6 (1)
		<i>POTEF</i>	22.7 (3)	<i>Fibulin-2</i>	3.6 (1)
		<i>Prospodin</i>	5.1 (6)	<i>HLA-A</i>	6.5 (1)
		<i>TGF-β RIII</i>	35.0 (2)	<i>IGFBP5</i>	5.5 (8)
		<i>Thrombospondin-1</i>	3.1 (2)	<i>LTBP1</i>	3.5 (1)
				<i>LTBP2</i>	2.5 (1)
				<i>Lysyl oxidase</i>	2.8 (2)
				<i>Lysyl oxidase homolog 1</i>	5.7 (2)
				<i>Perlecan</i>	6.3 (4)
				<i>Versican core protein</i>	8.5 (2)

Candidate substrates regarding the highest P:C ratios are shown. The highest P:C ratio of the peptides corresponding to the substrates is reported together with the number of spectra [peptide-spectrum matches (PSMs)] observed by MS/MS. The complete peptide lists for each substrate are reported in Supplemental Table 1.

RESULTS

N-terminomics analysis of ADAMTS2, 3, and 14

Investigation of the proteinase networks related to the ADAMTS2, 3, and 14

Identifications of new substrates were performed using human dermatosparactic skin fibroblasts, which lack active ADAMTS2 and only express low amounts of ADAMTS3 and 14. These cells were cocultured in a 4:1 ratio with HEK293 cells expressing or not recombinant ADAMTS2, 3, or 14. The serum-free conditioned medium of the different culture conditions was collected, and each ADAMTS-positive condition and its specific controls were labeled with different iTRAQs, pooled, and processed for TAILS analysis. In these conditions, the ratios between the intensities of the different reporter ions allow the relative quantification of peptides. Although natural N-terminal peptides and peptides corresponding to basal proteolysis lead to P:C ratios of ~ 1 , peptides with P:C ratios significantly >1 are likely to be generated by the ADAMTS under study (Fig. 1A). In addition, the amino-terminal extremities of the protease-generated N termini (neo-N termini) correspond to the P1' position of the cleavage sites, thereby allowing direct identification of cleavage sites. Finally, peptides with P:C ratios <1 (reflecting degradation or cell uptake of neo-N termini) are assumed to encompass the cleavage site but do not allow its precise localization. The cutoffs to discriminate neo-N termini from other N termini were determined from the normal distribution of natural N-terminal peptides, which are not expected to be modified by the proteinase. Very strict 3σ cutoff values were used to increase the probability of identifying relevant substrates cleaved with high efficacy.

Analyses of the different culture conditions revealed the presence of 1354, 1423, and 1918 different proteins in the secretomes used for ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14, respectively. The P:C ratios were calculated for all the identified peptides, and this indicated that 38, 51, and 79 extracellular or cell surface proteins were affected by the expression of ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14, respectively (Fig. 1B and Supplemental Table 1). These proteins were considered to be a part of their respective protease networks (defined as the sub-proteome affected by the proteinase, which includes its direct substrates and secondary events linked to its expression and activity) and used to give a better insight into the biological processes related to one specific ADAMTS. BiNGO analysis (21) showed that the major processes influenced by ADAMTS2, 3, and 14 are ECM organization, blood vessel development, response to wounding, and TGF- β receptor signaling pathway (Fig. 1C). The most significant biological process was "ECM organization," with a corrected *P* value between 4.6×10^8 for ADAMTS2 and 2.2×10^{15} for ADAMTS14, principally thanks to the presence of several fibril-forming collagens and fibronectin (Fig. 1C and Supplemental Table 1). "Blood vessel development" is mostly related to ADAMTS3 and ADAMTS14, with *P* values of 7.5×10^{11} and 1.2×10^9 , respectively (Fig. 1C), whereas the *P* value of ADAMTS2 was lower (2.4×10^4). ADAMTS2 and 14 are highly relevant to response to

wounding (Fig. 1C). More unexpectedly, ADAMTS3 and 14 networks were related to the TGF- β receptor signaling pathway. This pathway was not identified for ADAMTS2 using BiNGO, although some of the proteins in the ADAMTS2 network (*e.g.*, LTBP1) are clearly related to this pathway according to the literature (Supplemental Table 1). Among the proteins involved in this pathway, which were affected by at least 1 of the 3 ADAMTS, were TGF- β 1 and TGF- β 2, the coreceptors endoglin (CD105) and TGF- β RIII, interacting and trapping molecules present in elastic fibers (LTBP1, 2, and 3; fibulins 1, 2, and 3), and other ECM macromolecules that either modulate and/or are transcriptionally regulated by the TGF- β pathway (decorin, CTGF, and collagens) (Table 1 and Supplemental Table 1).

Candidate substrates of ADAMTS2, 3, and 14

Particular attention was paid to the nontryptic-like internal peptides (no "K" or "R" in P1) having a P:C ratio >1 because these are likely to result from direct cleavage by ADAMTS, whereas tryptic peptides are more ambiguous and can also reflect changes in protein expression. This analysis yielded 8, 17, and 22 potential direct substrates for ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14 (Table 1). Besides fibrillar collagens, ADAMTS2 was found to be likely able to process 1) the beaded filament-forming type VI collagen, outside the triple-helical domains; 2) decorin, a proteoglycan interacting with the surface of collagen fibrils; and 3) DKK3, a factor implicated in the regulation of Wnt/ β -catenin and TGF- β signaling (25, 26). The potential direct substrates of ADAMTS3 were more numerous and included fibril-forming collagens, other proteins of the ECM, and proteins regulating cell behavior (apoptosis and proliferation) or lipid metabolism, such as clusterin, granulins, or prosaposin (Table 1). There were 2 cell surface receptors, human leukocyte antigen (HLA)-A and TGF- β RIII, also identified as potential substrates with high P:C ratios, suggesting that they were present as soluble forms in the conditioned medium. ADAMTS14 shares many substrates with ADAMTS2 and/or ADAMTS3, such as fibrillar collagens, fibronectin, DKK3, HLA-A, and LTBP1. Some substrates were however identified only for ADAMTS14, including 1) lysyl oxidase and lysyl oxidase like-1, 2 enzymes that crosslink collagen and elastin; 2) versican and perlecan, 2 secreted proteoglycans with multiple functions; and 3) type XVIII collagen at a site close to that involved in the release of endostatin, a potent antiangiogenic cryptic C-terminal fragment of collagen XVIII.

Although substrate identification was performed using very strict cutoff values, validation assays have to be performed. As a first step toward the validation of candidate substrates, we decided to focus on 5 of them belonging to the 2 main identified categories (ECM and signaling regulation). The potential cleavages were systematically evaluated for the 3 ADAMTS in order to get information about their substrate specificity.

Biochemical validation

Structural molecules implicated in ECM architecture and remodeling

Cleavage of the C-propeptide of type III collagen—Although ADAMTS2 can process the aminopropeptide of type III procollagen, its activity on the C-propeptide of procollagen III (CP-III) was never previously reported. Surprisingly, also, the potential cleavage site identified by N-terminomics (G¹²²¹↓¹²²²D; P:C, 1.7) is the same as for BMP1 (27). This prompted us to characterize this new potential activity of ADAMTS2 in more detail.

In order to verify the release of CP-III by ADAMTS2 (Supplemental Table 1), we used the purified enzyme and recombinant mini-III, which is composed of a short triple-helical domain, the telopeptide, and entire C-propeptide (Fig. 2A) (15). ADAMTS2, but not an inactive enzyme purified in the same conditions, was able to release the CP-III (Fig. 2B). A similar activity was observed with ADAMTS14 (Fig. 2C). To further validate this *in vitro* cleavage and to confirm that this effect was not due to the copurification of a tiny amount of BMP1, the assay was also performed in the presence of a BMP1 synthetic inhibitor and/or in the presence of a specific enhancer of BMP1 activity on procollagen (PCPE) (29). ADAMTS2 cleaved the C-propeptide of type III collagen to the same extent regardless of the presence of the inhibitor or the enhancer (Fig. 2D). These results demonstrate that the C-propeptide of type III collagen is directly cleaved by ADAMTS2.

The ADAMTS2 cleavage site within mini-III was determined by N-terminal Edman sequencing and yielded the following cleavage site: G-F-A-P¹²¹⁸↓¹²¹⁹Y-Y-G-D (Fig. 2A). The Proline in the P1 position was also previously found in the N-propeptide cleavage site (1), but it is located 3 residues N terminal to the site identified by N-terminomics. The discrepancy between the 2 approaches could be related to the presence of BMP1 in the conditioned culture medium, the activity of which is possibly increased when there is prior cleavage by ADAMTS.

To explore the biological significance of this cleavage, type III collagen processing was assessed in MEFs from 6 different embryos (3 WT and 3 *Adamts2*^{−/−}) at 14.5 dpc. An antibody specific to the C-propeptide (LF-69) was used and showed a reduction in the amount of “free” C-propeptide together with the accumulation of pC forms when ADAMTS2 was absent (Fig. 2E).

Cleavage of cellular and plasma fibronectin—Fibronectin is another important component of the ECM. It is also abundant in plasma under a form lacking type III-A and type III-B domains (Fig. 2F). TAILS analyses indicate a possible cleavage site in the N-terminal domain (P:C, 0.12; Supplemental Table 1). Validation studies were performed by Western blotting using an antibody specific to the 30 kDa N-terminal domain (Fig. 2G). Media conditioned by normal human skin fibroblasts contained a fragment migrating ~33 kDa by SDS-PAGE. In contrast, accumulation of full-length fibronectin and absence of this 33 kDa product were observed in the medium of DFs (Fig. 2G). When recombinant-purified ADAMTS2 was added *in vitro* into the DF-conditioned medium, the 33 kDa product was also generated at the expense of the full-length fibronectin (Fig. 2G), and this processing was abolished in the

presence of EDTA. Noteworthy, the release of the 33 kDa fibronectin fragment was also specifically observed in the conditioned medium of HEK293 cells expressing ADAMTS3 or ADAMTS14 compared to nontransfected cells (Fig. 2H), suggesting that this activity is shared by all 3 enzymes.

In a second step, plasma fibronectin was also incubated *in vitro* with recombinant-purified ADAMTS2, resulting in a similar product of ~33 kDa (Fig. 2I). The full-length fibronectin and its C-terminal fragment after cleavage by ADAMTS cannot be easily separated using SDS-PAGE, making classic (Edman) N-terminal sequencing difficult to implement. Therefore, the 33 kDa fragment from plasma fibronectin was analyzed by mass spectrometry. In agreement with the specificity of the antibody used in Western blotting, the peptides observed by mass spectrometry cover the N-terminal assembly domain of fibronectin. The precise cleavage site was then determined using a new approach called ATOMS (22, 23) coupled to TMT labeling and to a multienzymatic digestion. The 5 peptides with the highest P:C ratios resulted from a unique and unambiguous cleavage site: V-R-A-A²⁹²↓²⁹³V-Y-Q-P (Fig. 2J). This cleavage site was not seen using a classic tryptic digestion such as in N-terminomics. This is likely due to the size of the tryptic peptide resulting from this cleavage site, which is too long (32 amino acids, 3.6 kDa) to be properly assigned by MS/MS.

Cell signaling molecules

Cleavage of DKK3 by ADAMTS2 and 14—DKK3 is a member of the DKK family, which comprises 4 members characterized by 2 conserved cysteine-rich domains (Fig. 3A). N-terminomics analyses indicated cleavage of DKK3 by ADAMTS2 and ADAMTS14 (Supplemental Table 1), a result that was confirmed *in vitro* using recombinant human DKK3 in the presence of recombinant ADAMTS2 or 14 (Fig. 3B). DKK3 is a highly glycosylated molecule migrating at 75–80 kDa by SDS-PAGE despite a predicted mass of 37.5 kDa. In the presence of ADAMTS2 or 14, the intensity of the corresponding band decreased, whereas 3 cleavage products migrating at 38, 55, and 70 kDa were observed (Fig. 3B). According to the N-terminomics analyses, DKK3 was cleaved at positions ¹²⁶M↓V¹²⁷, ¹²⁸F↓S¹²⁹, and ¹³⁰E↓T¹³¹. To determine the precise cleavage site of ADAMTS2 within DKK3, we used iTRAQ-ATOMS on recombinant proteins *in vitro*, which led to the identification of a single cleavage site at position ¹²⁶M↓V¹²⁷ (Fig. 3A). This suggests the existence of sequential secondary processing by other proteinases after initial ADAMTS2 cleavage or that the cleavage site is perhaps less strictly defined in conditions encountered in cell culture. The generation of 3 degradation products of DKK3 (38, 55, and 70 kDa) by ADAMTS2 or ADAMTS14 suggests the presence of at least 2 cleavage sites. This second site might be the ²⁵²I↓T²⁵³ identified for ADAMTS14 during the N-TAILS analysis. The reason why this site was not identified by iTRAQ-ATOMS on recombinant proteins was not investigated further.

DKK3 has been shown to be implicated in seminiferous tubule development (30). Therefore, the histology of testes from adult WT or *Adamts2*^{−/−} mice was examined by

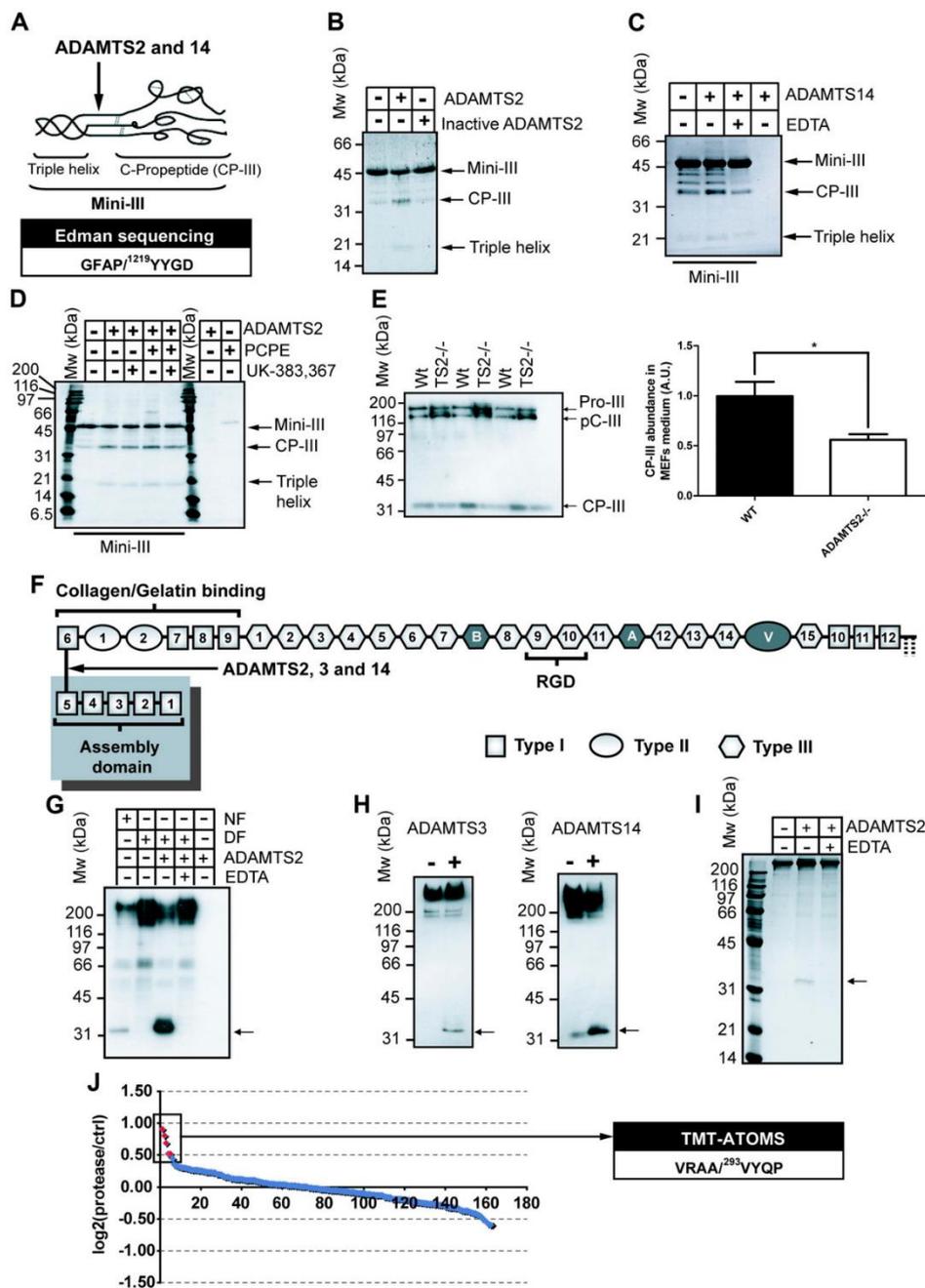


Figure 2. Novel proteolytic events of the pNPs related to structural molecules of the ECM: CP-III and fibronectin. *A*) Schematic view of the recombinant procollagen III model substrate (mini-III). The cleavage site determined by N-terminal Edman sequencing is reported below. *B* and *C*) SDS-PAGE (10% acrylamide, reducing conditions) stained with Coomassie blue shows the *in vitro* digestion of recombinant mini-III (850 nM) by recombinant-purified ADAMTS2 (50 nM) or its inactive mutant (*B*) or (continued on next page)

hematoxylin and eosin staining. The seminiferous tubules were altered in *Adamts2*^{-/-} mice with an increase in lumen space and a reduction in thickness of the tubules (Fig. 3C), which complemented previous findings showing a decrease of mature sperm in *Adamts2*^{-/-} testes (3). ADAMTS2 cleaves DKK3 upstream of the 2 conserved cysteine-rich domains known to be responsible for the inhibition of the Wnt pathway. Therefore, DKK3 processing by ADAMTS could activate, rather than abolish, its inhibitory function on the Wnt pathways. Because DKK3 is involved in seminiferous tubule development (30), it is tempting to speculate that the infertility of *Adamts2*^{-/-} male mice could be related to dysregulation of DKK3 function in testis.

LTBP1 processing—LTBP1 sequesters pro-TGF-β within the ECM to allow its rapid release when needed. The association of LTBP1 with pro-TGF-β by disulfide links is known as the large latent complex (LLC) (Fig. 4A). N-terminomics analyses revealed the cleavage of LTBP1 by ADAMTS3 at ³¹⁵PJA³¹⁶ and ⁷⁷⁵PJA⁷⁷⁶ positions (Fig. 4A). LTBP1 processing by ADAMTS3 was first confirmed by Western blotting in the medium of HEK293 cells expressing the proteinase (Fig. 4B). In the absence of ADAMTS3, 2 bands of 250 and 185 kDa were observed, which corresponded, respectively, to the LLC (LTBP1 associated with pro-TGF-β1) and to LTBP1 alone (Fig. 4B). When ADAMTS3 was expressed, the relative intensity of LLC decreased, whereas a cleavage product of 150 kDa, corresponding to the expected size after cleavage of LTBP1 at the ³¹⁵PJA³¹⁶ site, was markedly increased (Fig. 4A, B). No band of 104 kDa that would have resulted from the cleavage at the ⁷⁷⁵PJA⁷⁷⁶ site could be observed.

Proteomic analyses identified LTBP1 cleavage by ADAMTS14 at the ³⁶PJG³⁷ position (Fig. 4A and Supplemental Table 1). This should generate a cleavage product differing by only 1.5 kDa from the uncleaved LTBP1, which does not allow their discrimination by SDS-PAGE. When ADAMTS14 was expressed in HEK293 cells, LLC abundance decreased, whereas the band corresponding to LTBP1 alone increased (Fig. 4C), leading to a different electrophoretic pattern from that obtained with ADAMTS3. Because dissociation of LAP/TGF-β from LTBP1 should not result from a cleavage at the ³⁶PJG³⁷ site, it must be caused by a cleavage within the LAP domain (see Fig. 4A).

This hypothesis is further supported by the existence of a cleavage site in the LAP domain of TGF-β1, as suggested by the proteomic analysis (P:C, 0.28; Supplemental Table 1).

For ADAMTS2, a well-defined band corresponding to a degradation/maturation product was never detected. However, a slight decrease of the LLC intensity was consistently observed, suggesting that a cleavage that modifies or destroys the epitope recognized by the LTBP1 antibody may occur (Fig. 4D). In summary, it seems that whereas all the studied ADAMTSs are susceptible to cleave the LLC, there are significant differences in their cleavage specificity.

Cleavage of TGF-β RIII by ADAMTS2, 3, and 14—N-terminomics analyses identified a cleavage of TGF-β RIII (β-glycan) by ADAMTS3 between the endoglin-like and the *zona pellucida* domains (Fig. 5A) at the ³⁸³PJ³⁸⁴ site. TGF-β RIII cleavage was first assessed by Western blotting in the conditioned medium of inducible HEK cells. Because TGF-β RIII is a transmembrane receptor, only shed fragments could be identified in these conditions. The same pattern was observed in the presence of the 3 ADAMTS, with an increased abundance of 2 cleavage products of 50 and 60 kDa (Fig. 5B). To get further insight into the physiological relevance of this cleavage, Western blots were performed on the conditioned medium of normal and DFs. Although some intact shed ectodomain of TGF-β RIII could be seen with DFs, only the cleaved forms were present in the media of normal fibroblasts (Fig. 5C).

To assess the direct cleavage of TGF-β RIII, *in vitro* assays were performed using purified recombinant TGF-β RIII and ADAMTS2 or ADAMTS14. A band migrating ~120 kDa (Fig. 5D), accompanied by a higher molecular mass smear typical of proteoglycans, was observed in the presence of EDTA (Fig. 5D). In the presence of active ADAMTS2 or ADAMTS14, however, the intact soluble TGF-β RIII disappeared, and a single cleavage product was observed ~50 kDa (Fig. 5D). No other cleavage product was seen using either Western blotting (Fig. 5D) or Coomassie blue staining. The 60 kDa band observed in Fig. 5B could therefore be due to glycosylation or to an additional cleavage, occurring only in a cellular context, by ADAMTS2, 3, or 14 or other proteases. The 50 kDa band was analyzed by MS/MS and shown to correspond to the N-terminal endoglin-like domain resulting from a cleavage at the

ADAMTS14 (200 nM) with or without EDTA (20 mM, C). Mw, molecular weight. D) Digestion of mini-III by ADAMTS2 (50 nM) in the presence or absence of PCPE-1 (200 nM) with or without the specific BMP1 inhibitor (UK-383,367; 250 nM) (28). E) Type III collagen processing in the conditioned medium of MEFs extracted from 6 different embryos (WT or *Adamts2*^{-/-}) at 14.5 dpc. The Western blot was performed using an antibody specific to the C-propeptide of type III collagen (LF-69, left). Estimation of C-propeptide release in the MEF secretome (WT or *Adamts2*^{-/-}) is shown. Error bars represent ±SEM. *P = 0.0235, determined using the 1-tailed unpaired Student's *t* test. F) Schematic view of the fibronectin molecule. Type I, II, and III fibronectin domains are represented by gray squares, circles, or hexagons, respectively. The alternatively spliced extra fibronectin type III domains (A, B) and the variable region are shown in dark gray. The binding site to the integrins [encompassing the tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) motif] is underlined. The ADAMTS2, 3, and 14 cleavage site is indicated with an arrow. G) Immunoblots of the secretome of human normal fibroblasts (NF) or DFs using an antibody specific to the N-terminal (30 kDa) part of human fibronectin. Recombinant-purified ADAMTS2 (75 nM) was added *in vitro* to the secretome of DFs with or without EDTA (20 mM). H) Western blots of the secretome of HEK cells expressing ADAMTS3 or 14 in a doxycycline-dependent manner, using the anti-N-terminal domain of fibronectin antibody. I) *In vitro* digestion of human plasma fibronectin by recombinant ADAMTS2 shown by SDS-PAGE (12.5% acrylamide, reducing conditions) stained with Coomassie blue. The cleavage product of ~33 kDa corresponding to the N-terminal domain was identified by MS/MS using the protein band extracted from the gel. J) Fibronectin cleavage site in the presence of ADAMTS2 was determined using TMT-ATOMS. The samples were digested with a mix of proteases before analysis. A total of 163 peptides labeled with TMTs at their N termini were observed, most of them having TMT ratios of ~1 and derived from partial degradation of the commercial fibronectin preparation. The P:C ratios of those peptides are shown with a graphic representation of log₂[protease/control (ctl)]. The 5 peptides with the highest P:C ratio (red dots) originate from the same cleavage site and unambiguously define the preferential ADAMTS2 cleavage site within fibronectin. This cleavage site is reported on the right.

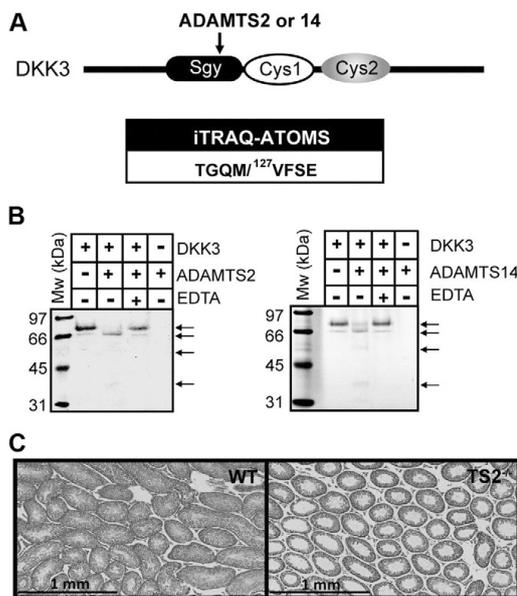


Figure 3. ADAMTS2 or 14 cleavage of DKK3 and potential implication in testis development. *A*) Schematic view shows the domain composition of DKK3. One of the cleavage sites observed by N-terminomics in complex media was confirmed by iTRAQ-ATOMS using recombinant proteins *in vitro*. The cleavage site determined by iTRAQ-ATOMS is reported below [P:C, 11.96; peptide-spectrum matches (PSMs), 8]. *B*) *In vitro* digestion of recombinant human DKK3 by recombinant-purified ADAMTS2 (left) or ADAMTS14 (right). Proteins were visualized by SDS-PAGE (10% acrylamide, reducing conditions) stained with Coomassie blue. Mw, molecular weight. *C*) Hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded sections of testes of 8-wk-old WT or *Adams2*^{-/-} (TS2^{-/-}) mice (*n* = 2).

³⁸³PJA³⁸⁴ cleavage identified by N-terminomics for ADAMTS3 (Fig. 5E).

Implication of ADAMTS2 in the TGF- β response of skin fibroblasts Many substrates identified in this study indicated that ADAMTS2, 3, and 14 play a major role in the regulation of TGF- β signaling. Using ADAMTS2 as a model proteinase, the response of human skin fibroblasts to TGF- β 1 or - β 2 was evaluated by RT-PCR (Fig. 6A) using α -SMA and CTGF as reporter genes. The specific contribution of ADAMTS2 was assessed using an siRNA directed against this protease (Fig. 6A). After treatment with TGF- β 1 or TGF- β 2, the induction of α -SMA or CTGF was attenuated in fibroblasts deficient in ADAMTS2 (Fig. 6B, C). Similar data were obtained when the response of normal and DFs was compared (data not shown). This reduction of TGF- β response was slightly more potent in the presence of TGF- β 2 compared to TGF- β 1 treatment (Fig. 6B, C), suggesting a contribution from TGF- β RIII, which is known to have a higher affinity for TGF- β 2. The response of human fibroblasts to TGF- β in the absence of ADAMTS2 was also verified by immunofluorescence (Fig. 6D). When fibroblasts were treated with TGF- β 1 or 2, a clear induction of α -SMA was seen. In agreement with the RT-PCR data, after TGF- β

treatment, the α -SMA level was reduced when ADAMTS2 is silenced, confirming the specific contribution of ADAMTS2 to the TGF- β response.

Cleavage site specificity of ADAMTS2, 3, and 14

Cleavage site specificities were analyzed based on cleavage events related to the candidate substrates (Table 1 and Supplemental Table 1) complemented with the cleavage sites determined by Edman or ATOMS. To take into account the contribution of the particular nature of fibrillar collagens (rich in Glycine and Proline), the analysis was performed with and without the cleavage sites of type I collagen (α -1 and α -2 chains) (Fig. 7). When collagen I was excluded, the cleavage sites of all 3 ADAMTS shared a common and specific enrichment in small nonpolar or slightly hydrophobic amino acids (G, P, A, M, F, and V) in the P1 and P1' positions (Fig. 7, right panels). According to this analysis, the preferential cleavage site for the pNPs is P/A₁G/V. Including collagen I cleavage sites in the analysis does not modify the deduced ADAMTS3 specificity but affects slightly the consensus cleavage site for ADAMTS2 and 14, notably by increasing the contribution of the Glycine residue in P1' (Fig. 7).

DISCUSSION

Recent data indicated that ADAMTS2, 3, and 14 could be involved in biological functions that are not related to collagen processing (31) and may thus have other physiological substrates (32). This hypothesis was evaluated using an N-terminomics approach that allows the identification of new substrates in complex samples, as already demonstrated with several metalloproteinases such as MMPs and meprins (12, 13). Using this approach, we identified several new extracellular and cell surface potential substrates of ADAMTS2, 3, and 14, of which some were validated by Western blotting, N-terminal sequencing, and/or mass spectrometry analysis. In this work, the proteins identified by N-terminomics on cell cultures constitute a subproteome (or protease network) related to the expression of ADAMTS2, 3, or 14. Under these experimental conditions, the protease network includes the primary direct substrates of the studied enzymes. It contains also proteins that are indirectly affected as a result of activation or inhibition of other actors such as other proteinases, inhibitors of proteinases, or cytokines. As a whole, the protease networks determined here in well-characterized models are therefore fully relevant to the biological functions of ADAMTS2, 3, or 14. Altogether, the N-terminomics and validation data have led to the identification of preferential cleavage sites. For the 3 ADAMTS, the P1 and P1' positions were enriched in nonpolar or slightly hydrophobic amino acids (mainly G, P, A, M, F, and V), a very unique specificity that strongly differs from that reported for BMP1 (D in P1'), MMP2 and 9 (L in P1'), or ADAMTS1 or 4 (E in P1). It is worth mentioning that the previously identified cleavage site allowing the release of the aminopeptide of type I, II, and III procollagens (A/P₁Q) could not be identified here because the

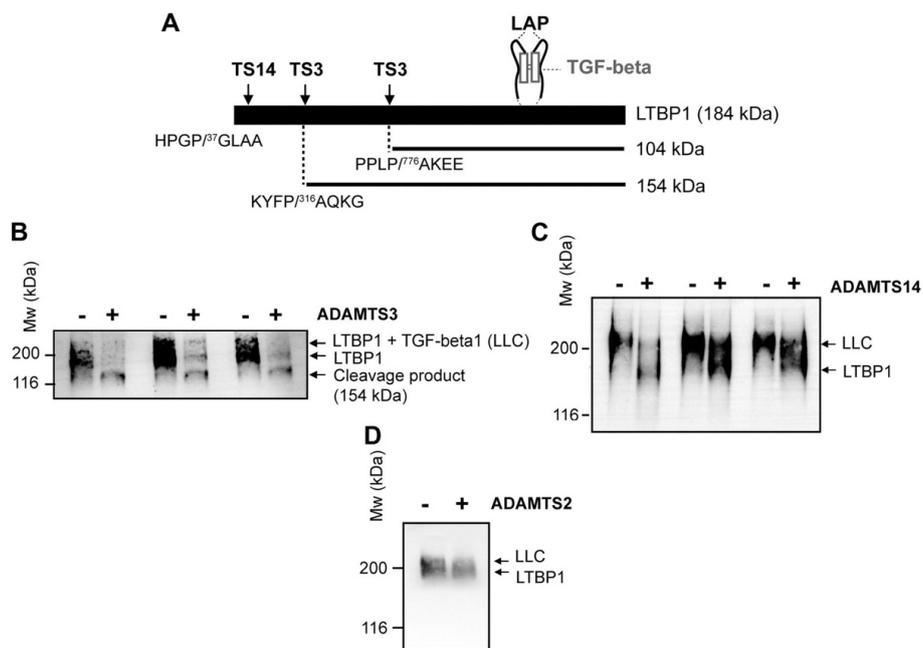


Figure 4. LTBP1 cleavage by the pNPs. *A*) Schematic view of the LLC composed of LTBP1 associated with pro-TGF- β 1, the latter being secreted as a noncovalent complex between TGF- β and the LAP. ADAMTS3 and 14 cleavage sites within human LTBP1, observed by N-terminomics, are shown by black arrows. Cleavage site sequences are reported below. *B–D*) Western blots using an anti-human LTBP1 antibody on the secretome of HEK cells expressing ADAMTS3 (*B*), ADAMTS14 (*C*), or ADAMTS2 (*D*) in a doxycycline-dependent manner. Proteins were separated by SDS-PAGE (7.5% acrylamide). Experiments were performed under nonreducing conditions to see the LLC. Mw, molecular weight.

proteins in the secretome were not treated to remove the blocked terminal pyrrolidone. The previously published “PJA” processing of α -1 type V procollagen was however identified and confirmed the reliability of our experimental procedure (Supplemental Table 1). Similarly, several “AJA” sites were identified, which fully correspond to the newly identified cleavage of VEGF-C by ADAMTS3 (10). Several different cleavage sites were also identified in the triple-helical domain of type I collagens (Supplemental Table 1). This was not anticipated but is not surprising based on the identification here of the preference of these ADAMTSs for proline- and glycine-rich sequences and knowing that the high expression of collagens by fibroblasts in culture leads to the secretion of a significant percentage of abnormally folded collagen molecules, which increases the possibility to identify true, although rare, cleaved sequences.

The similarity between the preferential cleavage sites for ADAMTS2, 3, and 14 certainly explains why they share several common substrates (such as fibronectin or TGF- β RIII). However, it is clear that substrate specificity is also governed by structural interactions between the substrate and the protease ancillary domains that are less conserved than the catalytic domain. This is probably the case for LTBP1 because the 3 studied ADAMTSs did not generate the same products.

The cleavage of the N-terminal domain of fibronectin by ADAMTS2 was confirmed using normal and DFs.

Interestingly, fibronectin has been reported to be implicated in platelet thrombus formation and diseases associated with thrombosis (33), and this could be correlated to previous results showing that ADAMTS2 is potentially involved in pediatric stroke and that its expression is increased in atherosclerotic plaques causing acute myocardial infarction (9). Fibronectin is also known to be involved in inflammation by recruiting and activating leukocytes, notably through its 29 kDa N-terminal fragment that can be released by thrombin (34). Moreover, the ADAMTS2 proteinase network shows other links with proteins involved in inflammation (see Supplemental Table 1: collagen α -2(VI) and α -3(VI) chains, IL-8, macrophage migration inhibitory factor, or the complement C1s subcomponent), which supports the role of ADAMTS2 in the immune system (4).

This study reports the unexpected cleavage of cell signaling molecules such as DKK3, which is implicated in prostate morphogenesis (26, 35) and testis development (30) probably through the regulation of TGF- β or Wnt/ β -catenin signaling. Investigation of testis morphology in *Adamts2*^{-/-} male mice shows the alteration of the seminiferous tubules leading to the interesting hypothesis that processing of DKK3 by ADAMTS2 could play a role during testis development. However, the exact mechanism needs to be studied more precisely.

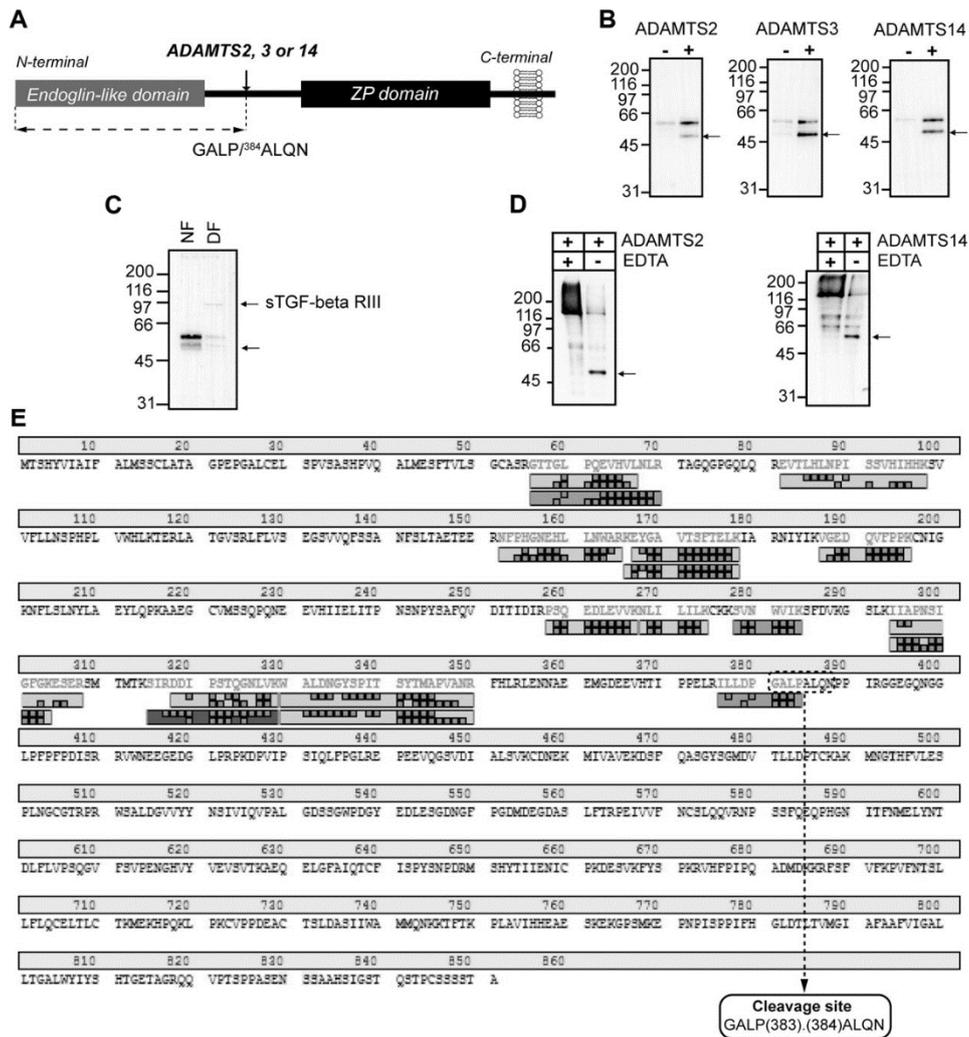


Figure 5. TGF- β RIII cleavage by ADAMTS2, 3, and 14. *A*) Schematic view of TGF- β RIII shows the cleavage site observed by N-terminomics and confirmed by MS/MS identification of the cleavage product in gel (Supplemental Table 1; see below). *B*) Western blot for TGF- β RIII in the medium of HEK cells over-expressing ADAMTS2, 3, or 14. The direct cleavage product is indicated by arrows. *C*) Western blot analysis of TGF- β RIII present in the medium of human normal fibroblasts (NF) or DFs. The shed form (sTGF- β RIII) is indicated by an arrow. *D*) Western blot shows the digestion of recombinant-purified TGF- β RIII (2.5 μ g) by recombinant ADAMTS2 (left) or 14 (right) *in vitro*. The only cleavage product, observed using Coomassie staining and identified by MS/MS, is the endoglin-like domain (arrow). *E*) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry identification of the 50 kDa TGF- β RIII product generated by ADAMTS2 cleavage. Semitypsin digestion was set as parameter for the identification of the peptide sequences. The cleavage product ends at the cleavage site determined by N-TAILS.

Analyses of the proteinase networks reveal a strong link between pNPs and TGF- β signaling. This is in line with previous data showing that 1) mutations affecting ADAMTS10, ADAMTS17, ADAMTS2, or ADAMTS4 proteins are involved in genetic diseases related to elastic fibers and TGF- β (36, 37); 2) the absence of ADAMTS2 reduces liver fibrosis (38); and 3) ADAMTS enzymes are

characterized by the presence of one or several domains similar to the “thrombospondin type I repeat” domain known to activate pro-TGF- β 1 (39, 40).

This study reports new mechanisms by which ADAMTS2, 3, and 14 can collectively modulate TGF- β signaling, through the cleavage of LTBP1, TGF- β RIII, and probably, pro-TGF- β . The direct cleavage of LTBP1 was

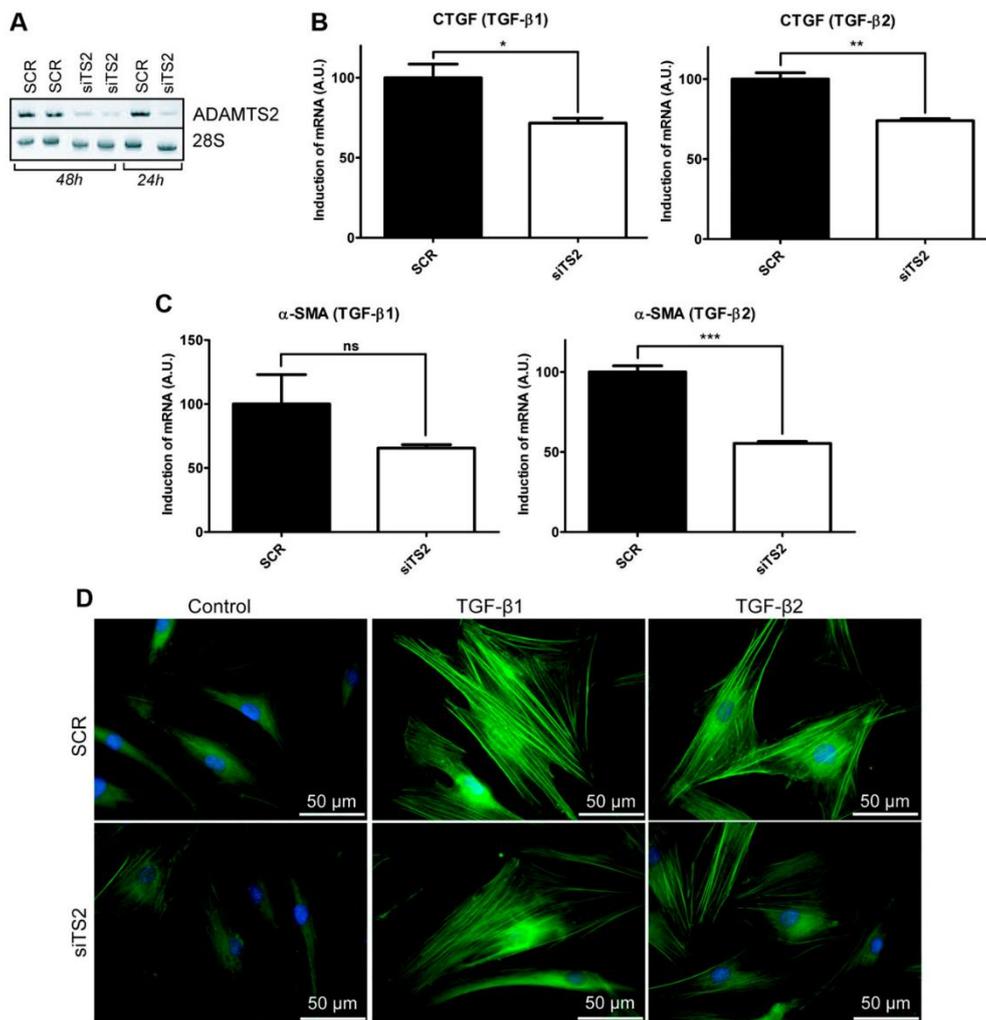


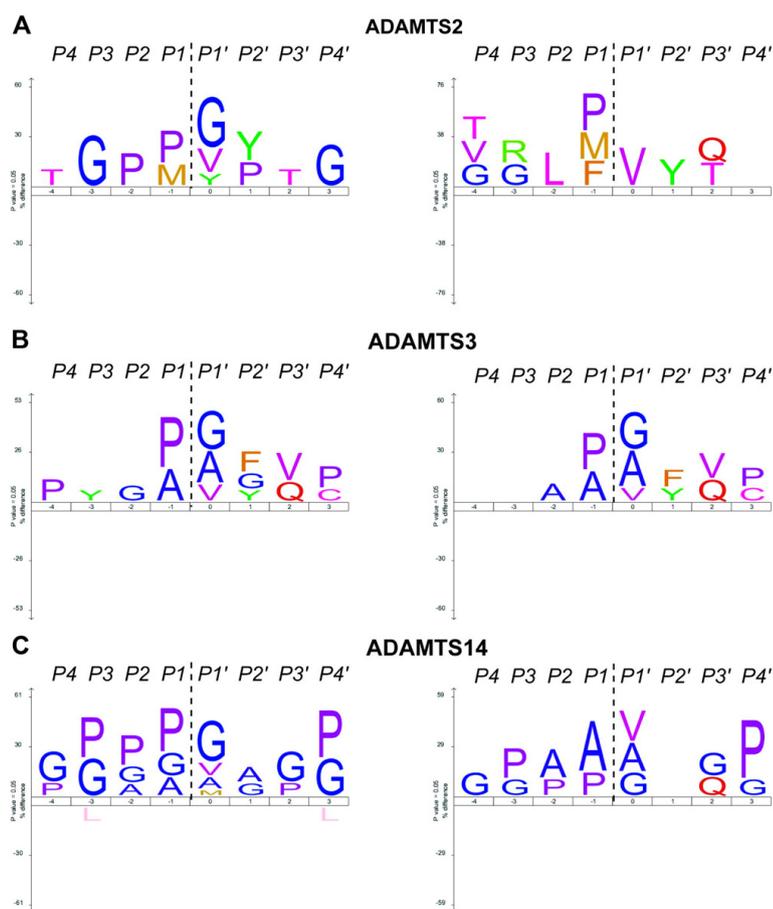
Figure 6. Biological implication of ADAMTS2 in TGF- β signaling in human fibroblasts. *A*) Assessment of ADAMTS2 silencing by RT-PCR after 24 or 48 h. Human normal dermal fibroblasts were transfected with a scrambled siRNA or an siRNA directed against ADAMTS2. *B* and *C*) Investigation of TGF- β response in human fibroblasts by RT-PCR using 2 TGF- β target genes: CTGF (*B*) and α -SMA (*C*). Human normal fibroblasts were transfected with a scrambled (SCR) or a specific siRNA (siTS2) for ADAMTS2 and were treated with 1 ng/ml TGF- β 1 (left panel) or TGF- β 2 (right panel) for 48 h. A.U., arbitrary units. Experiments were done in triplicate. Error bars are \pm SEM. ns, 0.1046; * P = 0.0178, ** P = 0.0017, and *** P = 0.0002, determined using the 1-tailed unpaired *t* test. *D*) Investigation of α -SMA level in human fibroblasts by immunofluorescence (FITC, green). Nuclei were stained with DAPI. Cells were treated as described above.

clearly demonstrated for ADAMTS3, which induces the release of TGF- β immobilized in the ECM. In the case of ADAMTS2 or 14, a specific cleavage site in LTBP1 inducing such release could not be identified. However, Western blot analyses showed that the LLC (formed by LTBP1, LAP, and TGF- β) is less abundant in the presence of ADAMTS2 or ADAMTS14. This suggests either that LTBP1 is cleaved at a site that is different from the ADAMTS3 cleavage site and could not be identified in our experimental conditions

or that cleavage occurs in the LAP or in TGF- β itself (see Fig. 4A). In favor of the latter hypothesis, N-terminomics data showed that ADAMTS14 cleaves the pro-TGF- β molecule between the LAP domain and C-terminal sequence corresponding to mature TGF- β (Supplemental Table 1).

The cell surface receptor TGF- β RIII is known to act as a coreceptor for TGF- β signaling and notably for TGF- β 2 (41, 42). TGF- β RIII can also be shed from the cell surface to release a soluble form that acts as an inhibitor of TGF- β

Figure 7. Analysis of the cleavage site specificities of ADAMTS2, 3, and 14. Data are shown for ADAMTS2 (A), ADAMTS3 (B), and ADAMTS14 (C) with (left) or without (right) type I collagen cleavages. The analyses were based on 18, 31, and 45 cleavage events (left) or 8, 26, and 23 cleavage events (right) respectively for ADAMTS2, ADAMTS3, and ADAMTS14. Cleavage sites determined by N-terminal Edman sequencing or ATOMS were used to complement the proteomic analysis. Amino acid sequence logos were generated using the iceLogo software package (24). The height of 1 amino acid reflects its frequency; the color represents its physicochemical properties.



signaling (43–45). Cleavage of the soluble TGF- β RIII within the nonstructured linker between the N-terminal endoglin-like domain and the *zona pellucida* domain hampers its ability to inhibit TGF- β signaling because both domains are required for the recognition of the growth factors of the TGF- β superfamily (23, 45, 46). Therefore, cleavage of the soluble TGF- β RIII by the pNPs within the nonstructured linker will also contribute to increase TGF- β availability.

Cleavage of LTBP1 and soluble TGF- β RIII by the pNPs should both lead to activation of TGF- β signaling. This hypothesis was evaluated in human skin fibroblasts using ADAMTS2 as a model. Our data clearly show that the response to TGF- β 1 and - β 2 is down-regulated in the absence of endogenous ADAMTS2. Additional characterizations will be required to identify more precisely the relative contribution of the different cleavages (LTBP1, pro-TGF- β , and/or TGF- β RIII). Because ADAMTS2 expression is induced by TGF- β (47), its role in TGF- β signaling reported here constitutes a positive feedback loop that could be involved in processes

such as fibrosis or wound healing (48, 49). We have reported that tetrachloride-induced liver fibrosis is reduced in *Adamts2*^{-/-} mice, implying the involvement of ADAMTS2 in fibrosis (38). This function was initially assumed to be due only to alterations in amino procollagen processing, but the involvement of ADAMTS2 in the cell response to TGF- β reported here could be an important additional mechanism.

In conclusion, this original analysis of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 shed a new light on the dogmatic idea that ADAMTS2, 3, and 14 are only involved in amino procollagen processing. Because they are able to cleave many ECM macromolecules but also proteins directly regulating cell phenotype such as factors involved in Wnt and TGF- β pathways, they should now be considered as multilevel regulators of ECM deposition and remodeling. [5]

The authors are grateful for support by the Incoming Postdoctoral–Marie Curie (COFUND) fellowship (Brussels, Belgium), the Télévie (7.4602.14), Fonds de la Recherche

Scientifique–Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS; T.0183.13), Centre National de la Recherche Scientifique, and University of Lyon. The authors thank Ulrich auf dem Keller (Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Zurich, Switzerland) for his help in running the analysis of N-terminomics data, Bart Devreese and Isabel Vandenberghe (Ghent University, Ghent, Belgium) for N-terminal Edman sequencing, Lany Fisher (U.S. National Institutes of Health) for the LF-69 rabbit antiserum, Antoine Heyres and Lola Vanoorschoot for their technical support, and Christophe Deroanne for his advice in running the small interfering RNA experiments (all from the Laboratory of Connective Tissues Biology, University of Liège). M.B. performed the analysis of the terminal amine isotopic labeling of substrate data and the biochemical validations of new substrates; C.L. performed the biochemical validations and preparation of proteomic samples for a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif 3 and 14 experiments; L.D., L.J., and J.D. provided mouse samples; L.D. provided the conditional human embryonic kidney cells expressing the different procollagen N-proteinases; J.D. provided the human embryonic kidney cells expressing active or inactive disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif 2; S.V.-L.G., D.J.S.H., and C.M. provided recombinant bone morphogenetic protein 1, procollagen C-proteinase enhancer, and miniprocollagen III; F.D. and I.Z.-C. performed the mass spectrometric analysis for a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif 2 (experiment A); F.D. performed the analyses with the Trans-Proteomic Pipeline; N.S., D.B., G.M., and E.D.P. performed the mass spectrometry analyses on the Q Exactive; S.V.-L.G., D.J.S.H., and B.N. gave advice during the experiments as well as critical reading of the manuscript; and M.B., C.M., and A.C. conceived and designed the experiments and wrote the paper. M.B. and C.L. are co-first authors. Mass spectrometry proteomic data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium *via* the PRoteomics IDentification partner repository with the data set identifier PXD002354 and digital object identifier 10.6019/PXD002354. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Bekhouche, M., and Colige, A. (2015) The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biol.* **44–46**, 46–53
- Nusgens, B. V., Verellen-Dumoulin, C., Hermanns-Lê, T., De Paepe, A., Nuytincq, L., Piérard, G. E., and Lapière, C. M. (1992) Evidence for a relationship between Ehlers-Danlos type VII C in humans and bovine dermatosparaxis. *Nat. Genet.* **1**, 214–217
- Li, S. W., Arita, M., Fertala, A., Bao, Y., Kopen, G. C., Långsjö, T. K., Hyttinen, M. M., Helminen, H. J., and Prockop, D. J. (2001) Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS2) develop fragile skin and male sterility. *Biochem. J.* **355**, 271–278
- Hofer, T. P., Frankenberger, M., Mages, J., Lang, R., Meyer, P., Hoffmann, R., Colige, A., and Ziegler-Heitbrock, L. (2008) Tissue-specific induction of ADAMTS2 in monocytes and macrophages by glucocorticoids. *J. Mol. Med. (Berl.)* **86**, 323–332
- Arning, A., Hiersche, M., Witten, A., Kurlmann, G., Kurnik, K., Manner, D., Stoll, M., and Nowak-Göttl, U. (2012) A genome-wide association study identifies a gene network of ADAMTS genes in the predisposition to pediatric stroke. *Blood* **120**, 5231–5236
- Goetsches, R., Comabella, M., Navarro, A., Perkal, H., and Montalban, X. (2005) Genetic association between polymorphisms in the ADAMTS14 gene and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **164**, 140–147
- Poonpet, T., Honsawek, S., Tammachote, N., Kanitnate, S., and Tammachote, R. (2013) ADAMTS14 gene polymorphism associated with knee osteoarthritis in Thai women. *Genet. Mol. Res.* **12**, 5301–5309
- Rodríguez-Lopez, J., Pombo-Suarez, M., Loughlin, J., Tsezou, A., Blanco, F. J., Meulenbelt, I., Slagboom, P. E., Valdes, A. M., Spector, T. D., Gomez-Reino, J. J., and Gonzalez, A. (2009) Association of a nsSNP in ADAMTS14 to some osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 321–327
- Lee, C. W., Hwang, I., Park, C. S., Lee, H., Park, D. W., Kang, S. J., Lee, S. W., Kim, Y. H., Park, S. W., and Park, S. J. (2012) Expression of ADAMTS2, -3, -13, and -14 in culprit coronary lesions in patients with acute myocardial infarction or stable angina. *J. Thromb. Thrombolysis* **33**, 362–370
- Jeltsch, M., Jha, S. K., Tvorogov, D., Anisimov, A., Leppänen, V. M., Holopainen, T., Kivelä, R., Ortega, S., Kärpanen, T., and Alitalo, K. (2014) CCBE1 enhances lymphangiogenesis via A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-3-mediated vascular endothelial growth factor-C activation. *Circulation* **129**, 1962–1971
- Kleifeld, O., Doucet, A., auf dem Keller, U., Prudova, A., Schilling, O., Kainthan, R. K., Starr, A. E., Foster, L. J., Kizhakkedathu, J. N., and Overall, C. M. (2010) Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat. Biotechnol.* **28**, 281–288
- Prudova, A., auf dem Keller, U., Butler, G. S., and Overall, C. M. (2010) Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 894–911
- Jefferson, T., auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V. V., Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A., Maier, W., Magdolen, V., Sterchi, E., Bond, J. S., Jayakumar, A., Traupe, H., Chalaris, A., Rose-John, S., Pietrzik, C. U., Postina, R., Overall, C. M., and Becker-Pauly, C. (2013) The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 309–333
- Fisher, L. W., Stubbs III, J. T., and Young, M. F. (1995) Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* **266**, 61–65
- Moali, C., Font, B., Ruggiero, F., Eichenberger, D., Rouselle, P., François, V., Oldberg, A., Bruckner-Tuderman, L., and Hulmes, D. J. (2005) 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
- Colige, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Dubail, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapière, C. M., and Nusgens, B. (2005) Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS2, a metalloproteinase cleaving the amino-propeptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *J. Biol. Chem.* **280**, 34397–34408
- Colige, A., Sieron, A. L., Li, S. W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilcox, W., Krakow, D., Cohn, D. H., Reardon, W., Byers, P. H., Lapière, C. M., Prockop, D. J., and Nusgens, B. V. (1999) Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 308–317
- Kleifeld, O., Doucet, A., Prudova, A., auf dem Keller, U., Gioia, M., Kizhakkedathu, J. N., and Overall, C. M. (2011) Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. *Nat. Protoc.* **6**, 1578–1611
- Vizcaíno, J. A., Deutsch, E. W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Ríos, D., Dians, J. A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P. A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., Gatto, L., Campos, A., Chalkley, R. J., Kraus, H. J., Albar, J. P., Martínez-Bartolomé, S., Apweiler, R., Omenn, G. S., Martens, L., Jones, A. R., and Hermjakob, H. (2014) ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat. Biotechnol.* **32**, 223–226
- auf dem Keller, U., and Overall, C. M. (2012) CLIPPER: an add-on to the Trans-Proteomic Pipeline for the automated analysis of TAILS N-terminomics data. *Biol. Chem.* **393**, 1477–1483
- Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **21**, 3448–3449
- Doucet, A., and Overall, C. M. (2011) Broad coverage identification of multiple proteolytic cleavage site sequences in complex high molecular weight proteins using quantitative proteomics as a complement to edman sequencing. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.003533
- Delolme, F., Anastasi, C., Alcaraz, L. B., Mendoza, V., Vadon-Le Goff, S., Talantikite, M., Capomaccio, R., Mevaere, J., Fortin, L., Mazzocut, D., Damour, O., Zanella-Cléon, I., Hulmes, D. J., Overall, C. M.,

- Valcourt, U., Lopez-Casillas, F., and Moali, C. (2015) Proteolytic control of TGF- β co-receptor activity by BMP-1/tolloid-like proteases revealed by quantitative iTRAQ proteomics. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 1009–1027
24. Colaert, N., Helsen, K., Martens, L., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2009) Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. *Nat. Methods* **6**, 786–787
25. Lee, E. J., Jo, M., Rho, S. B., Park, K., Yoo, Y. N., Park, J., Chae, M., Zhang, W., and Lee, J. H. (2009) Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of beta-catenin. *Int. J. Cancer* **124**, 287–297
26. Romero, D., Kawano, Y., Bengoa, N., Walker, M. M., Maltry, N., Niehrs, C., Waxman, J., and Kypta, R. (2013) Downregulation of Dickkopf3 disrupts prostate acinar morphogenesis through TGF- β /Smad signalling. *J. Cell Sci.* **126**, 1858–1867
27. Ge, G., and Greenspan, D. S. (2006) Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* **78**, 47–68
28. Fish, P. V., Allan, G. A., Bailey, S., Blagg, J., Butt, R., Collis, M. G., Greiling, D., James, K., Kendall, J., McElroy, A., McCleverty, D., Reed, C., Webster, R., and Whitlock, G. A. (2007) Potent and selective nonpeptidic inhibitors of procollagen C-proteinase. *J. Med. Chem.* **50**, 3442–3456
29. Hulmes, D. J., Mould, A. P., and Kessler, E. (1997) The CUB domains of procollagen C-proteinase enhancer control collagen assembly solely by their effect on procollagen C-proteinase/bone morphogenetic protein-1. *Matrix Biol.* **16**, 41–45
30. Das, D. S., Wadhwa, N., Kunj, N., Sarda, K., Pradhan, B. S., and Majumdar, S. S. (2013) Dickkopf homolog 3 (DKK3) plays a crucial role upstream of WNT/ β -CATENIN signaling for Sertoli cell mediated regulation of spermatogenesis. *PLoS One* **8**, e63603
31. Dubail, J., Kesteloot, F., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J. M., Lapière, C., Nusgens, B., and Colige, A. (2010) ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 4213–4232
32. Janssen, L., Dupont, L., Bekhouche, M., Noel, A., Leduc, C., Voz, M., Peers, B., Cataldo, D., Apte, S. S., Dubail, J., and Colige, A. (2015) ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. [E-pub ahead of print] *Angiogenesis*
33. Maurer, L. M., Tomasini-Johansson, B. R., and Mosher, D. F. (2010) Emerging roles of fibronectin in thrombosis. *Thromb. Res.* **125**, 287–291
34. Lohr, K. M., Kurth, C. A., Xie, D. L., Seyer, J. M., and Homandberg, G. A. (1990) The amino-terminal 29- and 72-Kd fragments of fibronectin mediate selective monocyte recruitment. *Blood* **76**, 2117–2124
35. Kawano, Y., Kitaoka, M., Hamada, Y., Walker, M. M., Waxman, J., and Kypta, R. M. (2006) Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3. *Oncogene* **25**, 6528–6537
36. Sengle, G., Tsutsui, K., Keene, D. R., Tufa, S. F., Carlson, E. J., Charbonneau, N. L., Ono, R. N., Sasaki, T., Wirtz, M. K., Samples, J. R., Fessler, L. I., Fessler, J. H., Sekiguchi, K., Hayflick, S. J., and Sakai, L. Y. (2012) Microenvironmental regulation by fibrillin-1. *PLoS Genet.* **8**, e1002425
37. Bourd-Boitun, K., Bonnier, D., Leyme, A., Mari, B., Tuffery, P., Samson, M., Ezan, F., Baffet, G., and Theret, N. (2011) Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta. *Hepatology* **54**, 2173–2184
38. Kesteloot, F., Desmoulière, A., Leclercq, I., Thiry, M., Arrese, J. E., Prockop, D. J., Lapière, C. M., Nusgens, B. V., and Colige, A. (2007) ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 2 inactivation reduces the extent and stability of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* **46**, 1620–1631
39. Crawford, S. E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J. E., Ribeiro, S. M., Lawler, J., Hynes, R. O., Boivin, G. P., and Bouck, N. (1998) Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in vivo. *Cell* **93**, 1159–1170
40. Murphy-Ullrich, J. E., and Poczatek, M. (2000) Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 59–69
41. Esparza-Lopez, J., Montiel, J. L., Vilchis-Landeros, M. M., Okadome, T., Miyazono, K., and López-Casillas, F. (2001) Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J. Biol. Chem.* **276**, 14588–14596
42. López-Casillas, F., Wrana, J. L., and Massagué, J. (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* **73**, 1435–1444
43. Velasco-Loyden, G., Arribas, J., and López-Casillas, F. (2004) The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 7721–7733
44. Boivin, W. A., Shackelford, M., Vanden Hoek, A., Zhao, H., Hackett, T. L., Knight, D. A., and Granville, D. J. (2012) Granzyme B cleaves decorin, biglycan and soluble betaglycan, releasing active transforming growth factor- β 1. *PLoS One* **7**, e33163
45. Mendoza, V., Vilchis-Landeros, M. M., Mendoza-Hernández, G., Huang, T., Villarreal, M. M., Hinck, A. P., López-Casillas, F., and Montiel, J. L. (2009) Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF-beta binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry* **48**, 11755–11765
46. Kirkbride, K. C., Townsend, T. A., Bruinsma, M. W., Barnett, J. V., and Globe, G. C. (2008) Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 7628–7637
47. Wang, W. M., Lee, S., Steigltz, B. M., Scott, I. C., Lebares, C. C., Allen, M. L., Brenner, M. C., Takahara, K., and Greenspan, D. S. (2003) Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 19549–19557
48. Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2002) Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 211–215
49. Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2007) Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J. Gastroenterol.* **13**, 3056–3062

Received for publication September 29, 2015.
Accepted for publication December 17, 2015.



In vivo N-Terminomics Highlights Novel Functions of ADAMTS2 and ADAMTS14 in Skin Collagen Matrix Building

Cédric Leduc¹, Laura Dupont¹, Loïc Joannes¹, Christine Monseur¹, Dominique Baiwir², Gabriel Mazzucchelli², Christophe Deroanne¹, Alain Colige^{1†} and Mourad Bekhouche^{1,3,4*†}

¹Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA-Cancer, University of Liège, Liège, Belgium, ²GIGA Proteomic Facility, GIGA-Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics, University of Liège, Liège, Belgium, ³Tissue Biology and Therapeutic Engineering, Centre National de la Recherche Scientifique/University of Lyon Unité Mixte de Recherche 5305, Lyon, France, ⁴Faculté d'Odontologie de Lyon, Université de Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Kazuhiro Yamamoto,
University of Liverpool,
United Kingdom

Reviewed by:

Fransiska Malfait,
Ghent University, Belgium
Paripok Phitsuvan,
King Mongkut's University of
Technology Thonburi, Thailand

*Correspondence:

Mourad Bekhouche
mourad.bekhouche@univ-lyon1.fr

[†]These authors share last authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Protein Chemistry and Enzymology,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 17 December 2020

Accepted: 08 February 2021

Published: 19 March 2021

Citation:

Leduc C, Dupont L, Joannes L,
Monseur C, Baiwir D, Mazzucchelli G,
Deroanne C, Colige A and
Bekhouche M (2021) In vivo N-
Terminomics Highlights Novel
Functions of ADAMTS2 and
ADAMTS14 in Skin Collagen
Matrix Building.
Front. Mol. Biosci. 8:643178.
doi: 10.3389/fmolb.2021.643178

A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif (ADAMTS)2 and ADAMTS14 were originally known for their ability to cleave the aminopeptides of fibrillar collagens. Previous work using N-terminomic approach (N-TAILS) *in vitro* led to the identification of new substrates, including some molecules involved in TGF- β signaling. Here, N-TAILS was used to investigate the substrates of these two enzymes *in vivo*, by comparing the N-terminomes of the skin of wild type mice, mice deficient in ADAMTS2, in ADAMTS14 and in both ADAMTS2 and ADAMTS14. This study identified 68 potential extracellular and cell surface proteins, with the majority of them being cleaved by both enzymes. These analyses confirm their role in collagen matrix organization and suggest their implication in inflammatory processes. Regarding fibrillar collagen, this study demonstrates that both ADAMTS2 and ADAMTS14 are involved in the processing of the aminopeptide of alpha1 and alpha2 type V collagen. It also revealed the existence of several cleavage sites in the Col1 domain and in the C-propeptide of type I collagens. In addition to collagens and other extracellular proteins, two major components of the cell cytoskeleton, actin and vimentin, were also identified as potential substrates. The latter data were confirmed *in vitro* using purified enzymes and could potentially indicate other functions for ADAMTS2 and 14. This original investigation of mouse skin degradomes by N-terminomic highlights the essential role of ADAMTS2 and ADAMTS14 in collagen matrix synthesis and turnover, and gives clues to better understand their functions in skin pathophysiology. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD022179.

Keywords: ADAMTS, collagen, Ehlers-Danlos Syndrome (EDS), degradomics, TAILS, N-Terminomics

INTRODUCTION

Ehlers-Danlos syndrome (EDS) encompasses a group of inherited diseases caused by mutations affecting genes involved in the homeostasis of connective tissues (Beighton et al., 1998). A significant number of these genes are directly related to the biology of fibrillar collagens. Mutations in type V and type III procollagens are the main causes of, respectively, the “classical” and the “vascular” types of EDS. Missense mutations in type I procollagens can also lead to rare forms of classical and vascular

EDS, while complete or partial skipping of exon six in alpha1 type I (COL1A1) or alpha2 type I (COL1A2) is responsible for arthrochalasia EDS, a condition mainly characterized by congenital bilateral hip dislocation, severe generalized joint hypermobility with multiple dislocations/subluxations and skin hyperextensibility (De Paepe and Malfait, 2012; Malfait and De Paepe, 2014). Electron microscopy of skin specimens shows loosely and randomly organized collagen fibrils with a smaller and variable diameter, and an irregular outline (Colige et al., 2004). The molecular basis behind this clinical picture is the absence of aminopropeptide cleavage of the mutated chain (either alpha1 or alpha2) since exon six encodes the cleavage site cleaved by aminoprocollagen peptidases (ADAMTS2, 3 and 14) (Colige et al., 1999). Null mutations in ADAMTS2, the main aminoprocollagen peptidase, lead also to EDS, but, surprisingly, not to the arthrochalasia EDS as reported for its mutated substrates. Instead, absence of ADAMTS2 activity causes dermatosparaxis EDS presenting with extreme skin fragility, characteristic craniofacial features, redundant skin with excessive skin folds at the wrists and ankles, umbilical hernia and severe bruising with a risk of subcutaneous hematomas and hemorrhages (Colige et al., 1999). In these patients and in animal models of deficiency in Adamts2 (TS2^{-/-}) electron microscopy shows collagen fibrils with a highly typical hieroglyphic or ribbon-like pattern. These differences in the morphology of collagen fibrils in arthrochalasia and dermatosparaxis, while persistence of N-propeptides is observed in both diseases, suggested that ADAMTS2 has possibly substrates other than type I procollagens.

Because of their close similarities with ADAMTS2, the consequences of mutations affecting ADAMTS3 and ADAMTS14 have been evaluated in mouse models (Janssen et al., 2016; Dupont et al., 2018). ADAMTS3 has been shown to be required for the formation of lymphatic network by its capacity to cleave pro-VEGF-C into fully active VEGF-C able to bind its receptors (Janssen et al., 2016). Regarding ADAMTS14, KO-mice do not display obvious specific phenotype despite the fact that biallelic null mutations have been predicted to be pathogenic using dedicated browser such as “GnomAD”. In the same line, mice deficient for both Adamts2 and Adamts14 (TS2^{-/-}TS14^{-/-}) display an aggravated phenotype as compared to TS2^{-/-} mice, again indicating further roles and substrates for ADAMTS14 (Dupont et al., 2018). In order to have first indications about the diversity of the substrates of ADAMTS2, 3 and 14, a proteomic analysis dedicated to the identification of protease substrates (N-TAILS) was performed in cell culture models (Bekhouche et al., 2016). This study showed that the repertoire of substrates of these “so-called” aminoprocollagen peptidases extends beyond fibrillary procollagens. Although most useful because of their relatively low complexity, these *in vitro* models do not recapitulate the *in vivo* situation. As an example, fibrillary procollagens are secreted in the culture medium as uncleaved precursors, whereas in connective tissues *in vivo* they stay concentrated close to the producing cells and are fully matured.

In order to clarify why arthrochalasia and dermatosparaxis EDS display different clinical phenotypes (Van Damme et al.,

2016) and to investigate the diverse functions of ADAMTS2 and ADAMTS14 *in vivo* (Dupont et al., 2018), N-Tails analysis has been performed on skin samples from wild-type mice (Wt) and TS2^{-/-}, TS14^{-/-} and TS2^{-/-}TS14^{-/-}.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

The hyperbranched polyglycerol-aldehyde polymer was purchased from Flintbox (University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada). Isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) labels are from AB Sciex (Concord, ON, Canada). Porcine trypsin was purchased from Promega (#V511A; Madison, WI, United States). Ultrafiltration devices were purchased from Merck Millipore. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Cell Lines

Fibroblasts were obtained from the dermis of healthy donors (normal fibroblasts, NF) and of a patient suffering from the dermatosparactic type of the Ehlers-Danlos syndrome (dermatosparactic fibroblasts, DF) (Nusgens et al., 1992). Cells were cultured in DMEM (Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza). For collagen production, cells were cultured in DMEM supplemented with 1% FBS and 50 µg/ml 2-phospho-L-ascorbic acid (Sigma Cat#49752). The conditioned medium was collected after 48h, centrifuged for 15 min at 4,000 rpm at 4°C. The supernatant was conserved at -80°C before collagen purification.

Skin Proteome Preparation

The experiment was conducted in triplicate using twelve 8-week-old adult mice (2 males and one female of each genotype (Wt, TS2^{-/-}, TS14^{-/-} and TS2^{-/-}TS14^{-/-})). The investigation on mice was reviewed and approved by Ethics Committee for Animal Use and Care of the University of Liege (Belgium) (protocol N°1,109). A square (1 cm²) of shaved skin was collected from the anteroventral part of the mice and incubated 1 h at 4°C under shaking in 3 ml of 50 mM HEPES sodium salt (pH 7.5), 2 mM CaCl₂ and 150 mM NaCl containing a cocktail of inhibitors of proteases and phosphatases (MS-SAFE, Sigma). Skin pieces were harvested and crushed with ceramic beads (MagNA Lyser Green Beads, Roche, n°03358,941,001) using the MagNA Lyser Instrument (Roche) in 90% (V/V) tissue protein extraction reagent (Thermo Scientific #78510), 10% (V/V) HEPES sodium salt (pH 7.5), 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl containing the MS-SAFE inhibitors cocktail. Crushed samples were centrifuged 5 min at 8,000 rpm at 4°C and the protein concentrations estimated (Bradford assay (Bradford, 1976)) in the collected supernatants and adjusted to 1.0 mg/ml. Samples of 500 µg of proteins for each condition were used for iTRAQ-TAILS labeling (Kleifeld et al., 2011; Bekhouche et al., 2016). Proteomic analyses were performed at the GIGA Proteomic platform on the ESI-Q Exactive (ThermoFisher) coupled with a 2D-RP/RP liquid chromatography (2D-RP/RP NanoAcquity

UPLC, Waters, Milford, United States) for the peptide fractionation in three fractions.

Proteomic Data Analysis

Proteomic data analysis was previously described (Bekhouche et al., 2016). Briefly, in a first step, peptides were identified using Mascot (version 2.2.06; Matrix Science Inc., Boston, MA, United States) and allowing non-tryptic cleavages and two missed cleavages/peptide. Carbamidomethyl cysteine was set as a fixed modification, and other modifications were set as variable: N-terminal acetyl, deamidation (NQ), Pyro-glu (N-term E), Pyro-Gln (N-term Q), Oxidation (M), iTRAQ (K), iTRAQ (Y) and iTRAQ (N-term). Peptide tolerance was set at 0.02 Da.

The tandem mass spectrometry (MS/MS) data were analyzed using the TransProteomicPipeline (TPP). The PeptideProphet and ProteinProphet software programs, embedded into TPP, were used to validate protein and peptide assignment. The nontryptic model was omitted in the PeptideProphet parameters. The error rate to validate proteins or peptides was respectively set at 2 and 5%. Then, Clipper software was used to determine the upper and lower cutoffs corresponding to 3-sigma calculated from the normal distribution of the log₂(P:C ratio) from natural mature N termini. A Gaussian error function was used to calculate a *p* value that reflects the probability of a peptide to be a false-positive. A peptide with a P:C ratio above or below the 3-sigma cutoff has 99,8% chance to be dependent of the studied protease (auf dem Keller and M Overall, 2012). The cutoffs for each experiment are reported in **Supplementary Table S4**. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Perez-Riverol et al., 2019) partner repository with the dataset identifier PXD022179 and 10.6019/PXD022179.

Biological Process Analysis

The biological processes have been investigated using the Panther database (PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools (Mi et al., 2019)). Statistical overrepresentation tests were performed using the whole *Mus musculus* genome as reference dataset. The *p*-Values are determined using the Fisher's Exact test corrected by the determination of the false discovery rate (fdr). The fdr was below 0.05 for all the reported biological process.

The Venn diagram were drawn using the BioVenn software (BioVenn—a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams (Hulsen et al., 2008)).

Purification of Recombinant ADAMTS2 and 14

Recombinant ADAMTS2, its inactive mutant, or ADAMTS14 were produced in HEK293 cells, purified and quantified as previously described (Colige et al., 2005). Briefly, recombinant proteases were purified, using Concanavalin A-Sepharose and Heparin-Sepharose columns, from 1 L of serum-free medium

conditioned during 48 h. Proteases were recovered in 50 mM Tris, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM CaCl₂.

Analysis of Fibrillar Collagens Degradation

Collagen from dermosparactic or normal calf skin was extracted and purified according to a reported procedure (Nusgens and Lapiere, 1979; Colige et al., 1995). Collagen from fibroblasts cultures, was concentrated by adding ethanol to the conditioned medium (see above, 2.2) at a final concentration of 33% (V/V). After overnight incubation at 4°C, precipitated collagen was recovered by centrifugation (7,000 rpm, 40 min, 4°C). Pellets were solubilized in 0.1 M acetic acid (pH 2.9) under shaking at 4°C for 18 h. Non-solubilized contaminants were excluded by centrifugation (17,000 rpm, 40 min, 4°C) and the supernatant containing the collagen was neutralized by adding 1 M Tris base solution (at 1/10 of the final volume). Collagen cleavage was analyzed by incubation of 10 µg of type I collagen with recombinant ADAMTS2 or 14 (200 nM for 16 h at 37°C) in 50 mM Tris (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 2 mM CaCl₂, in the presence or absence of 25 mM EDTA used as inhibitor of ADAMTS metalloproteinase activity. Collagens were used in native form or after thermal denaturation at 95°C for 10 min. Digestion products were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue.

Analysis of Cleavage of Intracellular Substrates

Cell lysates from human normal fibroblasts (NF) were prepared by sonication and incubated with recombinant human ADAMTS2 and/or 14 (200 nM for 16 h at 37°C) in 50 mM Tris (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 2 mM CaCl₂, in the presence or absence of 25 mM EDTA. Actin and vimentin cleavages were analyzed by Western blot using polyclonal anti- α -actin-1 (A2066, Sigma) and polyclonal anti-vimentin (VI008-01, Quartett).

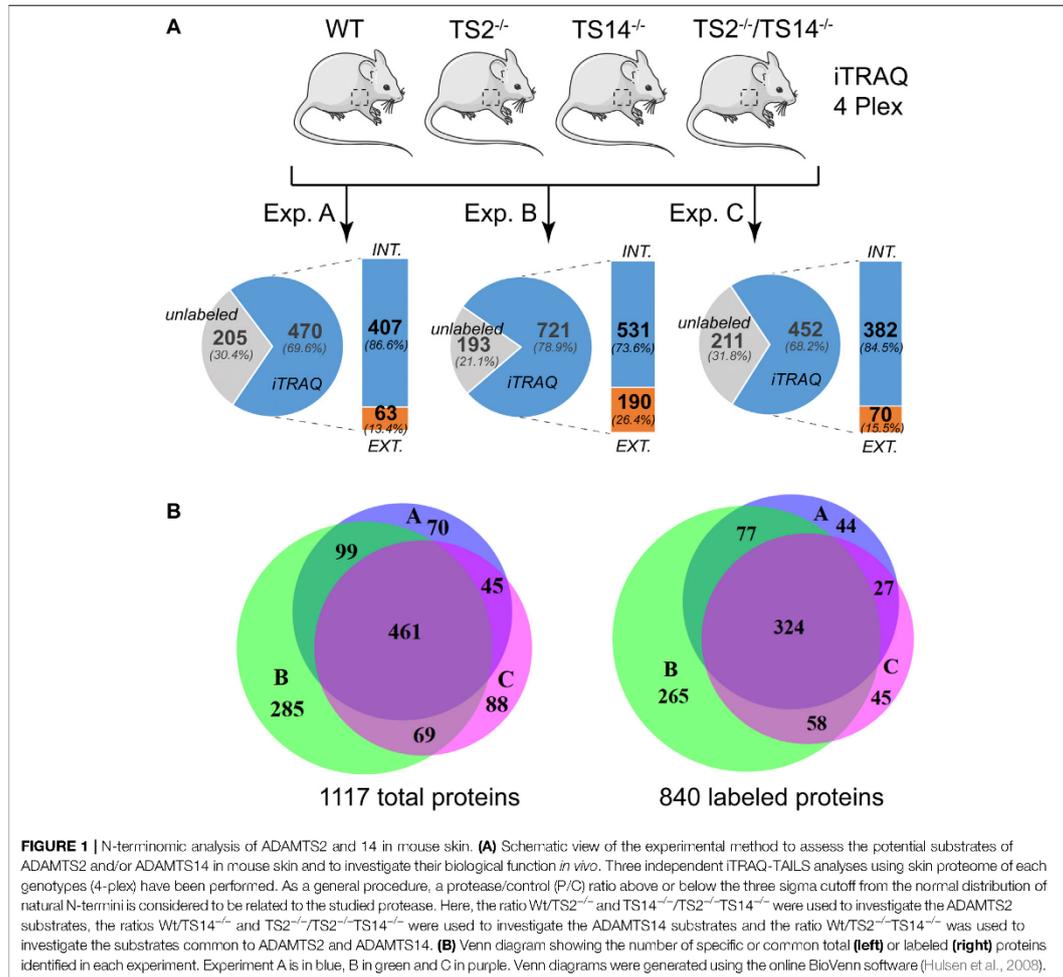
Determination of Cleavage Site Specificity

Amino acid sequence logos, corrected by the natural abundance of amino acids in the human proteome, were generated using the iceLogo software package (Colaert et al., 2009). Analyses were based on the cleavage sites determined by proteomics for all the potential extracellular substrates, without type I collagen cleavage sites or without all fibrillar collagens.

RESULTS

N-Terminomic Analysis of ADAMTS2 and ADAMTS14 Skin Degradome

ADAMTS2 and ADAMTS14 are clearly implicated in several physio-pathological processes (Colige et al., 1999; Kesteloot et al., 2007; Dubail et al., 2010; Dupont et al., 2018; Wang et al., 2020). To better understand their *in vivo* roles in skin physiology and extracellular matrix homeostasis, N-terminomic experiments have been performed on skin of mice, either wild type (Wt), deficient in Adamts2 (TS2^{-/-}), deficient in Adamts14 (TS14^{-/-})



and deficient in both Adamts2 and Adamts14 (TS2^{-/-}TS14^{-/-}) (Figure 1A). For each experiment, proteins extracted from the four genotypes were labeled with specific iTRAQ labels for quantification by mass spectrometry (MS/MS). This 4-plex experiment was performed in triplicate. The proteomic analysis shows that between 68 and 79% of the proteins were labeled and have therefore been used for relative quantification. Among the labeled proteins between 13 and 26% are extracellular. By using Venn diagrams as analytical tool, a total of 1,117 proteins, including 840 with an iTRAQ labeled peptide, were identified in the three experiments, but only 41 and 38% of them were common to the three experiments, for unlabeled and labeled proteins, respectively (Figure 1B). As actual substrates might have been missed during the proteomic analyses, especially when

their abundance is low, the data of these three experiments can be considered as complementary. In order to take this limitation into account but to generate also high confidence data, a labeled peptide was considered to identify a candidate substrate when it was observed in at least two experiments with a similar Protease/Control (P/C) fold change (either increased or decreased).

The degradomes (proteolytic events related to a proteolytic enzyme) are determined from the Protease/Control (P/C) ratios significantly different from the normal distribution of the natural N-termini. They include the proteins cleaved directly by the studied protease and also indirectly by the activation of other proteases or regulatory pathways. In this study, any N-terminally iTRAQ labeled peptide was considered to be part of the

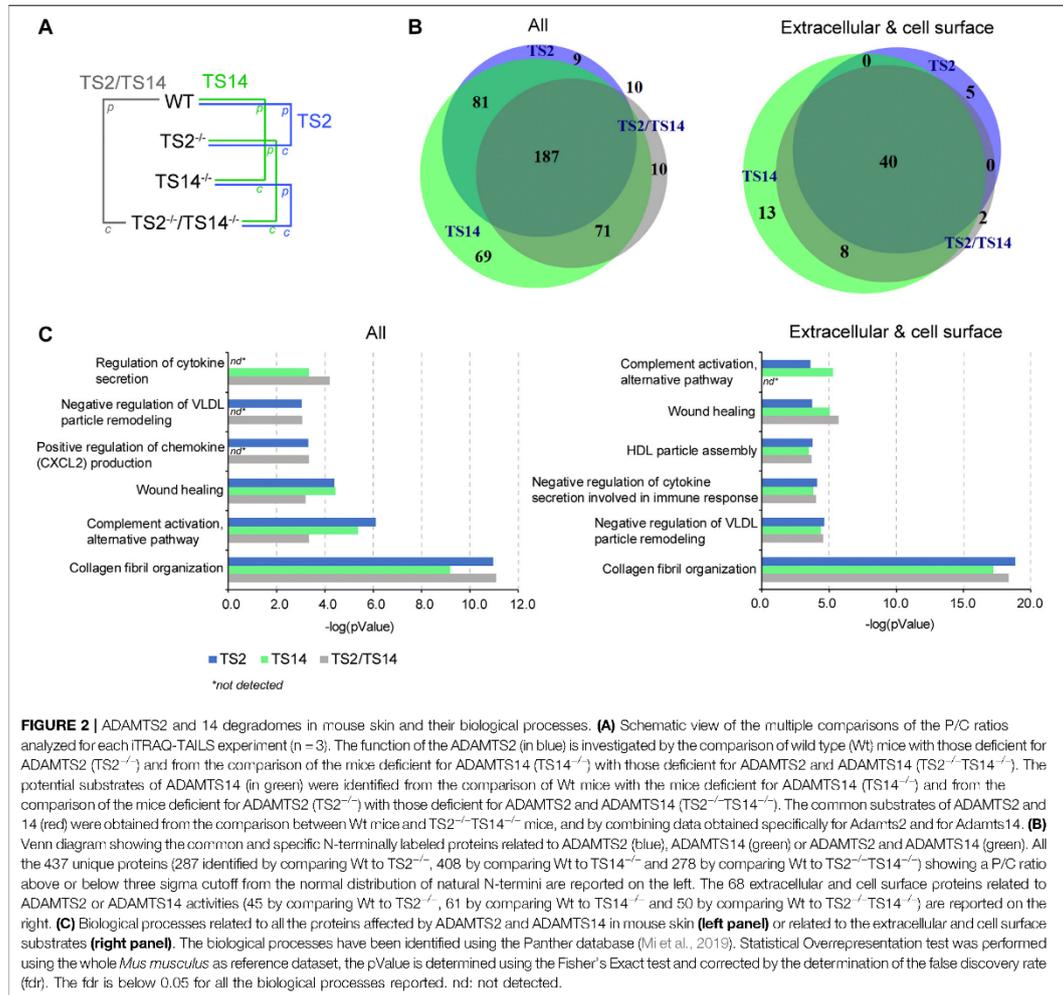


FIGURE 2 | ADAMTS2 and 14 degradomes in mouse skin and their biological processes. **(A)** Schematic view of the multiple comparisons of the P/C ratios analyzed for each ITRAQ-TAILS experiment ($n = 3$). The function of the ADAMTS2 (in blue) is investigated by the comparison of wild type (Wt) mice with those deficient for ADAMTS2 ($TS2^{-/-}$) and from the comparison of the mice deficient for ADAMTS14 ($TS14^{-/-}$) with those deficient for ADAMTS2 and ADAMTS14 ($TS2^{-/-}TS14^{-/-}$). The potential substrates of ADAMTS14 (in green) were identified from the comparison of Wt mice with the mice deficient for ADAMTS14 ($TS14^{-/-}$) and from the comparison of the mice deficient for ADAMTS2 ($TS2^{-/-}$) with those deficient for ADAMTS2 and ADAMTS14 ($TS2^{-/-}TS14^{-/-}$). The common substrates of ADAMTS2 and 14 (red) were obtained from the comparison between Wt mice and $TS2^{-/-}TS14^{-/-}$ mice, and by combining data obtained specifically for Adamts2 and for Adamts14. **(B)** Venn diagram showing the common and specific N-terminally labeled proteins related to ADAMTS2 (blue), ADAMTS14 (green) or ADAMTS2 and ADAMTS14 (green). All the 437 unique proteins (287 identified by comparing Wt to $TS2^{-/-}$, 408 by comparing Wt to $TS14^{-/-}$ and 278 by comparing Wt to $TS2^{-/-}TS14^{-/-}$) showing a P/C ratio above or below three sigma cutoff from the normal distribution of natural N-termini are reported on the left. The 68 extracellular and cell surface proteins related to ADAMTS2 or ADAMTS14 activities (45 by comparing Wt to $TS2^{-/-}$, 61 by comparing Wt to $TS14^{-/-}$ and 50 by comparing Wt to $TS2^{-/-}TS14^{-/-}$) are reported on the right. **(C)** Biological processes related to all the proteins affected by ADAMTS2 and ADAMTS14 in mouse skin (**left panel**) or related to the extracellular and cell surface substrates (**right panel**). The biological processes have been identified using the Panther database (Mi et al., 2019). Statistical Overrepresentation test was performed using the whole *Mus musculus* as reference dataset, the pValue is determined using the Fisher's Exact test and corrected by the determination of the false discovery rate (fdr). The fdr is below 0.05 for all the biological processes reported. nd: not detected.

ADAMTS2 and/or ADAMTS14 degradomes when its P/C ratio was above or below a 3-sigma cut-off from the normal distribution of natural N-termini, including those obtained after the removal of the signal peptide. The degradome of ADAMTS2 has been determined from Wt vs $TS2^{-/-}$ and from $TS14^{-/-}$ vs $TS2^{-/-}TS14^{-/-}$ ratios, and that of ADAMTS14 has been determined from Wt vs $TS14^{-/-}$ and from $TS2^{-/-}$ vs $TS2^{-/-}TS14^{-/-}$ ratios, while that of ADAMTS2 and ADAMTS14 together has been determined from Wt vs $TS2^{-/-}TS14^{-/-}$ ratios (Figure 2A). In this analysis, the whole degradome of ADAMTS2 and/or ADAMTS14 was found to be composed of 437 proteins, including 68 proteins secreted or anchored at the cell surface. Forty extracellular and cell

surface proteins were related to both ADAMTS2 and ADAMTS14 activities, while five are specific of ADAMTS2 and 21 (13 + 8) of ADAMTS14. Of note, two proteins were detected only when comparing Wt and $TS2^{-/-}TS14^{-/-}$, the coagulation factor XIIIa and the mast cell protease 4 (Figure 2B). The degradomes of ADAMTS2 and ADAMTS14 are common at 59% (40/68) when considering specifically the extracellular and cell surface proteins, while only a 40% (148/369) overlap is found when considering all the other proteins, showing an enrichment for common extracellular substrates (Figure 2B). Investigation of the biological processes (pantherdb.org) related to these degradomes clearly illustrated a fundamental role for these two enzymes in collagen fibril organization, which was

TABLE 1 | Potential extracellular substrates specific or common of ADAMTS2 and/or ADAMTS14.

Name	TS2	TS14	TS2TS14	Name	TS2	TS14	TS2TS14
Inter alpha-trypsin inhibitor	1.2 ± 0.7	1.9 ± 0.7	1.6 ± 0.5	Galectin-1	1.3 ± 0.3	1.9 ± 0.4	2.1 ± 0.4
AE-binding protein 1	0.7 ± 0.2	2.0 ± 0.5	1.2 ± 0.3	Galectin-7	2.0 ± 0.6	2.8 ± 0.8	4.8 ± 1.4
Alpha-2-HS-glycoprotein	0.7 ± 0.3	2.2 ± 1.3	0.9 ± 0.3	Gc-globulin	1.7 ± 0.8	4.1 ± 2.0	6.0 ± 3.7
Alpha-2-macroglobulin	1.7 ± 1.0	2.0 ± 0.8	2.2 ± 0.6	Gelsolin	2.6 ± 0.7	2.4 ± 0.9	5.0 ± 1.7
Annexin-8	6.4 ± 2.2	5.5 ± 1.9	15.0 ± nd ^a	H2-Q9	1.9 ± 1.3	2.7 ± 1.1	2.9 ± 1.1
Apolipoprotein A-I	2.7 ± 1.8	3.3 ± 1.9	4.5 ± 1.8	Hemopexin	1.0 ± 0.4	1.9 ± 0.5	1.5 ± 0.5
Apolipoprotein H	1.6 ± 0.8	2.6 ± 1.2	2.3 ± 0.8	Ig gamma-2B	1.8 ± 0.5	2.3 ± 0.8	3.5 ± 1.2
Beta-globin	2.2 ± 0.6	2.9 ± 1.1	6.7 ± 3.3	Ig gamma-3	1.1 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.8 ± 0.4
Biglycan	2.8 ± 2.4	3.0 ± 1.6	3.6 ± 1.8	Ig kappa chain V-V	1.2 ± 0.8	5.1 ± 2.7	2.9 ± 1.1
Carboxypeptidase A3	1.6 ± 0.4	2.1 ± 0.5	3.2 ± 1.1	Kallikrein j	2.0 ± 0.8	2.4 ± 0.6	5.1 ± 0.6
Cathepsin B heavy chain	1.3 ± 0.6	1.9 ± 0.6	1.6 ± 0.3	Kininogen-1	2.2 ± 0.5	2.9 ± 0.6	5.5 ± 0.2
Cathepsin H	1.2 ± 0.6	2.4 ± 0.8	2.0 ± 0.6	Lumican	1.6 ± 0.7	2.6 ± 1.3	2.3 ± 0.4
Cathepsin S	1.0 ± 0.5	2.2 ± 0.7	1.5 ± 0.4	Mast cell protease 4	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.4 ± 0.5
Caveolin-1	2.0 ± 0.8	3.1 ± 1.4	3.1 ± 0.0	MIF	1.1 ± 0.6	2.7 ± 1.1	1.8 ± 0.5
Cavin-1	2.1 ± 0.4	3.5 ± 0.9	8.7 ± 0.4	Myelin protein zero	1.6 ± 0.7	2.1 ± 1.1	1.7 ± 0.4
Coagulation factor XIIIa	2.5 ± 1.0	3.8 ± 1.5	7.8 ± nd ^a	Osteoglycin	2.3 ± 0.7	2.3 ± 0.9	4.5 ± 1.6
Collagen alpha-1(I) chain	4.2 ± 0.5	1.7 ± 0.2	6.8 ± 1.0	p24 gamma-1	2.1 ± 1.1	3.3 ± 1.7	1.4 ± 1.0
Collagen alpha-1(II) chain	3.7 ± 2.2	2.8 ± 1.3	5.8 ± 2.7	p35/Annexin A1	2.7 ± 1.2	2.7 ± 0.9	7.4 ± 3.7
Collagen alpha-1(IV) chain	1.6 ± 0.6	1.8 ± 0.6	2.2 ± 0.4	p36/Annexin A2	2.7 ± 1.2	2.7 ± 0.9	7.4 ± 3.7
Collagen alpha-1(V) chain	3.9 ± 1.7	4.1 ± 1.6	9.3 ± 0.8	PCPE-1	2.2 ± 0.4	1.9 ± 0.4	3.6 ± 0.5
Collagen alpha-1(VI) chain	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.6	3.4 ± 0.9	PDI A6	1.8 ± 0.7	2.1 ± 0.7	2.9 ± 0.9
Collagen alpha-1(XIV) chain	3.6 ± 0.7	2.3 ± 0.5	8.2 ± 2.5	Periostin	1.0 ± 0.5	2.2 ± 0.8	1.3 ± 0.4
Collagen alpha-2(I) chain	3.1 ± 0.7	1.6 ± 0.2	4.6 ± 0.6	Proapollipoprotein A-II	3.5 ± 2.5	4.9 ± 3.2	11.9 ± 7.9
Collagen alpha-2(V) chain	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.3	2.8 ± 0.3	Prolargin	2.9 ± 0.9	2.6 ± 0.8	5.8 ± 1.3
Collagen alpha-2(VI) chain	2.5 ± 0.7	2.2 ± 0.6	4.1 ± 0.0	Protein unc-80 homolog	1.8 ± 0.6	2.0 ± 0.2	3.5 ± 1.4
Collagen alpha-3(VI) chain	4.7 ± 1.3	2.1 ± 0.6	8.0 ± 1.2	Serp1n A1c	1.1 ± 0.3	2.4 ± 1.0	2.1 ± 0.5
Complement C3	1.8 ± 1.4	4.3 ± 3.4	2.3 ± 0.8	Serp1n A1d	0.8 ± 0.5	2.8 ± 1.3	1.0 ± 0.4
Complement C4-B	0.3 ± 0.1	2.7 ± 1.0	0.6 ± 0.2	Serp1n B6	4.7 ± 2.5	3.9 ± 2.4	8.0 ± 1.9
Complement factor B	0.9 ± 0.2	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.5	Protein serpinb6e	1.3 ± 0.3	2.3 ± 0.6	2.5 ± 0.1
Complement factor H	1.0 ± 0.3	1.8 ± 0.5	1.7 ± 0.6	Serum albumin	3.2 ± 1.7	4.2 ± 2.4	12.6 ± 9.7
Cornodesmosin	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.4	2.2 ± 0.4	Siderophilin	2.2 ± 0.7	2.8 ± 1.1	5.2 ± 2.5
Cystatin-3	2.4 ± 0.6	2.7 ± 0.8	7.0 ± 3.7	Stromelysin-1/MMP3	0.4 ± 0.1	1.5 ± 0.3	0.5 ± 0.1
Dermatopontin	2.0 ± 0.4	1.6 ± 0.2	3.1 ± 0.6	Susd 4	2.3 ± 0.7	2.4 ± 1.1	3.9 ± 1.1
Dermokine	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.2	Transcobalamin II	0.8 ± 0.5	2.2 ± 1.1	0.8 ± 0.2

^and: not determined.

The 68 extracellular and cell surface potential substrates are reported together with the average P/C ratio from at least two experiments for ADAMTS2, ADAMTS14 or ADAMTS2 and ADAMTS14. When several peptides were identified for a protein, the ratios from the peptide giving the highest value are reported for illustration. All the peptides and ratios are reported in supplemental.

expected for ADAMTS2 but was more surprising for ADAMTS14 since collagen fibrils in TS14^{-/-} mice appear to be normal. This analysis also shed light on their implication in lipoprotein regulation and assembly, notably by the cleavage of the proapollipoprotein A-II and apollipoprotein A-I, and in immune response by the regulation of cytokines and chemokines secretion and complement activation, notably through the cleavage of complement proteins (C3C, C4-B) and of the macrophage migration inhibitory factor (Figure 2C, Table 1, Supplementary Figure S1).

Proteomic Analysis of Type I Collagen Processing by ADAMTS2 And/or ADAMTS14 in Mouse Skin Cleavage of the Aminopropeptide of Fibrillar Collagens

As a positive control assessing the quality and the specificity of our technical approach, we first focused on the cleavages of the

aminopropeptides of type I procollagens, the primary substrates of ADAMTS2. For Col1A1 and Col1A2, the highest P/C ratios were detected at sequences corresponding to the published cleavage sites in the NC2 domain: S₁₅₁₋₁₅₂Q for Col1A1 and A₈₅₋₈₆Q for Col1A2 (Table 2). Peptides corresponding to more upstream sequences have P/C ratios largely below 1, evidencing the near absence of intact N-propeptide in Wt skin (Supplementary Table S2). These data clearly validate the reliability of our experimental setting.

Surprisingly, several additional potential cleavage sites were also identified in the NC2 domain (Figure 3A; Table 2), some with a P/C ratio >2. Some were a few amino acids downstream the “canonical” cleavage site and could therefore result from exopeptidase activity, but several others were at longer distance suggesting that ADAMTS2 cleaves within a preferred region and not exclusively at the previously reported single cleavage site.

Regarding ADAMTS14, no clear activity could be evidenced at sites cleaved by ADAMTS2, which is in line with previous studies

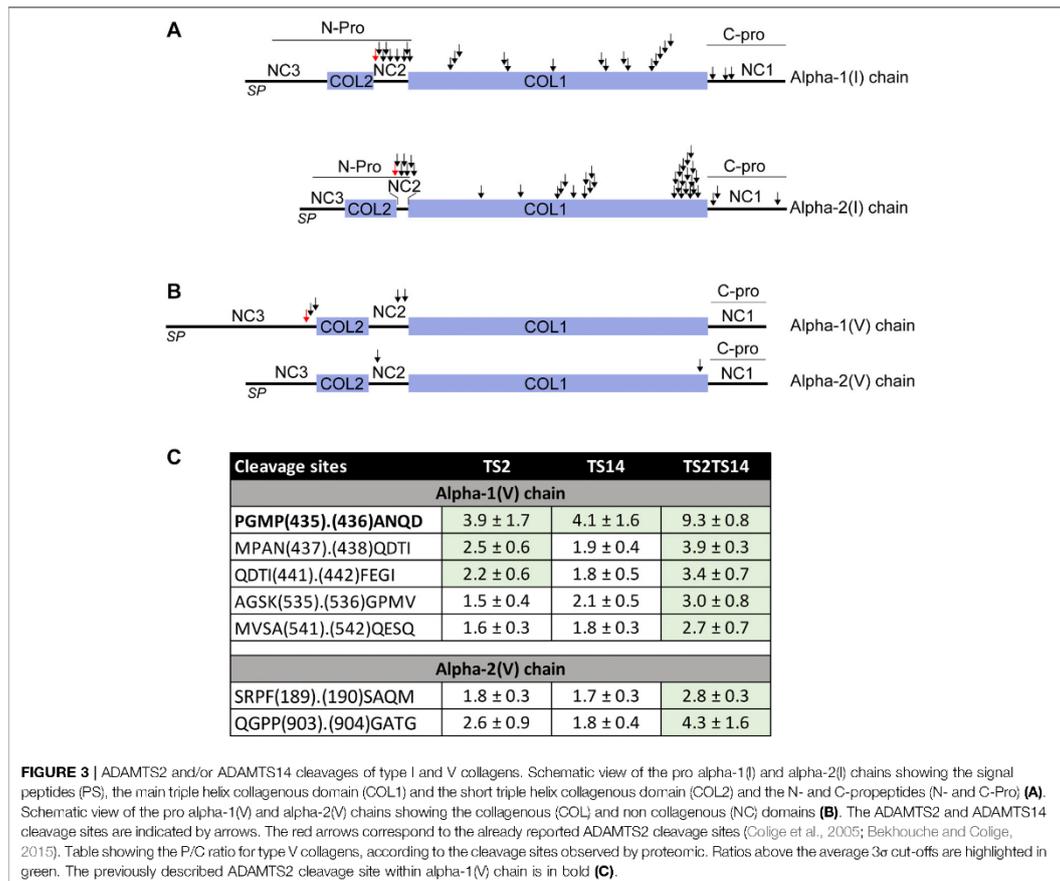
TABLE 2 | Type I collagen processing in mouse skin.

Collagen $\alpha 1(I)$ chain				Collagen $\alpha 2(I)$ chain			
Peptide Sequence	TS2	TS14	TS2TS14	Peptide Sequence	TS2	TS14	TS2TS14
<i>NC2 (A150-P167)</i>				<i>NC2 (A75-P96)</i>			
NFAS(151),(152)	4.2 ± 0.5	1.7 ± 0.2	6.8 ± 1.0	NFAA(85),(86)QYSDKGVSSGPGMGLMGPR	3.1 ± 0.7	1.6 ± 0.2	4.6 ± 0.6
QMSYGYDEKSAGVSVPGMGPSPGPR				FAAQ(86),(87)YSDKGVSSGPGMGLMGPR	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.3	1.5 ± 0.2
FASQ(152),(153)	2.0 ± 0.3	1.5 ± 0.2	2.9 ± 0.4	YSDK(90),(91)GVSSGPGMGLMGPR	2.9 ± 0.4	1.4 ± 0.2	2.9 ± 0.6
MYSYGYDEKSAGVSVPGMGPSPGPR				SDK(91),(92)VSSGPGMGLMGPR	1.9 ± 0.3	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.3
QMSY(155),(156)	2.4 ± 1.0	1.6 ± 0.3	3.3 ± 1.1	DKGV(92),(93)SSGPGMGLMGPR	1.9 ± 0.2	1.5 ± 0.1	2.8 ± 0.1
GYDEKSAGVSVPGMGPSPGPR				<i>Triple helix (G97-G1113)</i>			
SYGY(157),(158)	3.0 ± 1.0	1.8 ± 0.3	5.2 ± 2.0	SSGPG(96),(97)GPMGLMGPR	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.2	2.7 ± 0.5
DEKSAGVSVPGMGPSPGPR				GGPG(98),(99)MGLMGPR	2.5 ± 0.8	1.8 ± 0.5	3.9 ± 1.8
DEKS(161),(162)AGVSVPGMGPSPGPR	2.0 ± 0.3	1.5 ± 0.2	2.9 ± 0.5	RGIP(336),(337)GPAGAAGATGAR	2.5 ± 0.7	1.7 ± 0.4	3.6 ± 1.0
EKSA (162),(163)GVSVPGMGPSPGPR	1.9 ± 0.3	1.4 ± 0.1	2.6 ± 0.4	RPGP(485),(486)GPAGPR	2.4 ± 0.7	1.6 ± 0.4	3.5 ± 1.3
KSAG(163),(164)VSVPGMGPSPGPR	3.7 ± 0.3	1.4 ± 0.1	5.1 ± 0.2	RGTP(600),(601)GESGAAGPSGPIGSR	2.1 ± 0.6	1.6 ± 0.3	3.2 ± 1.1
<i>Triple helix (<I>G168-P1181</I>)</i>							
VSPV(167),(168)GPMGPSPGPR	1.8 ± 0.5	1.6 ± 0.4	2.5 ± 0.6	GESG(604),(605)AAGPSGPIGSR	2.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1	2.5 ± 0.4
VPGP(169),(170)MGPSPGPR	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.4	2.6 ± 1.0	ESGA(605),(606)AGPSGPIGSR	2.0 ± 0.4	1.4 ± 0.2	2.7 ± 0.5
TGPP(332),(333)	2.1 ± 0.6	1.7 ± 0.3	3.5 ± 1.1	VGAP (636),(637)GSAGASGGGLPGER	2.3 ± 0.8	1.7 ± 0.4	3.5 ± 1.2
GFPVAVGAKGEAGPQGAR				SGDR(699),(700)GEAGAAGPSGPIGSR	1.9 ± 0.4	1.6 ± 0.3	3.0 ± 0.7
PPGF(334),(335)PGAVGAKGEAGPQGAR	2.3 ± 0.8	1.7 ± 0.5	3.5 ± 1.7	GDRG(700),(701)EAGAAGPSGPIGSR	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.2	2.8 ± 0.3
PGFP(335),(336)GAVGAKGEAGPQGAR	2.4 ± 0.8	1.9 ± 0.5	4.0 ± 1.3	DRGE(701),(702)AGAAGPSGPIGSR	2.4 ± 0.6	1.7 ± 0.4	3.8 ± 1.1
RGFP(485),(486)GADGVAGPKGPGSGER	2.6 ± 1.0	1.7 ± 0.4	3.8 ± 1.5	GEAG(703),(704)AAGPSGPIGSR	2.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1	2.5 ± 0.4
GFPG(486),(487)ADGVAGPKGPGSGER	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2	EAGA(704),(705)AGPSGPIGSR	2.1 ± 0.4	1.5 ± 0.2	3.0 ± 0.7
AGAQ(608),(609)GAPGAPGAPGPR	2.2 ± 0.4	1.6 ± 0.3	3.1 ± 0.3	AGAP(969),(970)GPHGSVGPAGKHGSR	2.2 ± 0.5	1.6 ± 0.3	3.4 ± 0.7
PGPI(642),(643)GNVAGAPGPKGPR	2.4 ± 0.3	1.9 ± 0.3	4.3 ± 0.2	RGEF(987),(988)GPAGSVGPVAVGPR	2.5 ± 0.8	1.6 ± 0.4	3.7 ± 1.4
PPGP(689),(690)VKEGGKGPGR	2.4 ± 0.6	1.4 ± 0.3	3.1 ± 0.8				
AGSP(935),(936)GTPGPGQGIAGQR	2.2 ± 0.6	1.6 ± 0.3	3.1 ± 1.0	EPGP(989),(990)AGSVGPVAVGPR	2.2 ± 0.6	1.5 ± 0.3	3.2 ± 1.1
PGTP(938),(939)GPGIAGQR	2.6 ± 0.8	1.6 ± 0.4	3.8 ± 1.3	PGPA(990),(991)GSVGPVAVGPR	1.9 ± 0.2	1.3 ± 0.1	2.4 ± 0.4
KNGD(1,054),(1,055)	2.1 ± 0.5	2.0 ± 0.4	3.6 ± 0.1				
RGETGPAGPAGPIGAPGAR				AGSV(993),(994)GPVAVGPR	2.3 ± 0.5	1.5 ± 0.2	3.3 ± 0.9
NGDR(1,055),(1,056)	2.0 ± 0.4	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.5	SVGP(995),(996)VAVGPR	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2	2.6 ± 0.3
GETGPAGPAGPIGAPGAR				LKGY(1,031),(1,032)	2.2 ± 0.6	1.9 ± 0.5	3.6 ± 1.1
RGET (1,058),(1,059)	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	SGLQGLPLGLAGLHGDQAGPVPVAVGPR	2.6 ± 1.2	1.7 ± 0.5	3.1 ± 1.0
GPAGPAGPIGAPGAR				QGLPLGLAGLHGDQAGPVPVAVGPR	2.9 ± 0.6	1.9 ± 0.5	5.6 ± 2.4
ETGP(1,060),(1,061)AGPAGPIGAPGAR	2.4 ± 0.7	1.6 ± 0.4	3.5 ± 1.1	GLPG (1,039),(1,040)			
PAGP(1,063),(1,064)AGPAGPIGAPGAR	2.6 ± 0.8	1.5 ± 0.4	3.7 ± 1.5	LAGLHGDQAGPVPVAVGPR	2.3 ± 0.4	1.3 ± 0.2	2.8 ± 0.3
<i>NC1 (S1182-V1453)</i>							
GYDF(1,187),(1,188)	4.4 ± 0.4	9.5 ± 3.6	24.3 ± 7.6	LPGL(1,040),(1,041)	2.8 ± 1.2	2.5 ± 1.2	6.1 ± 2.9
SFLPQPPQEKSSQDQGR				AGLHGDQAGPVPVAVGPR	2.0 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.9 ± 0.5
DTTL(1,224),(1,225)KSLSQIENIR	2.5 ± 0.9	2.0 ± 0.9	3.4 ± 0.8	PGLA(1,041),(1,042)	1.5 ± 0.4	1.8 ± 0.2	2.7 ± 0.9
				GLHGDQAGPVPVAVGPR	2.2 ± 0.3	1.5 ± 0.2	3.2 ± 0.1
LKSL(1,227),(1,228)SQIENIR	2.3 ± 0.6	1.7 ± 0.5	3.2 ± 0.8	LAGL(1,043),(1,044)HGDQAGPVPVAVGPR	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.1	2.4 ± 0.4
				GLHG(1,045),(1,046)DQAGPVPVAVGPR	2.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.7 ± 0.5
				LHGD(1,046),(1,047)QAGPVPVAVGPR	2.2 ± 0.3	1.5 ± 0.2	3.2 ± 0.1
				HGDQ(1,047),(1,048)GAPVPVAVGPR	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.1	2.4 ± 0.4
				GDQ(1,048),(1,049)APVPVAVGPR	2.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.7 ± 0.5
				RSGQ(1,076),(1,077)PVPVAVGPR	2.2 ± 0.3	1.5 ± 0.2	3.2 ± 0.1
				<i>NC1 (Y1114-K1372)</i>			
				DATL(1,145),(1,146)KSLNLIETLLTPEGSR	3.9 ± 3.4	6.0 ± 5.6	3.2 ± 1.0
				LKSL(1,148),(1,149)NLIETLLTPEGSR	1.6 ± 0.4	2.0 ± 0.6	2.7 ± 0.8
				RLPF(1,347),(1,348)LDIAPLDIGGADQEFR	3.0 ± 0.7	2.0 ± 0.6	5.3 ± 1.2

Cleavage sites observed by proteomics of ADAMTS2 (TS2) and ADAMTS14 (TS14) within $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of type I collagen. Each cleavage site has been observed at least in two experiments. The sequences of the cleavage sites are reported in bracket according to the UniprotKB numbering. The classical N-propeptide cleavage sites are highlighted in grey.

(Dupont et al., 2018) showing that type I collagen is fully processed in the TS14^{-/-} mice, and further confirming the specificity of our analyses. Most interestingly, the P/C ratios

were, however, higher in TS2^{-/-}TS14^{-/-} than in TS2^{-/-} mice suggesting that, in the absence of ADAMTS2, ADAMTS14 can display some aminoprocollagen peptidase activity *in vivo* (Table 2).



The processing of the aminopropeptide of type V procollagens is still a matter of controversy, especially *in vivo*. Processing of Col5A1 has been reported to be performed by BMP1 (within the NC3 domain) and by ADAMTS2 (within the NC3 domain upstream of the Col2 domain) (Figure 3B). However, no cleavage has been reported in the NC2 domains of Col5A1 or Col5A2, while their sequence and localization between two collagen domains are similar to those of type I, II and III fibrillar procollagens which are all processed in this region. Several peptides N-terminally iTRAQ labeled were identified in the large N-terminal domain of Col5A1 encompassing the Col2, NC2 and NC3 domains (Figure 3B). As opposed to what was observed for type I procollagens, the P/C ratios were usually similar for ADAMTS2 and ADAMTS14, suggesting that both enzymes can process Col5A1 with the same efficacy (Figure 3C). Accordingly, the P/C ratios were much higher when comparing Wt and TS2^{-/-}TS14^{-/-} samples. The main processing site (P_{435-436A}, upstream of the Col2 domain) was identical to that

described previously using recombinant proteins (Colige et al., 2005). As for Col1A1 and Col1A2, other cleavage sites were also identified in this region of Col5A1, two with P/C > 2 (N_{437-438Q} and I_{441-442F}) and one with a P/C of 0.4 (Q_{438-439D}) reflecting a preferential cleavage at N_{437-438Q}. The P/C of the other labeled peptides was not affected by the presence or absence of ADAMTS2 and ADAMTS14, which confirms the specificity of the cleavages with a P/C ratio >2.

Most interestingly, two cleavage sites were also identified in the NC2 domain of Col5A1, including one at an A_Q site as in Col1A2 (Figure 3B). Altogether these data indicate that ADAMTS2 and ADAMTS14 can process the N-terminal portion of Col5A1 at three different sites, meaning that Col5A1 is present in the skin under forms (including that generated by BMP1 cleavage) having N-terminal non-collagenous extremity of different size and bulkiness.

N-terminally iTRAQ-labeled peptides corresponding to the NC2 domain of Col5A2 were also detected. Although the P/C

ratios were lower than for Col1A1, Col1A2 and Col1A5, it clearly indicates that the N-propeptide of Col5A2 can be processed by ADAMTS2 and ADAMTS14, but probably at a reduced rate.

Similar to our previous study *in vitro*, the cleavage of the N-propeptide of Col3A1 was not seen in this experiment, probably because the corresponding peptide was not isolated and therefore not analyzed during the MS/MS step.

Cleavages Outside of the Aminopropeptide

Having confirmed and further documented the processing of the aminopropeptides of fibrillar collagens, we were also intrigued by the presence of potential cleavage sites elsewhere in type I collagen chains. In a previous work performed *in vitro* using human cells (Bekhouche et al., 2016), we identified several peptides corresponding to the Col1 domain and the C-propeptide of Col1A1 and Col1A2 that were possibly generated by ADAMTS2 or ADAMTS14 (Supplementary Table S3). However, we hypothesized that this could be an artifact linked to the *in vitro* conditions, such as incomplete folding of the triple helical domains leading to an increased sensitivity to proteases. Here, dozens of peptides corresponding to the Col1 domain of Col1A1 and Col1A2 were found to be N-terminally iTRAQ labeled. For both Col1A1 and Col1A2, the P/C ratios were, on average, between 1.5 and two when considering ADAMTS2, and between 1.0 and 1.5 for ADAMTS14 (Supplementary Tables S2, S3). However, similarly to what was observed for the processing of the aminopropeptides, these ratios were significantly higher when comparing Wt and TS2^{-/-}TS14^{-/-} skin samples, suggesting that ADAMTS2 and ADAMTS14 can cleave at identical sites. Some “hot spot” regions characterized by several contiguous cleavage sites were found, as, for example, at positions 333 to 337 and 827 to 838 of Col1A1 as well as at positions 988 to 996 of Col1A2 (Table 2). They can be generated by direct cleavages operated by ADAMTS2 and 14 in more sensitive domains or, alternatively, by a single cleavage followed by progressive degradation by exopeptidases. In both cases however, it means that the observed individual P/C ratios give an underestimation of the actual cleavage activity in the concerned region.

Finally, peptides corresponding to cleavages in the C-propeptides were also found. As opposed to our observations for Col1 domain, the P/C ratios were similar for both ADAMTS2 and ADAMTS14, again illustrating the specificity in the identification of potential cleavage sites. For Col1A1, one site (F₁₁₈₇₋₁₁₈₈S) is located upstream of the C-propeptide cleavage site by BMP1 (A₁₂₀₇₋₁₂₀₈D) while the two others are located about 20 amino acids downstream. For Col1A2, three sites were identified, all after the cleavage site for BMP1 (Table 2).

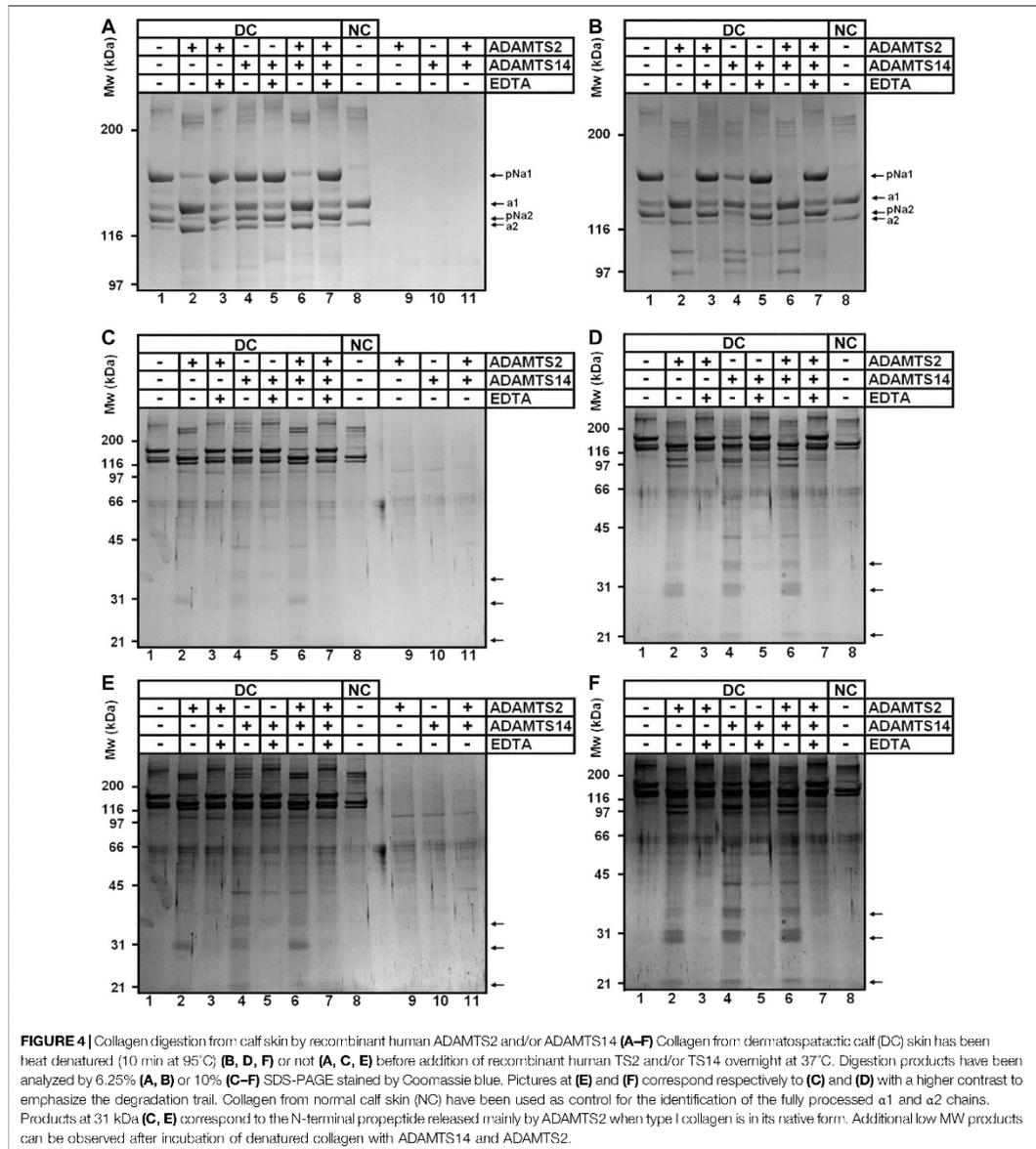
Confirmation of the Cleavage of Type I Collagen Within the Col1 Domain and the C-Propeptide

To confirm our iTRAQ data showing multiple cleavages in the Col1 triple helical domain and in the C-propeptide of type I

collagens, we performed *in vitro* assays using recombinant enzymes and collagen purified from the skin of dermatosparactic calf which is characterized by the persistence of the aminopropeptides in about 80% of type I collagen molecules (Figure 4A, lane 1). This particular substrate was chosen because it provides the opportunity to have an internal control consisting in the processing of the aminopropeptide of Col1A1 and Col1A2. This cleavage (conversion of pNa1 and pNa2 into a1 and a2 chains) was almost complete in the presence of recombinant ADAMTS2, but much reduced in the presence of ADAMTS14 in accordance with its lower aminoprocollagen peptidase activity (Figure 4A, lanes 2 and 4, respectively). When looking at lower molecular weight products (Figures 4C,E), the released pNa1 propeptide was observed with an apparent 30 kDa MW and was mainly found in the presence of recombinant active ADAMTS2 (lanes 2 and 6). The presence of other bands and of “trails”, covering the entire migration lanes and corresponding to cleavages of collagen in multiple sites, were also identified (lane 2), including in the presence of recombinant ADAMTS14 (lane 4). Since ADAMTS14 has only a reduced aminoprocollagen peptidase activity, it shows that the two types of activity are not related.

The same type I collagen preparation was also used as substrate after heat denaturation to verify whether disruption of the triple helical folding impacts the sensitivity to cleavage. Processing of the aminopropeptides by ADAMTS2 or ADAMTS14 was still observed, but marked differences were also visible as compared to gels obtained with native collagen (compare panels a, c, e to panels b, d, f of Figure 4), such as the presence of products at 97 and 110 kDa observed in the presence of ADAMTS2 and 14 (lanes 2, 4 and 6 on each panel), and at 105 kDa specifically in the presence of ADAMTS14 (lanes four on each panel). Additional discrete degradation products of lower MW were also identified as well as more pronounced degradation trails along the entire migration lanes (Figure 4, lanes 2, 4, 6; panels d and f).

The presence of cleavage sites within the C-propeptide of Col1A1 and Col1A2 was also evidenced by our iTRAQ analyses on *in vitro* assays. Since collagen purified from dermatosparactic skin lacks the C-propeptide, we used collagen produced by human dermatosparactic fibroblasts in culture which is mainly secreted as complete procollagen still retaining its two propeptides (pro-alpha one and pro-alpha 2). After incubation with active ADAMTS2 (Figure 5, lane 2), proa1 and proa2 are converted into pCa1 and pCa2, respectively, as a result of the aminoprocollagen peptidase activity of ADAMTS2. Fully processed alpha1 was also observed while similar amount of pNa1 was absent in the control (lane 1) suggesting that it is produced by cleavage of the N- and C-propeptides of the proa1 chain. In line with this hypothesis, the amount of alpha2 chain recovered after incubation with ADAMTS2 exceeded the amount of pNa2 in the control. Moreover, the relative intensity of pCa2 was lower after incubation with ADAMTS2 (lane 2) than expected from the intensity of proa2 in the control. These two observations clearly suggest some cleavage of the C-propeptide of proa2.



Regarding ADAMTS14, only a low aminoprocollagen peptidase activity was observed, as expected, as illustrated by the presence of low amounts of pCa2 generated from proa2

(lane 3). However, accumulation of pNa2 was clearly observed indicating that ADAMTS14 can cleave the C-propeptide of Col1A2 more efficiently than its N-propeptide.

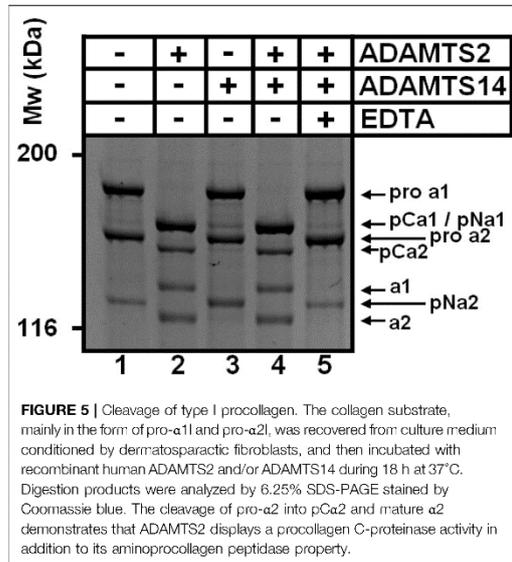


FIGURE 5 | Cleavage of type I procollagen. The collagen substrate, mainly in the form of pro- α 1 and pro- α 2, was recovered from culture medium conditioned by dermosparactic fibroblasts, and then incubated with recombinant human ADAMTS2 and/or ADAMTS14 during 18 h at 37°C. Digestion products were analyzed by 6.25% SDS-PAGE stained by Coomassie blue. The cleavage of pro- α 2 into pCa2 and mature α 2 demonstrates that ADAMTS2 displays a procollagen C-proteinase activity in addition to its aminoprocollagen peptidase property.

Other Potential Substrates Involved in Collagen Fibril Formation

Several proteoglycans, non-fibrillar collagens and matricellular proteins are known to be involved in the regulation of collagen fibril formation and functions. Some of them were found to be potential substrates of ADAMTS2 and/or ADAMTS14 based on P/C ratios significantly >2 (Table 1). They are therefore mentioned, although cleavages were not confirmed by other methods, since their processing could be involved in the clinical features found in dermosparactic EDS and other connective tissue disorders.

Two sites of cleavage in type XIV collagen were found for both ADAMTS2 and ADAMTS14: at positions 630 (AQYQY.LEID) within the fifth fibronectin type-III domain and 1,636 (MARY.TAIL) within the third collagen like domain. Identical sites for both enzymes strongly suggest that the cleavages are real and that type XIV collagen is a true substrate. Potential cleavages were also found in COL4A1 (G₁₄₃₈₋₁₄₃₉T), at a position corresponding to the release of the arresen cryptic bioactive fragment and in type VI collagens: (1) in the first VWFA domain of COL6A1 (F₁₈₆₋₁₈₇S); (2) in the VWFA1 and VWFA2 domains of COL6A2 (F₁₁₆₋₁₁₇S and F₁₄₁₋₁₄₂A) and (3) in the VWFA6 domain of COL6A3 (F₁₀₅₁₋₁₀₅₂A). Besides collagens, potential proteolytic cleavages were also found in PCPE-1 (a co-factor stimulating the processing of the C-propeptide of fibrillar collagens by BMP-1) and in three proteoglycans regulating matrix assembly: biglycan, lumican and osteoglycin. Finally, the degradomes of ADAMTS2 and ADAMTS14 in mouse skin point out several proteins involved in the immune system such as immunoglobulins, complement proteins (C3, C4-B, factor B, factor H), the macrophage inhibitory factor or annexins A8,

A1 and A2 known to be involved in leukocyte recruitment and activation (Swisher et al., 2007; Poeter et al., 2014; Sugimoto et al., 2016).

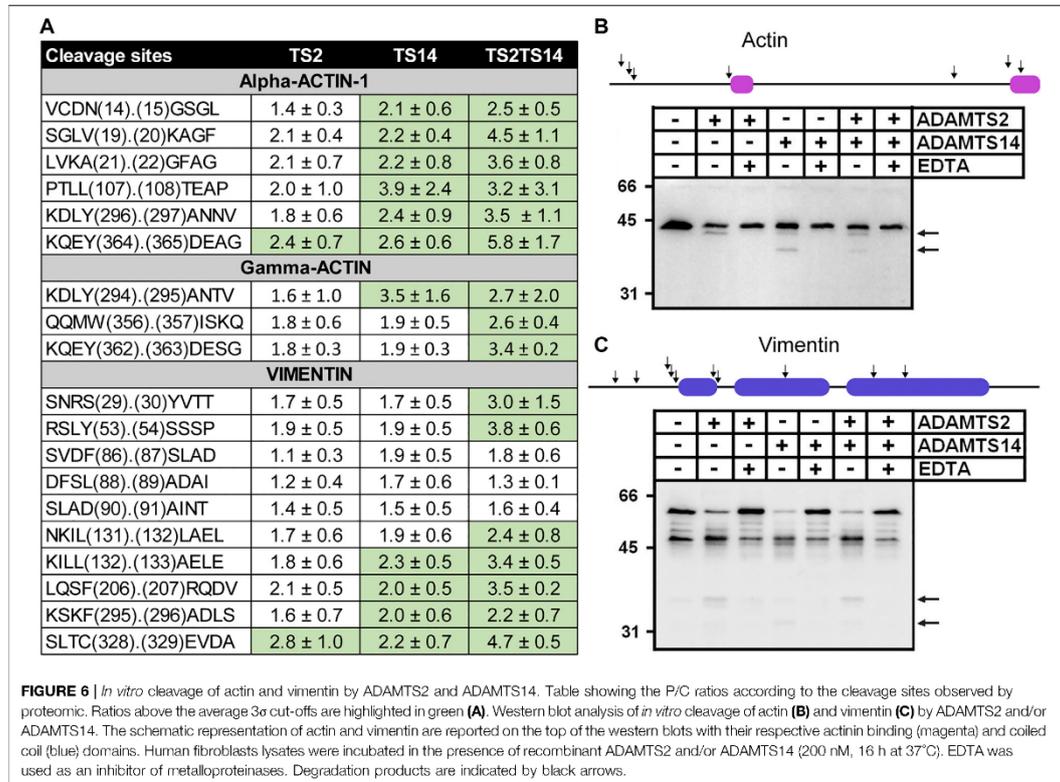
Potential Intracellular Cleavages

This work was primarily focused on extracellular and cell surface degradome since ADAMTS2 and ADAMTS14 are secreted proteases. Unexpectedly however, numerous cleavage sites related to the presence/absence of ADAMTS2 and/or ADAMTS14 were found in intracellular proteins (Supplementary Table S1), including actins and vimentin (Figure 6A). On average, P/C ratios for actin were higher for ADAMTS14 than for ADAMTS2, as opposed to what was seen for the N-propeptides cleavages, and even higher when comparing Wt skin and TS2^{-/-}TS14^{-/-} skins. Of note also, cleavage sites in actin-2, also known as gamma-actin, are identical to the corresponding cleavage sites in actin-1 which suggests their specificity. In order to confirm these surprising observations, fibroblasts extracts were incubated in the presence of purified ADAMTS2 and/or ADAMTS14 with or without a saturating concentration of EDTA used as inhibitor (Figure 6B). In the absence of ADAMTS and EDTA, actin was detected as a single band of 42 kDa with an antibody raised against the C-terminal decapeptide of alpha-actin-1, demonstrating absence of cleavage by intracellular endogenous proteases, while a second product of about 40 kDa was observed after incubation with ADAMTS2, which would correspond to cleavages at positions V₁₉₋₂₀K and/or A₂₁₋₂₂G in alpha-actin-1 (Figure 6A). This product was also seen with ADAMTS14, in addition to a second one at about 34–35 kDa which was not observed with ADAMTS2. Remarkably, only discrete bands were seen, with no trace of smear which would indicate multiple cleavages at specific positions.

Regarding vimentin, several peptides with N-terminal iTRAQ labeling were detected, some with P/C ratio slightly but significantly higher in the presence of ADAMTS2 or ADAMTS14 (Figure 6A). For confirmatory purposes Western blot analysis was performed on fibroblast extracts incubated or not with purified ADAMTS2 or ADAMTS14. In the control samples, vimentin appeared as two major bands at 48 kDa and at 58 kDa the latter likely corresponding to the full-length protein. Additional minor products at 53, 50, 46 and 39 kDa were also visible (Romano et al., 2020) (Figure 6C). Upon incubation with ADAMTS2 or 14, the intensity of bands at 58 and 53 kDa were markedly reduced, accompanied by an increased intensity of the products at 48 and 39 kDa and the presence of additional bands at 37 and 32 kDa. These data clearly suggest the existence of several cleavage sites by ADAMTS2 and ADAMTS14 but were not investigated further.

Cleavage Site of ADAMTS2 and ADAMTS14 in Mouse Skin

The cleavage sites observed by N-terminomics were used to evaluate cleavage sites enrichment linked to the presence of ADAMTS2 and ADAMTS14. All the potential cleavage sites were used, in a first step, to establish the privileged consensus

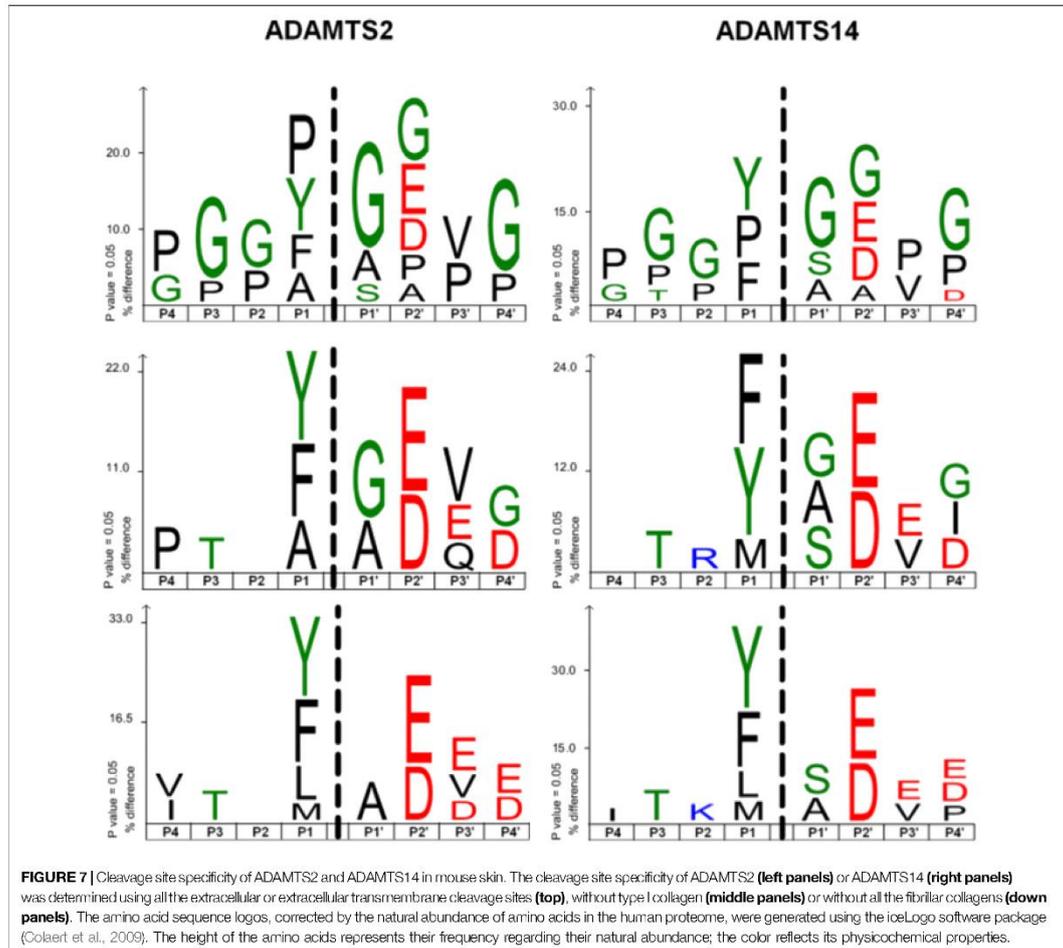


cleavage sites (Figure 7, upper panel). This revealed an overrepresentation of G and P that could be linked, at least in part, to the abundance of these amino acids in collagens. In addition, Y, F and A were often found at P1 and A and S at P1', which is similar to previously described cleavage sites for aminoproteases (Bekhouche et al., 2016; Janssen et al., 2016) (Figure 7, upper panel). Considering all the potential extracellular substrates, excluding type I collagen (middle panel) or all fibrillar collagens (lower panel), it was shown that ADAMTS2 and ADAMTS14 display common preferential cleavage sites, enriched in small nonpolar, amphipathic or slightly hydrophobic amino acids (G, P, F, Y, A, I and M). Of note also was the presence of acidic amino acids at P2', P3' and P4'.

DISCUSSION

The procollagen N-proteinases were originally described only for their ability to specifically excise the N-terminal propeptide of fibrillar collagens (Bekhouche and Colige, 2015). However, more recently, we and others have demonstrated their roles in TGFβ signaling (Bekhouche et al., 2016) and in lymphangiogenesis

through the proteolytic activation of pro-VEGF-C into VEGF-C able to interact with its receptors (Janssen et al., 2016; Brouillard et al., 2017; Dupont et al., 2018; Wang et al., 2020). The existence of marked differences between the phenotype of patients with arthrochalasia EDS (caused by the absence of the ADAMTS2 cleavage sites in type I collagen) and the phenotype of patients with dermatosparactic EDS (null mutations in ADAMTS2) is another observation arguing for additional functions of ADAMTS2. Finally, the peculiar atopic dermatitis-like skin phenotype of mice deficient in both ADAMTS2 and ADAMTS14 (Dupont et al., 2018) also points to yet to be discovered new substrates of these two related enzymes. In order to search for such potential substrates using a large-scale unbiased approach, we have compared N-terminomes of the skin of Wild type, TS2^{-/-}, TS14^{-/-} and TS2^{-/-} TS14^{-/-} mice, an experimental approach never tried before because its inherent difficulties, such as the dynamic nature of the cleavage events that could be hidden by cellular uptake, rapid degradation of the generated peptides, and potential variations in protein composition or cell abundance. Moreover, the deficiency of a protease *in vivo* can be compensated by another protease cleaving near or at the same cleavage site (Fortelny et al., 2014). As an additional challenge, skin is formed by several



compartments such as *epidermis*, dermis, and muscular, nerve and blood vessels elements which may vary in abundance, a situation susceptible to induce modifications in the relative abundance of a specific protein. The use of a high throughput method and the complexity of the skin samples led to variations between the three individual experiments which prevented the identification of potential gender differences. In this study, three individual experiments have therefore been analyzed independently, in order to increase the likelihood of identifying new substrates, and have been compared between each other in a second step for validations purposes. Potential substrates were identified by taking into account only peptides harboring a P/C ratio above or below the 3-sigma cutoff from the normal distribution of natural N-termini, which constitutes a very stringent threshold. Sixty-eight proteins located at the cell surface or being part of the extracellular matrix were identified as

potential substrates of ADAMTS2 and/or ADAMTS14, from which fibrillary collagens were the most represented in terms of identified peptides.

The previously described cleavage sites by ADAMTS2 of the N-propeptide of COL1A1 and COL1A2 were clearly identified, confirming the relevance of our experimental model. Of notes, however, these cleavages seem to occur within a preferential sequence rather than at a specific cleavage site as always reported so far, which illustrates that ADAMTS2 is capable to cleave multiple peptide bonds. As an additional evidence of the specificity of the N-TAILS data, cleavages of the N-propeptide of COL1A1 and COL1A2 by ADAMTS14 were only marginal, which was expected from previous *in vitro* and *in vivo* data showing that ADAMTS14 displays only a very low aminoprocollagen peptidase activity (Colige et al., 2002; Dupont et al., 2018). Having clearly demonstrated the reliability of our experimental design, we then

investigated the cleavages of the N-propeptides of type V procollagens which are still incompletely defined. For COL5A1, a cleavage by BMP1 was previously identified within the NC3 domain (Imamura et al., 1998; Bonod-Bidaud et al., 2007) but could not be identified here as expected when using models comparing Wt to Adamts2 and/or Adamts14 deficient skins. The P₄₃₅₋₄₃₆A site previously found for ADAMTS2 at the end of the variable domain (Colige et al., 2005) was identified here for Adamts2 but also for Adamts14. Accordingly, the P/C ratio was much higher by comparing Wt skin to TS2^{-/-}TS14^{-/-} skin, indicating that both enzymes display this activity *in vivo* and, therefore, identifying a new function for ADAMTS14. Some cleavages by both enzymes were also identified in the NC2 domain of COL5A1 and COL5A2 separating the small and the large central triple helical domains, at a location similar to the ones reported for type I, type II and type III procollagens, which was never described before. The existence of several cleavage sites generating type V collagens with N-propeptides of different size and bulkiness is a new observation and is probably part of the regulation operated by type V collagen on collagen fibril formation (Linsenmayer et al., 1993; Marchant et al., 1996; Wenstrup et al., 2004) as observed *in vitro* and *in vivo* in EDS. It would also explain why arthrochalic and dermatosparactic EDS have different clinical manifestations since both type I and type V collagen processing are altered in dermatosparaxis while only type I collagen is affected in arthrochalia.

Besides cleavages of the N-propeptides, N-TAILS identified also several cleavages in the central COL1 domain of both alpha one and alpha 2 type I collagens. While some sites were not, or only barely, affected by the presence of ADAMTS2 or 14 (P/C < 1.5), some others were characterized by higher ratios, especially in some clusters, and when comparing Wt to TS2^{-/-}TS14^{-/-} skin, which suggested specificity in these cleavages. This hypothesis was evaluated *in vitro* using purified enzymes and purified collagen, either native or heat denatured. It showed that ADAMTS2 and ADAMTS14 can cleave within the COL1 triple helical domain, but mainly (or only) when collagen is unfolded. This “collagenase” activity was similar for ADAMTS2 and ADAMTS14, while ADAMTS14 displays only a limited capacity to cleave the aminopropeptide of non-denatured procollagen which demonstrates that the two activities are independent. The existence of such function was never described before and its biological relevance will have to be further investigated. An attractive hypothesis would be that, when ADAMTS2 (or ADAMTS14) meets and interacts with its type I procollagen substrate, it cleaves the N-propeptide but it also degrades collagen trimers that are not correctly folded, therefore preventing their integration in fibrils. This quality control function of aminoprocollagen peptidases, if confirmed, would also explain why collagen fibrils have a so irregular and abnormal shape in dermatosparaxis. Indeed, in the absence of ADAMTS2, aminoprocollagen but also collagen with defects in the triple helix domains can both accumulate in fibrils and hamper the highly organized polymerization process of collagen fibrils.

Excision of the C-propeptide of type I procollagen was originally attributed to BMP1, and later extended to meprins α and β (Kessler et al., 1996; Jefferson et al., 2013). Here, our degradomic analysis has

revealed major cleavage sites for ADAMTS2 and ADAMTS14 in the C-propeptide of both COL1A1 and COL1A2. This was also confirmed *in vitro* using purified enzymes and type I procollagen, and is reminiscent to what was already demonstrated for type III procollagen (Bekhouche et al., 2016). However, the functional relevance of these observations *in vivo*, when BMP1 is present and active, is not clear yet since, except for one site in COL1A1, they are located downstream of the BMP1 site. In these conditions, these ADAMTS-dependent cleavages should not affect the maturation of type I collagen and its polymerization. Since the C-propeptide of type I collagen can inhibit collagen synthesis when released in the extracellular space (Mizuno et al., 2000), an intriguing hypothesis would be that its cleavage by ADAMTS2 or 14 would affect its regulatory function.

The main purpose of this study was to get a better insight into the overall implications of ADAMTS2 and ADAMTS14 in collagen fibril homeostasis. In addition of cleavages at multiple sites in fibrillary collagens, other proteins regulating collagen fibrillogenesis were also found to be potential substrates, similarly to what was found previously regarding the cleavage of Lox (Rosell-García et al., 2019), a crucial enzyme for the formation of crosslinks stabilizing collagen fibrils. Two cleavages were found in COL14A1, a FACIT (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix) known for its capacity to interact with collagen fibrils and regulate their formation (Young et al., 2002; Agarwal et al., 2012). Similarly, type VI collagen was also identified as a likely substrate regulating fibril formation (Lamandé and Bateman, 2018; Wu and Ge, 2019). However, the functional relevance of these cleavages was not investigated further but would deserve additional characterizations.

Lumican, biglycan and osteoglycin are members of the Small Leucin-rich Proteoglycan (SLRP) family (Frikeche et al., 2016). They are considered as collagen fibril-regulating proteins, and are also emerging as factors controlling immune response. It is interesting to note that these three proteoglycans have been identified here as potential substrates of ADAMTS2 which is also implicated in immune response as previously described (Hofer et al., 2008) and further illustrated here by the specific enrichment in biological processes linked to complement activation and regulation of cytokines involved in immune response. Although still to be considered as a working hypothesis and having to be confirmed by complementary approaches, these observations could pave the way to better understand the multiple roles of ADAMTS2 and 14 in extracellular matrix formation and functions.

Analysis of the skin degradome also identified cytoplasmic proteins, such as actin and vimentin, as potential substrates of ADAMTS2 and 14. These surprising data were confirmed *in vitro* using skin fibroblasts extracts incubated with recombinant purified enzymes, but not by comparing the electrophoretic pattern of actin and vimentin in Wt and ADAMTS2-deficient fibroblasts. This could suggest that these cleavages occur only after secretion or release in the extracellular space, as observed after cell death for example. We cannot however completely rule out the possibility that ADAMTS2 and 14 could display intracellular activities, either during the secretion process, as described for procollagen processing, or after their internalization when bound to cell membrane (Dubail et al.,

2010). The proteomic identification of intracellular substrates has already been reported for MMP2 (auf dem Keller et al., 2013) and by studies reporting the intracellular functions of MMPs (Jobin et al., 2017), such as α -actinin cleavage, or the transcriptional regulation of NF- κ -B inhibitor alpha by MMP12 (Marchant et al., 2014). Interestingly, these intracellular activities are related to the innate immunity system (Marchant et al., 2014) with a propensity for MMPs to regulate negatively the pro-inflammatory response (Dufour and Overall, 2013; Khokha et al., 2013). Further studies are needed to precisely assess the role the cleavage of proteins by ADAMTS2 and ADAMTS14 either in the extracellular and/or in the intracellular space, with a potential implication in cytoskeleton dynamic, gene expression and inflammatory response.

CONCLUSION

Our N-TAILS analysis of mouse skin degradomes has extended our knowledge regarding the roles of ADAMTS2 and 14 well beyond the previously known cleavage of the N-propeptide of type I, type II and type III procollagens. The identification *in vivo* of several cleavage sites in the N-terminal region of type V collagen, generating N-terminal propeptides of different size and bulkiness, is a new finding possibly explaining how type V collagen can finely tune collagen fibril formation and structure. In the same context, other molecules involved in fibrillogenesis, such as SLRPs and non-fibrillar collagens, have also been identified as likely substrates of ADAMTS2 and 14.

Another intriguing observation is the potential quality control activity leading to the degradation of incorrectly folded collagen trimers before their assembly in collagen fibrils. If this hypothesis is confirmed, this would represent a key activity of ADAMTS2 and 14 for maintaining the structural integrity of collagen fibers and connective tissues.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article.

REFERENCES

- Agarwal, P., Zvolanek, D., Keene, D. R., Schulz, J. N., Blumbach, K., Heinegård, D., et al. (2012). Collagen XII and XIV, new partners of cartilage oligomeric matrix protein in the skin extracellular matrix suprastructure. *J. Biol. Chem.* 287, 22549–22559. doi:10.1074/jbc.M111.335935
- auf dem Keller, U., Prudova, A., Eckhard, U., Fingleton, B., and Overall, C. M. (2013). Systems-level analysis of proteolytic events in increased vascular permeability and complement activation in skin inflammation. *Sci. Signal.* 6, rs2. doi:10.1126/scisignal.2003512
- auf dem Keller, U., and Overall, C. M. (2012). CLIPPER: an add-on to the Trans-Proteomic Pipeline for the automated analysis of TAILS N-terminomics data. *Biol. Chem.* 393, 1477–1483. doi:10.1515/hsz-2012-0269

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Use and Care, University of Liège, Belgium.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, AC and MB; methodology, MB; formal analysis, AC DB and MB; investigation, CL CM LD CD and LJ; data curation, DB GM and MB; writing original draft preparation, MB and CL; writing review and editing, AC and MB; visualization, MB and AC; supervision, MB and AC; project administration, AC and MB; funding acquisition, AC and MB. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

The authors are grateful for support by the Incoming Postdoctoral–Marie Curie (COFUND) fellowship (Brussels, Belgium), the Télévie (7.4602.14; 7.4608.19; 7.4566.16), Fonds de la Recherche Scientifique–Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS; T.0183.13; CDR J003220 F).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ulrich auf dem Keller (Technical University of Denmark, Denmark) for his help in running the analysis of N-terminomics data, and Antoine Heyres for its technical support. We thank the Betty Nusgens for critical reading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.643178/full#supplementary-material>.

- Beighton, P., De Paepe, A., Steinmann, B., Tsipouras, P., and Wenstrup, R. J. (1998). Ehlers-danlos syndromes: revised nosology, villefranche, 1997. Ehlers-danlos national foundation (United States) and ehlers-danlos support group (United Kingdom). *Am. J. Med. Genet.* 77, 31–37. doi:10.1002/(sici)1096-8628(19980428)77:1<31::aid-ajmg8>3.0.co;2-o
- Bekhouche, M., and Colige, A. (2015). The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biol.* 44–46, 46–53. doi:10.1016/j.matbio.2015.04.001
- Bekhouche, M., Leduc, C., Dupont, L., Janssen, L., Delolme, F., Vadon-Le Goff, S., et al. (2016). Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets. *FASEB J.* 30, 1741–1756. doi:10.1096/fj.15-279869
- Bonod-Bidaud, C., Beraud, M., Vaganay, E., Delacoux, F., Font, B., Hulmes, D. J., et al. (2007). Enzymatic cleavage specificity of the pro α 1(V) chain

- processing analysed by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 405, 299–306. doi:10.1042/BJ20070051
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Brouillard, P., Dupont, L., Helaers, R., Coulie, R., Tiller, G. E., Peeden, J., et al. (2017). Loss of ADAMTS3 activity causes Hennekam lymphangiectasia-lymphedema syndrome 3. *Hum. Mol. Genet.* 26, 4095–4104. doi:10.1093/hmg/ddx297
- Colaert, N., Helsens, K., Martens, L., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2009). Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. *Nat. Methods* 6, 786–787. doi:10.1038/nmeth1109-786
- Colige, A., Beschin, A., Samyn, B., Goebels, Y., Van Beeumen, J., Nusgens, B. V., et al. (1995). Characterization and partial amino acid sequencing of a 107-kDa procollagen I N-proteinase purified by affinity chromatography on immobilized type XIV collagen. *J. Biol. Chem.* 270, 16724–16730. doi:10.1074/jbc.270.28.16724
- Colige, A., Sieron, A. L., Li, S. W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., et al. (1999). Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 308–317. doi:10.1086/302504
- Colige, A., Vandenberghe, L., Thiry, M., Lambert, C. A., Van Beeumen, J., Li, S. W., et al. (2002). Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J. Biol. Chem.* 277, 5756–5766. doi:10.1074/jbc.M105601200
- Colige, A., Nuytinck, L., Hausser, L., Van Essen, A. J., Thiry, M., Herens, C., et al. (2004). Novel types of mutation responsible for the dermatosparax type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIc) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene. *J. Invest. Dermatol.* 123, 656–663. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23406.x
- Colige, A., Ruggiero, P., Vandenberghe, L., Dubail, J., Kesteloot, P., Van Beeumen, J., et al. (2005). Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *J. Biol. Chem.* 280, 34397–34408. doi:10.1074/jbc.M506458200
- De Paepe, A., and Malfait, F. (2012). The Ehlers-Danlos syndrome, a disorder with many faces. *Chin. Genet.* 82, 1–11. doi:10.1111/j.1399-0004.2012.01858.x
- Dubail, J., Kesteloot, P., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J. M., et al. (2010). ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 4213–4232. doi:10.1007/s00018-010-0431-6
- Dufour, A., and Overall, C. M. (2013). Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 233–242. doi:10.1016/j.tips.2013.02.004
- Dupont, L., Ehx, G., Chantry, M., Monseur, C., Leduc, C., Janssen, L., et al. (2018). Spontaneous atopic dermatitis due to immune dysregulation in mice lacking Adamts2 and 14. *Matrix Biol.* 70, 140–157. doi:10.1016/j.matbio.2018.04.002
- Fortelny, N., Cox, J. H., Kappelhoff, R., Starr, A. E., Lange, P. F., Pavlidis, P., et al. (2014). Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease web. *PLoS Biol.* 12, e1001869. doi:10.1371/journal.pbio.1001869
- Frikeche, J., Maiti, G., and Chakravarti, S. (2016). Small leucine-rich repeat proteoglycans in corneal inflammation and wound healing. *Exp. Eye Res.* 151, 142–149. doi:10.1016/j.exer.2016.08.015
- Hofer, T. P. J., Frankenberger, M., Mages, J., Lang, R., Meyer, P., Hoffmann, R., et al. (2008). Tissue-specific induction of ADAMTS2 in monocytes and macrophages by glucocorticoids. *J. Mol. Med.* 86, 323–332. doi:10.1007/s00109-007-0284-0
- Hulsen, T., de Vlieg, J., and Alkema, W. (2008). BioVenn—a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* 9, 488. doi:10.1186/1471-2164-9-488
- Imamura, Y., Steigltz, B. M., and Greenspan, D. S. (1998). Bone morphogenetic protein-1 processes the NH2-terminal propeptide, and a furin-like proprotein convertase processes the COOH-terminal propeptide of pro- α 1(V) collagen. *J. Biol. Chem.* 273, 27511–27517. doi:10.1074/jbc.273.42.27511
- Janssen, L., Dupont, L., Bekhouche, M., Noel, A., Leduc, C., Voz, M., et al. (2016). ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. *Angiogenesis* 19, 53–65. doi:10.1007/s10456-015-9488-z
- Jefferson, T., Auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V. V., Broder, C., Hedrich, J., et al. (2013). The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 309–333. doi:10.1007/s00018-012-1106-2
- Jobin, P. G., Butler, G. S., and Overall, C. M. (2017). New intracellular activities of matrix metalloproteinases shine in the moonlight. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864, 2043–2055. doi:10.1016/j.bbmc.2017.05.013
- Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M., and Greenspan, D. S. (1996). Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 271, 360–362. doi:10.1126/science.271.5247.360
- Kesteloot, P., Desmoulière, A., Ledercq, I., Thiry, M., Arrese, J. E., Prockop, D. J., et al. (2007). ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 2 inactivation reduces the extent and stability of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 46, 1620–1631. doi:10.1002/hep.21868
- Khokha, R., Murthy, A., and Weiss, A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 649–665. doi:10.1038/nri3499
- Kleifeld, O., Doucet, A., Prudova, A., auf dem Keller, U., Gioia, M., Kizhakkedathu, J. N., et al. (2011). Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. *Nat. Protoc.* 6, 1578–1611. doi:10.1038/nprot.2011.382
- Lamandé, S. R., and Bateman, J. F. (2018) Collagen VI disorders: insights on form and function in the extracellular matrix and beyond. *Matrix Biol.* 71–72, 348–367. doi:10.1016/j.matbio.2017.12.008
- Linsenmayer, T. P., Gibney, E., Igoe, P., Gordon, M. K., Fitch, J. M., Fessler, L. I., et al. (1993). Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken α 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 121, 1181–1189. doi:10.1083/jcb.121.5.1181
- Malfait, F., and De Paepe, A. (2014). The Ehlers-Danlos syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 802, 129–143. doi:10.1007/978-94-007-7893-1_9
- Marchant, J. K., Hahn, R. A., Linsenmayer, T. F., and Birk, D. E. (1996). Reduction of type V collagen using a dominant-negative strategy alters the regulation of fibrillogenesis and results in the loss of corneal-specific fibril morphology. *J. Cell Biol.* 135, 1415–1426. doi:10.1083/jcb.135.5.1415
- Marchant, D. J., Bellac, C. L., Moraes, T. J., Wadsworth, S. J., Dufour, A., Butler, G. S., et al. (2014). A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nat. Med.* 20, 493–502. doi:10.1038/nm.3508
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., and Thomas, P. D. (2019). PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 47, D419–D426. doi:10.1093/nar/gky1038
- Mizuno, M., Fujisawa, R., and Kuboki, Y. (2000). The effect of carboxyl-terminal propeptide of type I collagen (c-propeptide) on collagen synthesis of preosteoblasts and osteoblasts. *Calcif. Tissue Int.* 67, 391–399. doi:10.1007/s002230001150
- Nusgens, B., and Lapiere, C. M. (1979). A simplified procedure for measuring amino-procollagen peptidase type I. *Anal. Biochem.* 95, 406–412. doi:10.1016/0003-2697(79)90747-4
- Nusgens, B. V., Verellen-Dumoulin, C., Hermanns-Lê, T., De Paepe, A., Nuytinck, L., Piérard, G. E., et al. (1992). Evidence for a relationship between Ehlers-Danlos type VII C in humans and bovine dermatosparaxis. *Nat. Genet.* 1, 214–217. doi:10.1038/ng0692-214
- Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., et al. (2019). The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 47, D442–D450. doi:10.1093/nar/gky1106
- Poeter, M., Brandherm, I., Rossaint, J., Rosso, G., Shahin, V., Skryabin, B. V., et al. (2014). Annexin A8 controls leukocyte recruitment to activated endothelial cells via cell surface delivery of CD63. *Nat. Commun.* 5, 3738. doi:10.1038/ncomms4738
- Romano, E., Rosa, I., Fioretto, B. S., Lucatelli, E., Innocenti, M., Ibba-Manneschi, L., et al. (2020). A two-step immunomagnetic microbead-based method for the isolation of human primary skin telocytes/cd34+ stromal cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5877. doi:10.3390/ijms21165877
- Rosell-García, T., Paradela, A., Bravo, G., Dupont, L., Bekhouche, M., Colige, A., et al. (2019). Differential cleavage of lysyl oxidase by the metalloproteinases BMP1 and ADAMTS2/14 regulates collagen binding through a tyrosine sulfate domain. *J. Biol. Chem.* 294, 11087–11100. doi:10.1074/jbc.ra119.007806

- Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Teixeira, M. M., and Sousa, L. P. (2016). Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance. *J. Immunol. Res.* 2016, 8239258. doi:10.1155/2016/8239258
- Swisher, J. F., Khatri, U., and Feldman, G. M. (2007). Annexin A2 is a soluble mediator of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 82, 1174–1184. doi:10.1189/jlb.0307154
- Van Damme, T., Colige, A., Syx, D., Giunta, C., Lindert, U., Rohrbach, M., et al. (2016). Expanding the clinical and mutational spectrum of the Ehlers-Danlos syndrome, dermatosparaxis type. *Genet. Med.* 18, 882–891. doi:10.1038/gim.2015.188
- Wang, G., Muhl, L., Padberg, Y., Dupont, L., Peterson-Maduro, J., Stehling, M., et al. (2020). Specific fibroblast subpopulations and neuronal structures provide local sources of Vegf-processing components during zebrafish lymphangiogenesis. *Nat. Commun.* 11, 2724. doi:10.1038/s41467-020-16552-7
- Wenstrup, R. J., Florer, J. B., Brunskill, E. W., Bell, S. M., Chervoneva, I., and Birk, D. E. (2004). Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J. Biol. Chem.* 279, 53331–53337. doi:10.1074/jbc.M409622200
- Wu, Y., and Ge, G. (2019). Complexity of type IV collagens: from network assembly to function. *Biol. Chem.* 400, 565–574. doi:10.1515/hsz-2018-0317
- Young, B. B., Zhang, G., Koch, M., and Birk, D. E. (2002). The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. *J. Cell Biochem.* 87, 208–220. doi:10.1002/jcb.10290

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Leduc, Dupont, Joannes, Monseur, Baiwir, Mazzucchelli, Deroanne, Colige and Bekhouche. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II. 3. LES SIDEROFLEXINES

Projet ATER - Université de Versailles Saint-Quentin-En-Yvelines – Université Paris-Saclay
Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire (UR 4589)

Direction de projet : Dr. N. LELEU

Titre : Identification de biomarqueurs liés au stress cellulaire et aux pathologies neurodégénératives.

II. 1. a. Identification des partenaires d'interaction par coIP-MS

Les interactions de type protéine-protéine jouent un rôle essentiel dans la régulation des fonctions cellulaires et tissulaires, notamment dans l'étude des enzymes qui nécessitent l'interaction entre l'enzyme et le substrat. Dans le but d'élargir mon expertise en protéomique, j'ai réalisé des études d'interactions protéine-protéine par protéomique dans le cadre d'un ATER au sein de l'Université de Versailles-Saint-Quentin-En-Yvelines (UVSQ-LGBC). Ce projet vise à caractériser les fonctions des protéines de la membrane interne mitochondriale : les sidéroxiflexines (SFXN). Initialement liées au métabolisme du fer, les SFXNs sont impliquées dans des pathologies neurodégénératives (SFXN1 réduite chez des patients atteints d'Alzheimer) et au fonctionnement de la chaîne respiratoire (145–147). **L'objectif de ce projet était d'identifier les partenaires des sidéroxiflexines par co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse (interactomique) afin de mieux comprendre leur(s) fonction(s).**

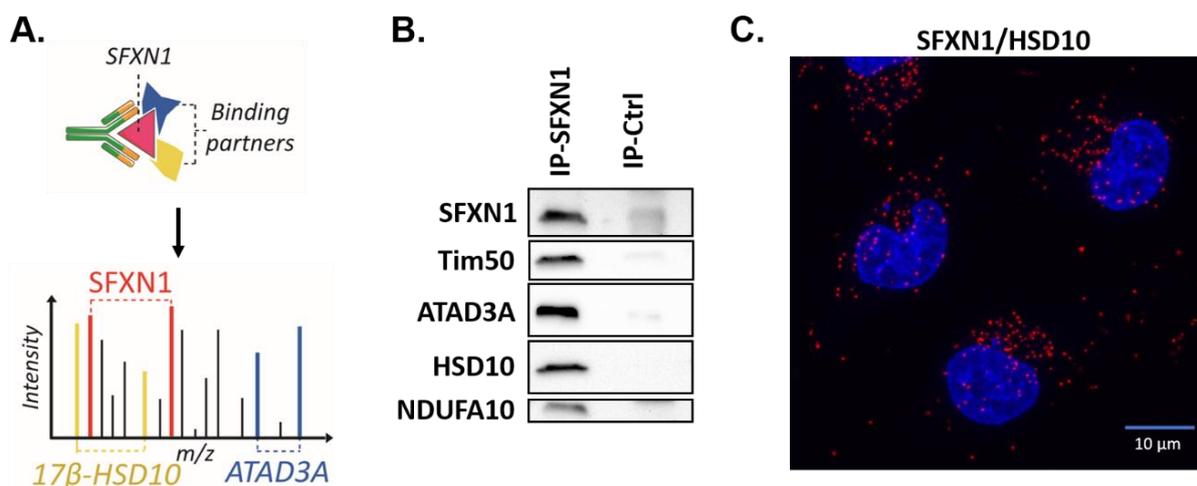


Figure 28. Identification des partenaires d'interactions des sidéroxiflexines (SFXN). (A) Protocole d'immunoprécipitation-spectrométrie de masse MS/MS pour l'identification de partenaires d'interaction. (B) Co-immunoprécipitation et immunoblots à partir d'extraits mitochondriaux de cellules COV434. (C) Interaction entre la SFXN1 et HSD10 mise en évidence par un test de ligature de proximité. Les points rouges indiquent une proximité spatiale inférieure à 40 nm *in cellulo*.

Ces recherches ont permis d'identifier 97 nouveaux partenaires d'interaction potentiels. Certains ont été validés par co-immunoprécipitation ainsi que par des tests de ligature de proximité *in cellulo* (Fig. 28). Parmi les protéines identifiées et validées, sont retrouvées hsd10, une protéine impliquée dans la synthèse des stéroïdes et surexprimée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou encore ATAD3A, jouant un rôle dans les contacts réticulum endoplasmique (RE)/mitochondrie et la dynamique mitochondriale (148,149). L'analyse *in silico* des partenaires d'interaction montre un lien inédit avec la respiration cellulaire (Fig. 29) (150).

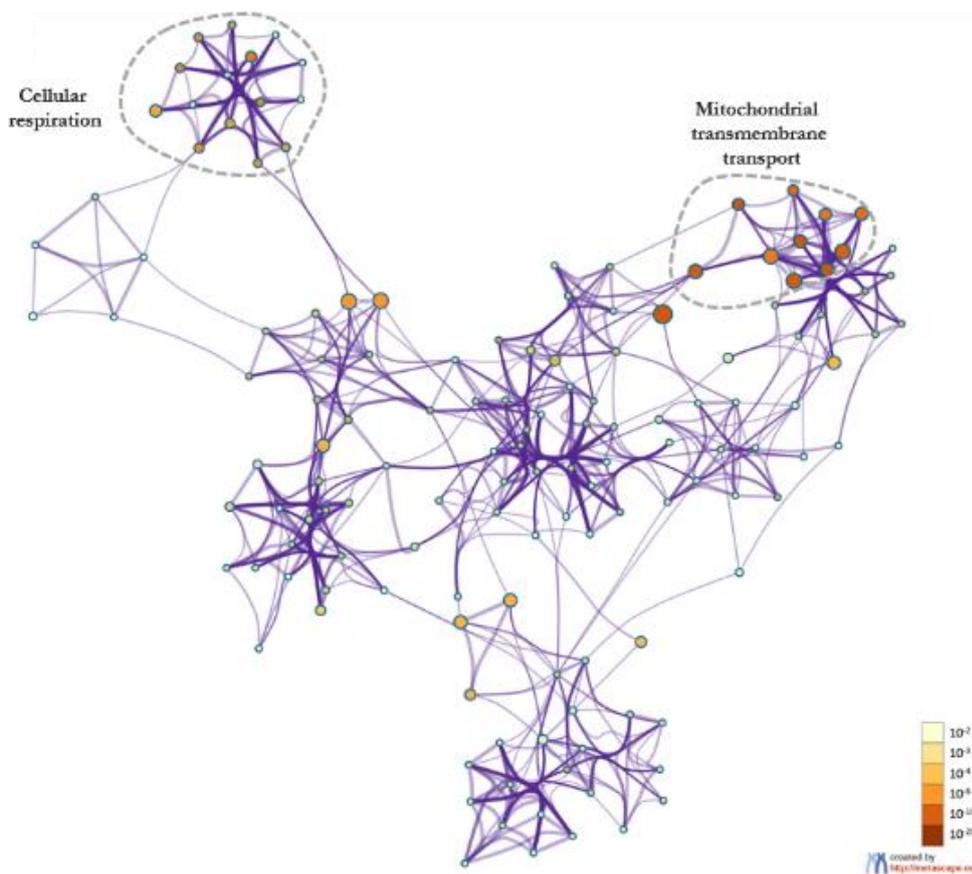


Figure 29. Analyse *in silico* des partenaires d'interaction de la SFXN1. Réseau de termes enrichis visualisés à l'aide de Metascape et colorés selon la p-value. Les termes incluant le plus de partenaires d'interaction tendent à avoir une p-value plus significative (orange/rouge). Image extraite de Tifon N, Bekhouche M et al., 2022.

II. 3. b. Valorisation du projet d'ATER et perspectives

Points forts du projet (atouts) :

- Cette expérience d'ATER m'a permis d'acquérir une expérience dans l'enseignement Universitaire et a enrichi ma mobilité au niveau national.
- Ce projet m'a amené à explorer des protéines membranaires mitochondriales différenciant des protéines extracellulaires.
- J'ai acquis une certaine expérience dans l'investigation des interactions protéine-protéine : test de ligature de proximité, co-immunoprécipitation
- Ces travaux ont renforcés mon expérience en biologie cellulaire.
- Ces travaux ont également renforcé mon expérience en protéomique (coIP-MS).
- Une communication orale a été réalisée au sein de l'UMR UMR1173/Infection et inflammation chronique (2IC).
- Une publication en qualité de co-premier auteur a découlé de ce projet :

◇ Tifoun N†, **BEKHOUCHE M†**, De las Heras J.M., Guillaume A, Bouleau S, Guénel I, Mignotte B, Le Floch N. A High-Throughput Search for SFXN1 Physical Partners Led to the Identification of ATAD3, HSD10 and TIM50. *Biology* 2022, 11, 1298. <https://doi.org/10.3390/biology11091298>

Points à améliorer (faiblesses) :

- Manque d'encadrement d'étudiants stagiaires.
- Alors que le projet de post-doc a été financé par un financement propre obtenu après rédaction du projet ; en qualité d'ATER, je me suis inscrit dans un projet préalablement défini.

II. 3. ENVIRONNEMENTS MATRICIELS & L'INGENIERIE TISSULAIRE

Projet Actuel - Université Claude Bernard Lyon 1

MCF associé - Faculté d'Odontologie de Lyon de 2018 à 2022

MCF UFR Biosciences – Département de Biochimie & biologie moléculaire depuis septembre 2022

Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique (UMR CNRS 5305)

Equipe de "Recherche Ostéoarticulaire et Dentaire"

Chef d'équipe : Dr. F. MALLEIN-GERIN

Collaborateurs du projet : Pr. J-C. FARGES & Pr. M. DUCRET

Titre : Mécanismes enzymatique de réparation/régénération tissulaire : vers le développement d'environnements matriciels adaptés pour une ingénierie tissulaire contrôlée.

II. 3. a. Contexte

Comme indiqué en introduction (partie I.3.e.), les procédures de régénération endodontique (PRE), notamment à partir de cellules souches associées à un hydrogel hydraté, sont proposées en cas de pulpites irréversibles afin de remplacer le tissu pulpaire nécrosé (107). **L'application de ces stratégies thérapeutiques personnalisées fait face à différents verrous scientifiques et cliniques nécessitant des recherches selon 4 axes principaux pour : (I) guider le processus de régénération vers une cinétique de dégradation de l'hydrogel synchronisée avec la néosynthèse d'un tissu de composition et structure identique, (II) éradiquer les bactéries résiduelles entravant la réparation/régénération pulpaire, (III) contrôler l'inflammation et, (IV) établir un diagnostic fiable discriminant la pulpite réversible de la pulpite irréversible** (Fig. 30). Le programme de recherche mené depuis 2018 en collaboration du Pr. J-C FARGES et du Pr. M DUCRET aborde deux thèmes généraux interdépendants. Le premier thème, plutôt applicatif, vise à développer de nouvelles matrices biologiques à base de fibrine et notamment aux propriétés antimicrobiennes. Le second thème vise à étudier les mécanismes formation tissulaire à base de cellules souches en hydrogel de fibrine. En effet, la formation d'un tissu fonctionnel nécessite des interactions cellule-matrice ainsi qu'une dégradation et une néo-synthèse matricielle contrôlés et implique par conséquent l'action coordonnée des mécanismes enzymatiques mis en jeu (Fig 30).

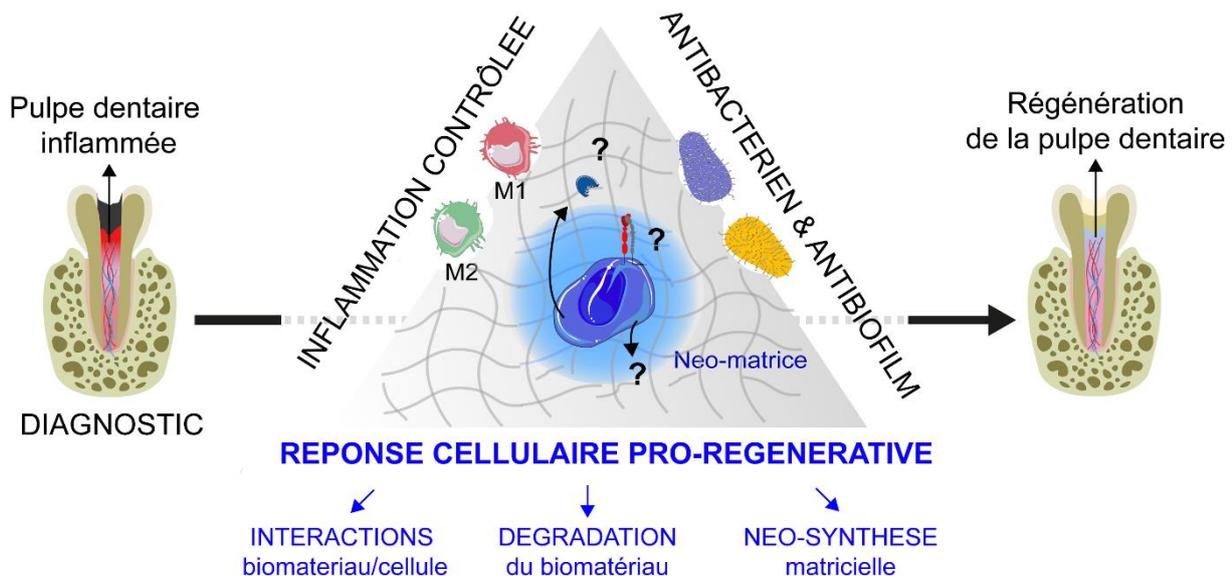


Figure 30. Axes de recherches pour un traitement personnalisé des caries visant à maintenir la vitalité pulpaire (image adaptée de *Ducret et al., 2021*).

II. 3. b. Développement d'un hydrogel antibactérien

Cependant, différents verrous scientifiques limitent les PRE parmi lesquels l'impossibilité de désinfecter totalement l'espace pulpaire (endodonte), après éviction du tissu, en raison de la présence de bactéries potentiellement organisées sous forme de biofilms enchâssés au sein de la matrice minéralisée. L'absence d'activité antimicrobienne constitue une limitation importante dans la mesure où les bactéries résiduelles au sein des tubules dentinaires empêchent clairement la régénération de la PD (151). Des études ont préalablement été menées au laboratoire afin de produire un hydrogel à base de fibrine biocompatible et permettant la production de matrice collagénique par les CSM-PD (131). Afin de parfaire cet hydrogel, deux étudiantes du M2 sciences du médicament (UCBL) et un étudiant dentiste du M2 Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMIC, UCBL) ont cherché à développer des hydrogels aux propriétés antibactériennes (F. CHARRIAUD, M. BOLON, A. COSTANTINI) (Fig. 31). L'objectif étant de produire un hydrogel constituant un environnement aseptique permettant la régénération du tissu pulpaire par les CSM-PD.

Nous avons développé une approche visant à incorporer, au moment de la fabrication de l'hydrogel, un agent antibactérien couplé à un système porteur capable de relarguer progressivement l'antibiotique pendant la durée du processus de régénération dans l'attente du rétablissement du système d'immunosurveillance. Les nanoparticules (NPs) ont prouvé leur efficacité pour la vectorisation d'antibiotiques (152). En particulier, les nanoparticules d'acide poly (D, L)-lactique (PLA) ont reçu une attention considérable ces dernières années en raison de

leur nature biodégradable et biocompatible et de leur faible niveau d'immunogénicité et de toxicité (153). Nous avons postulé que l'incorporation de PLA-NPs au sein de l'hydrogel de fibrine pouvait constituer un outil thérapeutique pour apporter l'antibiotique au contact des bactéries endodontiques (Fig. 31).

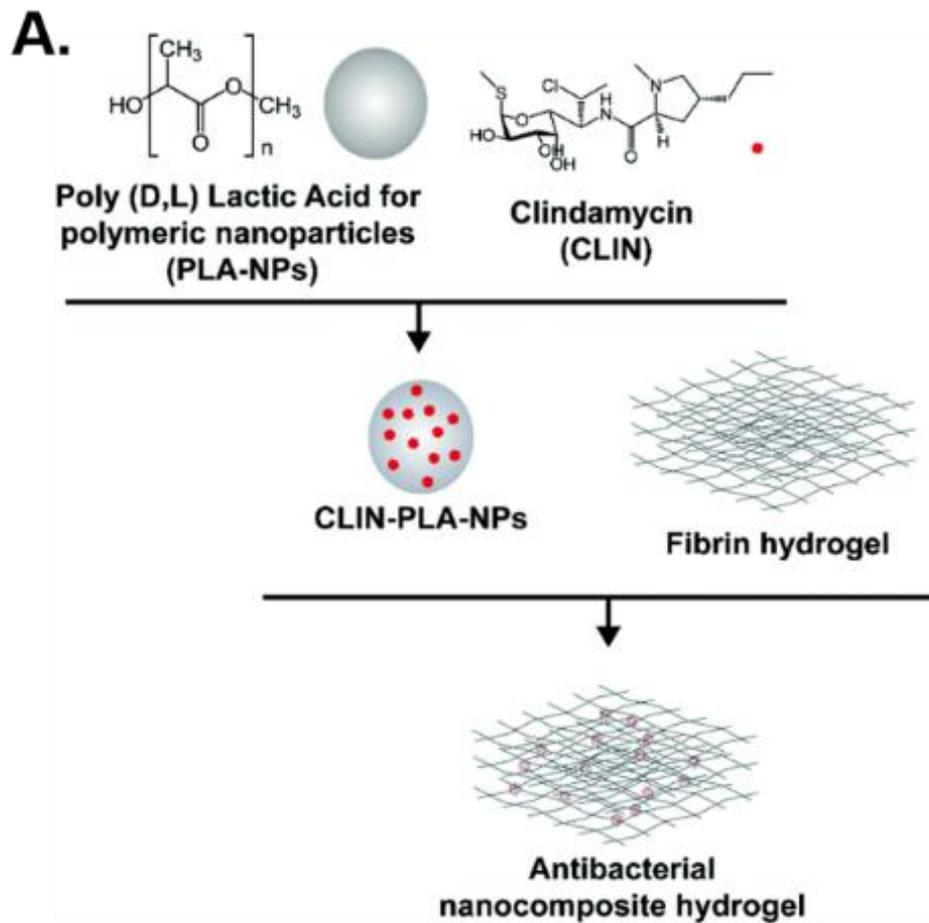


Figure 31. Schéma de principe de production d'un hydrogel nanocomposite antibactérien. La clindamycine (CLIN) est portée par des nanoparticules de PLA au sein de cet hydrogel.

Synthèse des nanoparticules

En collaboration d'un partenaire industriel (ADJUVATIS®), nous avons réussi à vectoriser la clindamycine (CLIN), sur des PLA-NPs innovantes (i-Particles®). L'analyse de leur microstructure a montré la formation de nanoparticules sphériques de charge négative et de taille homogène piégeant la CLIN à une hauteur de $42.62 \pm 7.18\%$, ce qui correspond à un taux de chargement de 10.01 ± 2.35 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) (Fig. 32, Tableau 1).

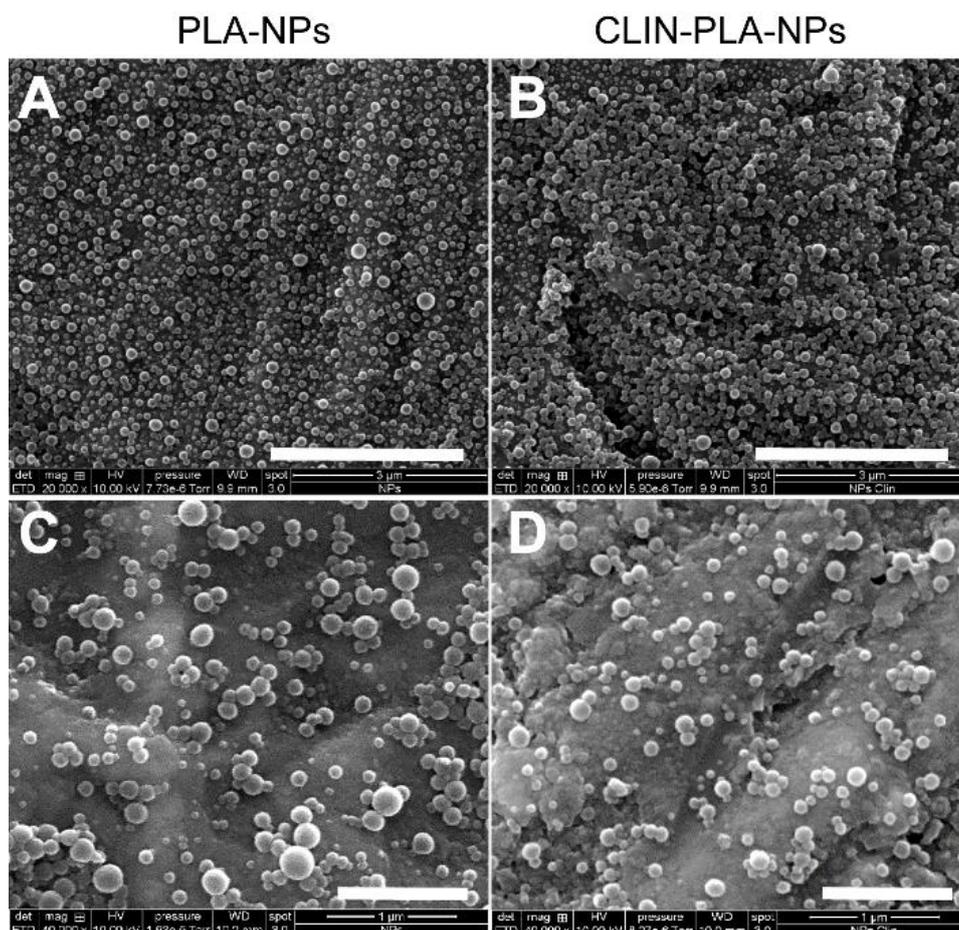


Figure 32. Morphologie des nanoparticules observée par microscopie électronique à balayage (MEB). Images de MEB représentatives des nanoparticules de PLA contrôles (gauche ; A,C) ou chargées en clindamycine (droite ; B,D) (échelle : 1 μ m).

	PLA-NPs	CLIN-PLA-NPs
Diameter (nm)	155.4 \pm 1.7	158.7 \pm 2.3
Polydispersity index	0.087 \pm 0.010	0.090 \pm 0.006
Zeta potential (mV)	-66.00 \pm 2.55	-60.34 \pm 1.66
Entrapment efficiency (%)	-	42.62 \pm 7.18
Drug-loading (μ g/mg)	-	10.01 \pm 2.35

Tableau 1. Caractéristiques des nanoparticules. Diamètre hydrodynamique, indice de polydispersité (PDI) et potentiel zeta des nanoparticules vides (PLA-NPs) ou chargées en antibiotique (CLIN-PLA-NPs). Les valeurs sont la somme \pm la déviation standard de différents lots de nanoparticules (N = 3 pour les PLA-NPs et N = 5 pour les CLIN-PLA-NPs). L'efficacité de piégeage et le chargement en antibiotiques (mg CLIN par mg PLA) ont été déterminés par la quantification de CLIN par HPLC. Pas de différences significatives (p-value < 0,05) sont observées entre les PLA-NPs et les CLIN-PLA-NPs.

Propriétés antimicrobiennes des nanoparticules

Les propriétés antimicrobiennes ont, dans un premier temps, été évaluées en utilisant les nanoparticules en absence d'hydrogel. Les nanoparticules ainsi développées présentent des activités antimicrobiennes et antibiofilm contre *E. faecalis* utilisées comme bactérie modèle. Ces propriétés caractérisées par la concentration minimale d'inhibition de croissance bactérienne ("Minimal Inhibitory Concentration, MIC", 32 µg/mL), la concentration minimale d'inhibition de formation de biofilm ("Minimal Biofilm Inhibition Concentration, MBIC₅₀", 4 µg/mL) ainsi que la concentration minimale d'éradication de biofilm ("Minimal Biofilm Eradication Concentration, MBEC₅₀", 16 µg/mL) ne sont pas affectées par la vectorisation de l'antibiotique sur les PLA-NPs (Tableau 2). En d'autres termes, l'association de la CLIN aux PLA-NPs n'altère pas ses propriétés.

	MIC (µg/ml)	MBIC ₅₀ (µg/ml)	MBEC ₅₀ (µg/ml)
CLIN	32	4	16
CLIN-PLA-NPs	32	4	16
PLA-NPs	> 128	> 256	> 256

Tableau 2 : Propriétés antimicrobiennes des nanoparticules contre *Enterococcus faecalis*. La concentration minimale inhibitrice (CMI ou "MIC") contre *E. faecalis* a été déterminée selon la méthode de microdilution en milieu liquide, en présence de concentrations sérielles de clindamycine (0,004 à 256 mg/mL), libre ou chargée sur des nanoparticules (respectivement CLIN et CLIN-PLA-NP), ou des concentrations équivalentes de PLA-NP vides (0,016 à 1,02% de contenu solide). La concentration minimale d'inhibition du biofilm (MBIC₅₀) et la concentration minimale d'éradication du biofilm (MBEC₅₀) ont été estimées en mesurant la densité du biofilm d'*E. faecalis* après coloration au cristal violet. La MBIC₅₀ est définie comme la plus faible concentration de CLIN qui inhibe de 50 % la formation du biofilm, tandis que la MBEC₅₀ est définie comme la plus faible concentration de CLIN qui éradique 50 % d'un biofilm formé depuis 24 heures. Les valeurs ont été déterminées après l'ajout de clindamycine libre (CLIN), chargée sur des nanoparticules (CLIN-PLA-NPs) ou de nanoparticules vides (PLA-NPs).

Propriétés antimicrobiennes de l'hydrogel nanocomposite

Sur la base de travaux antérieurs du laboratoire ayant permis de mettre au point un hydrogel de fibrine injectable compatible avec une potentielle utilisation en clinique (131). En accord avec les propriétés antimicrobiennes des CLIN-PLA-NPs déterminées par cette étude, un hydrogel nanocomposite a été formulé à une concentration finale de 50 µg/ml CLIN afin de pouvoir inhiber la croissance bactérienne et agir sur les biofilms. Des tests de diffusion sur agar ont été réalisés afin de confirmer les propriétés antimicrobiennes de cet hydrogel (Fig. 33). L'association de CLIN-PLA-NPs, permet de conférer des propriétés antimicrobiennes à l'hydrogel. Ce pouvoir antimicrobien diffuse de l'hydrogel à l'agar ce qui laisse penser que cet hydrogel permettrait de maintenir un environnement aseptique pour la régénération de la pulpe dentaire et que les NPs pourraient potentiellement diffuser au sein des tubules dentinaires afin de parfaire la procédure de désinfection.

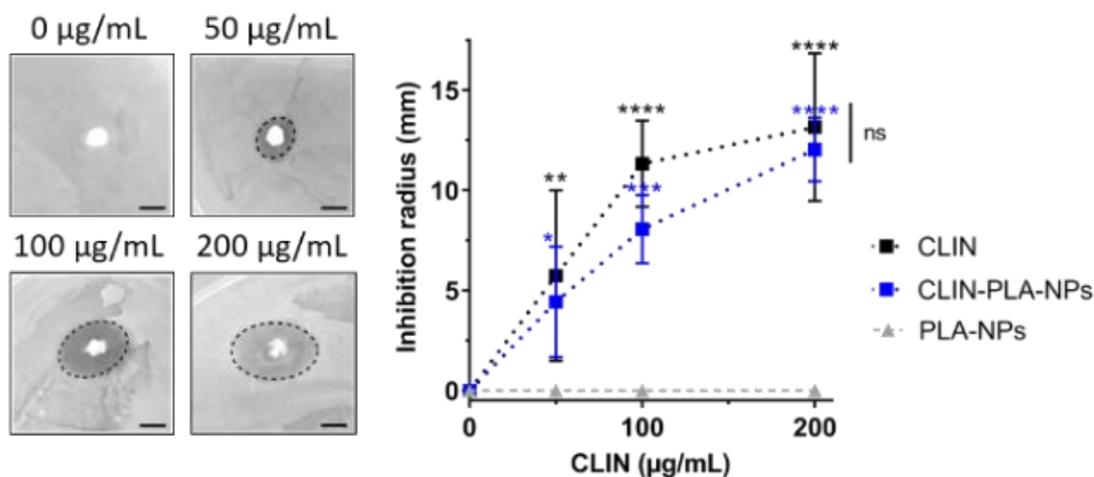


Figure 33. Propriétés antimicrobiennes de l'hydrogel nanocomposite. Tests de diffusion sur agar en présence de l'hydrogel de fibrine seul (0 µg/mL de clindamycine) ou d'hydrogels de fibrine associé à des CLIN-PLA-NPs pour obtenir des concentrations finales de 50, 100 ou 200 µg/mL de clindamycine. Les images représentatives sont rapportées à gauche (barre d'échelle de 10 mm). La représentation graphique du rayon d'inhibition en présence de 50, 100 ou 200 µg/mL de CLIN libre (carrés noirs) ou de 2, 4 ou 8 mg/mL de CLIN-PLA-NPs (carrés bleus) ou de PLA-NPs (triangles gris) est rapportée à droite ($N = 3$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ vs. PLA-NP comme contrôle. Les différences entre la CLIN libre et la CLIN-PLA-NPs ne sont pas significatives (ns).

Distribution et diffusion des nanoparticules à partir de l'hydrogel

L'investigation de l'hydrogel nanocomposite par MEB en condition environnementale (sans préparation préalable, à l'état frais à -20°C) montre qu'une partie des nanoparticules est sous forme libres dans les espaces ménagés par le réseau de fibrine et qu'une partie est associée aux fibres composant ce réseau (Fig. 34A-B). L'étude cinétique du relargage cumulatif de la CLIN à partir de l'hydrogel montre que cette dernière est rapidement libérée pour atteindre un plateau après 24 h (Fig. 34C). L'utilisation de nanoparticules vectorisant la CLIN permet donc de maintenir, dans une certaine mesure, l'antibiotique au sein du gel.

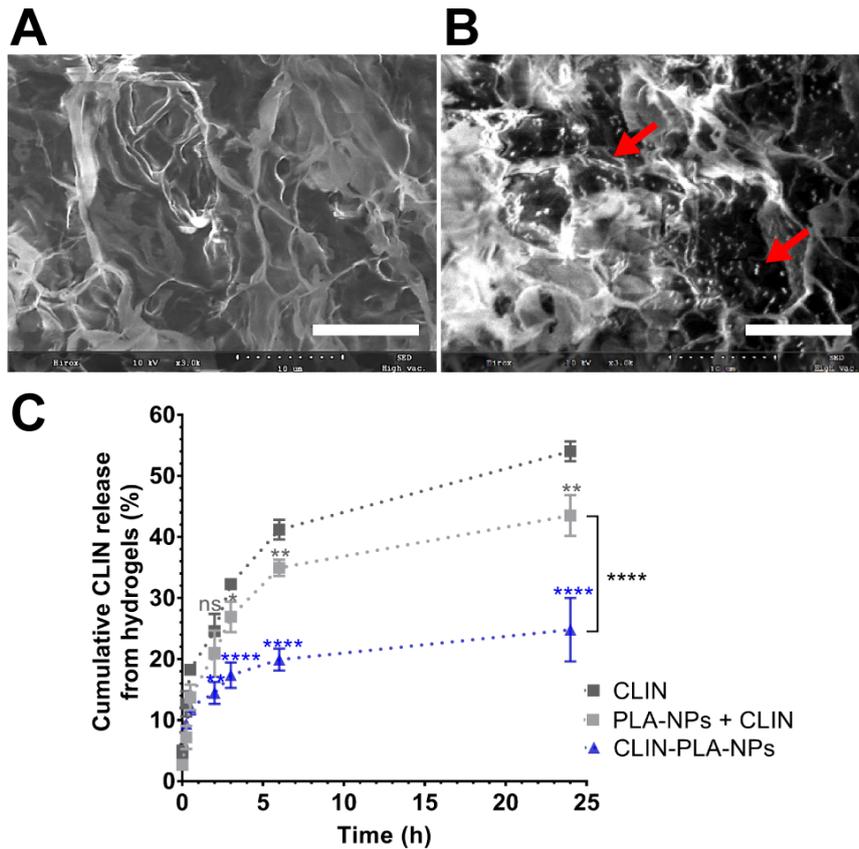


Figure 34. Distribution et diffusion de l'antibiotique de l'hydrogel. Images MEB représentatives de la microstructure d'un hydrogel de fibrine seul (A) et d'un hydrogel de fibrine contenant des CLIN-PLA-NPs (B). Les NPs sont indiquées par des flèches rouges à titre d'illustration. Barre d'échelle : 10 μ m. (C) Libération cumulative de CLIN à partir d'hydrogels de fibrine formulés avec de la CLIN libre, de la CLIN libre + des PLA-NP vides ou de la CLIN chargée sur des PLA-NP ($N = 3$). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ vs contrôle CLIN libre. La différence statistique entre PLA-NPs + CLIN et CLIN-PLA-NPs à 24 h est indiquée par une parenthèse. Aucune différence significative n'a été observée en dessous de 2 h.

La distribution et le relargage étudiés à l'aide de nanoparticules fluorescentes montre que ces dernières sont distribuées de manière homogène au sein du gel et ne forment pas d'agglomérats (Fig. 35). Elles sont libérées de l'hydrogel moins rapidement que le fluorophore seul. L'ajout de cellules souches mésenchymateuses de pulpe dentaire humaine (CSM-PD) n'affecte pas de manière significative le relargage des NPs de l'hydrogel, ce qui suggère que ce biomatériau peut être utilisé à la fois pour des approches de régénération pulpaire cellularisées et non cellularisées.

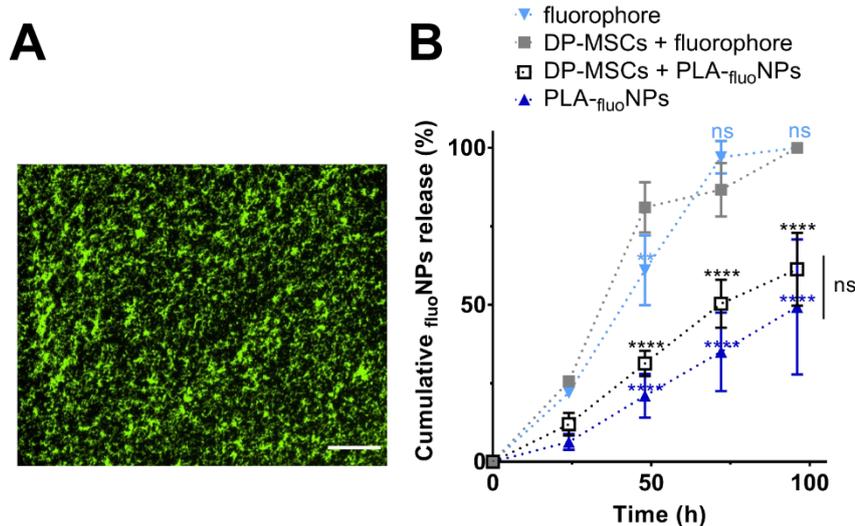


Figure 35. Distribution et diffusion des nanoparticules de l'hydrogel. La distribution des nanoparticules a été évaluée par l'utilisation des nanoparticules de PLA renfermant du fluorophore vert, le Bodipy (PLA-fluoNPs). (A) La distribution des des PLA-fluoNPs dans l'hydrogel de fibrine est observée par microscopie à fluorescence (barre d'échelle : 25 mm). (B) Représentation graphique montrant la libération cumulative des PLA-fluoNPs à partir d'hydrogels non cellularisés ou contenant des DP-MSC (triangles bleu foncé et carrés noirs vides, respectivement) et du fluorophore à partir d'hydrogels non-cellularisé ou contenant des DP-MSC (triangles bleu clair et carrés gris, respectivement). Le fluorophore seul a été utilisé comme témoin. La fluorescence libérée est exprimée en pourcentage de la fluorescence incorporée dans l'hydrogel au départ ($N = 3$). **** $P < 0,0001$ vs fluorophore libre comme contrôle. Aucune différence significative n'a été observée en dessous de 48 h. Les différences entre DP-MSC + PLA-fluoNPs et PLA-fluoNPs ne sont pas significatives (ns).

Cytocompatibilité de l'hydrogel nanocomposite

Les CSM-PD présentent $91.00 \pm 3.68\%$ et $91.75 \pm 1.69\%$ de l'activité métabolique contrôle respectivement en présence de PLA-NPs ou CLIN-PLA-NPs (Fig. 36A). Des expériences de "live/dead" (Fig. 36B-F) réalisées après 48 h de culture, montrent $74.63 \pm 3.21\%$ et $77.24 \pm 3.46\%$ de CSM-PD vivantes en présence de CLIN-PLA-NPs et PLA-NPs respectivement. Ces résultats démontrent que l'hydrogel nanocomposite ainsi formulé est cytocompatible tout en présentant des propriétés antimicrobiennes.

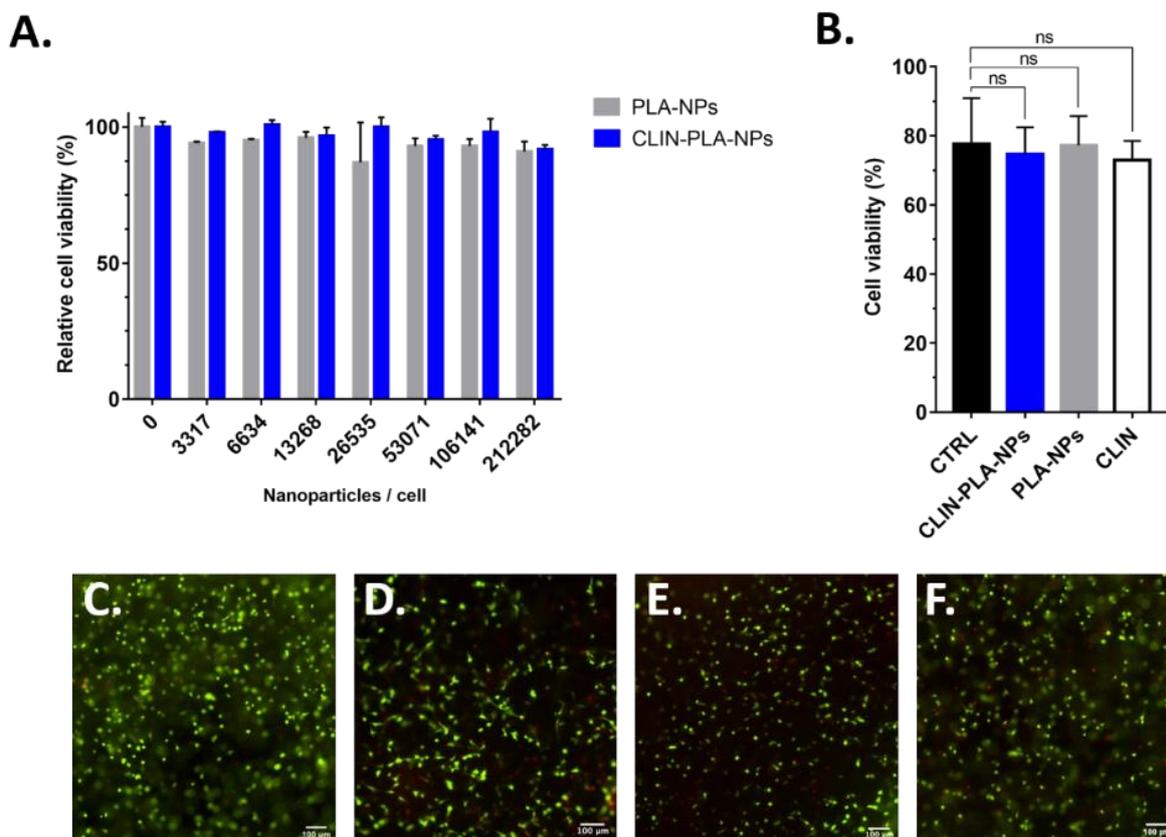


Figure 36. Cytocompatibilité de l'hydrogel nanocomposite. Test de viabilité cellulaire à base de résazurine (A). Test de viabilité fluorescent de type live/dead (B). Images illustrant la viabilité des cellules au sein de l'hydrogel de fibrine seule (C) ou contenant les CLIN-PLA-NPs (D), la CLIN (E) ou les PLA-NPs (F). La barre d'échelle correspond à 100 μ m.

Pour confirmer l'innocuité de l'hydrogel nanocomposite, la production de collagène de type I a été évaluée par immunohistochimie (Fig. 37). Après 7 jours de culture, les cellules sont viables et synthétisent une matrice extracellulaire contenant du collagène de type I que ce soit dans l'hydrogel de fibrine seul ou dans l'hydrogel contenant des CLIN-PLA-NPs ou des PLA-NPs (Fig. 37B-D).

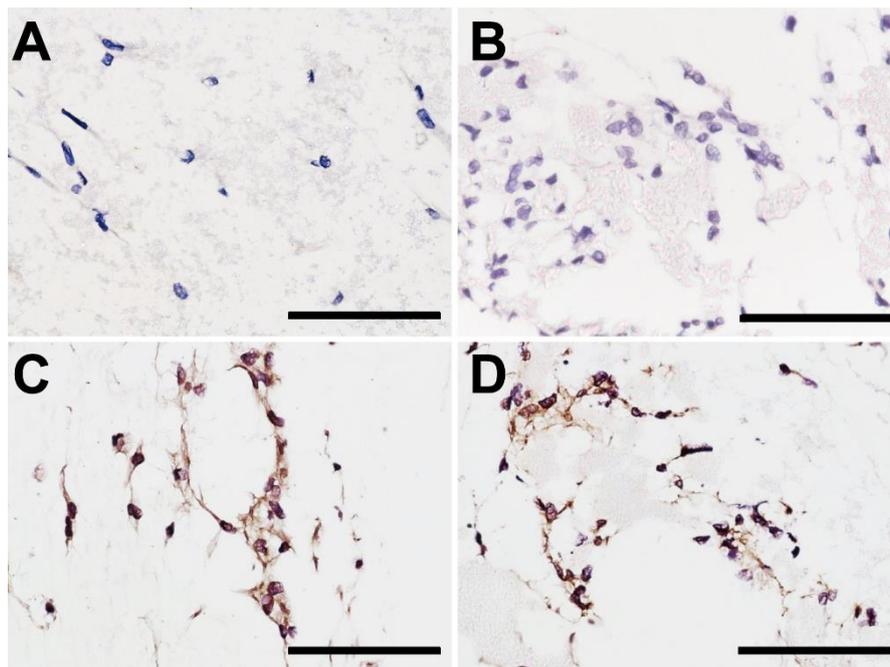


Figure 37. Synthèse d'une matrice collagénique à base de collagène de type I par les DP-MSCs en hydrogel nanocomposite. Images représentatives de l'immunomarquage du collagène de type I après 7 jours de culture des DP-MSCs dans un hydrogel de fibrine seul (A et C) ou dans un hydrogel de fibrine contenant des CLIN-PLA-NP à 2 mg/mL équivalent à 50 μ g/mL de clindamycine (B et D). Contrôles sans l'anticorps primaire (A et B). Barre d'échelle : 20 μ m.

II. 3. c. Développement d'hydrogels : conclusion et perspectives

Ces travaux ont permis de développer un hydrogel innovant, antibactérien et biocompatible. Cet hydrogel est à la fois capable d'agir sur des bactéries en suspension ou organisées en biofilm. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans un journal de référence dans le domaine (154). Ce projet sera poursuivi par l'évaluation des propriétés antibactériennes/antibiofilm, la réponse inflammatoire de cet hydrogel ainsi que la biodistribution des nanoparticules dans des modèles de petits animaux (murins). Un financement de la fondation de l'Avenir a été obtenu par le Pr J-C FARGES afin de soutenir ces travaux (Partenaire, 36 k€, 2021). L'ensemble de cette étude a été réalisée en utilisant *E. faecalis* comme bactérie modèle, il est envisagé d'étendre cette étude pilote à d'autres bactéries de la flore orale telles que *Streptococcus gordinii* ou *Porphyromonas gingivalis*.

D'autre part, de nouvelles formulations de nanoparticules seront explorées afin de vectoriser d'autres classes de molécules aux propriétés antibiotiques, et potentiellement antibiofilm, permettant de réduire le risque potentiel de résistance aux antibiotiques. Ce projet a été sélectionné pour financement par l'AAPG2021. Une ANR JC portée par le Pr Maxime DUCRET est actuellement en cours incluant le financement d'une étudiante en thèse en co-encadrement (Marianne LEVEQUE) du parcours pharmacie recrutée depuis Janvier 2022 dans le cadre de ces études.

Des formulations d'hydrogels sont actuellement en cours d'étude afin d'améliorer les propriétés mécaniques et/ou réguler la réponse des cellules. Un projet inter-équipes soutenu par l'institut (partenaire, LBTI, 12 k€, 2022-2023) vise à associer l'hydrogel de fibrine à un polymère 3D mécaniquement rigide à base de PEG afin de renforcer l'architecture 3D de la fibrine dans le temps. Ce financement inclut la rétribution d'une étudiante ingénieur (niveau M1).

Un second projet collaboratif, porté par le Pr. M DUCRET et le Dr A AUSSEL du laboratoire BIOTISS (INSERM U1026, Université de Bordeaux), vise à ajouter des particules de MEC afin de tenter de réguler la réponse des cellules souches de pulpes dentaires avec pour hypothèse que cet environnement matriciel à base de collagène réduise la synthèse rapide et excessive de matrice extracellulaire. Ce projet soutenu par l'Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO) est actuellement mené par une étudiante de Master 2 Biotechnologies (Camille GIROLET) du parcours de l'Université Grenoble-Alpes.

II. 3. d. Mécanismes biomoléculaires initiés par les CSM en gel de fibrine.

La régénération d'un tissu fonctionnel à base de cellules souches nécessite que ces dernières dégradent l'environnement matriciel temporaire (hydrogel) et synthétisent une matrice de composition similaire au tissu à régénérer ; le tout de manière coordonnée. L'approche systématique visant à développer des biomatériaux et à tester leur capacité à régénérer les tissus, sans connaître les mécanismes mis en jeu, peut conduire à la formation de tissus dysfonctionnels liés à des phénomènes de réparations cicatriciels, caractérisés par le dépôt excessif de matrice extracellulaire (fibrose), ou à la minéralisation ectopique des tissus (59,93,116,117). A ce jour, il existe peu d'études visant à comprendre les mécanismes biomoléculaires initiés par les cellules souches dans ces environnements matriciels temporaires. Or, la réussite des stratégies de régénération tissulaire nécessite des interactions cellule-matrice ainsi qu'une dégradation et une néo-synthèse matricielle contrôlées, impliquant un ensemble de récepteurs et de réactions enzymatiques, pour la formation d'un tissu entièrement fonctionnel.

Sur la base de mon expérience en enzymologie et dans la biologie de la matrice, je développe, depuis 2018, un thème de recherche visant à étudier les mécanismes de formation tissulaire à base de cellules souches en hydrogel de fibrine. Ces travaux serviront à identifier des cibles pouvant agir comme points de contrôle afin de guider la régénération du tissu pulpaire. L'objectif final étant de maintenir l'intégrité structurale de l'hydrogel (contrôle de la contraction et de la dégradation), puis de parvenir à synchroniser le remplacement de l'hydrogel par une matrice de pulpe dentaire. Trois objectifs spécifiques seront menés à court terme : (i) l'identification des récepteurs cellulaires impliqués dans l'interaction des CSM-PD avec la fibrine, (ii) la détermination gènes et protéines différenciellement exprimées ainsi que la composition de la MEC néosynthétisée par les CSM-PD au sein de l'hydrogel, et (iii) le décryptage des événements protéolytiques qui conduisent à la dégradation de l'hydrogel et à la synthèse d'une nouvelle MEC par les CSM-PD.

Les données rapportées à partir d'ici sont originales (pas encore soumises à publication).

Intégrité des hydrogels de fibrine en présence de CSM-PD

En présence de CSM-PD, l'hydrogel de fibrine commence à être dégradé à partir du troisième jour de culture (Fig. 38). En effet, des produits de dégradations sont observés par SDS-PAGE notamment aux alentours de 40 kDa, 30 kDa et 10 kDa. La dégradation par la protéase à sérine, plasmine, ne semble pas suffisante, à elle seule, pour expliquer ces événements protéolytiques. Les hydrogels sont ici cultivés dans un système d'inserts produits à partir des cônes formant ainsi des matrices en suspension en contact seulement de la paroi du cône. Dans ces inserts, l'hydrogel se désolidarise à partir du 4^{ème} jour et semble en partie dégradé ce qui suggère que la dégradation de l'hydrogel est trop importante (données expérimentales non illustrées). Des expériences sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes mis en place par le CSM-PD en hydrogel de fibrine afin de pouvoir contrôler ces mécanismes de manière réfléchie sans pour autant faire varier les paramètres de production de l'hydrogel (concentration en fibrinogène, réticulation...) qui auraient une répercussion sur son utilisation simple en situation clinique.

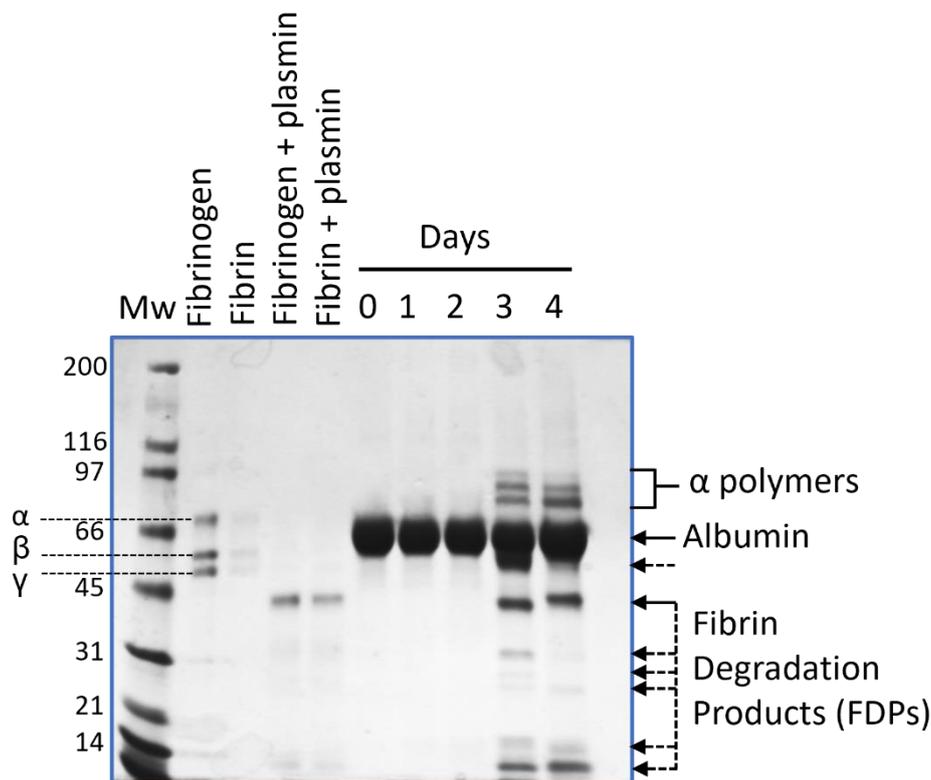


Figure 38. Dégradation de l'hydrogel de fibrine. SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (4-15%) du milieu conditionné par des CSM-PD cultivées en hydrogel de fibrine. Le milieu a été prélevé tous les jours pendant 4 jours. Le fibrinogène ou le fibrinogène seul (5 µg), traité ou non avec la plasmine (2 mU), a été chargé dans les quatre premières lignes comme contrôles.

Investigations par des approches à large spectre

Les données existantes liés aux mécanismes initiés lors de la réparation/régénération tissulaire sont peu nombreuses et *de facto* très variés selon le tissu à régénérer, le type de cellules utilisé et la formulation de l'hydrogel. Le développement de méthodes -omiques telles permet une surveillance à large spectre des niveaux de transcriptions et de protéines, ce qui constitue des outils précieux fournissant une vue d'ensemble des processus physiopathologiques complexes et permettant de déchiffrer les mécanismes biomoléculaires à l'aide d'une approche descendante (155). Nous avons, par conséquent, choisi de développer une approche multi-omique afin d'obtenir des informations non biaisées. Cette recherche a été sélectionnée dans le cadre de l'AAPG ANR 2021 (jeune chercheur). Ce projet nommé TRIDENTOMIC s'appuie sur l'utilisation d'approches de type transcriptomique et protéomique (protéomique quantitative et N-terminomique) (Fig. 39). **Au-delà du sujet appliqué à la pulpe dentaire, l'objectif de ce projet est également de développer une méthodologie afin de décrypter les mécanismes de régénération tissulaire ; adaptable à différents contextes.**

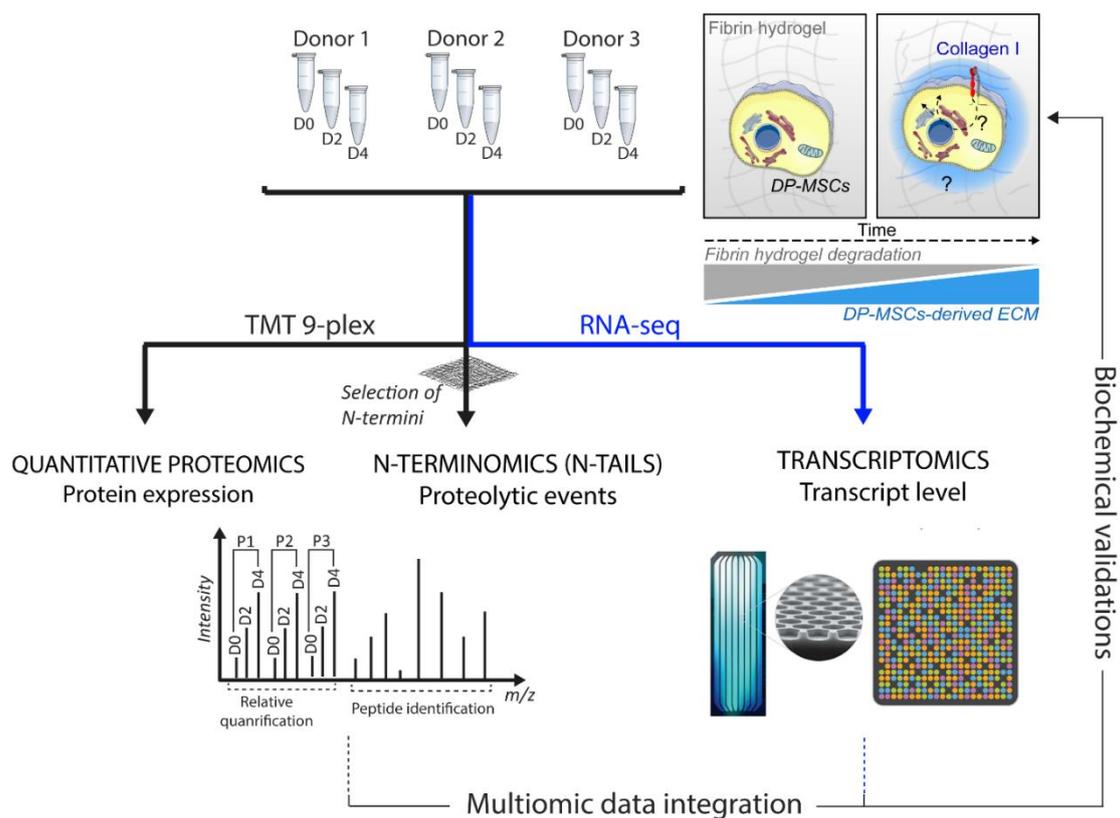


Figure 39. Schéma illustrant l'approche multi-omique pour l'investigation des mécanismes de CSM en gel de fibrine.

Transcriptomique pour l'évaluation du taux transcrits des CSM en hydrogel de fibrine

Personnes impliquées. Alicia REUZEAU (Master 2 Biologie cellulaire/UCBL ; 2021-2022), Joévin BARRIER (Assistant ingénieur CNRS ; 2021-2022)

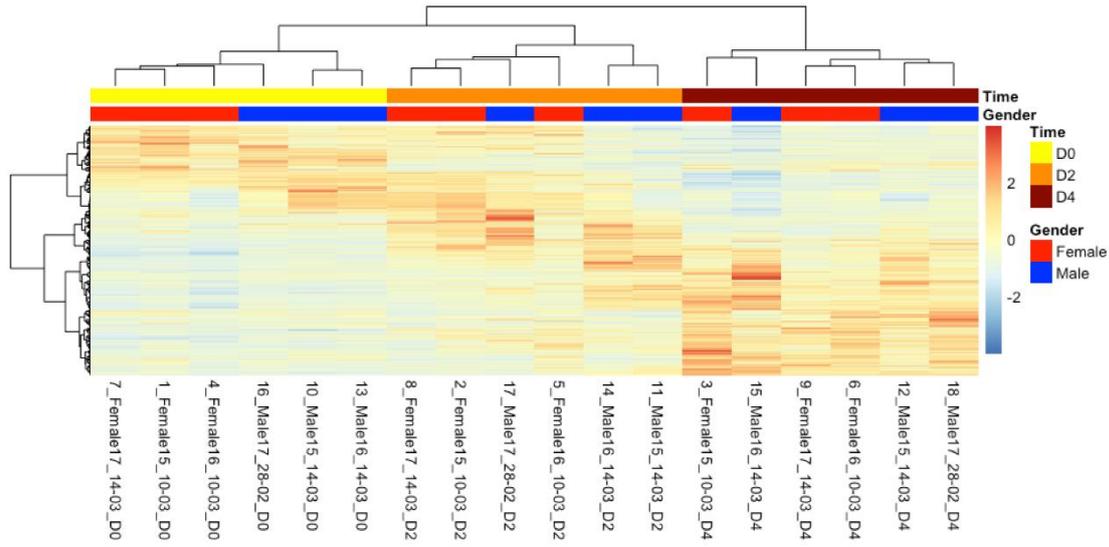
Préparation des échantillons pour l'analyse transcriptomique

Certaines protéines sont difficilement identifiées par la protéomique en raison de leur complexité (modifications post-traductionnelles...). L'analyse transcriptomique n'est pas nécessairement le reflet de l'expression des protéines mais elle a pour but de compléter les données protéomiques. Ces données serviront également à conforter les processus biologiques mis en évidence par les analyses protéomiques. L'analyse RNA-Seq a été réalisée sur 6 donneurs (3 de sexe masculin et 3 de sexe féminin) aux temps 0, 48 et 96 h.

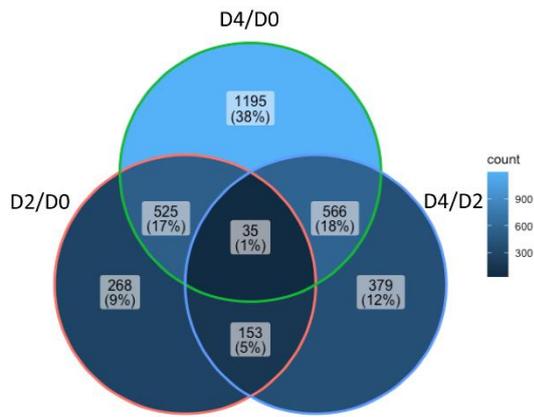
Analyse transcriptomique (RNA-seq) des CSM-PD en hydrogel de fibrine

Les analyses transcriptomiques indiquent que les cellules cultivées dans l'hydrogel de fibrine régulent le taux de transcrits de certains gènes afin de s'adapter à l'environnement 3D, composé de fibrine, qui les entoure (Fig.40A). Les transcrits différentiellement régulés semble être plus proche pour un même temps donné entre différents donneurs, que si l'on compare deux temps différents pour un même donneur. Autrement dit, la variabilité inter-individus est moins marquée que la variabilité entre deux temps différents. Même si nous pouvons noter une relative variabilité inter-individus pour un même temps donné, il ne semble pas y avoir de tendance particulièrement liée au sexe du donneur (Fig. 40A). La régulation des taux de transcrit est appréciée par le calcul des ratio D2/D0 (réponse précoce), D4/D2 (réponse secondaire) et D4/D0 (réponse globale). La comparaison des transcrits différentiellement régulés au cours du temps montre que seuls 6% des transcrits régulés sont communs entre la réponse précoce (D2/D0) et la réponse secondaire (D4/D2). Cependant, cette analyse transcriptomique indique que les transcrits spécifiquement régulés au quatrième jour, et correspondant à la réponse globale (D4/D0) sont de 38% (Fig. 40B). La singularité de la réponse globale pourrait suggérer qu'une partie non négligeable des transcrits est régulée relativement lentement dans le temps, ce qui, *in fine*, permettrait de les observer pour la réponse globale et non dans le cadre des réponses précoces et secondaires. Au niveau transcriptionnel, cette réponse globale, à 4 jours, est donc majoritairement différente des réponses précoces et secondaire. Seulement 1% des transcrits est commun aux trois périodes et cette réponse globale présente des similitudes plutôt bien réparties avec les réponses précoce (17% de transcrits communs) et secondaire (18% de transcrits communs) (Fig. 40B).

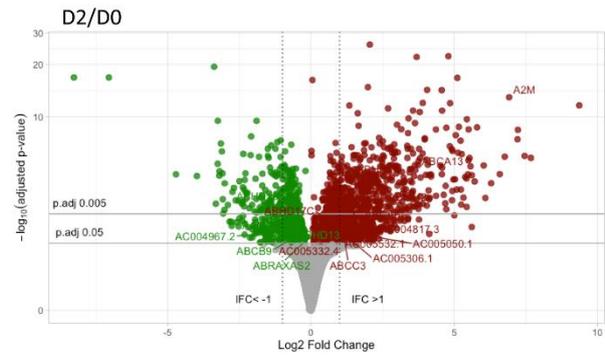
A.



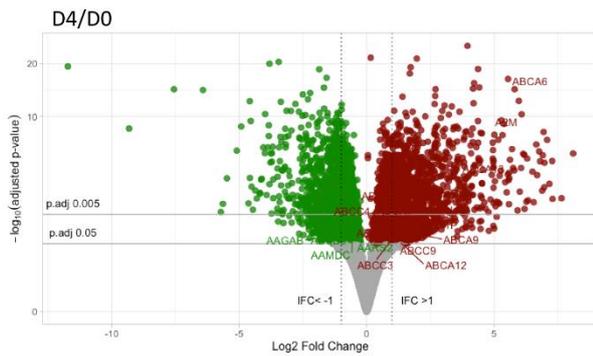
B.



C.



D.



E.

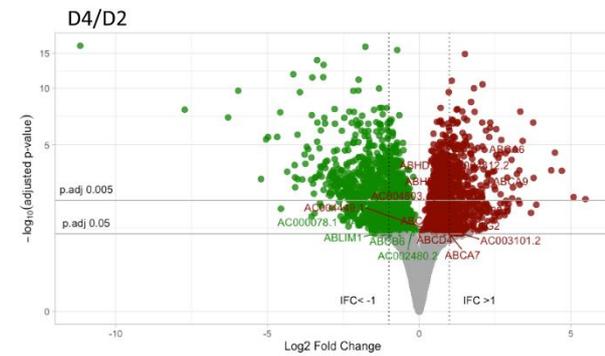


Fig. 40. Analyse RNAseq du taux de transcrit des CSM-PD en hydrogel de fibrine. (A) Heatmap rapportant le taux de transcrit selon une échelle de couleur allant du bleu (taux faible) au rouge (taux important). (B) Diagramme de Venn rapportant le nombre de gènes différentiellement transcrits communs et spécifiques entre les réponses précoce (D2/D0), secondaire (D4/D2) et globale (D4/D0). (C-E) Représentations en volcans des gènes différentiellement transcrits durant les réponses précoce (C), secondaire (D) et globale (E).

La répartition des transcrits différentiellement sur-régulés ou sous-régulés montre une proportion plus importante de transcrit sur-régulés durant les réponses précoces et globales alors que les transcrits différentiellement régulés dans le cadre de la réponse secondaire sont en majorité sous-régulés (Fig. 40 C-E). En effet, les analyses identifient 981, 1133 et 2321 transcrits respectivement pour les réponses précoces (D2/D0), secondaire (D4/D2) et globales (D4/D0). Parmi ces transcrits ; 549, 631 et 1465 transcrits sont différentiellement régulés respectivement pour les phases précoces (D2/D0), secondaire (D4/D2) et globales (D4/D0) dont environ 80% (439/549) sur sur-régulés durant les 2 premiers jours ; 62% (907/1465) pour la durée globale alors que seulement 34% (216/631) le sont durant la phase secondaire. Ces résultats semblent indiquer que la phase secondaire diffère de la phase primaire. En d'autres termes, les principaux mécanismes impliqués dans l'adaptation à l'environnement matriciel seraient mis en place durant les deux premiers jours. Parmi les 50 transcrits les plus sur-régulés, on retrouve notamment les métalloprotéases MMP3, MMP1, MMP8, MMP10, plus particulièrement durant la phase précoce, marquant ainsi une étape dédiée au remaniement de l'environnement matriciel (Tableau 3). Ces métalloprotéases ne sont pas différentiellement régulées durant la phase secondaire et seule la MMP1 est retrouvée parmi les 50 transcrits les plus régulés durant la phase globale (D4/D0). Ces résultats indiquent encore une fois un phénomène de sur-régulation durant les deux premiers jours et un contre-mécanisme de régulation négative durant les 2 jours suivants. La MMP3 illustre ce mécanisme. Cette métalloprotéase est fortement surexprimée durant les deux premiers jours alors qu'elle n'est pas différentiellement régulée au quatrième jour (Tableau 4).

En ce qui concerne les récepteurs de surface de type intégrine, la sous-unité intégrine $\alpha 2$ est retrouvée sur-exprimée durant la phase précoce et la phase globale. Cette expérience de transcriptomique identifie également la sur-régulation des sous unités $\alpha 6$, $\alpha 10$, $\alpha 5$ ainsi que la sous-unité $\alpha 7$ au quatrième jour (Tableau 4). La sous-unité intégrine $\alpha 1$, connue pour interagir avec les matrices de collagènes établies est quant à elle sous-régulée durant la phase secondaire suggérant que les cellules construisent et modifient leur environnement durant ces 4 jours d'analyse.

Au niveau transcriptionnel, les chaînes $\alpha 1$ des collagènes X, XIII et XVII sont sur-régulées durant la phase précoce. Le collagène X semble subir un phénomène de sous-régulation durant la phase secondaire. Les chaînes $\alpha 1$ des collagènes XVIII et XIX sont sur-régulés de manière significative au jour 4 (Tableau 4). La chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I, est sous-régulée au quatrième jour. Il est important de noter que l'absence de régulation au niveau transcriptionnel ne signifie pas l'absence d'expression par les cellules. Le rôle de ces différents collagènes, sous-unités intégrines ainsi que des métalloprotéases identifiés restent à établir.

D2/D0			D4/D2			D4/D0		
gene_name	Log2FC	pval_adj	gene_name	Log2FC	pval_adj	gene_name	Log2FC	pval_adj
IL24	9.4	2.17e-12	AJ009632.2	5.5	4.57e-03	SLCO4A1	8.1	1.07e-06
PRR16	7.7	2.53e-06	HMGB3P7	5.1	3.83e-03	GLP2R	7.6	9.48e-04
TNFSF11	7.5	1.71e-06	NPNT	4.7	2.95e-04	BICDL1	7.3	1.03e-03
IL19	7.2	4.57e-09	MGP	4.5	3.13e-05	AC099541.2	7.3	4.41e-06
NOTUM	7.2	4.84e-08	ARNILA	4.4	2.78e-04	AL133355.1	7.2	1.60e-04
A2M	6.9	1.02e-13	LINC01482	3.9	7.17e-03	CLCA2	7.1	5.78e-08
AREG	6.8	1.99e-06	SLC22A31	3.8	6.38e-04	LINC02600	7.0	6.06e-06
CA9	6.6	3.98e-05	APOD	3.8	2.49e-07	IL18RAP	7.0	2.52e-04
AP001189.3	6.3	1.50e-04	AL357033.1	3.7	1.31e-02	S100A8	6.9	8.53e-09
B4GALNT2	6.1	9.63e-04	ABCA6	3.4	5.69e-06	LINC02725	6.9	1.52e-06
KRT81	6.0	9.69e-06	FAM180A	3.3	2.75e-08	AP003025.2	6.9	3.85e-04
TMEFF2	5.8	2.29e-09	LINC01239	3.3	1.26e-03	TNFSF11	6.8	4.62e-06
MMP3	5.7	1.16e-04	FOXD4L6	3.3	6.48e-03	AREG	6.8	7.13e-07
AC113189.2	5.6	4.71e-05	HID1	3.3	2.82e-04	FOXD4L6	6.7	4.53e-05
LINC02085	5.6	1.56e-02	CLCA2	3.3	5.13e-03	NOTUM	6.7	1.64e-07
SERPINB2	5.6	1.13e-05	EPPK1	3.2	4.18e-04	AJ009632.2	6.6	1.48e-03
BMP8B	5.5	2.57e-06	CRTAM	3.2	2.10e-05	C1orf87	6.5	2.67e-05
EGLN3	5.5	3.98e-09	CCN5	3.1	1.63e-03	AC021188.1	6.3	1.21e-03
POM121L9P	5.5	3.94e-06	CNTN6	3.1	4.26e-03	EREG	6.3	2.81e-06
MMP1	5.5	4.08e-05	CXCL12	3.0	8.00e-05	CNNM1	6.3	1.40e-03
ANO1	5.4	2.19e-10	CASP12	2.9	6.69e-03	CD93	6.2	2.98e-03
AC025809.1	5.4	2.54e-03	SELENOP	2.9	2.33e-05	MMP1	6.2	1.38e-06
MT3	5.4	7.54e-05	KCNK15	2.9	9.26e-03	KCNK3	6.1	1.13e-06
BICDL2	5.4	6.17e-05	EXPH5	2.9	1.15e-02	A2M	6.1	5.30e-11
CST7	5.3	9.23e-04	AL022328.1	2.9	6.18e-04	THBD	6.1	1.47e-05
INMT	5.3	1.19e-06	AC021148.2	2.9	5.21e-03	AC093627.6	6.0	4.39e-04
C1orf87	5.2	1.98e-03	TMEM100	2.8	3.41e-05	PECAM1	6.0	5.20e-13
IL1RN	5.2	3.45e-04	AL359198.1	2.8	1.52e-02	AC106865.1	5.9	3.42e-03
CLCNKA	5.2	6.67e-08	SLC13A4	2.8	6.28e-03	ABCA6	5.8	4.51e-15
PAQR5	5.2	2.01e-09	AL354836.1	2.8	1.23e-02	CASP12	5.8	2.16e-05
ABCA13	5.1	9.14e-07	GPER1	2.7	4.91e-06	PRSS35	5.7	1.47e-05
GGT5	5.1	1.60e-17	AC011503.1	2.7	3.02e-03	BMP8B	5.7	4.37e-07
GALNT15	5.1	3.45e-04	H4C8	2.7	3.40e-05	ANGPT2	5.6	3.55e-06
RIPOR2	5.1	1.79e-08	SLC7A4	2.7	6.53e-03	EXPH5	5.6	7.26e-05
ADCY8	5.0	8.65e-05	LINC00525	2.6	1.20e-02	LINC02172	5.6	3.23e-05
FER1L6-AS2	5.0	5.74e-03	Z93943.1	2.6	1.68e-02	MYZAP	5.6	1.84e-03
BMP8A	5.0	8.90e-05	PPM1L	2.6	6.18e-05	GNA14	5.6	9.62e-05
LINC02669	4.9	6.27e-07	AP001042.1	2.6	1.32e-02	ACKR4	5.5	4.02e-17
EREG	4.9	4.13e-04	AC005740.4	2.6	1.33e-02	GALNT15	5.5	4.11e-05
TMC1	4.9	1.23e-03	SCNN1A	2.5	8.12e-07	AL031777.2	5.5	4.79e-04
AL158071.2	4.9	4.55e-07	BCL2L11	2.5	4.33e-05	PKD4	5.4	1.27e-04
LRRC32	4.9	1.02e-12	ABCA9	2.5	1.98e-03	HTR7	5.4	9.50e-10
SLC16A6	4.8	2.31e-07	ADAMTS15	2.5	1.65e-02	TMEFF2	5.3	1.85e-08
MMP8	4.8	5.14e-23	RANBP3L	2.5	2.21e-02	PAQR5	5.3	3.38e-10
GALNT18	4.7	2.56e-09	TSPAN11	2.5	1.48e-03	RANBP3L	5.3	2.24e-05
NPTX1	4.7	3.17e-03	AL022328.2	2.5	3.13e-04	KRT81	5.2	4.95e-05
MMP10	4.7	2.14e-04	FOXD4	2.4	3.24e-04	FER1L6-AS2	5.2	1.72e-03
MAFA	4.7	1.74e-03	ACOXL-AS1	2.4	1.26e-02	FXD2	5.2	1.51e-03
XKRX	4.6	6.63e-04	AC013477.1	2.4	2.14e-02	LINC02669	5.2	5.65e-08
AL359834.1	4.6	1.41e-05	AC137630.3	2.4	8.34e-04	AC099560.1	5.1	6.24e-03

Tableau 3. Extrait des transcrits différenciellement régulés par les CSM-PD en hydrogel de fibrine. Liste des cinquante protéines présentant la plus importante sur-régulation du taux de transcrit.

D2/D0			D4/D2			D4/D0		
gene_name	FC	pval_adj	gene_name	FC	pval_adj	gene_name	FC	pval_adj
ITGA2	6.9	4.13e-07	ITGA1	0.5	6.70e-03	ITGA2	6.9	1.60e-07
ITGA6	4.7	5.06e-03	ITGA6-AS1	0.2	1.94e-02	ITGA6	5.7	8.61e-04
ITGA6-AS1	4.1	2.78e-02	MMP16	2.6	1.91e-03	ITGA10	3.5	1.19e-07
ITGA10	2.6	1.07e-04	ADAMTS15	5.6	1.65e-02	ITGA7	2.2	1.30e-02
ITGA5	2.1	4.82e-06	ADAMTS6	0.5	8.34e-03	MMP1	72.5	1.38e-06
MMP3	52.4	1.16e-04	ADAMTSL4	0.4	6.45e-03	MMP10	23.0	1.46e-04
MMP1	44.7	4.08e-05	ADAMTS12	0.4	2.54e-04	MMP8	20.7	2.21e-19
MMP8	27.8	5.14e-23	ADAM19	0.4	4.72e-04	MMP13	6.1	7.86e-04
MMP10	26.0	2.14e-04	COL14A1	3.4	6.94e-03	MMP3	5.5	1.95e-02
MMP11	3.1	4.62e-03	COL7A1	0.3	1.09e-06	MMP27	3.7	2.82e-02
ADAM28	5.8	7.26e-04	COL22A1	0.3	3.49e-03	MMP21	2.9	1.85e-02
ADAMTS3	2.8	5.28e-03	COL17A1	0.2	1.68e-02	MMP19	0.5	9.02e-06
ADAMTS1	0.5	1.65e-02	COL10A1	0.2	1.08e-06	MMP7	0.4	3.48e-02
ADAMTS5	0.2	2.01e-03				MMP25	0.4	3.84e-03
COL10A1	5.7	1.54e-06				ADAMTS7P4	2.8	3.65e-05
COL13A1	5.0	1.64e-03				ADAMTS3	2.8	2.68e-03
COL17A1	4.0	3.91e-02				ADAMTS17	2.4	4.21e-02
						ADAMTS6	0.4	4.35e-04
						ADAMTS1	0.3	2.28e-04
						ADAMTS5	0.3	2.97e-03
						COL19A1	9.5	3.99e-03
						COL13A1	8.6	1.27e-05
						COL18A1	2.0	2.32e-02
						COL1A1	0.5	2.15e-02
						COL22A1	0.2	5.08e-04

Tableau 4. Transcrits de protéines extracellulaire ou de la surface des cellules différentiellement régulés par les CSM-PD en hydrogel de fibrine. Liste des protéines de type intégrine, métalloprotéases ou collagéniques présentant différemment régulés au niveau transcriptionnel.

Approche protéomique

Afin d'identifier les protéines différentiellement exprimées au cours du temps par les cellules souches de pulpe dentaire cultivées en hydrogel de fibrine nous avons opté pour une technique de quantification relative par protéomique. La protéomique quantitative est ici basée sur l'analyse LC-MS/MS (MS2) d'échantillons marqués avec une étiquette isobare (Tandem Mass Tag "TMT") spécifique pour chaque condition. La balise isobarique conduit à un pic unique (ion parent) pour un peptide spécifique dans les spectres MS1. Elle n'augmente donc pas la complexité de l'échantillon, et permet une quantification relative en fonction de la condition pour ce peptide dans les spectres MS2 (Fig. 41). Le spectre MS2 rapportant les ions "filles", issu de la fragmentation du peptide, permet de déterminer la séquence du peptide. L'approche TMT permet d'étudier différentes conditions expérimentales, en parallèle, pouvant aller jusqu'à un multiplexage de 16 conditions. Ces marqueurs isobariques ont également l'avantage d'être facilement utilisables *in vitro*, sur tout échantillon biologique (milieu de culture, cellules, extraits de tissus, fluides corporels...).

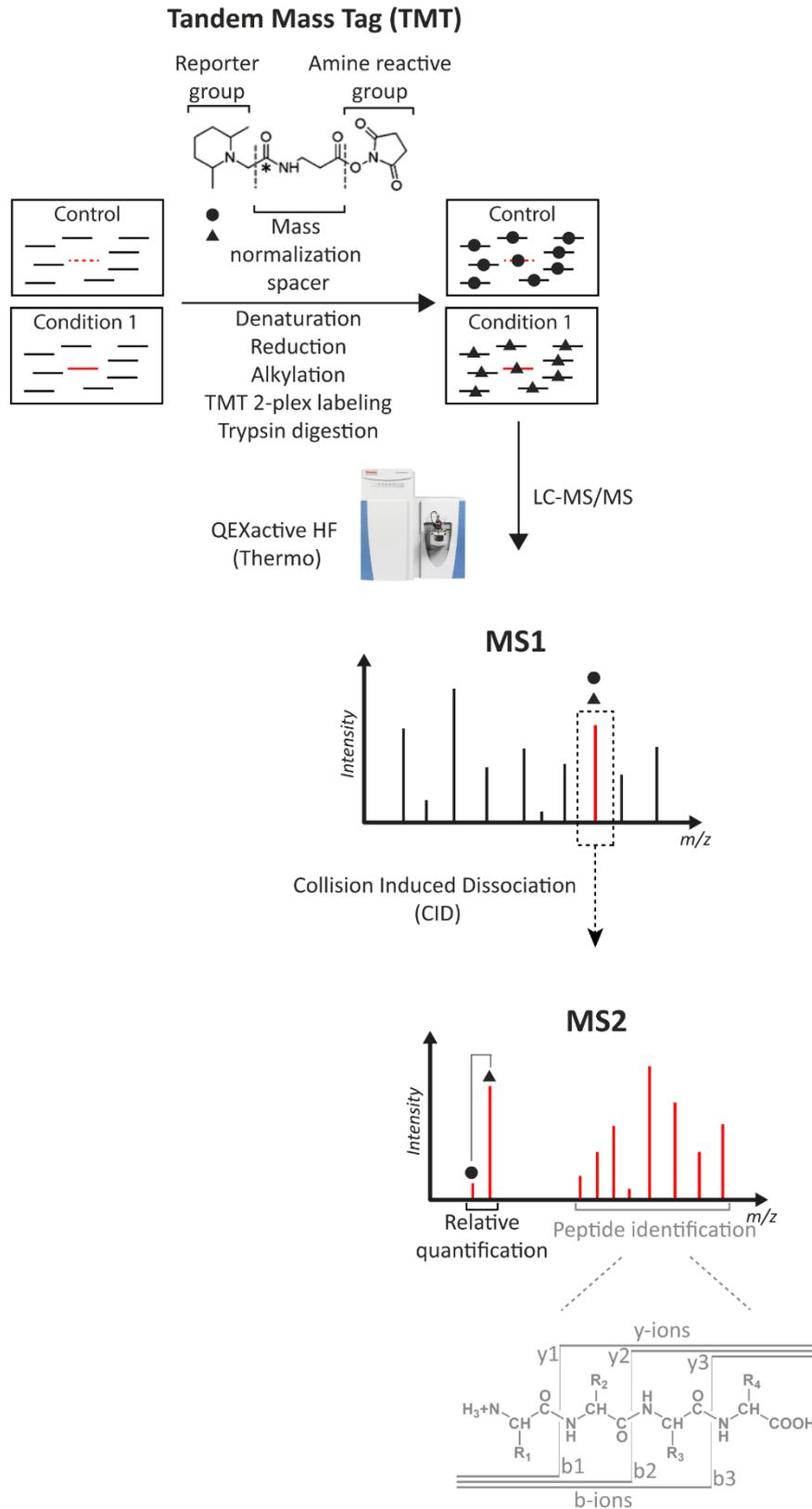


Figure 41. Processus expérimental de protéomique quantitative basée sur un marquage TMT. Les protéines issues de différentes sources biologiques plus ou moins complexes (milieu de culture, cellules, extraits de tissus, fluides corporels...) sont dénaturées, réduites, alkylées, marqués au TMT et digérées à la trypsine avant analyse LC-MS/MS.

Protéomiques quantitative appliquée aux CSM en hydrogel de fibrine

Personnes impliquées. David TONG (Master 2, Biotechnologies/UGA ; 2020-2021), Alicia REUZEAU (Master 2 Biologie cellulaire/UCBL ; 2021-2022), Joévin BARRIER (Assistant ingénieur CNRS ; 2021-2022)

Adaptation du protocole de préparation des échantillons pour l'analyse TMT-MS/MS

Les analyses LC-MS/MS nécessite la préparation d'échantillons protéiques analysables ; c'est-à-dire, sans protéines surreprésentées, telles que l'albumine ou la fibrine, qui augmentent le niveau de fond et pourraient affecter l'identification des protéines/peptides. Cette limitation est particulièrement vraie pour les cellules souches de pulpe dentaire cultivées dans des hydrogels de fibrine. Il existe différentes approches afin d'augmenter la couverture de détection telles que l'utilisation de méthodes de fractionnement, à travers une échangeuse de cations par exemple, pour générer 2 ou 3 fractions. Cette approche a l'inconvénient d'augmenter le temps d'analyse machine. Nous avons récemment réussi à réduire ce risque grâce à un protocole faisant appel à un milieu spécifiquement dédié, sans albumine, et à l'utilisation d'une procédure de lyse mécanique suivie d'une centrifugation afin de séparer la matrice de fibrine présente sous forme insoluble. Une première expérience pilote montre que ce protocole ainsi développé permet d'identifier 2892 protéines dont des collagènes, des protéases extracellulaires et des intégrines (Fig. 42). Cette expérience suppose également que des méthodes de fractionnement des échantillons ne sont pas nécessaires.

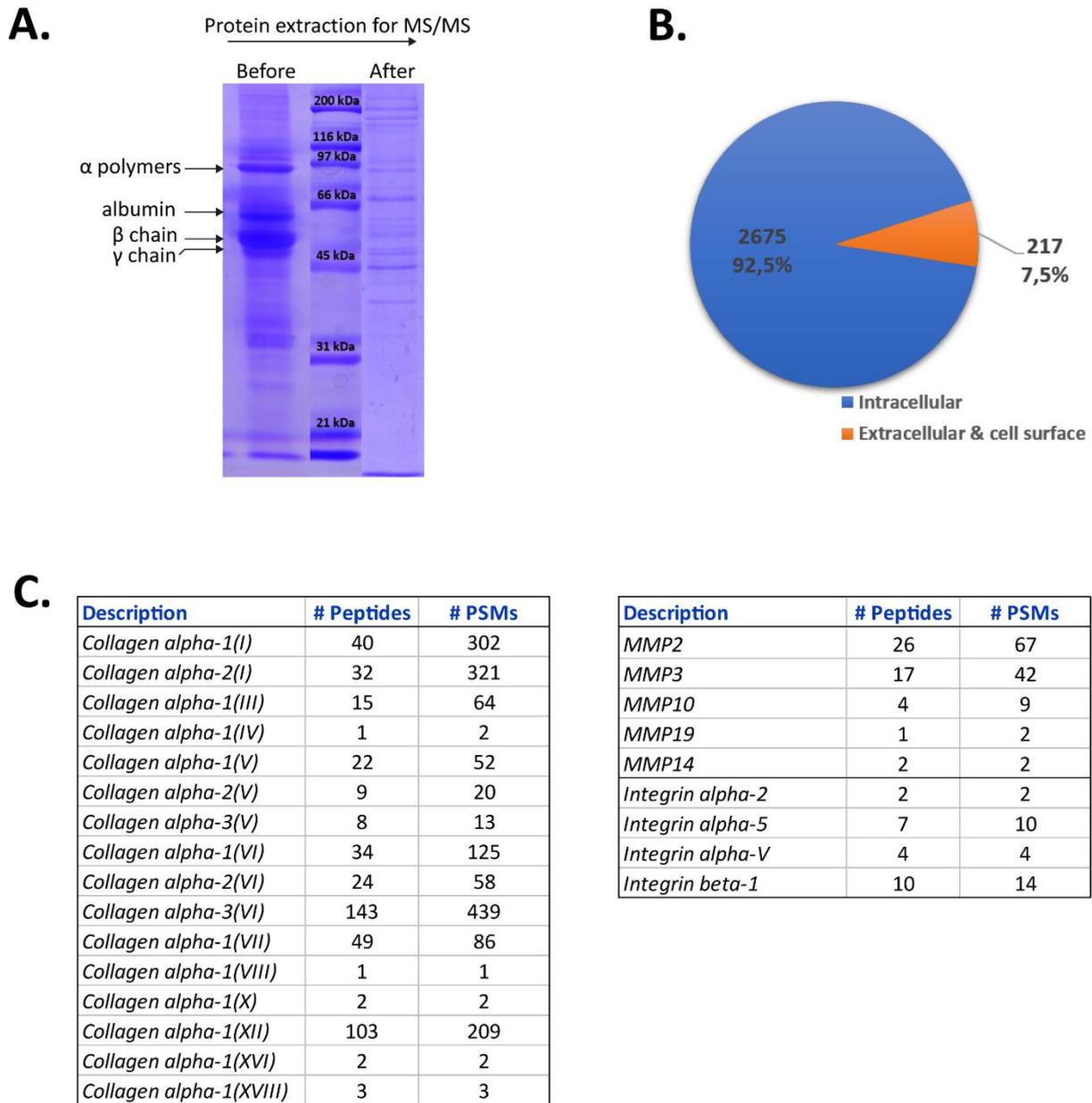


Figure 42. Préparation d'échantillon protéiques issus de CSM en hydrogel de fibrine pour l'analyse MS/MS. (A) SDS-PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie d'un échantillon avant et après extraction protéique. (B) Nombre de protéines identifiées par MS/MS à partir des protéines extraites de CSM-PD cultivées en hydrogel de fibrine. (C) Tableau rapportant quelques exemples de protéines extracellulaires identifiées par MS/MS ainsi que le nombre de peptides uniques identifiés et le nombre de fois où ces peptides ont été observés par l'appareil ("PSM ; peptide spectral match").

Identification protéomique des protéines différenciellement exprimées au cours du temps

En accord avec les résultats précédents montrant la surexpression de la sous-unité intégrine $\alpha 2$, les analyses ont été centrées sur des temps précoces, entre 0 et 4 jours, afin de se concentrer sur l'analyse des mécanismes initiés en hydrogel et en supposant que ces derniers conditionnent les mécanismes de réparation tissulaire et constituent des étapes clés pour une future régulation. Ainsi les analyses ont été réalisées à 0, 2 et 4 jours. Les analyses de spectrométrie de masse incluent 6

donneurs au total, 3 de sexe masculin et 3 de sexe féminin, afin d'exclure les biais de genre ainsi que les biais liés à la variabilité inter-individus. Afin d'optimiser la quantité de protéines injectable ; les expériences sont réalisées en 2 expériences de TMT-9Plex, chacune incluant les CSM-PD de 3 donneurs cultivées en hydrogel de fibrine et dont les protéines ont été extraites aux temps 0, 2 et 4 jours. Les résultats issus de la première expérience réalisée en 2021 par David TONG (stagiaire M2 – UGA – 2021) sont rapportées ici pour illustration. La seconde expérience est en cours d'analyse dans le cadre d'une approche plus globale (voir partie perspective ; II. 3. f). Les protéines sont extraites selon le protocole préalablement établi.

La première expérience de protéomique quantitative (TMT 9-plex) permet l'identification de 1621 protéines. Cette analyse multiplexée identifie différentes familles de protéines intra- et extracellulaires telles que des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire comme les protéines kinases activées par des agents mitogènes, MAPKs et régulateurs (MAPK1 ; MAPK14 ; MAPKAPK2 ; MCRIP1), des récepteurs de surface (uPARAP/Endo180 ; GPR84 ; LRP1 ; ITGB1...), des collagènes (COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A2, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL7A1, COL18A1, COL12A1) ; des protéoglycanes (HSPG2 ; CSPG4 ; lumican, biglycan, dystroglycan ; decorine...) ainsi que des métalloprotéases (MMP1, MMP2, MMP3, MMP14 ; ADAMTS13). Il est important ici de noter que toute analyse protéomique ne fournit pas une liste exhaustive des protéines mais autorise une cartographie globale et partielle des protéines différentiellement exprimées et identifiables dans le cadre de ce jeu expérimental précis impliquant le multiplexage de 9 conditions expérimentales (Fig. 43A).

Dans le cadre précis de cette première expérience, la distribution de la significativité protéines en fonction de leur ratio J2/J0, rapporté sous la forme d'un diagramme en volcan, met en avant une distribution plus homogène entre les protéines surexprimées et sous-exprimées durant les deux premiers jours (Fig. 43B). Les protéines différentiellement exprimées et de manière significative durant la phase secondaire (entre le deuxième et le quatrième jour) sont essentiellement surexprimées (Fig. 43C). Cette expérience ne nous permet pas d'identifier des protéines sous-exprimées entre les jours 2 et 4 (Fig. 43D).

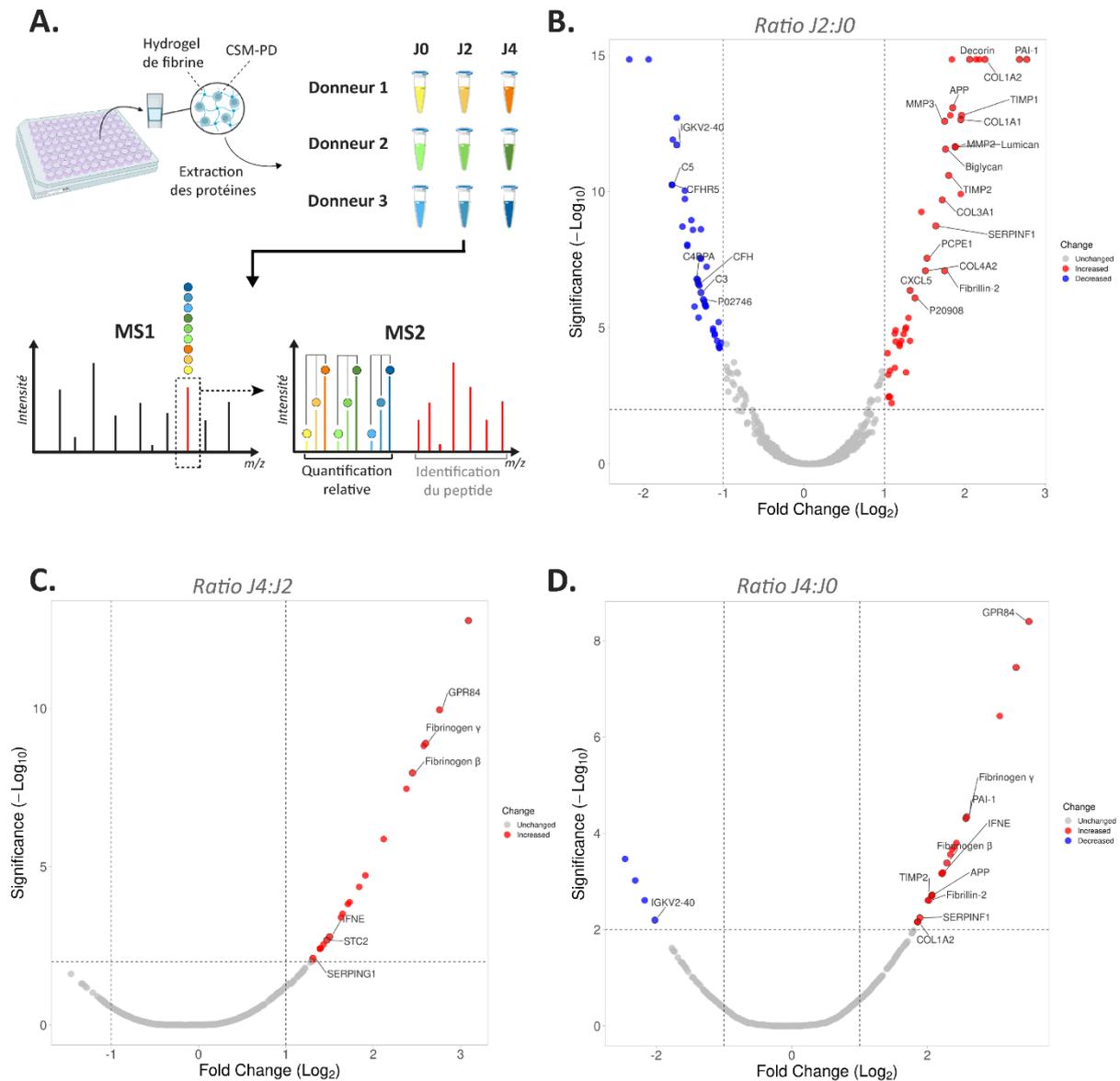


Figure 43. Identification protéomique des protéines différemment exprimées par les CSM-PD en hydrogel de fibrine. (A) Schéma illustrant l'analyse LC-MSMS de 9 conditions expérimentales marquées par un marqueur isobarique différent (TMT 9-Plex). (B) Distribution de la significativité des protéines en fonction de leur ratio J2/J0, rapporté sous la forme d'un diagramme en volcan ("volcano plot") montrant les protéines surexprimées en rouge, les protéines sous-exprimées en bleu ainsi que les protéines pas ou peu affectées (gris). (C) Diagramme en volcan pour le ratio J4/J2. (D) Diagramme en volcan pour le ratio J4/J0.

Cette analyse permet d'identifier 50 protéines différentiellement exprimées durant les deux premiers jours, 21 entre le deuxième et quatrième jour, et 26 entre le jour de départ et le quatrième jour (Tableau 5). En accord avec les résultats de transcriptomique, ces résultats suggèrent que les principales modifications se déroulent durant un temps précoce, pendant les deux premiers jours. Cela n'est pas surprenant dans la mesure où les cellules, changeant d'environnement, vont synthétiser une matrice dérivant de ces dernières. Cependant, nous pouvons noter ici que le nombre de protéines différentiellement exprimées entre les jours 0 et 4 est inférieur au nombre de protéines différentiellement exprimées durant les deux premiers jours supposant qu'un certain nombre de protéines reviennent à un niveau basal durant les jours 3 et 4.

Parmi les protéines surexprimées dans un temps précoce (entre J0 et J2), nous identifions la surexpression de collagènes (types I, III et IV), de protéoglycanes (biglycane, lumican, décorine) et de métalloprotéases (MMP2 et MMP3) (Tableau 5). Nous remarquons également que 82% (41/50) des protéines différentiellement exprimées durant les deux premiers jours sont extracellulaires ou associées à la surface alors que 76,2% des protéines différentiellement exprimées durant la phase secondaire, entre les jours 2 et 4 sont intracellulaires (Tableaux 5-6). Ces résultats indiquent des processus différents entre les deux premiers jours et les deux jours suivants.

Ratio D2:D0					
Accession	Name	#Pept.	#PSMs	FC	P-Val
P05121	PAI-1	15	70	6.83	1.41E-15
P52823	Stanniocalcin-1	3	8	6.41	1.41E-15
P08123	Collagen alpha-2(I)	26	130	4.77	1.41E-15
Q12841	FSTL1	10	30	4.53	1.41E-15
<i>Q5SYB0</i>	<i>FRMPD1</i>	1	5	0.22	1.41E-15
<i>Q8N130</i>	<i>SLC34A3</i>	1	5	4.41	1.41E-15
P07585	Decorin	13	53	4.18	1.41E-15
P22352	GPX3	6	35	0.26	1.41E-15
P26447	S100A4	3	10	3.57	1.41E-15
P05067	APP	4	6	3.61	8.35E-14
P01033	TIMP1	8	24	3.90	1.59E-13
<i>Q9H993</i>	<i>ARMT1</i>	3	5	3.53	1.59E-13
Q969H8	MYDGF	3	4	0.33	1.96E-13
P02452	Collagen alpha-1(I)	33	160	3.87	2.30E-13
P08254	MMP3	5	9	3.37	2.61E-13
<i>Q9NVG8</i>	<i>TBC1D13</i>	1	1	0.32	1.23E-12
A0A087WW87	IGKV2-40	2	5	0.33	1.93E-12
P08253	MMP2	20	69	3.67	2.25E-12
P51884	Lumican	11	33	3.67	2.31E-12
P21810	Biglycan	4	20	3.39	2.78E-12
P16035	TIMP2	7	24	3.48	2.54E-11
P01031	Complement C5	45	125	0.32	5.61E-11
Q9BXR6	CFHR5	8	30	0.32	5.64E-11
Q9UGM5	Fetuin-B	2	4	0.36	9.21E-11
P0DOX6	IGM	1	64	3.87	1.23E-10
P06331	IGHV4-34	2	6	0.36	1.86E-10
P02461	Collagen alpha-1(III)	13	45	3.29	2.02E-10
<i>P29373</i>	<i>CRABP2</i>	2	4	0.36	9.21E-11
<i>P46060</i>	<i>RANGAP1</i>	3	4	0.38	1.12E-09
P36955	SERPINF1	13	44	3.11	1.81E-09
P08697	Alpha-2-antiplasmin	11	39	0.35	1.92E-09
P02652	Apolipoprotein A-II	1	5	0.41	2.42E-09
<i>Q9NQS1</i>	<i>AVEN</i>	1	1	0.39	2.54E-09
P05160	Coagulation factor XIII B	33	245	0.37	8.79E-09
P00747	Plasminogen	33	112	0.37	9.89E-09
Q15113	PCOLCE	14	47	2.88	2.78E-08
P01772	IGHV3-33	1	9	0.41	2.68E-08
<i>Q15637</i>	<i>Splicing factor 1</i>	2	2	0.41	2.94E-08
<i>P15374</i>	<i>UCHL3</i>	3	6	0.43	5.73E-08
P35556	Fibrillin-2	2	10	3.36	8.03E-08
P08572	Collagen alpha-2(IV)	4	7	2.84	8.03E-08
P04003	C4b-binding protein alpha	19	84	0.40	1.62E-07
P0DOY2	IGLC2	3	49	0.40	1.72E-07
P01834	IGKC	6	57	0.40	2.05E-07
P08603	Complement factor H	23	85	0.40	2.51E-07
P23142	Fibulin-1	30	161	0.41	2.85E-07
P42830	CXCL5	2	6	2.50	4.30E-07
P01024	Complement C3	85	365	0.41	5.15E-07
P20908	Collagen alpha-1(V)	16	41	2.61	8.12E-07
P02746	C1QB	6	23	0.42	9.30E-07

Tableau 5. Liste des protéines différemment exprimées par les CSM-PD en gel de fibrine entre le jour 0 et deuxième jour. Les protéines sous-exprimées sont rapportées en gris. Les protéines intracellulaires sont en italique.

Ratio D4:D2					
Accession	Name	#Pept.	#PSMs	FC	P-Val
P49137	MAPKAPK2	1	1	8.51	1.67E-13
Q9NQS5	GPR84	2	5	6.78	1.10E-10
P02679	Fibrinogen γ	26	513	6.06	1.26E-09
Q96HU8	DIRAS2	1	3	5.98	1.51E-09
P02675	Fibrinogen β	29	512	5.48	1.08E-08
P20700	Lamin-B1	5	12	5.21	3.43E-08
Q3KQV9	UAP1L1	1	1	4.33	1.33E-06
Q9Y2G1	MYRF	1	2	3.76	1.90E-05
Q16891	IMMT	2	2	3.58	4.36E-05
P84243	H3-3A	3	10	3.31	1.33E-04
Q96JJ6	JPH4	1	2	3.28	1.52E-04
Q96M86	DNHD1	1	4	3.14	3.07E-04
Q14376	GALE	2	4	3.09	4.01E-04
Q86WN2	IFNE	1	6	2.83	1.64E-03
O76061	Stanniocalcin-2	3	4	2.78	2.08E-03
Q7L7L0	HIST3H2A	2	20	2.69	2.87E-03
P02545	LMNA	39	132	2.63	3.79E-03
P11021	HSPA5	31	170	2.63	3.87E-03
Q13492	PICALM	6	9	2.62	3.93E-03
P05155	SERPING1	3	5	2.49	7.86E-03
P24752	ACAT1	3	9	2.45	9.40E-03

Tableau 6. Liste des protéines différenciellement exprimées par les CSM-PD en gel de fibrine entre le deuxième et le quatrième jour. Les protéines intracellulaires sont en italique.

Ratio D4:D0					
Accession	Name	#Pept.	#PSMs	FC	P-Val
Q9NQS5	GPR84	2	5	11.31	4.02E-09
P49137	MAPKAPK2	1	1	9.95	3.61E-08
P20700	LMNB1	5	12	8.40	3.69E-07
P05121	PAI-1	15	70	5.99	4.57E-05
P02679	Fibrinogen γ	26	513	5.94	4.92E-05
Q9Y2G1	MYRF	1	2	5.39	1.58E-04
Q96JJ6	JPH4	1	2	5.29	1.92E-04
Q96HU8	DIRAS2	1	3	5.18	2.16E-04
Q8N130	SLC34A3	1	5	5.07	2.76E-04
Q5SYB0	FRMPD1	1	5	0.18	3.42E-04
P02675	Fibrinogen β	29	512	4.88	4.15E-04
Q3KQV9	UAP1L1	1	1	4.70	6.51E-04
Q86WN2	IFNE	1	6	4.65	6.88E-04
P84243	H3-3A	3	10	4.62	6.88E-04
P22352	GPX3	6	35	0.20	9.58E-04
P52823	Stanniocalcin-1	3	8	4.21	1.93E-03
P16035	TIMP2	7	24	4.19	1.93E-03
P05067	APP	4	6	4.19	1.93E-03
Q14376	GALE	2	4	4.17	2.01E-03
P05204	HMG2	4	16	0.22	2.47E-03
P35556	Fibrillin-2	2	10	4.04	2.47E-03
Q7L7L0	HIST3H2A	2	20	4.03	2.47E-03
A0A087WW87	IGKV2-40	2	5	0.25	6.36E-03
P36955	SERPINF1	13	44	3.70	5.69E-03
P08123	Collagen alpha-2(I)	26	130	3.62	6.91E-03
Q16891	IMMT	2	2	3.61	6.94E-03

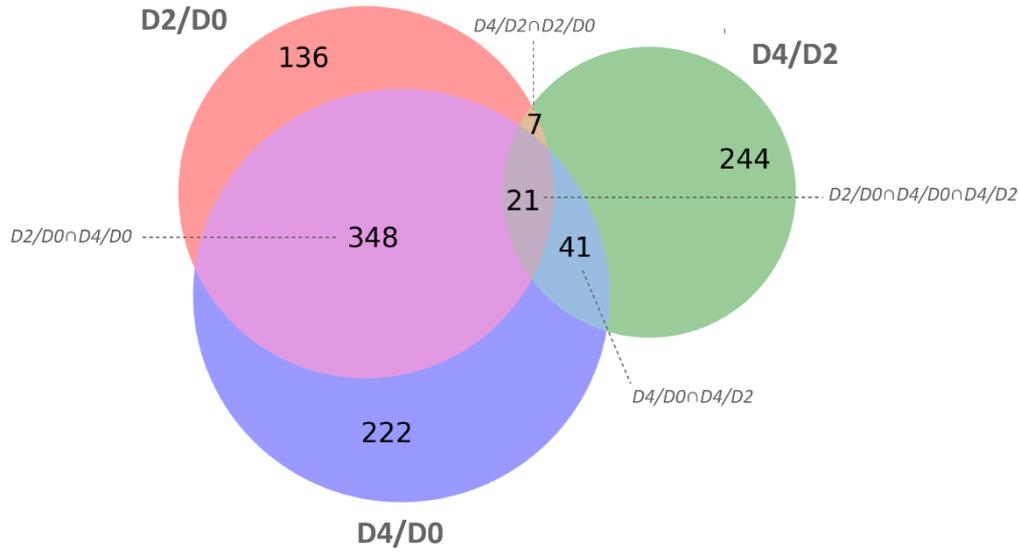
Tableau 7. Liste des protéines différenciellement exprimées par les CSM-PD en gel de fibrine entre le jour 0 et quatrième jour. Les protéines sous-exprimées sont rapportées en gris. Les protéines intracellulaires sont en italique.

Des analyses d'annotations fonctionnelles ont été réalisées afin d'apprécier les mécanismes moléculaires et biologiques associés à ces ensembles de protéines différentiellement exprimées (Fig. 44). Les résultats montrent clairement, là encore, une différence entre les processus biologiques associés aux protéines différentiellement régulées durant les deux premiers jours par rapport aux protéines différentiellement régulées entre le deuxième et le quatrième jour (Tableaux 5-7). Les processus liés aux protéines différentiellement régulées sur l'ensemble des quatre jours sont principalement communs des processus identifiés durant les deux premiers jours (Fig. 44A). Ces principaux mécanismes sont liés à une réponse immunitaire, principalement innée, due à la présence de protéines du complément (C1Q, C3, C4, C5) ou de cytokines (IFNE) notamment (Fig. 44B, Tableau 5). Ces processus impliquent également des mécanismes de remaniement de la matrice extracellulaire, de cicatrisation et de phagocytose (Fig. 44B). De manière commune, on retrouve des mécanismes liés à la fibrinolyse et à la cicatrisation. Durant les deux premiers jours, on retrouve des activités de type endopeptidases jouant un rôle important dans l'orchestration de ces remaniements matriciels. Ces processus sont notamment dus à l'identification de protéases telles que les MMP2 et 3 (fig. 44B ; Tableau 5). Entre les jours 2 et 4, les processus biologiques sont associés à la modification de la morphologie des cellules, à leur étalement et leur division. Cette réponse secondaire semble donc être différente de la réponse primaire et conforte la différence observée au niveau transcriptionnel.

L'ensemble de ces résultats semblent indiquer que la réponse des cellules souches de pulpe dentaire en hydrogel de fibrine se décompose en deux étapes dont une première étape précoce, durant les deux premiers jours, liée à la dégradation de l'environnement ainsi qu'à la néosynthèse matricielle. L'étape secondaire, entre les jours 2 et 4, met en avant l'adaptation de morphologie des cellules, leur étalement ainsi que leur division. Cette première expérience réalisée par David TONG (Stagiaire M2, Université Grenoble-Alpes, 2020-2021) implique des cellules issues de trois donneurs : deux de sexe féminin (âgées 13 et 15 ans) et un de sexe masculin (âgé de 15 ans). Afin d'enrichir les données et réduire les biais de genre une seconde expérience a été réalisée incluant trois donneurs également : deux de sexe masculin (âgés de 15 et 16 ans) et un de sexe féminin (âgée de 17 ans). Cette seconde expérience a été réalisée par Alicia REUZEAU (stagiaire Master 2 Biologie cellulaire, Université Lyon 1) et Joévin BARRIER (Assistant Ingénieur CNRS), recruté pour une durée de 12 mois, dans le cadre de l'ANR TRIDENTOMIC.

Afin de confirmer la pertinence de ces résultats, des validations par des méthodes de biologie moléculaire (RT-qPCR) et de biochimie (immunoblot) ont été entreprises.

A.



B.

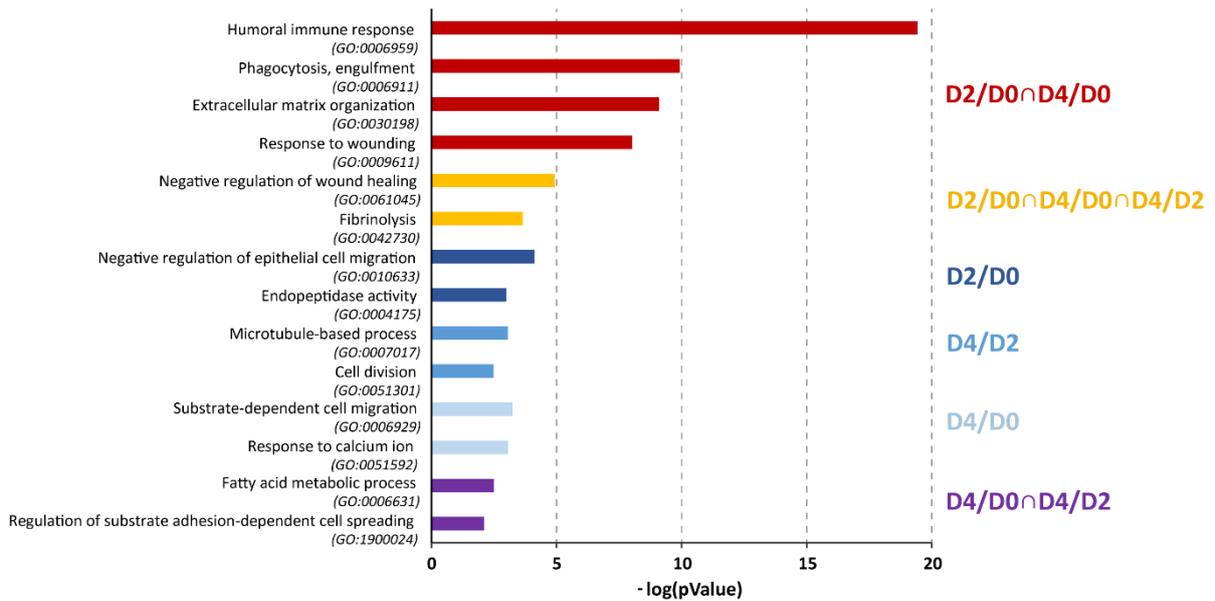


Figure 44. Processus biologiques associées aux protéines différenciellement exprimées.

Analyse des annotations fonctionnelles suite à l'interrogation de la base Gene Ontology (GO) par les ensembles de protéines différenciellement exprimées par les CSM-PD en hydrogel de fibrine. L'ensemble des processus biologiques identifiés sont rapportées sous forme de diagramme de Venn afin de comparer globalement les processus au cours du temps. (B) Les processus biologiques les plus pertinents sont rapportées sous forme de diagramme. Le numéro d'accèsion du terme GO est rapporté entre parenthèse.

Validation de biomolécules identifier par -omique

Identification des récepteurs intégrines impliqués dans l'interaction CSM-PD/fibrine

L'interaction des cellules avec l'hydrogel de fibrine joue un rôle dans la réponse des cellules à cet environnement qui ne leur est pas habituel et par conséquent dans la néosynthèse du tissu qui en dérive. Dans un premier temps, nous avons ciblés les intégrines, des récepteurs connus pour jouer un rôle primordial dans la réponse des cellules à leur environnement (157,158). Les données -omiques mettent en évidence la surexpression de la sous unité intégrine $\alpha 2$. Les résultats de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), d'immunoblot et d'immunofluorescence confirment l'augmentation rapide et importante du taux de transcrits et protéique de la sous-unité $\alpha 2$ impliquée dans le remodelage tissulaire (Fig. 45) (159).

Les intégrines sont capables de transmettre des signaux de l'extérieur, à partir de la MEC, vers l'intérieur de la cellule et du cytosquelette ("*outside-in*") ; et de l'intérieur vers l'intérieur ("*inside-in*") à partir d'endosomes internalisés (160,161). La localisation de l'ITGA2 dans les CSM-PD a par conséquent été évaluée par immunofluorescence afin de préciser de quel type de signalisation il s'agit. Cette dernière expérience confirme clairement une surexpression de l'ITGA2 à la surface des CSM-PD caractéristique d'une signalisation "*outside-in*" (Fig. 45C).

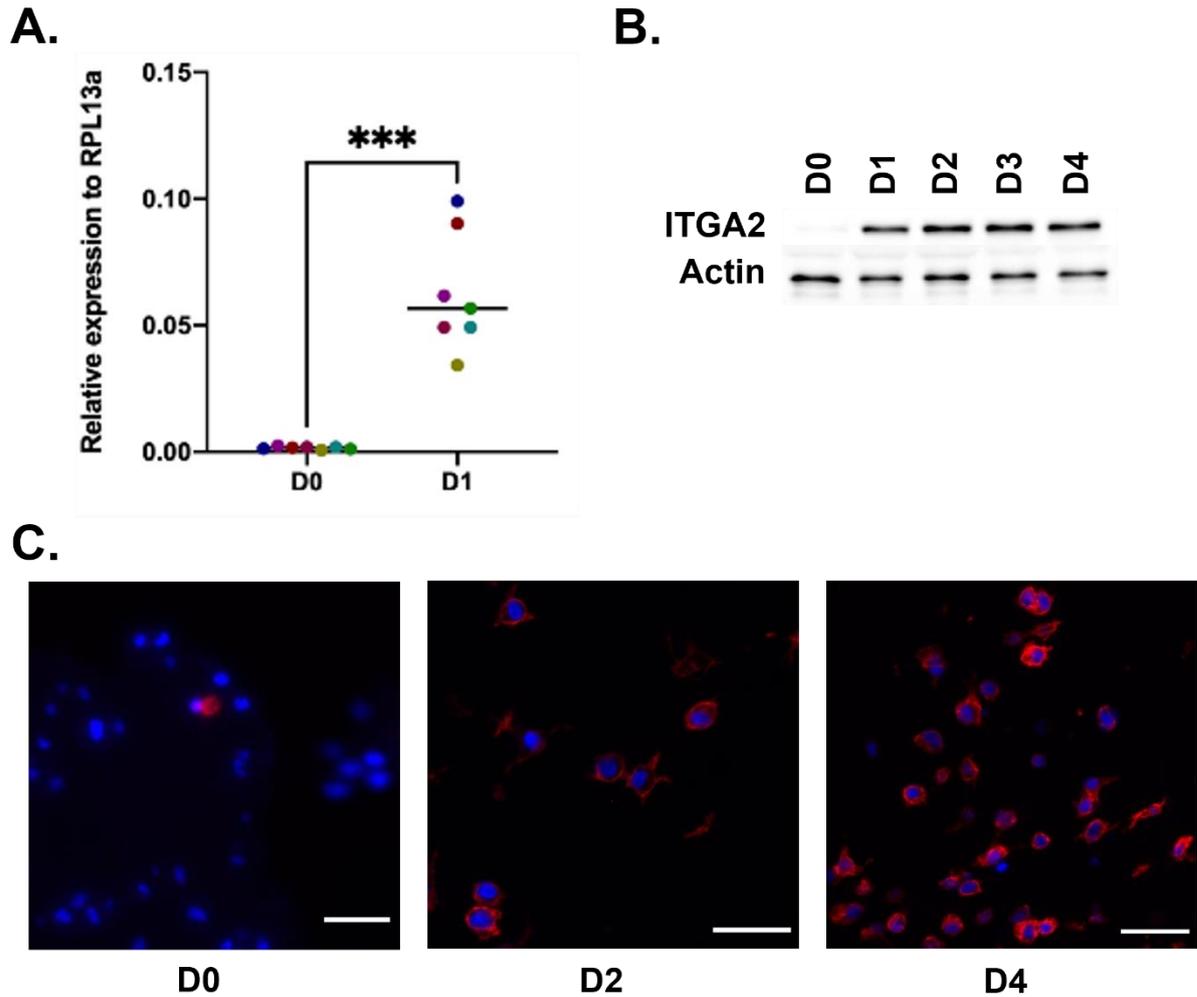


Figure 45. Surenexpression de la sous-unité intégrine $\alpha 2$ par les CSM-PD en hydrogel de fibrine. (A) Niveau de transcript de la sous-unité intégrine $\alpha 2$ évalué par RT-qPCR à 0 ; 24h (D0 et D1). L'étude a été réalisée à partir de CSM-PD de différents donneurs ($n = 7$) cultivées en hydrogel de fibrine. *** p value <0.001 . (B) Niveau protéique de l'ITGA2 visualisé par immunoblot à partir d'extraits protéiques issues de CSM-PD cultivées en hydrogel de fibrine aux temps 0, 24, 48,72 et 96h (D0, D1, D2, D4). (C) Marquage immunofluorescent de la sous-unité intégrine $\alpha 2$ à la surface des CSM-PD à 0, 2 et 4 jours (D0 et D4).

Afin d'évaluer la spécificité de cette surexpression, nous avons également étudié les sous unités intégrines $\alpha 1$, $\alpha 2$, αV , $\beta 1$ et $\beta 3$ connues pour être exprimées à la surface des cellules mésenchymateuses (59,159). Aucune différence significative n'est observée pour ces sous-unités ce qui suggère que les CSM-PD surexpriment, de manière relativement spécifique, la sous unité intégrine $\alpha 2$ en hydrogel de fibrine (Fig. 46).

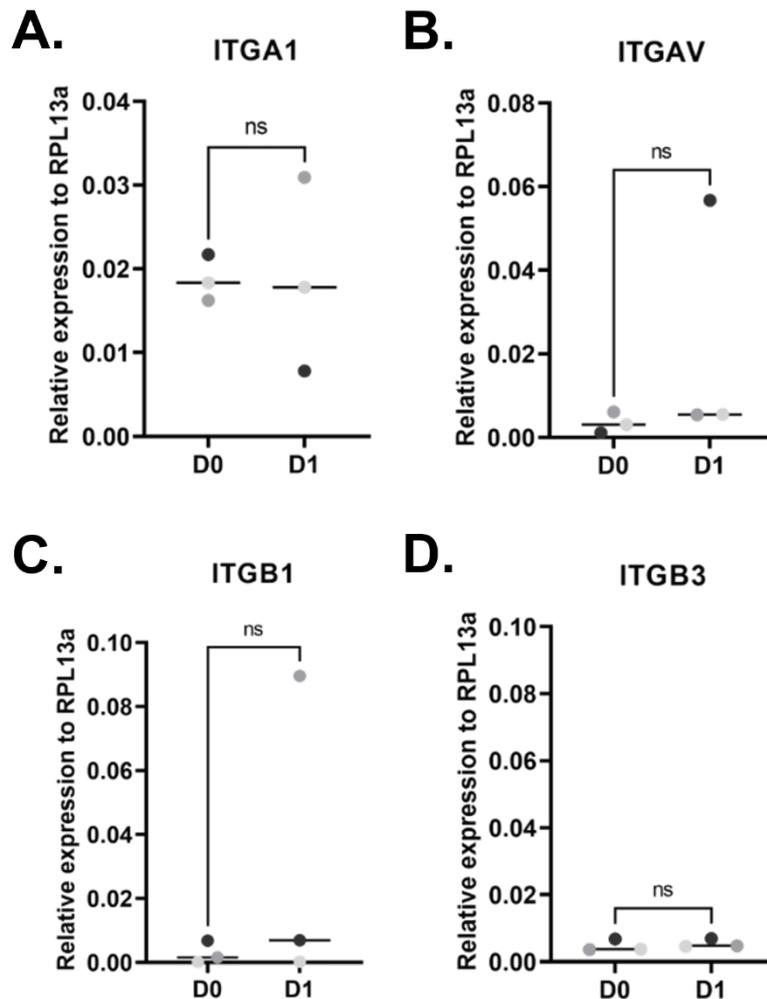


Figure 46. Niveau de transcrit des intégrines (ITG) des cellules mésenchymateuses. (A) Niveau de transcrit des intégrines (ITG) connues pour interagir avec le collagène (ITGA1, ITGB1) ou la fibrine (ITGAV, ITGB3) évalué par RT-qPCR entre 0 et 24h (D0 et D1). L'étude a été réalisée à partir de CSM-PD de différents donneurs (n= 3) cultivées en hydrogel de fibrine durant un jour (D0 et D1 respectivement pour jour 0 et jour 1). ***pvalue*<0.01; ****pvalue*<0.001; ns: non-significatif.

Expression des métalloprotéases MMP1 et MMP3 par les CSM-PD en hydrogel de fibrine

Des études ont été menées afin de valider l'expression des MMP1 et 3 potentiellement impliquées dans les mécanismes de dégradation de l'hydrogel et de néosynthèse tissulaire.

Ces résultats montrent une augmentation rapide et importante du taux de transcrits de la collagénase MMP1 ainsi que de la stromelysine MMP3 (Fig. 47). Cette augmentation au niveau transcriptionnel se traduit par une augmentation de la quantité de protéine. Alors que les niveaux protéiques de l'ITGA2 et de la MMP1 augmentent, ou sont stables, au cours du temps ; il semblerait que le niveau protéique de la MMP3 atteigne son maximum d'intensité au deuxième jour et décline ensuite au terme du quatrième jour. Des études sont actuellement menées afin de mieux comprendre le rôle de ces biomolécules dans le remodelage de l'hydrogel de fibrine.

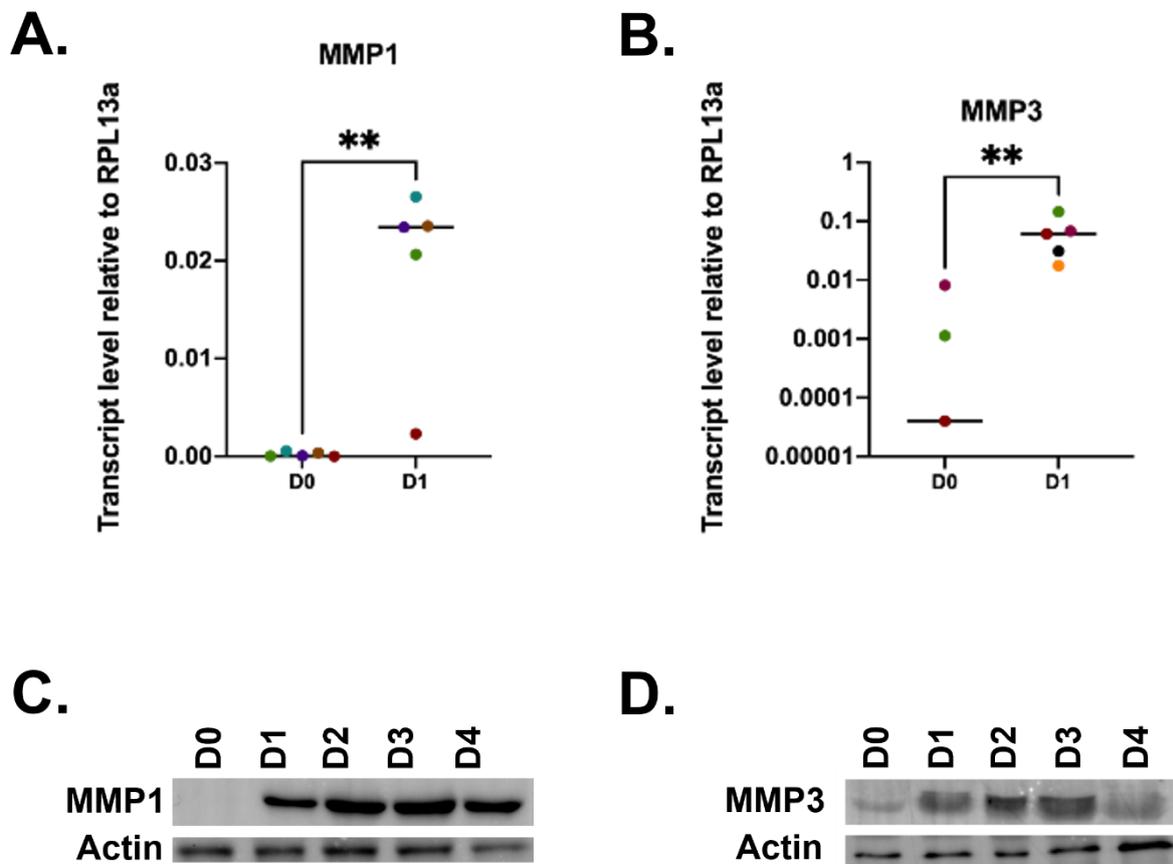


Figure 47. Validation des MMP1 et MMP3 surexprimées par les CSM-PD en hydrogel de fibrine. (A-B) Niveaux de transcrit de la MMP1 (A) et de la MMP3 (B) évalués par RT-qPCR entre 0 et 24h (D0 et D1). L'étude a été réalisée à partir de CSM-PD de différents donneurs (n = 5) cultivées en hydrogel de fibrine durant un jour. ***pvalue*<0.01; ****pvalue*<0.001. (C-D) Niveaux protéiques de la MMP1 (C) et de la MMP3 (D) déterminés par immunoblot à partir d'extraits protéiques issues de CSM-PD de cultivées en hydrogel de fibrine.

N-terminomique pour l'identification du dégradome des CSM en hydrogel de fibrine

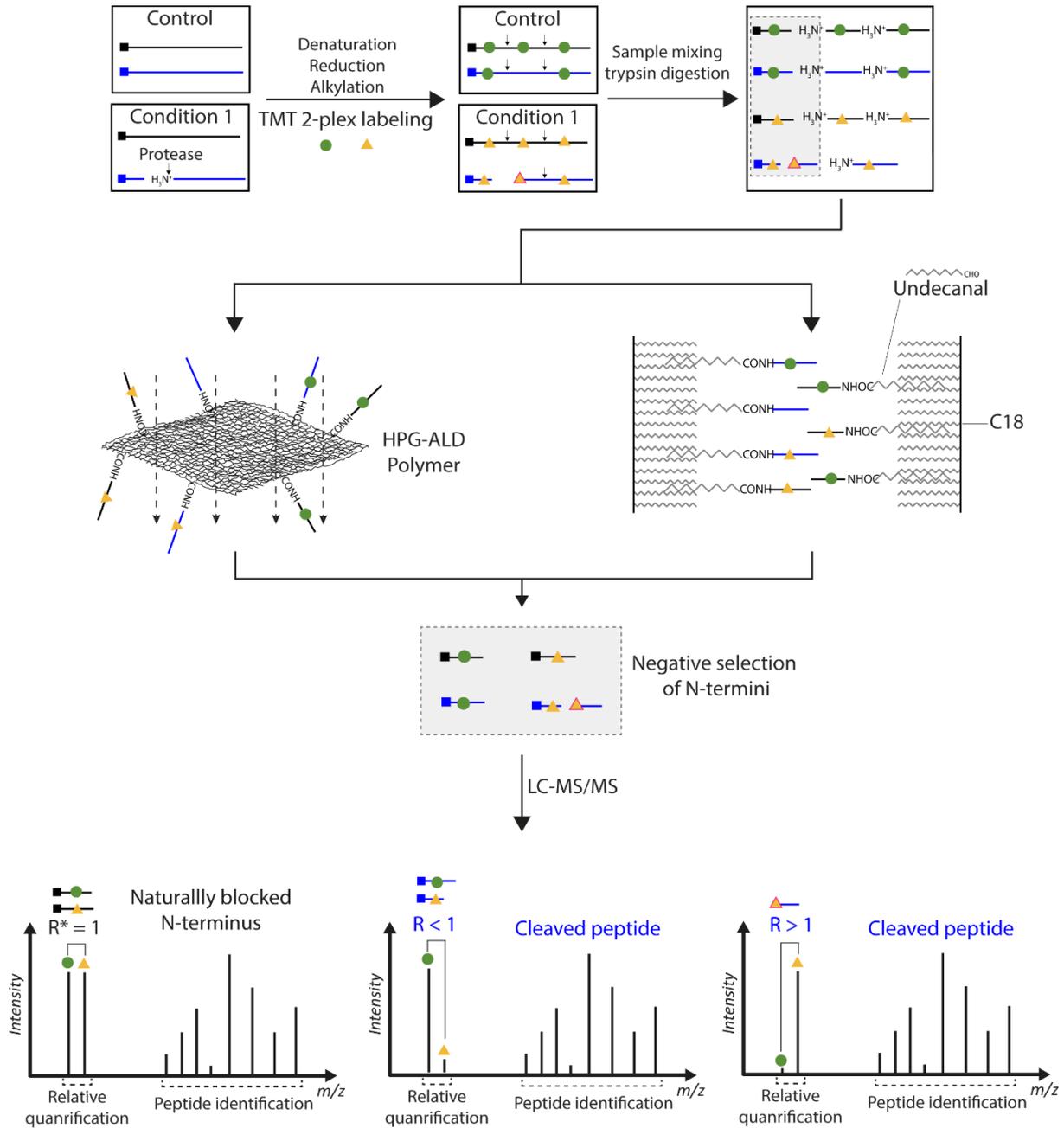
Personnes impliquées. Sean THIERRY (Master 2, Biotechnologies/UGA ; 2022-2023), Camille GIROLET (Master 2, Biotechnologies/UGA ; 2022-2023)

Adaptation du protocole de préparation des échantillons pour l'analyse N-terminomique

Les progrès de la protéomique donne accès à l'identification à haut débit des événements protéolytiques à partir de milieux complexes. Cette méthode, appelée N-Terminal Amine Labeling of Substrates (N-TAILS), a été développée en 2010 et utilisée à l'origine pour découvrir les substrats des protéases (162). Elle consiste en la quantification relative multiplexée des néo-N-termini générés par la protéolyse. Cette méthode N-terminomique est centrée sur l'analyse des peptides N-terminaux des protéines. Ces peptides sont enrichis par une sélection négative. A l'origine, cette sélection était opérée à l'aide d'un polymère qui piège les peptides internes des protéines présentant des amines primaires N-terminales libres générées par la trypsine. Cette méthode permet d'identifier les néo-N-termini générés par les protéases qui présentent donc un rapport (protéase/témoin) supérieur à 1 selon la condition étudiée par rapport aux N-termini naturels (Fig. 48).

Cette technique de N-terminomique, ou N-TAILS, a été utilisée avec succès pour déterminer les substrats de MMP2, MMP9(163), MMP25 (164), ADAMTS7 (165), et des méprines (α et β) (166,167). Le coordinateur a été le premier à utiliser les N-TAILS sur les protéases ADAMTS2, 3 et 14 *in vitro* (168) et *in vivo* à partir d'échantillons complexes de peau de souris (141). Le N-TAILS a également été utilisé pour étudier la progression de la cicatrisation en utilisant des exsudats de plaies porcines et humaines (169). Utilisé dans le cadre du projet de protéome humain centré sur le chromosome, N-TAILS a permis d'identifier 17 produits protéiques manquants dans la PD, tous étant des candidats pour des gènes codant pour des protéines (129).

Nous avons préalablement entrepris d'actualiser le protocole de N-TAILS, notamment en modifiant le protocole de sélection négative des extrémités N-terminale. Le nouveau protocole permet ainsi de s'affranchir du polymère HPG-ALD ("Hyper branched Polyglycerol and ALDehyde polymer") et de réduire des étapes de précipitation des échantillons. Ce nouveau protocole visant à enrichir les extrémités N-terminale dit "HUNTER" ("*High-efficiency Undecanal-based N Termini EnRichment* ") est basé sur le couplage des peptides internes des protéines, présentant une extrémité N-terminale libre, à un aldéhyde présentant une chaîne hydrocarbonée de 10 carbones ($C_{11}H_{22}O$; undecanal) afin que ces derniers soient retenus sur une colonne C18 (170).



$R^* = \text{Condition 1} / \text{Control}$

Figure 48. Protocole TAILS. Cette approche est basée sur la comparaison différentielle entre un échantillon contrôle et une condition présentant des activités protéolytiques (condition 1). Les deux échantillons traités à l'aide de deux marqueurs isobariques distincts (TMT, cercles et triangles) qui marquent et bloquent simultanément toutes les amines primaires libres, y compris les N-termini des protéines, les résidus lysine internes et les néo-amines terminales générées par protéolyse (triangle entouré de rouge). Les deux échantillons sont regroupés et soumis à une digestion à la trypsine pour générer des peptides internes et C-terminaux ayant des N-terminaux libres. Une procédure de sélection négative des peptides ayant une extrémité N-terminale bloquée (naturellement ou par un marquage TMT) est réalisée. Cette sélection négative est basée sur l'utilisation d'un aldéhyde, polymère HPG-ALD ou undecanal ; liant les extrémités N-terminales libres générées par la trypsine. Les peptides sélectionnés sont soumis à une analyse MS/MS permettant la quantification relative des peptides marqués, leur identification et la séquence du site de clivage. Les extrémités N-terminales d'origine, présentes dans les deux échantillons, résulteront à un rapport condition/contrôle proche de 1, tandis que les peptides ayant une nouvelle extrémité N-terminale générée par un événement protéolytique auront rapport significativement > 1 . Une preuve indirecte de la disparition du peptide clivé peut-être donnée par un rapport < 1 . La pertinence du ratio peut être estimée par rapport à la distribution normale des extrémités N-terminales naturellement bloquées (acétylation, cyclisation, méthylation...).

Le protocole de N-terminomique a également été adapté à l'analyse multiplexée des échantillons protéiques issus des CSM-PD en hydrogel de fibrine. Ainsi les protéines ont été extraites dans les mêmes conditions que pour la protéomique quantitative (TMT-9Plex). Une première expérience pilote a été réalisée afin d'évaluer l'efficacité de ce protocole ainsi adapté (Fig. 49). L'objectif de cette expérience étant d'estimer la capacité de ce protocole à sélectionner les extrémités N-terminales ; les protéines n'ont pas été marquées au TMT. Les résultats montrent que ce protocole fonctionne et permet d'enrichir les extrémités N-terminales naturellement bloquées de 1 à 70% respectivement avant et après sélection N-terminale (Fig. 49B).

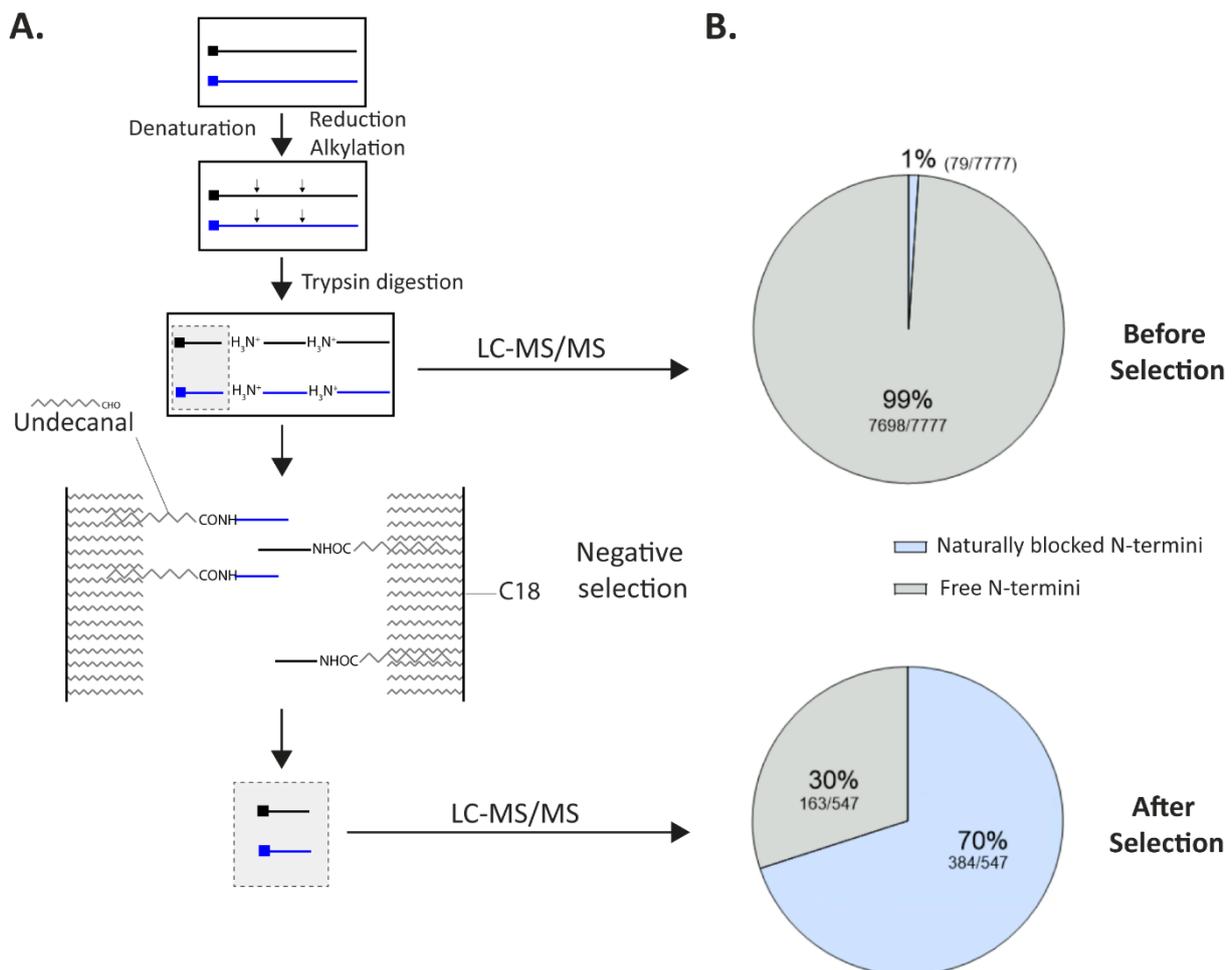


Figure 49. Test du protocole de sélection HUNTER. (A) Schéma récapitulatif des étapes du test de sélection négative. Les échantillons sont analysés par LC-MS/MS avant et après sélection. (B) Quantification des extrémités N-terminales libres (gris) et naturellement bloquées (bleu).

D'autre part les conditions expérimentales ont également été adaptées afin d'optimiser l'analyse N-terminomique multiplexée des échantillons protéiques issus des CSM-PD en hydrogel de fibrine. En effet ; les quantités de peptides étant, *de facto*, plus faibles après sélection négative ; les expériences de N-terminomique ont été réalisées en 6-Plex incluant un donneur de chaque sexe dans chaque expérience. Au total, 3 expériences ont été réalisées et sont en cours d'analyse. Les

résultats issus de la première analyse (6-Plex), ont rapidement été parcourus (Fig. 50). Après marquage et sélection N-terminale, cette première expérience identifie 2130 peptides dont 78 % de peptides bloqués au niveau de leur extrémité N-terminale incluant 12 % de peptides marqués en position N-terminale (Fig 50A).

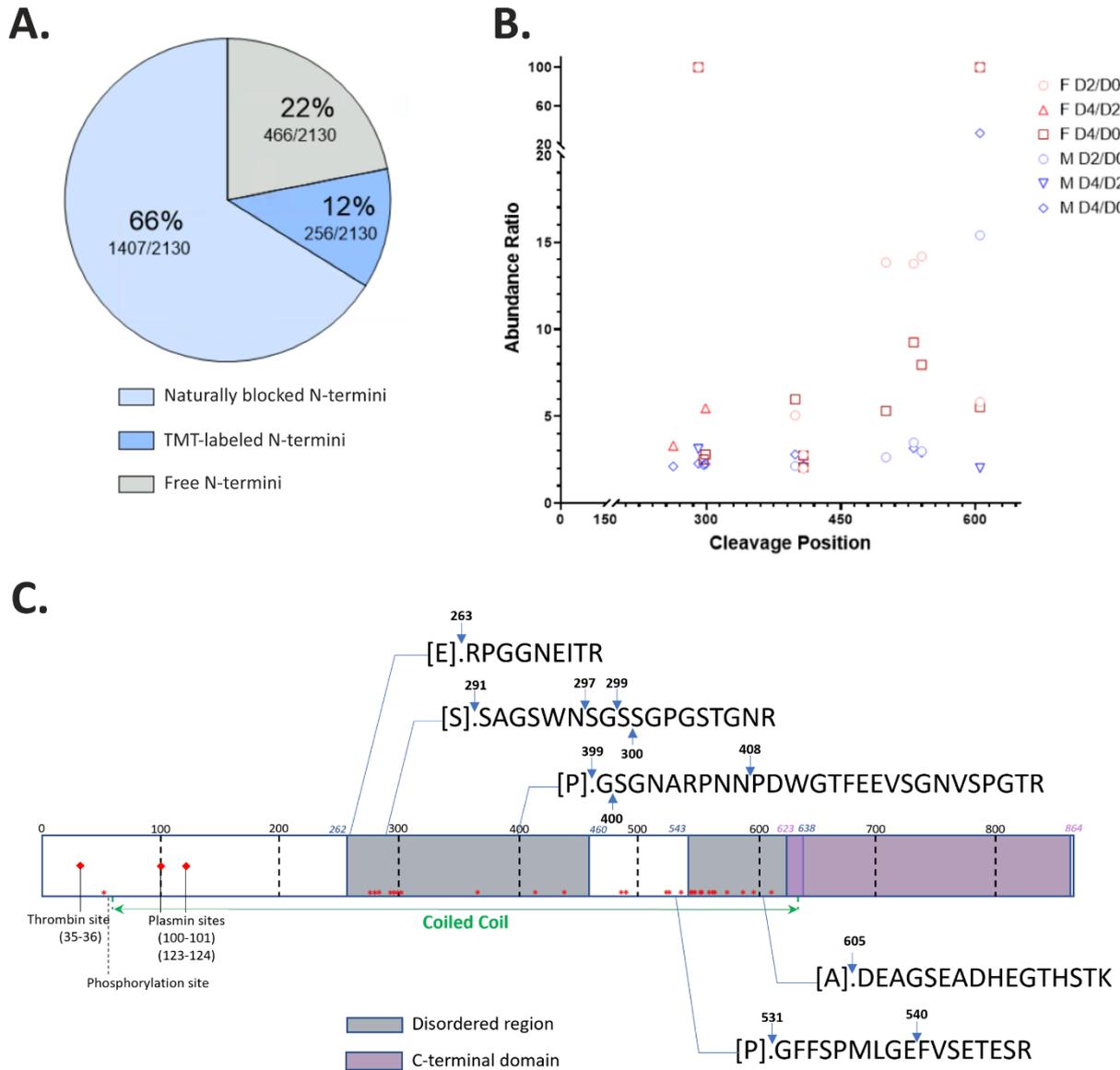


Figure 50. N-terminomique appliquée aux CSM-PD en hydrogel de fibrine. Expérience de N-terminomique incluant les cellules issues de deux donneurs de sexe différents. Les extraits protéiques issus des cellules cultivées en hydrogel de fibrine à différents temps 0 (D0), 2 jours (D2) et 4 jours (D4) sont sujets au protocole de N-terminomique. (A) Proportion de peptide N-terminaux identifiés. (B) Graphique rapportant les peptides ayant un ratio d'abondance (D2/D0 ; D4/D2 et D4/D0) supérieur à 2 et en fonction de la position de clivage au sein de la séquence du fibrinogène alpha (entrée UniProt P02671). (C) Représentation schématique montrant les positions de clivages au sein du fibrinogène alpha pour les peptides ayant un rapport supérieur à 2 chez les deux donneurs. Chaque événement protéolytique est indiqué par une flèche bleue. Les sites de clivages connus de la thrombine et de la plasmine sont rapportés ainsi que les sites de phosphorylations.

Pour illustration, les évènements protéolytiques issus de la première analyse et liés au fibrinogène, ont rapidement été rapportés (Fig. 50). Cette expérience permet d'identifier de nombreux évènements protéolytiques au sein de la chaîne alpha du fibrinogène (Fig. 50B ; Tableau 8). Les sites de clivages rapportés diffèrent de ceux rapportés pour les protéases à sérines tels que la thrombine, utilisée pour la production des gels de fibrine ; ou la plasmine connue pour dégrader la fibrine (Fig. 50C). Les sites de clivage identifiés en présence des CSM-PD semblent être principalement localisés au sein de la chaîne alpha du fibrinogène. Aucun peptide issu des chaînes beta ou gamma n'est identifié avec un ratio d'abondance significativement différent (Tableau 8). Plus précisément, les sites de clivages identifiés sont localisés au niveau des régions désordonnées de la chaîne alpha du fibrinogène. Ces mêmes régions correspondent à la zone structurée en bobine servant à l'élongation du fibrinogène (Fig. 7). Il est à noter que ces sites de clivages diffèrent également de ceux rapportés pour la MMP3 dans la littérature et qui se localisent principalement à proximité des sites de clivage identifiés pour la thrombine ou la plasmine (positions 35, 38 et 121) (171). Un site a également été identifié en position 432. Cette étude incluant l'ensemble des évènements protéolytiques issus des CSM-PD, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de d'établir un lien potentiellement direct entre le clivage de la fibrine et l'activité enzymatique de la MMP3.

Sequence	Positions	Donnor 1						Donnor 2					
		D2/D0		D4/D0		D4/D2		D2/D0		D4/D0		D4/D2	
		FC	P-Value	FC	P-Value	FC	P-Value	FC	P-Value	FC	P-Value	FC	P-Value
FIBRINOGEN ALPHA CHAIN (#P02671)													
[T].ADSG	[20-35]	0.32	4.3E-01	0.02	4.6E-06	0.07	5.1E-10	0.01	3.9E-16	0.01	5.4E-16	0.71	9.4E-01
[A].DSGE	[21-35]	0.05	2.2E-04	0.03	1.2E-05	0.50	4.4E-01	0.05	2.3E-08	0.02	2.8E-10	0.47	2.5E-01
[D].SGEG	[22-35]	0.10	7.0E-03	0.03	9.1E-06	0.25	1.3E-02	0.04	4.2E-09	0.01	1.3E-13	0.30	3.4E-03
[S].GEGD	[23-35]	0.15	3.7E-02	0.06	1.2E-03	0.29	3.2E-02	0.05	2.5E-08	0.01	1.7E-13	0.31	4.7E-03
[G].EGDF	[24-35]	0.03	6.0E-06	0.01	1.1E-16	0.29	3.2E-02	0.17	2.4E-03	0.05	1.6E-06	0.31	4.7E-03
[K].DSHS	[101-114]	100.00	1.1E-16	100.00	1.1E-16	0.26	1.3E-02	1.60	9.9E-01	0.94	9.8E-01	0.59	7.3E-01
[K].QLEQ	[203-216]	0.45	7.2E-01	0.37	5.4E-01	0.84	1.0E+00	0.23	1.3E-02	0.26	6.7E-02	1.15	9.8E-01
[K].ALTD	[250-258]	29.86	5.1E-06	18.26	1.7E-03	0.61	7.2E-01	1.64	9.9E-01	0.95	9.8E-01	0.58	7.2E-01
[R].MELE	[259-271]	4.05	1.8E-01	3.14	5.4E-01	0.79	9.8E-01	1.16	9.9E-01	0.97	9.8E-01	0.85	9.8E-01
[M].ELER	[260-271]	4.57	1.2E-01	3.81	4.1E-01	0.83	1.0E+00	1.10	9.9E-01	1.21	1.0E+00	1.08	9.8E-01
[E].LERP	[261-271]	2.99	4.0E-01	3.42	4.7E-01	1.14	1.0E+00	1.51	9.9E-01	1.82	9.8E-01	1.21	9.8E-01
[E].RPGG	[263-271]	0.50	7.8E-01	1.64	9.4E-01	3.30	6.2E-02	1.30	1.0E+00	2.12	8.7E-01	1.56	8.0E-01
[R].GGST	[272-287]	1.97	7.7E-01	1.75	9.3E-01	0.89	1.0E+00	0.39	1.3E-01	0.66	7.8E-01	1.71	6.4E-01
[G].STSY	[274-287]	1.74	8.4E-01	2.49	7.2E-01	1.37	9.8E-01	1.06	9.9E-01	1.88	9.8E-01	1.78	5.3E-01
[T].SYGT	[276-287]	1.87	7.8E-01	1.60	9.4E-01	0.85	1.0E+00	1.68	9.9E-01	2.15	8.7E-01	1.28	9.8E-01
[S].YGTG	[277-287]	0.51	7.9E-01	0.49	7.6E-01	0.97	1.0E+00	1.19	1.0E+00	1.09	9.8E-01	0.91	9.8E-01
[T].GSET	[280-287]	3.22	3.4E-01	1.75	9.3E-01	0.55	5.6E-01	0.99	9.9E-01	1.80	9.8E-01	1.82	4.9E-01
[GL].SETE	[281-287]	0.95	1.0E+00	2.42	7.6E-01	2.56	2.5E-01	1.13	9.9E-01	1.79	9.8E-01	1.61	7.3E-01
[N].PSSA	[289-308]	2.40	6.0E-01	2.22	8.0E-01	0.93	1.0E+00	1.23	1.0E+00	1.48	9.8E-01	1.08	9.8E-01
[S].SAGS	[291-308]	100.00	1.1E-16	100.00	1.1E-16	1.15	1.0E+00	0.73	7.0E-01	2.28	8.1E-01	3.11	4.7E-03
[A].GSWN	[293-308]	0.90	9.9E-01	0.93	9.7E-01	1.04	1.0E+00	1.28	1.0E+00	1.81	9.8E-01	1.41	9.0E-01
[N].SGSS	[297-308]	1.27	9.7E-01	2.51	7.2E-01	1.88	5.9E-01	1.31	1.0E+00	2.20	8.4E-01	1.57	7.9E-01
[S].GSSG	[298-308]	1.12	9.8E-01	1.73	9.4E-01	1.55	8.7E-01	0.85	9.6E-01	1.23	1.0E+00	1.44	8.9E-01
[G].SSGP	[299-308]	0.51	8.0E-01	2.80	6.5E-01	5.46	1.0E-03	1.37	9.9E-01	2.25	8.2E-01	1.59	7.3E-01
[G].STGS	[330-367]	0.60	9.0E-01	0.66	9.3E-01	1.11	1.0E+00	1.21	1.0E+00	0.90	9.8E-01	0.74	9.5E-01
[T].GSWN	[332-367]	1.24	9.8E-01	1.22	9.7E-01	0.99	1.0E+00	100.00	3.9E-16	100.00	5.4E-16	0.74	9.5E-01
[N].PGSP	[349-367]	2.23	6.6E-01	2.22	8.0E-01	1.00	1.0E+00	1.16	9.9E-01	1.75	9.8E-01	1.59	7.3E-01
[P].GSTG	[355-367]	5.96	4.8E-02	8.56	4.1E-02	1.44	9.8E-01	1.12	9.9E-01	1.21	1.0E+00	1.00	9.9E-01
[G].STGQ	[382-425]	2.26	6.5E-01	1.93	8.9E-01	0.86	1.0E+00	1.04	9.9E-01	1.56	9.8E-01	1.50	8.4E-01
[T].GQWH	[384-425]	2.04	7.4E-01	2.55	7.1E-01	1.25	1.0E+00	1.26	1.0E+00	1.82	9.8E-01	1.48	8.6E-01
[H].SEGS	[388-425]	1.68	8.6E-01	2.92	6.1E-01	1.61	8.3E-01	1.09	9.9E-01	1.56	9.8E-01	1.44	8.9E-01
[S].ESGS	[389-425]	2.83	4.5E-01	2.94	6.0E-01	1.04	1.0E+00	0.97	9.9E-01	1.47	9.8E-01	1.50	8.4E-01
[E].SGSF	[390-425]	1.36	9.5E-01	2.12	8.3E-01	1.56	8.7E-01	0.93	9.9E-01	1.35	9.9E-01	1.45	8.9E-01
[S].GSPR	[391-425]	2.29	6.5E-01	2.39	7.6E-01	0.98	1.0E+00	0.90	9.9E-01	1.36	9.8E-01	1.44	8.9E-01
[G].SFRP	[392-425]	1.37	9.5E-01	3.43	4.7E-01	2.48	2.8E-01	1.11	9.9E-01	1.79	9.8E-01	1.59	7.3E-01
[S].FRPD	[393-425]	100.00	1.1E-16	100.00	1.1E-16	0.32	6.2E-02	1.22	1.0E+00	1.54	9.8E-01	1.27	9.5E-01
[P].GSGN	[399-425]	5.05	8.7E-02	5.97	1.4E-01	1.18	1.0E+00	2.14	7.4E-01	2.81	6.0E-01	1.32	9.5E-01
[N].ARPN	[403-426]	1.02	1.0E+00	1.29	9.7E-01	1.27	1.0E+00	1.88	9.1E-01	2.53	6.9E-01	1.34	9.5E-01
[N].NPDW	[407-425]	0.79	9.8E-01	1.27	9.7E-01	1.62	8.3E-01	1.51	9.9E-01	2.11	8.7E-01	1.39	9.0E-01
[N].PDWG	[408-425]	2.78	4.6E-01	2.74	6.7E-01	0.99	1.0E+00	1.27	1.0E+00	2.17	8.6E-01	1.72	6.4E-01
[N].PDWGT	[408-426]	2.00	7.6E-01	2.08	8.5E-01	1.04	1.0E+00	1.70	9.9E-01	2.71	6.3E-01	1.59	7.3E-01
[P].DWGT	[409-425]	2.64	5.1E-01	3.70	4.2E-01	1.40	9.8E-01	0.92	9.9E-01	1.48	9.8E-01	1.61	7.3E-01
[E].VSGN	[416-425]	1.72	8.4E-01	1.65	9.4E-01	0.96	1.0E+00	2.01	8.0E-01	1.81	9.8E-01	0.90	9.8E-01
[K].EKVT	[447-458]	1.89	7.8E-01	2.35	7.8E-01	1.18	1.0E+00	0.71	6.8E-01	1.00	9.8E-01	1.41	9.0E-01
[M].DLGT	[496-510]	2.77	4.7E-01	3.87	4.0E-01	1.40	9.8E-01	0.98	9.9E-01	1.58	9.8E-01	1.61	7.3E-01
[T].LSGI	[500-510]	13.84	8.5E-04	5.31	1.9E-01	0.38	1.9E-01	2.64	4.7E-01	1.83	9.8E-01	0.69	9.0E-01
[L].SGIG	[501-510]	5.95	4.8E-02	3.46	4.7E-01	0.58	6.4E-01	0.75	7.9E-01	1.12	9.8E-01	1.48	8.6E-01
[S].GIGT	[502-510]	9.79	5.3E-03	2.30	7.9E-01	0.24	8.4E-03	1.45	9.9E-01	1.00	9.8E-01	0.70	9.4E-01
[G].IGTL	[503-510]	2.21	6.6E-01	1.34	9.7E-01	0.60	6.9E-01	1.86	9.1E-01	0.97	9.8E-01	0.54	5.3E-01
[I].GTLD	[504-510]	11.35	2.4E-03	6.96	8.6E-02	0.61	7.3E-01	1.08	9.9E-01	0.81	9.8E-01	0.75	9.5E-01
[K].TFPG	[528-547]	2.27	6.5E-01	2.05	8.5E-01	0.91	1.0E+00	0.46	2.4E-01	0.53	5.5E-01	1.16	9.8E-01
[P].GFFS	[531-547]	13.77	8.5E-04	9.25	3.2E-02	0.68	8.7E-01	3.49	2.1E-01	3.16	4.4E-01	0.96	9.9E-01
[F].FSPM	[533-547]	3.79	2.2E-01	3.58	4.4E-01	0.90	1.0E+00	1.74	9.9E-01	1.57	9.8E-01	0.83	9.8E-01
[P].MLGE	[536-547]	5.29	7.4E-02	5.44	1.8E-01	1.01	1.0E+00	1.26	1.0E+00	1.39	9.8E-01	1.12	9.8E-01
[M].LGEF	[537-547]	3.86	2.1E-01	1.60	9.4E-01	0.41	2.5E-01	0.66	6.3E-01	0.88	9.8E-01	1.33	9.5E-01
[L].GEFV	[538-547]	1.06	9.9E-01	2.28	7.9E-01	2.12	4.4E-01	0.64	6.0E-01	0.87	9.8E-01	1.36	9.4E-01
[E].FVSE	[540-547]	14.19	7.6E-04	7.96	5.5E-02	0.56	5.9E-01	2.98	3.4E-01	2.91	5.5E-01	0.96	9.9E-01
[K].ESSS	[559-573]	1.98	7.7E-01	1.72	9.4E-01	0.83	1.0E+00	0.46	2.4E-01	0.62	7.3E-01	1.22	9.7E-01
[E].SSSH	[560-573]	3.31	3.1E-01	1.66	9.4E-01	0.50	4.4E-01	0.70	7.2E-01	0.72	8.7E-01	1.06	9.8E-01
[S].SSHH	[561-573]	1.75	8.3E-01	1.87	8.9E-01	1.07	1.0E+00	0.46	2.4E-01	0.61	6.9E-01	1.33	9.5E-01
[G].IAEF	[567-573]	4.78	1.0E-01	3.74	4.2E-01	0.77	9.8E-01	0.95	9.9E-01	0.97	9.8E-01	1.02	9.9E-01
[K].QFTS	[582-591]	0.57	8.7E-01	0.39	5.7E-01	0.66	8.3E-01	0.08	4.8E-06	0.07	1.8E-05	0.85	9.8E-01
[Q].FTSS	[583-591]	0.63	9.2E-01	0.49	7.6E-01	0.77	9.8E-01	1.21	1.0E+00	1.80	9.8E-01	1.47	8.7E-01
[F].TSST	[584-591]	0.50	7.8E-01	1.28	9.7E-01	2.57	2.5E-01	0.56	4.5E-01	0.86	9.8E-01	1.53	8.1E-01
[T].SSTS	[585-591]	2.40	6.0E-01	1.97	8.8E-01	0.82	1.0E+00	1.20	1.0E+00	1.41	9.8E-01	1.17	9.8E-01
[A].DEAG	[605-620]	100.00	1.1E-16	100.00	1.1E-16	1.01	1.0E+00	100.00	3.9E-16	100.00	5.4E-16	1.30	9.5E-01
[A].DEAG	[605-621]	5.83	5.1E-02	5.52	1.7E-01	0.93	1.0E+00	15.41	3.5E-05	31.53	8.2E-07	2.02	2.7E-01
FIBRINOGEN BETA CHAIN (#P02675)													
[S].QGVN	[31-44]	0.49	7.8E-01	0.46	7.1E-01	0.94	1.0E+00	1.13	9.9E-01	1.07	9.8E-01	0.94	9.9E-01
[V].NDNE	[34-44]	0.24	2.0E-01	0.05	5.1E-04	0.23	6.1E-03	0.01	3.9E-16	0.01	1.1E-14	1.08	9.8E-01
[N].DNEE	[35-44]	0.22	1.5E-01	0.13	3.1E-02	0.58	6.4E-01	0.04	2.6E-09	0.04	4.9E-08	0.92	9.8E-01
[K].QCSK	[423-436]	0.51	8.0E-01	0.32	4.2E-01	0.66	8.3E-01	0.23	1.3E-02	0.23	3.8E-02	0.99	9.9E-01

Tableau 8. Fibrine

II. 3. e. Valorisation du projet de recherche actuel

Points forts du projet (atouts) :

- Ce projet de recherche développé depuis 2018 permet de mettre à profit mon expertise dans la biologie de la matrice extracellulaire ainsi que dans les méthodes -omiques afin d'étudier les mécanismes de régénération tissulaire à base d'hydrogels et de cellules souches.
- Ce projet multidisciplinaire, voir translationnel, mêle praticiens hospitaliers et chercheurs dans différentes disciplines (biochimistes, chirurgien dentistes, pharmaciens...) facilitant la réflexion et l'échange enrichissant sous différents angles.
- A ce jour, 9 étudiants ont contribué à cette thématique à travers des stages de différents niveaux : Marie BOLON Marie [Master 2 Sciences du médicament – Université Lyon 1 – 2019], Arthur COSTANTINI [Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire – Université Lyon 1 – 2019], Amal ROUBACHE [Master 2 Sciences du médicament – Université Lyon 1 – 2020], David TONG [Master 2 Biotechnologies – Université Grenoble-Alpes - 2021], Alicia REUZEAU [Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire – Université Lyon 1 – 2022], Axelle DANCOURT [2^{ème} année de BTS – La Martinière Duchère – 2020], Marianne LEVEQUE [Etudiante en thèse (co-encadrement) – Ecole doctorale "Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire" – depuis 01/2022], Sean THIERRY [Master 2 Biotechnologies – Université Grenoble-Alpes - 2023], Camille GIROLET [Master 2 Biotechnologies – Université Grenoble-Alpes - 2023]).
- Cette thématique de recherche est soutenue par différentes subventions depuis 2018 : IFRO portée par le Pr JC FARGES [10 k€, 2018-2019], projet inter-équipe du LBTI [10 k€, 2019-2020], ANR JC ENDONANOBIOTIC portée par le Pr M DUCRET [275 k€, 2021-2014] ; IFRO portée par le Pr M DUCRET [10 k€, 2021-2022] ; fondation de l'avenir portée par le Pr JC FARGES [36 k€, 2021-2023] ; projet inter-équipes du LBTI porté par le Dr J SOHIER [12 k€, 2022-2023], ANR JC TRIDENTOMIC [171 k€, 2021-2024], subvention d'accueil de l'Université Lyon 1 [12 k€, 2022-2023]).

• Une publication, deux revues ainsi qu'un chapitre d'ouvrage ont été publiées dans le cadre de ce projet :

◇ Richert R, Ducret M, Alliot-Licht B, **BEKHOUCHE M**, Gobert S & Farges J-C. A critical analysis of research methods and experimental models to study pulpitis. *International Endodontic Journal (IEJ)* 2022. doi: 10.1111/iej.13683

◇ Ducret M, Costantini A, Gobert S, Farges JC, **BEKHOUCHE M**. Fibrin-based scaffolds for dental pulp regeneration: from biology to nanotherapeutics. *European Cells and Materials* 2021: **41**, p. 1-14.

◇ **BEKHOUCHE M**, Bolon M, Charriaud F, Lamrayah M, Da Costa D, Primard C, Costantini A, Padeloup M, Gobert S, Mallein-Gerin F, Verrier B, Ducret M, Farges JC. Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. *Journal of Materials Chemistry B* 2020: **8**(36), p. 8422-8432.

◇ **Chapitre d'ouvrage** : **BEKHOUCHE M** & Virard F. Immunité du Parodonte. *Traité EMC Médecine buccale* 2022. Elsevier. doi : 10.1016/S1877-7864(22)45384-5

Points à améliorer (faiblesses) :

• Le projet de recherche visant à étudier les mécanismes enzymatiques de régénération tissulaire et la progression de l'inflammation pulpaire nécessite des moyens humains (techniciens, AI, Ingénieur) afin de suivre au quotidien certaines expérimentations et pour le développement de nouveaux outils d'analyses multi-échelles de mécanismes complexes qui seraient adaptables à différentes thématiques.

• Cette thématique de recherche propose différents projets de recherches ambitieux qui seraient propices aux développements de nouvelles techniques d'analyses de données multi-omiques et au recrutement d'étudiant(e)s en thèse. En effet, le recrutement d'un(e) étudiant(e) en thèse faciliterait la mise en place de ces nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des caries dentaires mais également pour le traitement de pathologies impliquant des mécanismes inflammatoires afin de répondre à des besoins d'utilité publique.

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes biomoléculaires initiés par les CSM en hydrogel de fibrine. Ces recherches mettent en œuvre une approche multi-omique afin de mieux caractériser les cibles biomoléculaires régulés par les cellules en hydrogel ainsi que la biodégradation de l'environnement composé d'une matrice protéique biomimétique. Différents projets seront menés afin de poursuivre et étendre les travaux réalisés notamment au travers de 3 grands axes.

Mécanismes et régulation de la réparation/régénération endodontique

Extension des expériences de validation des cibles biomoléculaires identifiées

Des expériences seront menées afin de poursuivre la validation des cibles identifiées par les méthodes -omiques. Parmi ces cibles on retrouve notamment les sous-unités intégrines ITGA5, ITGA6, ITGA10 ; les métalloprotéases MMP8, MMP10, MMP11, ADAM28 et ADAMTS3 ; ainsi que les chaînes alpha des collagènes X, XIII, et XVII. Ces cibles préalablement identifiées seront également visualisées dans un modèle d'insert aux dimensions d'un canal radiculaire par des techniques d'imagerie confocales et d'imagerie 3D ("Light Sheet").

Investigation du rôle de la MMP3 dans la régénération/réparation tissulaire

Une donnée intrigante de la littérature montre que la MMP3 est surexprimée dans la pulpe dentaire humaine enflammée (172). Cette protéase est connue pour avoir un large spectre suggérant soit un manque de spécificité soit un contrôle lié à une distribution spatio-temporelle précise (18,173,174). En effet, sa localisation, extracellulaire ou intracellulaire, ainsi que son rôle reste à préciser. Afin de mieux comprendre le rôle de la MMP3 dans les mécanismes de régénération tissulaire ainsi que son lien potentiel avec la surexpression de la sous-unité intégrine $\alpha 2$. Des expériences seront menées afin d'identifier le répertoire de substrat de la MMP3 dans le secretome ou le milieu intracellulaire des CSM-PD. Les sites de clivages précis de la MMP3 au sein de la fibrine seront identifiés par l'utilisation des protéines purifiées *in vitro* (technique "ATOMS : Amine Terminal Oriented Mass Spectrometry"). Afin d'évaluer le lien potentiel avec l'intégrine $\alpha 2$; l'expression ainsi que l'activité de la MMP3 seront évaluées après inhibition chimique (BTT-3033) (175) ou biomoléculaire (shRNA) de la sous unité intégrine $\alpha 2$. La dégradation de la fibrine sera évaluée par SDS-PAGE et immunoblot après inhibition de l'ITGA2. Des expériences seront également réalisées après inhibition, chimique (UK 370106) (176) ou biomoléculaire (shRNA), de la MMP3.

Extension des études mécanistiques à différents tissus

Tissus osseux

Dans le contexte de la réparation osseuse, le biomatériau composite idéal, doit présenter des propriétés antibactériennes, ostéogéniques et une cinétique de dégradation contrôlée pour permettre son remplacement par un tissu osseux semblable à celui d'origine. Un projet collaboratif entre la France et le Maroc a pour objectif général de développer une nouvelle génération de biomatériaux composites basés sur la combinaison bioverres/fibrine pour la réparation/régénération osseuse. Ce projet a été proposé dans le cadre du Programme Huber Curien Toubkal 2024 en collaboration du Dr Meriame BRICHA (co-coordinatrice) et du Dr Khalil EL MABROUK du Laboratoire Matériaux, Biomateriaux et Ingénierie Tissulaire (MBIT) de l'Université Euromed de Fès (Maroc). Cette équipe développe des verres bioactifs composés de silicium, de calcium et de phosphore par différentes méthodes sol-gel (177) ou hydrothermales (178). Ce projet articulé en 4 axes (Fig. 51) ; incluant potentiellement une étudiante en thèse en co-tutelle, vise à : (i) synthétiser et caractériser de nouveaux verres bioactifs ; (ii) formuler et caractériser un environnement composite ; (iii) évaluer les propriétés antibactériennes et ostéogéniques de cet environnement et (iv) caractériser la dégradation de l'environnement temporaire et la néosynthèse matricielle par protéomique.

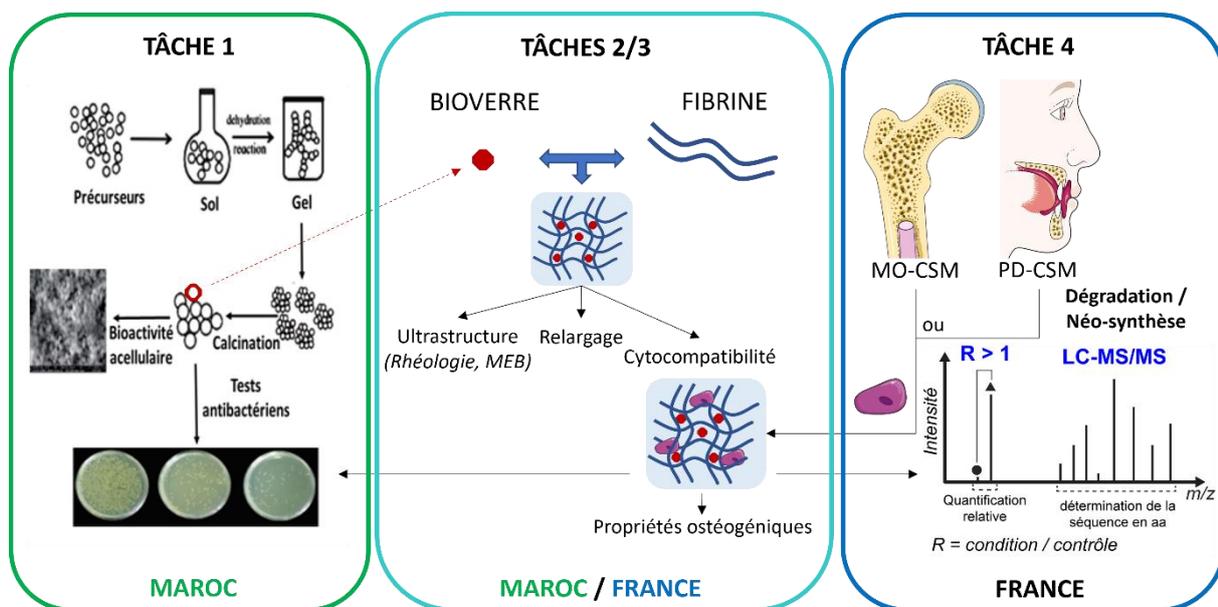


Figure 51. Phases de développement du biomatériau composite Bioverre / Fibrine de sa formulation chimique à son évaluation biochimique.

Le cartilage

Dans le contexte du cartilage, un dispositif médical à base de fibrine est actuellement développé au sein de l'équipe ROAD (Dr F. MALLEIN-GERIN) afin de remplacer le cartilage nasal. Des études protéomiques seront menées afin d'évaluer la dégradation de l'hydrogel dans le temps.

Extension des analyses multi-omiques et intégration de données multi-échelles pour le diagnostic

Exemple du diagnostic du degré d'inflammation pulpaire

Les techniques -omiques développées dans le cadre des recherches présentes et futures génèrent une quantité importante de données riches en informations précises, selon l'échelle étudiée, mais qui restent encore sous-exploitées en raison de leur analyse parcellaire. En effet, dans le cadre d'une situation physiopathologique donnée, le développement de protocoles expérimentaux novateurs permettant d'identifier les niveaux d'expressions géniques et protéiques, les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, protéolyse...) et post-transcriptionnelles (bases modifiées des ARN), la dynamique des interactions protéine-protéine et le développement des outils numériques vont dans le sens d'une médecine personnalisée et des preuves.

Dans le cadre de la carie dentaire, le traitement personnalisé nécessite un diagnostic fiable du degré d'inflammation pulpaire afin d'identifier les tissus ayant la capacité de se rétablir et ainsi de maintenir une vitalité pulpaire. Cependant, l'absence d'outils de diagnostic précis freine ce type d'approches (108). En effet, seule la vitalité de la PD est testée en utilisant des stimuli au froid ou électrique, car le degré d'inflammation exact de la PD est encore aujourd'hui cliniquement difficile à déterminer (179). Le développement d'outils de diagnostics du degré d'inflammation pulpaire constitue un défi scientifique et technologique majeur en médecine bucco-dentaire. L'utilisation d'une approche multi-omique pour l'identification potentielle de biomarqueurs/néoépitopes ou signatures biomoléculaires spécifiques (protéolyse...) du degré d'inflammation pulpaire faciliterait le développement futur d'un test de diagnostic afin d'aider le praticien dans sa prise de décision en matière de traitement.

L'ensemble des données de protéomique, dégradomique, interactomique, transcriptomique obtenues à travers ce programme de recherche constitueront autant de données fondamentales pour une meilleure compréhension de la dynamique de la matrice extracellulaire en lien avec les activités protéolytiques ainsi que les réponses cellulaires à ces variations d'environnement. A

moyen terme, nous chercherons à développer des compétences et outils afin d'associer et intégrer les différentes données omiques obtenues. Cet outil et démarche d'investigation permettra d'obtenir différents niveaux d'informations concernant le choix d'un biomatériau ou pour aider à la prise en charge d'un phénomène pathophysiologique donné. Un projet collaboratif impliquant Guillaume LAUNEY (MCF, Bioinformatique, MMSB Lyon 1), Gilles RAUTUREAU (PR, Métabolomique, ICBMS, Lyon 1), Maxime DUCRET (PU-PH, LBTI, Faculté d'Odontologie de Lyon) et Jean-Christophe FARGES (PU-PH, LBTI, Faculté d'Odontologie de Lyon) a été proposé dans le cadre de l'appel à projet SHAPE-MED de l'Université Lyon 1. Ces grandes quantités de données, quand bien même analysées, sont difficiles à mettre en corrélation et à intégrer pour le diagnostic de pathologies. Des outils d'intelligence artificielles (IA) constituent une piste de réflexion afin d'aider le praticien dans le diagnostic et la prise de décision. A long terme, les différentes données omiques viendront nourrir ces outils d'IA pour un diagnostic de plus en plus précis et une médecine bucco-dentaire personnalisée (Fig. 52, extraite de R. RICHERT *et al.*, 2022).

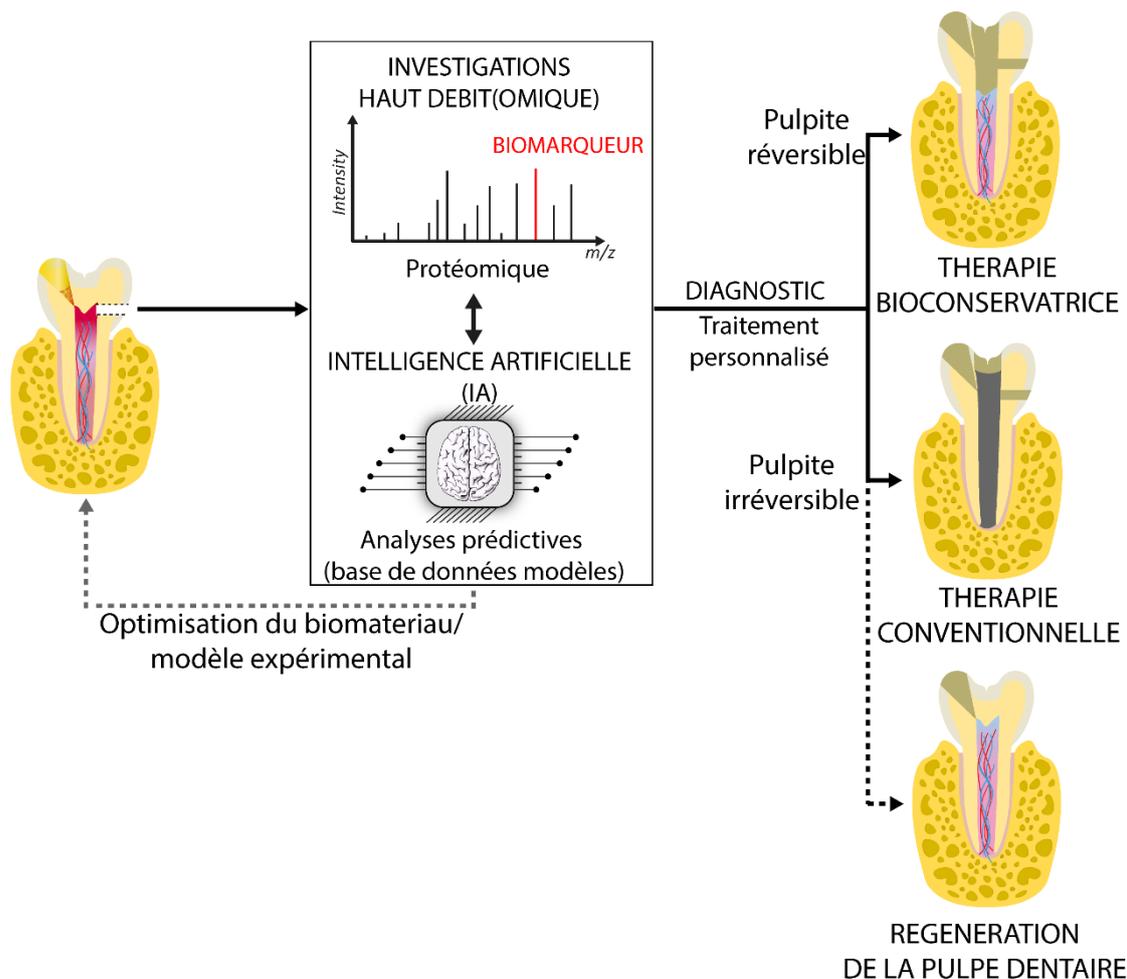


Figure 52. Futures orientations potentielles de l'investigation de l'inflammation pulpaire pour la conception et la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques innovantes et personnalisées (figure adaptée de Richert R *et al.*, *IEJ*, en édition).

PUBLICATIONS

Issues des travaux encadrés

Domaine de recherche :

**ENVIRONNEMENTS MATRICIELS ADAPTES POUR
LA REPARATION/REGENERATION TISSULAIRE**

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2020,
8, 8422Development of an antibacterial nanocomposite
hydrogel for human dental pulp engineering†M. Bekhouche,^{id}*^{ab} M. Bolon,^{id}^a F. Charriaud,^{id}^a M. Lamrayah,^a
D. Da Costa,^{id}^{bc} C. Primard,^{id}^c A. Costantini,^a M. Padeloup,^{id}^a S. Gobert,^{id}^a
F. Mallein-Gerin,^{id}^a B. Verrier,^{id}^a M. Ducret,^{id}^{abd} and J.-C. Farges,^{id}^{abd}

Hydrogel-based regenerative endodontic procedures (REPs) are considered to be very promising therapeutic strategies to reconstruct the dental pulp (DP) tissue in devitalized human teeth. However, the success of the regeneration process is limited by residual bacteria that may persist in the endodontic space after the disinfection step and contaminate the biomaterial. The aim of this work was to develop an innovative fibrin hydrogel incorporating clindamycin (CLIN)-loaded Poly (D,L) Lactic Acid (PLA) nanoparticles (NPs) to provide the hydrogel with antibacterial properties. CLIN-PLA-NPs were synthesized by a surfactant-free nanoprecipitation method and their microphysical properties were assessed by dynamic light scattering, electrophoretic mobility and scanning electron microscopy. Their antimicrobial efficacy was evaluated on *Enterococcus faecalis* by the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal biofilm inhibition and eradication concentrations (MBIC and MBEC). Antibacterial properties of the nanocomposite hydrogel were verified by agar diffusion assays. NP distribution into the hydrogel and release from it were evaluated using fluorescent PLA-NPs. NP cytotoxicity was assessed on DP mesenchymal stem cells (DP-MSCs) incorporated into the hydrogel. Type I collagen synthesis was investigated after 7 days of culture by immunohistochemistry. We found that CLIN-PLA-NPs displayed a drug loading of $10 \pm 2 \mu\text{g}$ per mg of PLA polymer and an entrapment efficiency of $43 \pm 7\%$. Antibiotic loading did not affect NP size, polydispersity index and zeta potential. The MIC for *Enterococcus faecalis* was $32 \mu\text{g mL}^{-1}$, MBIC₅₀ and MBEC₅₀ were 4 and $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. CLIN-PLA-NPs appeared homogeneously distributed throughout the hydrogel. CLIN-PLA-NP-loaded hydrogels clearly inhibited *E. faecalis* growth. DP-MSC viability and type I collagen synthesis within the fibrin hydrogel were not affected by CLIN-PLA-NPs. In conclusion, CLIN-PLA-NP incorporation into the fibrin hydrogel gave the latter antibacterial and antibiofilm properties without affecting cell viability and function. This formulation could help establish an aseptic environment supporting DP reconstruction and, accordingly, might be a valuable tool for REPs.

Received 16th April 2020,
Accepted 24th July 2020

DOI: 10.1039/d0tb00989j

rsc.li/materials-b

1. Introduction

Regenerative endodontic procedures (REPs) aim at reconstructing a dental pulp (DP) tissue in the endodontic space of devitalized human teeth, in order to restore major functionalities involved in injury detection such as immune surveillance and sensitivity.^{1–5} Over the last decade, many tissue engineering approaches have

been developed to achieve this goal. Most are based on the injection, into the cleaned endodontic space, of a three-dimensional (3D) scaffold incorporating or not DP mesenchymal stem cells (DP-MSCs).⁴ Numerous kinds of scaffolds were tested, such as natural and synthetic polymers/co-polymers, hydroxyapatite/tricalcium phosphate powders, self-assembling peptide systems, platelet-rich plasma and decellularized extracellular matrices (ECM).^{6–11} However, all of them only partially reach the materiobiological criteria necessary for DP regeneration which include bioinspired structural design, low cytotoxicity, physiological degradation by host and/or incorporated cells, and rapid replacement with an ECM characteristic of the tissue.^{8,11,12} In addition, authors rarely took into consideration one major limit of REPs which is the persistence of residual bacteria in the endodontic space after the disinfection step. Indeed, bacteria are hardly eliminated by the disinfectants classically used such as

^a Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, UMR5305 CNRS/ Université Lyon 1, Lyon, France^b Faculté d'Odontologie, Université de Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France^c Adjuvatis®, Lyon, France^d Hospices Civils de Lyon, Service de Consultations et Traitements Dentaires, Lyon, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Clindamycin detection by HPLC and stability (SI1) – calibration curve of PLA-NPs and fluorescence release (SI2). See DOI: 10.1039/d0tb00989j



sodium hypochlorite, owing to their organization into biofilms on the dentin surface and their deep penetration within dentin tubules. They clearly hamper DP regeneration^{13–15} by promoting host immune/inflammatory events instead of regenerative ones. To overcome this difficulty, polydioxanone-based nanofibrous hydrogels containing metronidazole, ciprofloxacin, and/or clindamycin^{16–19} have been proposed. Although these scaffolds displayed effective antibacterial properties against species present into the endodontic space such as *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*, they strongly affected DP-MSCs viability (up to 50%). Therefore, designing new hydrogel formulations with antibacterial and antibiofilm properties, capable of preserving cell viability and function, is clearly required.^{8,11,20}

Fibrin was recently reported as a promising scaffold material for REPs since it promotes DP-like tissue formation both *in vitro* and *in vivo*.^{11,21} We recently developed an injectable fibrin hydrogel formulation highly suitable to dental practice since it clearly supported DP-MSCs viability and DP-like collagenous ECM deposition.²⁰ However, neither fibrin nor its degradation products display any antimicrobial activities.²² We decided in the present study to give our newly developed fibrin scaffold antibacterial properties by adding antibiotic-loaded nanoparticles (NPs).

NPs used as carriers have demonstrated high relevance in antibiotic delivery since they preserve the native structure of the drug, enhance its bioavailability and biodistribution in infected tissues and ensure its high concentration locally. By slowly releasing the molecule, they increase the exposure time of the bacterial population to the antibiotic whereas, by restraining the drug localization within the infected site, they minimize putative systemic side effects.²³ Antibiotic-loaded NPs appear well adapted to biofilm eradication owing to their ability to penetrate deep into biofilm matrices.²⁴ This penetration enables the antibiotic to reach the deepest and most persistent bacteria which are difficult to eliminate.²⁵ Over the last years, Poly (D,L) Lactic Acid NPs (PLA-NPs) received considerable attention, because of their biodegradable nature, biocompatibility, and low immunogenicity.²⁶ PLA is a biopolymer with high safety profile²⁷ which has been approved by the US Food and Drug Administration for various applications.²⁶ PLA-NPs constitute a versatile carrier of drugs and vaccines^{26–28} and have been used to deliver antifungal and antibacterial drugs such as amphotericin B,²⁹ minocycline³⁰ and pipemidic acid.³¹ Our hypothesis was that PLA-NPs could constitute a suitable antibiotic carrier that, once added to our fibrin hydrogel formulation, would provide the hydrogel with antibacterial and antibiofilm properties. The antibiotic clindamycin (CLIN) was chosen because of its broad spectrum activity against endodontic bacteria and its routine use in oral medicine in patients allergic to β -lactams.³² Also, CLIN can be easily incorporated into PLA-NPs owing to its hydrophobicity.^{33–35}

This study aimed at designing a nanocomposite scaffold made of a fibrin hydrogel supplemented with CLIN-loaded PLA-NPs in order to provide the aseptic environment necessary for DP regeneration without affecting DP-MSC viability and function (Fig. 1).

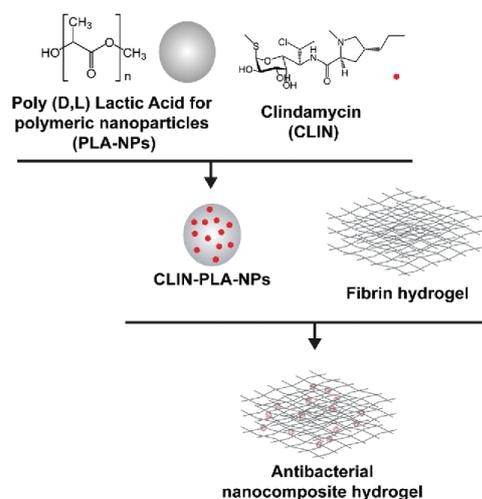


Fig. 1 Schematic representation of the two-step synthesis of the nanocomposite hydrogel.

2. Experimental

2.1 NP synthesis

PLA (MW 45 g mol⁻¹, pK_a 3.8) was produced according to the patent FR2745005A1 of Physis (France). CLIN (MW 424.98 g mol⁻¹, pK_a 7.6, log P 2.16) was purchased from Sellekchem (USA). CLIN-PLA-NPs were synthesized as previously described using a surfactant-free solvent diffusion method.³⁶ Briefly, CLIN and PLA were dissolved in acetone (2.5% w/w) and this solution was slowly added to an aqueous phase composed of ethanol and 4 mM carbonate buffer (pH 10) under moderate stirring. Pyrogen free water (Otec, Aguetant, France) was added at the end of pouring to favour solvents evaporation under reduced pressure and controlled temperature using a Rotavapor coupled to a heating bath (Buchi, France). The final volume of particles was precisely measured as well as the final pH of the solution (pH 8.5, storage buffer). NPs without CLIN were synthesized in parallel using the same method.

2.2 NP morphophysical properties

NP hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential were measured for the different CLIN-PLA-NP and PLA-NP batches after dilution (1/150) of the NP suspension in 1 mM NaCl using a Zetasizer Nano ZS Plus (Malvern Instruments, UK). Diameter and PDI were measured by dynamic light scattering (DLS) at 25 °C at a 173 degree angle. The zeta potential was determined by measuring electrophoretic mobilities by laser Doppler velocimetry using the same device, at a scattering angle of 12.5 degree. Each value was the average of 4 measurements.

NP morphology was visualized with a scanning electron microscope equipped with a field emission gun (FEI Quanta



250 SEM, Thermo Fischer Scientific, USA). For sample preparation, the NP solution was diluted 10 times and a drop was deposited on a glass coverslip then air-dried. The coverslip was then copper sputtered (BAL-TEC, MGS 010, UK) prior to observation.

2.3 CLIN loading into PLA-NPs

The amount of CLIN incorporated into the PLA-NPs was determined using the high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Visible detection method developed by Na-Bangchang *et al.*³⁷ The HPLC system was composed of a Degasser 1260 (Agilent, USA), a Quaternary Pump G1311A, an Autosampler G1329A, a Column Heater G1316A and a Diode Array Detector G1315A, all four from Hewlett Packard (USA). Chromatograms were obtained using the Chem Station for Liquid Chromatography 3D System software (Hewlett Packard, USA). The stationary phase was a CLYPEUS C18 column (5 μm , 100×4 mm, Higgins Analytical, USA). The mobile phase was composed of 0.02 M disodium hydrogenophosphate (Sigma Aldrich, France) (pH 2.8) and acetonitrile (ACN, Carbo Elba, Italy) in proportion 76:24 (v/v). The solvent used was HPLC grade. The chromatographic analysis was operated at 25 °C. A 100 μL volume was injected at a flow rate of 0.75 mL min^{-1} . The wavelength was set at 200 nm. This method showed linearity ($R^2 = 0.997$) in the CLIN concentration range 1–60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ESI† 1).

The CLIN-PLA-NP suspension was centrifuged at 11 000 rpm for 45 min and the supernatant was transferred in a new tube for quantification. CLIN-PLA-NPs present in the pellet were solubilized using ACN to release loaded CLIN. PLA was precipitated by adding pure methanol (Carbo Elba, Italy) with a total solvent volume of 50 μL per g of PLA. The ratio ACN:methanol was adjusted to 1:14 (v/v).

Entrapment efficiency (EE) was calculated using the formula:

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Mass of encapsulated CLIN}}{\text{Total mass of CLIN}} \times 100$$

Drug loading (DL) was calculated using the formula:

$$\text{DL (\mu g mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Mass of encapsulated CLIN}}{\text{Mass of PLA polymer}}$$

To assess CLIN release from the NPs, CLIN-PLA-NPs were diluted in PBS buffer (1:1, v:v) and incubated in triplicate at 37 °C for 9 days. At different time points (5, 22, 46, 90, 162, 214 h), the NPs were collected by centrifugation at 11 000 rpm for 45 min and the CLIN content was determined as described above. The clindamycin release from the nanoparticles at each time was reported as a percentage of the starting mass of CLIN. Stability of clindamycin in PBS at 37 °C was assessed by HPLC for 21 days (ESI† 1).

2.4 Antibacterial and antibiofilm properties

The *E. faecalis* (ATCC® 47077) strain was used to evaluate the antibacterial properties of CLIN-PLA-NPs. The minimal inhibitory concentration (MIC), defined as the lowest antibiotic concentration that inhibits a visible planktonic bacterial growth after an overnight

incubation at 37 °C, was determined using the broth microdilution method. An *E. faecalis* suspension was prepared to obtain an optical density (OD) of 0.004 at 600 nm, which corresponds to 10^6 colony forming units (CFU) per mL. The suspension was cultured in a 96-well plate in brain-heart infusion (BHI) broth (Becton Dickinson, USA), in the presence of serial dilutions of free CLIN (0.004 to 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$) or of the corresponding CLIN-PLA-NPs or PLA-NPs dilutions (see Result section 3.1). The plate was incubated for 24 h at 37 °C and OD was measured at 600 nm with a Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific). The lowest CLIN concentration that yields an OD similar to the negative control was determined as the MIC. The MIC value was confirmed by seeding the bacterial suspensions used for MIC determination on BHI-agar plates (Sigma Aldrich, France).

The minimal biofilm inhibitory concentration (MBIC), defined as the lowest antibiotic concentration that inhibits the growth of a visible biofilm, was determined by culturing *E. faecalis* in BHI supplemented with 1% glucose (Sigma Aldrich), then by plating bacteria at an initial OD of 0.004 during 24 h at 37 °C, in the presence of the same CLIN, CLIN-PLA-NP or PLA-NP serial dilutions as previously described in this section. Biofilms formed after 24 h³⁸ were washed three times with PBS (Gibco, France) and stained with 0.1% crystal violet (Sigma Aldrich). After a 15 min incubation, biofilms were washed again three times with water and dried at room temperature (RT). Glacial acetic acid was added to solubilize crystal violet and biofilm absorbance was measured at OD 590 nm.

The minimal biofilm eradication concentration (MBEC), defined as the lowest antibiotic concentration that eradicates a 24 hour old biofilm³⁸ was determined in the same experimental conditions as for MBIC measurement, except that free CLIN, CLIN-PLA-NPs or PLA-NPs were added on a 24 hour old *E. faecalis* biofilm.

Antimicrobial properties of the nanocomposite fibrin hydrogel (see Section 2.5 for hydrogel preparation) were assessed using an agar diffusion method based on the plating of hydrogels containing 50, 100 or 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CLIN, CLIN-PLA-NPs or equivalent 0.2, 0.4 or 0.8% solid content PLA-NPs, on BHI broth-agar previously seeded with *E. faecalis* at 1.5 OD. Each experiment was performed three times in triplicate. After 24 h at 37 °C, inhibition areas were photographed and measured using the Fiji software.

2.5 PLA-NP distribution and release from the nanocomposite hydrogel

The fibrin hydrogel formulation was prepared as previously described by Ducret *et al.*²⁰ to obtain a final fibrin hydrogel composed of 10 mg mL^{-1} fibrinogen ($M_w \sim 340$ kDa, pI 5.8) (EMD Millipore Corp., USA) which had been polymerized in the presence of 4 U mL^{-1} thrombin (Sigma Aldrich, France). CLIN-PLA-NPs or free CLIN were added to obtain a final concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CLIN into the hydrogel.

To characterize the microstructure of the fibrin hydrogel and NP localization, fibrin-alone and CLIN-PLA-NP-loaded fibrin hydrogels were treated for scanning electron microscopy



(SEM). Briefly, samples were rinsed with water, frozen in pasty nitrogen, sublimated at $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ to unveil the fibrin network and sputtered with gold/palladium. Samples were then observed with a FEI Quanta 250 SEM (Thermo Fisher Scientific, USA).

To assess CLIN release, hydrogels were prepared as above in the presence of $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ clindamycin in free (CLIN) or formulated (CLIN-PLA-NPs) forms, or of the equivalent 0.2% solid content empty particles (PLA-NPs). After polymerization, 1 volume of PBS was added on the top of the hydrogel and incubated in a humidified chamber at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. At different time points (0.25, 0.5, 2, 3, 6, 24 h), the solution was collected and replaced with a fresh one. Samples were analysed by HPLC-UV and the cumulative CLIN release was determined. The assay was realized in triplicate using three different batches of nanoparticles.

General distribution of NPs in the hydrogel was assessed using PLA-NPs coupled with a green-Bodipy fluorophore (PLA- fluo -NPs) (Adjuvatis[®], France). PLA- fluo -NPs had a diameter of 171 nm, a PDI of 0.03 and a zeta potential of $-57 \pm 1\text{ mV}$, all values comparable to non-fluorescent PLA-NPs and CLIN-PLA-NPs (see Result section 3.1). PLA- fluo -NPs displayed an EE of 95–98%, which indicated that the measured fluorescence intensity reflected directly the NP amount present in the hydrogel. Nanocomposite hydrogels were formulated as previously described, using the same amount of PLA- fluo -NPs as for CLIN-PLA-NPs. They were observed with an Eclipse TE300 fluorescence microscope (Nikon, Japan) using an excitation wavelength of 505 nm and an emission wavelength of 515 nm. Images were analysed using the Fiji software.

To assess NP release over time, hydrogels containing PLA- fluo -NPs were incubated in PBS at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 days. The incubation medium was collected at different time points (24, 48, 72 and 96 h) and the fluorescence intensity was determined using a multimode flagship microplate reader (Infinite M1000, Tecan, Switzerland). The percentage of released PLA- fluo -NPs was calculated by comparing the released fluorescence to the total fluorescence incorporated in the hydrogel, because fluorescence intensity is directly proportional to PLA- fluo -NPs concentration in these conditions ($R^2 > 0.99$) (ESI† 2).

2.6 DP-MSc isolation and expansion

Isolation and expansion of DP-MSCs were performed with a good manufacturing practice approach as described previously.^{39,40} Briefly, healthy impacted human third molars were collected from donors aged 13–17 years with informed consent of the patients and their parents, in accordance with the World Medical Association's Declaration of Helsinki and the French Public Health Code (Article R1211-49), and following a protocol approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH: DC-2014-2325). DPs from teeth between Nolla developmental stages 5 (crown almost completed) and 7 (one third root completed) were gently extirpated from pulp cavities and cut into fragments of about $0.5\text{--}2\text{ mm}^3$. Pulp fragments were seeded as explants on dishes pre-coated with a mixture of human placental collagens I and III ($0.5\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$) and cultured in Optistem[®] serum-free medium (Univercell Biosolutions, France) supplemented with 100 IU mL^{-1} penicillin

and 100 mg mL^{-1} streptomycin (Thermo Fischer Scientific, USA). After 2 weeks, cells outgrowing from the explants were harvested using TrypLE[®] (Thermo Fischer Scientific, USA) and checked for stemness by flow cytometry as previously described.³⁸ DP-MSCs were passaged 2–3 times before being incorporated into the fibrin hydrogel formulation ($1667\text{ cells per }\mu\text{L}$). Cellularized formulations were then poured into 96-well plates for polymerization and cultured in $120\text{ }\mu\text{L}$ Optistem[®] medium.

2.7 Cell viability determination

Cytotoxicity was determined after 48 h of culture in NP-free fibrin hydrogels and in fibrin hydrogels containing 0.2% solid content PLA-NPs, CLIN-PLA-NPs, or the equivalent $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ free CLIN, using a Live/Dead Cell Double Staining[®] kit (Sigma Aldrich, France). Experiments were performed in triplicate using three different PLA-CLIN-NPs and PLA-NPs batches and DP-MSCs from two female patients (13 and 14 year old). DP-MSCs viability is defined as the percentage of living cells compared to total cells. Briefly, hydrogels were quickly rinsed three times with PBS and incubated for 15 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a PBS solution containing $0.2\text{ }\mu\text{M}$ acetoxyethyl ester of calcein and $0.2\text{ }\mu\text{M}$ propidium iodide. They were then observed using an Eclipse TE300 fluorescence microscope (Nikon Instruments Europe B.V., Netherlands) and cells were counted using the Fiji software. Negative controls were realized by replacing DP-MSCs with PBS to confirm signal specificity.

2.8 Type I collagen immunohistochemistry

Type I collagen synthesis by DP-MSCs was determined using immunohistochemistry as described previously²⁰ with slight modifications. Briefly, DP-MSCs were cultured for 7 days in fibrin-alone, fibrin/CLIN-PLA-NP or fibrin/PLA-NP hydrogels as described in Section 2.7. Hydrogels were fixed in acidified formal alcohol (AFA; Microm Microtech, France) at $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h and classically embedded in paraffin. Five μm serial sections were cut, deparaffinized and rehydrated. For antigen retrieval, sections were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ first in 0.5% hyaluronidase diluted in PBS for 1 h then in Pepsin Reagent (ref R2283, Sigma Aldrich, France) for 15 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the sections in 0.5% hydrogen peroxide for 10 min at RT. To reduce non-specific binding of antibodies, sections were treated with BlockAid[™] (Thermo Fisher Scientific, USA) at RT for 1 h. Sections were then incubated with the anti-type I collagen rabbit polyclonal antibody (1/2000) (ref. 20111[380k], Novotec, Bron, France) overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antibody detection was performed with an ImmPRESS[®] HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase) Polymer Detection kit (Vector Laboratories, USA). Sections were finally counterstained with hematoxylin, mounted with DEPEX medium (ref 06522, Sigma Aldrich, France) and observed with an Eclipse TE300 microscope.

2.9 Statistical analyses

Data are presented as the mean values \pm standard deviation. Statistical analyses were performed on GraphPad Prism version



7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) using ANOVA followed by multiple comparison using statistical hypothesis testing and Bonferroni correction. The number of samples (N) is indicated in figure captions. A difference among means with a P -value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 Characterization of the nanoparticles with or without clindamycin

The CLIN-PLA-NPs were synthesized by the surfactant-free nanoprecipitation method³⁶ which includes three stages: an initial nucleation stage, a growth phase, and the formation of stable particles when an equilibrium is reached. A small size distribution results from a high nucleation rate and a low growth of particles.⁴¹ At high pH, the carboxylic acid groups of the PLA polymer are highly ionized, leading to a rapid stabilization of the nanoparticles driven by electrostatic repulsions between them. This method is applicable for the encapsulation of lipophilic or amphiphilic compounds, driven by hydrophobic interactions with the polymer,⁴² as previously characterized by molecular modelling.³⁶

The CLIN-PLA-NPs exhibited a Z-average size of 159 ± 2 nm and a polydispersity index of 0.09 ± 0.01 which indicated a relatively narrow particle size distribution (Table 1). PLA-NPs and CLIN-PLA-NPs exhibited a regular spherical morphology, were fairly uniform in size and did not show any form of aggregation (Fig. 2A–D). The zeta potential of -60 ± 2 mV was negative according to the net charge of PLA in the storage buffer (pH 8.5). CLIN incorporation into PLA-NPs did not significantly modify their diameter, PDI, zeta potential, or morphology. Entrapment efficiency was $43 \pm 7\%$, a value corresponding to a drug loading of 10 ± 2 μg CLIN per mg PLA (Table 1). The profile of clindamycin release from PLA nanoparticles was evaluated for 9 days in PBS at 37 °C. It was characterized by a fast burst release of more than 60% of the clindamycin loaded onto the nanoparticles (Fig. 2E).

3.2 Antibacterial and antibiofilm properties of CLIN-PLA-NPs

To assess the antimicrobial properties of CLIN-PLA-NPs, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against *E. faecalis*

Table 1 PLA-NP and CLIN-PLA-NP hydrodynamic diameter, polydispersity index and zeta potential. Values are the mean \pm standard deviation of different batches ($N = 3$ for PLA-NPs and $N = 5$ for CLIN-PLA-NPs). Entrapment efficiency and drug loading (μg CLIN per mg PLA) were determined by CLIN quantification using HPLC. No significant difference (P -value < 0.05) was observed among means diameter, PDI or zeta potential using ANOVA followed by multiple comparison using statistical hypothesis testing and Bonferroni correction

	PLA-NPs	CLIN-PLA-NPs
Hydrodynamic diameter (nm)	155 ± 2	159 ± 2
Polydispersity index	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Zeta potential (mV)	-66 ± 3	-60 ± 2
Entrapment efficiency (%)	—	43 ± 7
Drug loading (μg mg^{-1})	—	10 ± 2

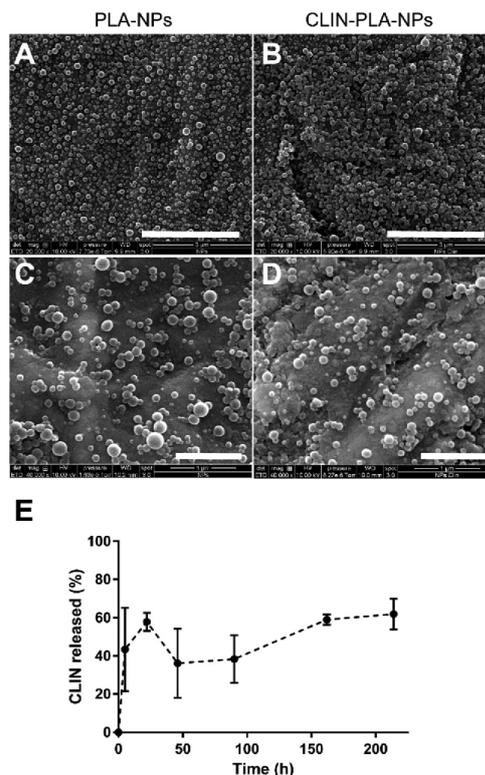


Fig. 2 Representative SEM images of PLA-NPs (A and C) and CLIN-PLA-NPs (B and D) at low and high magnification. Scale bars: 3 μm (top) and 1 μm (bottom). Profile of clindamycin release from the nanoparticles in PBS at 37 °C ($N = 3$) (E).

was determined according to the broth microdilution method, in the presence of serial concentrations of clindamycin (0.004 to 256 μg mL^{-1}), free or loaded onto nanoparticles (respectively CLIN and CLIN-PLA-NPs), or equivalent concentrations of empty PLA-NPs (0.016 to 1.02% solid content). A similar value of 32 μg mL^{-1} was obtained for free CLIN and CLIN-PLA-NPs (Table 2), whereas PLA-NPs were unable to inhibit *E. faecalis* growth. To evaluate the ability of CLIN-PLA-NPs to prevent biofilm formation or degrade a 24 hour old biofilm, MBIC₅₀ and MBEC₅₀ were estimated by measuring *E. faecalis* biofilm density after crystal violet staining. The MBIC₅₀, defined as the lowest CLIN concentration that results in a 50% inhibition of biofilm formation, was found to be 4 μg mL^{-1} for CLIN-PLA-NPs and free CLIN. PLA-NPs did not inhibit *E. faecalis* biofilm formation. The MBEC₅₀, defined as the lowest CLIN concentration that eradicates 50% of a 24 hour old biofilm, was determined following the addition of free CLIN, CLIN-PLA-NPs or PLA-NPs on a 24 hour old biofilm. It was found to be 16 μg mL^{-1} for CLIN-PLA-NPs and free CLIN, whereas PLA-NPs did not affect the biofilm.



Table 2 CLIN and NP antibacterial and antibiofilm properties ($N = 3$)

	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBIC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBEC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CLIN	32	4	16
CLIN-PLA-NPs	32	4	16
PLA-NPs	> 256	> 256	> 256

3.3 Antimicrobial properties of the nanocomposite hydrogel

To assess the antimicrobial properties of the nanocomposite hydrogel, agar diffusion assays were designed by plating hydrogel formulations containing fibrin alone (control) or fibrin supplemented with 50–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of free (CLIN) or clindamycin-loaded nanoparticles (CLIN-PLA-NPs), or with equivalent concentrations of free PLA-NPs (0.2–0.8% solid content) on *E. faecalis*-seeded agar dishes (Fig. 3A). Fibrin hydrogels containing clindamycin or clindamycin-loaded nanoparticles clearly inhibited *E. faecalis* growth in a dose-dependent manner, whereas the fibrin hydrogel loaded with PLA-NPs did not exhibit any antimicrobial activity (Fig. 3B).

3.4 Nanocomposite hydrogel formulation

A nanocomposite hydrogel containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ clindamycin in free form or loaded onto nanoparticles, which corresponds to 0.2% solid content of PLA, was formulated to provide the hydrogel with efficient antibacterial and antibiofilm properties. Fibrin hydrogel microstructure was then analysed at high magnification using SEM. Fibrin formed a loose meshwork (Fig. 4A). Clindamycin-loaded nanoparticles appeared localized within the holes of the meshwork and/or in close contact with fibrin (Fig. 4B). Cumulative clindamycin release from fibrin hydrogels was assessed to determine the impact of the formulation on the release of the antibiotic. After 24 h, 54.0 \pm 0.9% and 43.5 \pm 1.9% of the clindamycin was released from the fibrin hydrogel when it was added under the free form or in addition to empty nanoparticles respectively, while only 24.8 \pm 3.0% of the initially introduced clindamycin was released from the nanocomposite hydrogel formulated with clindamycin-loaded nanoparticles (Fig. 4C). This suggests that clindamycin-loaded nanoparticles restrain CLIN release from the hydrogel.

To investigate the release of nanoparticles from the hydrogel and their distribution within the hydrogel, green-fluorescent NPs (PLA-fluoNPs) were used. No release of the fluorophore from the particles into the aqueous medium (PBS) was observed within the four days of the experiment (ESI† 2). NPs appeared homogeneously distributed in the fibrin hydrogel and did not form agglomerates or patchwork (Fig. 4D). Time-course analyses of PLA-fluoNP release were then performed from hydrogels incorporated with or without DP-MSCs. Cumulative release profiles highlighted a complete release of the free fluorophore from the fibrin hydrogel after 4 days in the presence or absence of DP-MSCs, demonstrating that the fluorophore was not trapped by the fibrin hydrogel (Fig. 4E). After the same time, 61.3 \pm 6.7% and 49.3 \pm 12.4% of PLA-fluoNPs were released from cellularized and non-cellularized hydrogels, the difference being not significant.

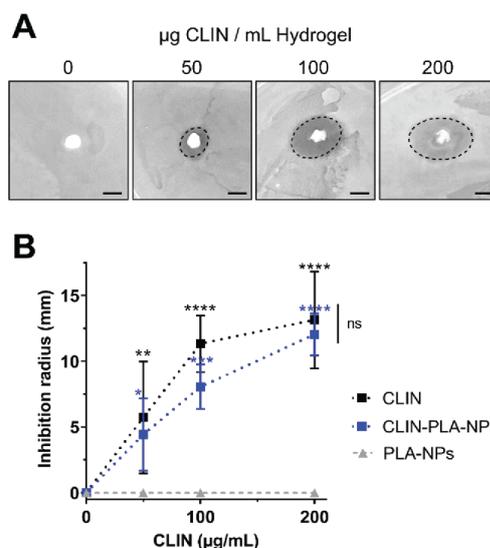


Fig. 3 (A) Representative pictures of agar diffusion assays in the presence of the fibrin-alone hydrogel (far left) or fibrin hydrogels loaded with CLIN-PLA-NPs to get final concentrations of 50, 100 or 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CLIN. Scale bar is 10 mm. (B) Graphical representation reporting the inhibition radius in the presence of 50, 100 or 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ free CLIN (black squares) or 2, 4 or 8 mg mL^{-1} CLIN-PLA-NPs (blue squares) or PLA-NPs (grey triangles). $N = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs. PLA-NPs as control. Differences between free CLIN and CLIN-PLA-NPs are not significant (ns).

3.5 Nanocomposite hydrogel cytotoxicity

CLIN-PLA-NP toxicity on DP-MSCs was investigated using a Live/Dead® assay and fluorescence imaging (Fig. 5A–D). After 48 h of culture, similar percentages of living DP-MSCs were observed in the presence of empty or clindamycin-loaded nanoparticles (77 \pm 4% and 75 \pm 3%, respectively) (Fig. 5E). Values were not statistically different from control cultures (in absence of NPs) or in the presence of free CLIN which showed 78 \pm 7% and 73 \pm 3% of living cells, respectively (Fig. 5E).

To confirm that NPs did not alter DP-MSC functionality, the synthesis of type I collagen, the main component of DP ECM, was assessed by immunohistochemistry after 7 days of culture (Fig. 6). While no staining was detected in the controls performed without primary antibody (Fig. 6A and B), we observed that DP-MSCs produced type I collagen both in the fibrin-alone hydrogel (Fig. 6C) and in the fibrin hydrogel containing CLIN-PLA-NPs (Fig. 6D).

4. Discussion

This paper reports the development of an innovative fibrin-based hydrogel supplemented with antibiotic-loaded PLA-NPs to establish an aseptic environment favourable to tissue regeneration. Antimicrobial properties were provided to the hydrogel



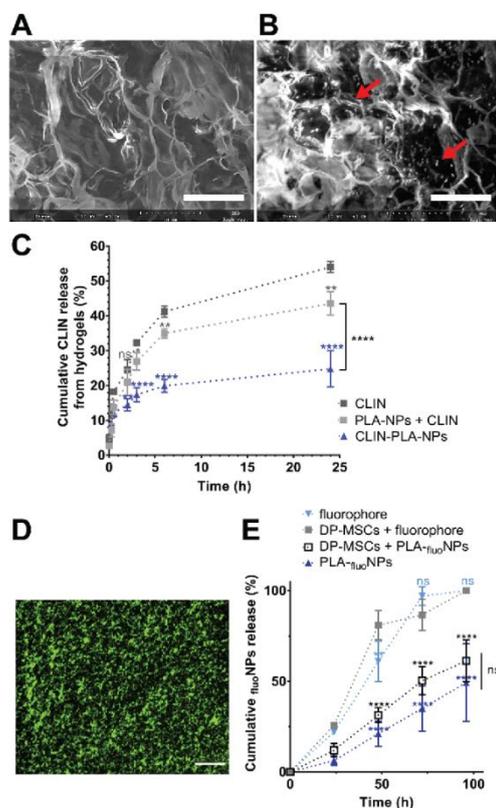


Fig. 4 Representative SEM pictures of the microstructure of a fibrin-alone hydrogel (A) and of a fibrin hydrogel containing CLIN-PLA-NPs (B). NPs are indicated by red arrows for illustration. Scale bar: 10 μm . (C) Cumulative release of CLIN from fibrin hydrogels formulated with free CLIN, free CLIN + empty PLA-NPs, or CLIN encapsulated in PLA-NPs ($N = 3$). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ vs. free CLIN control. The statistical difference between PLA-NPs + CLIN and CLIN-PLA-NPs at 24 h is indicated by a bracket. No significant difference was observed below 2 h. (D) Distribution of PLA- fluo -NPs within the fibrin hydrogel. Scale bar: 25 μm . (E) Graphical representation showing the cumulative release of PLA- fluo -NPs from non-cellularized or DP-MSC-containing hydrogels (dark blue triangles and empty black squares, respectively), and of the fluorophore from non-cellularized or DP-MSC-containing hydrogels (light blue triangles and gray squares, respectively). The fluorophore alone was used as a control. Released fluorescence is expressed as the percentage of the starting one incorporated into the hydrogel. $N = 3$. $****P < 0.0001$ vs. free fluorophore as control. No significant difference was observed below 48 h. Differences between DP-MSCs + PLA- fluo -NPs and PLA- fluo -NPs are not significant (ns).

via clindamycin-loaded nanoparticles. NPs have been proposed in dentistry for various clinical applications including endodontic space (root canal) disinfection.^{23,43,44} Most studies relied on the use of metal-based NPs (silver, gold, copper oxide, iron oxide or zinc oxide) which are known to have intrinsic antimicrobial properties.⁴⁵ However, the eco and cytotoxicity of these NPs is a

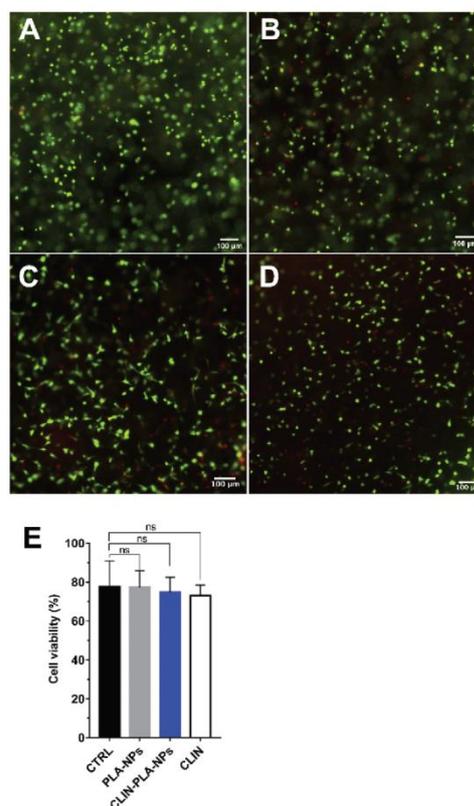


Fig. 5 Cell viability assessment with the Live/Dead[®] assay. (A–D) Representative pictures of DP-MSCs stained after culture for 48 h in a fibrin-alone hydrogel (A) or in a fibrin hydrogel containing 0.2% solid content PLA-NPs (B) or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ clindamycin-loaded nanoparticles (0.2% solid content) (C), or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ free CLIN (D). Scale bar: 100 μm . (E) Graphical representation of DP-MSC viability in the fibrin-alone hydrogel (CTRL) or in the presence of 0.2% solid content PLA-NPs or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ clindamycin loaded onto nanoparticles (CLIN-PLA-NPs), or free (CLIN) ($N = 6$; ns: not significant).

major drawback that still remains to be solved.²³ For this reason, non-metal polymeric 160–230 nm NPs made of chitosan or poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) were incorporated into toothpastes to deliver the antiseptic chlorhexidine in the dental biofilm. However, they displayed an *in vitro* toxicity between 20 and 60% on human gingival fibroblasts,⁴⁶ which precluded their clinical use. Therefore, designing novel NP formulations that are both antimicrobial and non-cytotoxic is required.

NP formation and drug entrapment efficiency (EE) depend on several parameters including the chemical synthesis method, the nature of the selected solvent, and the physicochemical properties of the drug.⁴⁷ By using a solvent diffusion method previously reported,³⁶ we obtained PLA-NPs and CLIN-PLA-NPs with similar hydrodynamic diameters (about 155–160 nm), polydispersity



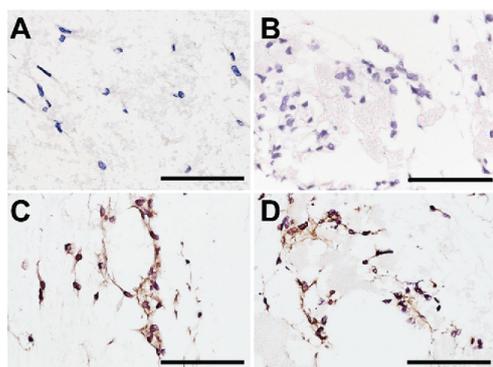


Fig. 6 Representative pictures of type I collagen immunostaining after 7 days of culture of DP-MSCs in a fibrin-alone hydrogel (A and C) or in a fibrin hydrogel containing 2 mg mL^{-1} CLIN-PLA-NPs (B and D). Controls without the primary antibody (A and B). Scale bar: $20 \mu\text{m}$.

index (0.09) and zeta potential values (about -65 mV). This suggests that the CLIN incorporation did not significantly modify the physical parameters of PLA-NPs. Particle size influences many properties and it is therefore important to characterize precisely this physicochemical parameter. DLS data are not sufficient to assess particles' size and size distribution because this method is intensity-based and therefore more sensitive to large particles. We accordingly used SEM which allows a number-based particles' size measurement. SEM results highlighted a large number of small-sized particles. In addition, particles observed by SEM were dehydrated, which may lead to their artificial compaction compared to DLS measurements.

Nanoparticle synthesis by nanoprecipitation was conducted in carbonate buffer at pH 10. At this pH, clindamycin, which exhibits a pK_a of 7.6, is to a very small extent ionized and therefore less soluble than in water. This reduced solubility results in a decreased diffusion of clindamycin in the aqueous phase during the nanoprecipitation process, favouring its coprecipitation with the hydrophobic polymer. The entrapment rate into PLA particles is thus enhanced in carbonate buffer compared to nanoprecipitation in water for example. Such a phenomenon was previously described by Govender *et al.* with procaine hydrochloride as a drug and PLGA as a polymer.⁴⁸ We thus obtained a drug loading of $10 \pm 2 \mu\text{g CLIN per mg PLA}$ and an entrapment efficiency of $43 \pm 7\%$. These values were higher than those obtained during PLGA-nanosphere vectorization of antibiotics such as minocycline which was reported to give the highest EE (29.9%).⁴⁹ Higher antibiotic EE could only be obtained with the use of surfactants,^{29,31} but the latter are known to be deleterious for many host cells and tissues. On the contrary, one major benefit of our CLIN-PLA-NPs is that they were prepared following a protocol that did not need any surfactant or stabilizer that may be pro-inflammatory or toxic for cells incorporated into or close to the fibrin hydrogel.

The lincosamide antibiotic CLIN inhibits bacterial protein synthesis by acting at the level of the 50S ribosome.³² It was

chosen in this study to provide the hydrogel with antimicrobial properties for various reasons, first owing to its broad spectrum activity and its routine use in oral medicine in patients allergic to β -lactams such as amoxicillin.³² CLIN is for these patients the antibiotic of choice for treating oral infections or to prevent endocarditis.⁵⁰ Interestingly, CLIN has the original ability to stimulate the host immune system by promoting the mobilization and chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes to the infected sites.⁵⁰ This property may be highly valuable to attract, into the fibrin scaffold, periodontal/blood immune cells in order to potentiate the CLIN antibacterial effect. CLIN was also shown to promote angiogenesis, another interesting property in the context of DP regeneration where the development of new vessels into the endodontic space is needed.⁵¹ Finally, CLIN was selected as an example of antibiotic since it can be easily incorporated into PLA-NPs owing to its positive charge and hydrophobicity.^{33–35}

Antibacterial properties of CLIN-PLA-NPs were assessed on *E. faecalis*, a microorganism frequently found in persistent endodontic infections, hard to eradicate and responsible for many endodontic treatment failures.⁵² The MIC of $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ reported in this work for the *E. faecalis* ATCC[®] 47077TM strain in the presence of CLIN-PLA-NPs was the same as for free CLIN, suggesting that CLIN incorporation into PLA-NPs did not decrease its antimicrobial properties. It was similar to the MIC reported by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing for *E. faecalis* growth inhibition by CLIN. CLIN was found to be efficient at relatively high concentration, but its incorporation into PLA-NPs could strongly limit its putative systemic effects and adverse reactions.⁵³ Experiments in animal models are on-going to investigate *in vivo* the safety of CLIN-PLA-NPs and the ability of this innovative medical device to promote DP regeneration. Interestingly, CLIN-PLA-NPs were able to inhibit the formation of an *E. faecalis* biofilm. This result contrasts with the reported inability of CLIN-containing electrospun nanofibers to inhibit the formation of *E. faecalis* and *Actinomyces naeslundii* biofilms in the absence of ciprofloxacin and metronidazole.¹⁸ We suggest that this difference is due to the presence of PLA-NPs which are known to protect the structure of the drug, enhance its bioavailability and biodistribution, and ensure a high local antibiotic concentration.²³ It may also be a result of the microstructure of the fibrin hydrogel which could allow for a better diffusion of the antibiotic through the meshwork.⁵⁴ Indeed, the agar diffusion assay clearly displayed that CLIN-PLA-NPs progressively released from the hydrogel efficiently inhibited *E. faecalis* growth, in a similar way to $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ free CLIN incorporated into the hydrogel. This result demonstrates that CLIN-PLA-NPs maintain their activity upon incorporation within the nanocomposite hydrogel. Other works have demonstrated that CLIN inhibits *Streptococcus aureus* biofilm formation,⁵⁵ and the MBIC₅₀ results reported here extend the CLIN antibiofilm property to *E. faecalis*. In addition, our MBEC₅₀ data indicates that CLIN-PLA-NPs can induce *E. faecalis* biofilm dispersal. This property may be highly valuable in the context of DP regeneration since the eradication of the endodontic bacterial biofilm



present on the dentin wall or deeply entrapped in dentin tubules remains a major challenge to REPs.^{14,15,56}

Investigation of the nanocomposite hydrogel microstructure using SEM showed that the fibrin formed a loose meshwork with CLIN-PLA-NPs that seemed to be free and/or in contact with the fibrin fibrils. Time-course analysis of CLIN release from the hydrogel revealed that, after 24 h, CLIN was released approximately two times slower from the hydrogel when it was loaded onto PLA nanoparticles compared to free CLIN. Clindamycin release from nanoparticles in a physiological buffer (PBS at 37 °C) was rapid, which suggests the dissolution of the drug which is close to the surface and, accordingly, rapidly available. The small size of the particles, characterized by a large surface to volume ratio, may enhance this effect. These results suggest that the CLIN-PLA-NPs allows for the maintenance of the CLIN within the nanocomposite hydrogels in comparison to free CLIN. Since HPLC equipped with UV/Visible detection at 200 nm is prone to background-limited sensitivity, our study of clindamycin release from the hydrogel was restricted to 24 h. Further studies are necessary to precisely characterize the time-course release of clindamycin from the various fractions of this three component system, using for example a more accurate detection method such as HPLC-MS/MS.⁵⁷ The use of fluorescent PLA-based nanoparticles demonstrated that the NPs were homogeneously distributed into the hydrogel and did not form aggregates. Time-course analyses further revealed that PLA-_{fluo}-NPs were progressively released from the hydrogel into the medium without any impact of the DP-MSCs on the NP release profile. This result indicates that the nanocomposite hydrogel could be used for a cellularized approach of REPs. Altogether, these results suggest that the hydrogel may constitute a reservoir capable of bringing NP close to the dentin wall after injection into the endodontic space. This property is extremely valuable to destroy bacterial biofilms present on the dentin surface and in dentin tubules.⁵⁸ This finding suggests that the use of PLA-NPs as a CLIN carrier and their progressive release from the hydrogel could allow for a prolonged effect of the antibiotic by maintaining high drug concentration within the hydrogel and at its periphery compared to the drug alone. This could provide a suitable environment lasting long enough to allow the formation of a novel immunocompetent DP-like tissue. It is possible that the hydrophobic nature of both fibrin and PLA could be involved in the progressive release of the NPs from the hydrogel. However, the precise mechanisms by which NPs are maintained into the hydrogel and released from it remain to be solved. Deciphering the close relationships that we observed between NPs and the fibrin network will help answer this question.

The biocompatibility of the nanocomposite hydrogel was assessed on DP-MSCs. Cell viability was found to be about 75% after 48 h of culture in the presence of CLIN-PLA-NPs, which corresponds to the ISO 10993-5 standards that require at least 70% cell viability.⁵⁹ These results are similar to those reported for various types of mesenchymal stem cells, including DP-MSCs, seeded in a fibrin scaffold.^{11,60} They are higher than the DP-MSC viability of 50–60% measured in clindamycin,

ciprofloxacin and metronidazole-loaded electrospun nanofibers.¹⁹ This difference may be due to the high biocompatibility reported for fibrin scaffolds compared to synthetic ones.¹¹ At the functional level, our immunostaining experiments showed that DP-MSCs cultured within fibrin-alone and CLIN-PLA-NP-containing hydrogels synthesized type I collagen, which confirms the previously reported safety of fibrin-based scaffolds for DP-MSCs.²⁰ Our results are consistent with a recent study reporting that CLIN was safe for DP-MSCs *in vitro* in the same range of concentrations (*i.e.* below 500 µg mL⁻¹).⁵¹ However, the mechanism of action of CLIN on DP-MSCs within the nanocomposite hydrogel deserves further characterization to determine the real impact of the antibiotic on cell differentiation and hydrogel degradation in favour of dental pulp matrix neo-synthesis.

5. Conclusions

In the present study, we successfully developed an innovative, antibacterial and biocompatible hydrogel that may be valuable for DP regeneration in a previously infected endodontic space. CLIN-loaded PLA-NPs released from the hydrogel displayed antibiotic and antibiofilm properties that could overcome a major challenge of REPs which is the persistence, in the endodontic space, of bacteria that hamper the DP regeneration process. Work is on-going to determine what proportion of NPs accumulate along the dentin wall and penetrate into the micrometer-sized dentin tubules. Investigations of the antibacterial properties of these NPs loaded with CLIN or other antibiotic molecules against multispecies endodontic biofilms are also in progress. We believe that the presented technology could be transferable to other tissue engineering and regenerative medicine strategies where asepsis is difficult to reach by conventional disinfection means.

Author contributions

BV, FMG and JCF conceived the original idea. JCF and MD designed the study, supervised the work and wrote the article. MBe analysed the results and drafted the article. MBo, FC and ML synthesized and characterized the CLIN-PLA-NPs. MBo performed the release analyses and assessed the antimicrobial properties. MBe prepared the samples for SEM analyses and immunohistochemistry. SG extracted and characterized the DP-MSCs. MP and AC performed the Live/Dead analyses. CP synthesized the PLA-_{fluo}-NPs. DD performed the biofilm analyses. CP and DD gave technical advices regarding NPs synthesis and characterizations.

Conflicts of interest

BV, DD and CP work for the Adjuvatis[®] company which manufactured PLA-NPs and have accordingly a commercial interest. However, these authors only supplied the material and were not involved in data analyses or interpretation.



Acknowledgements

This work was supported by the French National Centre for Scientific Research (CNRS) and the French Institute for Odontological Research (IFRO). DDC is a recipient of a CIFRE PhD grant from the French National Association of Research and Technology (ANRT). ML was supported by a PhD studentship of the *Ligue contre le Cancer* (France) for three years. The authors acknowledge the contribution of Adjuvatis® for providing PLANPs and its expertise in the NP domain, and the *Centre Technologique des Microstructures* (Université Lyon 1, Villeurbanne, France) for help with electron microscopy. Immunohistochemistry experiments were performed by N. El Kholti in the PRIMATISS facility housed in the laboratory (UMR 5305 CNRS/Université Lyon 1).

References

- J. J. Mao, S. G. Kim, J. Zhou, L. Ye, S. Cho, T. Suzuki, S. Y. Fu, R. Yang and X. Zhou, *Dent. Clin. North Am.*, 2012, **56**(3), 639–649.
- A. Diogenes, N. B. Ruparel, Y. Shiloah and K. M. Hargreaves, *J. Am. Dent. Assoc., JADA*, 2016, **147**(5), 372–380.
- T. Gong, B. C. Heng, E. C. M. Lo and C. Zhang, *Stem Cells Int.*, 2016, **2016**, 9204574.
- M. Ducret, H. Fabre, A. Celle, F. Mallein-Gerin, E. Perrier-Groult, B. Alliot-Licht and J. C. Farges, *Biomed. Mater. Eng.*, 2017, **28**(s1), S159–S168.
- T. Morotomi, A. Washio and C. Kitamura, *Jpn Dent. Sci. Rev.*, 2019, **55**(1), 5–11.
- K. M. Galler, R. N. D'Souza, J. D. Hartgerink and G. Schmalz, *Adv. Dent. Res.*, 2011, **23**(3), 333–339.
- V. Rosa, A. Della Bona, B. N. Cavalcanti and J. E. Nör, *Dent. Mater.*, 2012, **28**(4), 341–348.
- M. T. Albuquerque, M. C. Valera, M. Nakashima, J. E. Nör and M. C. Bottino, *J. Dent. Res.*, 2014, **93**(12), 1222–1231.
- P. J. Palma, J. C. Ramos, J. B. Martins, A. Diogenes, M. H. Figueiredo, P. Ferreira, C. Viegas and J. M. Santos, *J. Endod.*, 2017, **43**(8), 1279–1287.
- C. C. Huang, R. Narayanan, N. Warshawsky and S. Ravindran, *Front. Physiol.*, 2018, **9**, 495.
- K. M. Galler, F. P. Brandl, S. Kirchhof, M. Widbillier, A. Eidt, W. Buchalla, A. Göpferich and G. Schmalz, *Tissue Eng., Part A*, 2018, **24**(3–4), 234–244.
- Y. Li, H. Meng, Y. Liu and B. P. Lee, *Sci. World J.*, 2015, **2015**, 685690.
- A. F. Fouad, *Adv. Dent. Res.*, 2011, **23**(3), 285–289.
- L. Vishwanat, R. Duong, K. Takimoto, L. Phillips, C. O. Espitia, A. Diogenes, S. B. Ruparel, D. Kolodrubetz and N. B. Ruparel, *J. Endod.*, 2017, **43**(6), 916–922.
- P. Verma, A. Nosrat, J. R. Kim, J. B. Price, P. Wang, E. Bair, H. H. Xu and A. F. Fouad, *J. Dent. Res.*, 2017, **96**(1), 100–106.
- M. C. Bottino, K. Kamocki, G. H. Yassen, J. A. Platt, M. M. Vail, Y. Ehrlich, K. J. Spolnik and R. L. Gregory, *J. Dent. Res.*, 2013, **92**(11), 963–969.
- J. Palasuk, K. Kamocki, L. Hippenmeyer, J. A. Platt, K. J. Spolnik, R. L. Gregory and M. C. Bottino, *J. Endod.*, 2014, **40**(11), 1879–1884.
- K. Kamocki, J. E. Nör and M. C. Bottino, *Int. Endod. J.*, 2015, **48**(12), 1147–1156.
- A. Karczewski, S. A. Feitosa, E. I. Hamer, D. Pankajakshan, R. L. Gregory, K. J. Spolnik and M. C. Bottino, *J. Endod.*, 2018, **44**(1), 155–162.
- M. Ducret, A. Montebault, J. Josse, M. Padeloup, A. Celle, R. Benchrih, F. Mallein-Gerin, B. Alliot-Licht, L. David and J. C. Farges, *Dent. Mater.*, 2019, **35**(4), 523–533.
- N. Ruangsawasdi, M. Zehnder and F. E. Weber, *J. Endod.*, 2014, **40**(2), 246–250.
- H. Redl, G. Schlag, G. Stanek, A. Hirschl and T. Seelich, *Biomaterials*, 1983, **4**(1), 29–32.
- L. Wang, C. Hu and L. Shao, *Int. J. Nanomed.*, 2017, **12**, 1227–1249.
- K. Forier, K. Raemdonck, S. C. De Smedt, J. Demeester, T. Coenye and K. Braeckmans, *J. Controlled Release*, 2014, **190**, 607–623.
- W. S. Cheow and K. Hadinoto, *Methods Mol. Biol.*, 2014, **1147**, 227–238.
- B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki and H. Brem, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2016, **107**, 163–175.
- A. Mahapatro and D. K. Singh, *J. Nanobiotechnol.*, 2011, **9**, 55.
- V. Pavot, M. Berthet, J. Rességuier, S. Legaz, N. Handké, S. C. Gilbert, S. Paul and B. Verrier, *Nanomedicine*, 2014, **9**(17), 2703–2718.
- D. M. Casa, T. C. Carraro, L. E. de Camargo, L. F. Dalmolin, N. M. Khalil and R. M. Mainardes, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2015, **15**(1), 848–854.
- W. Yao, P. Xu, Z. Pang, J. Zhao, Z. Chai, X. Li, H. Li, M. Jiang, H. Cheng, B. Zhang and N. Cheng, *Int. J. Nanomed.*, 2014, **9**, 3963–3970.
- E. Pancani, M. Menendez-Miranda, A. Pastor, F. Brisset, M. F. Bernet-Camard, D. Desmaële and R. Gref, *Acta Pharm. Sin. B*, 2018, **8**(3), 420–431.
- M. Smieja, *Can. J. Infect. Dis.*, 1998, **9**(1), 22–28.
- S. J. Siegel, J. B. Kahn, K. Metzger, K. I. Winey, K. Werner and N. Dan, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2006, **64**(3), 287–293.
- P. Gao, X. Nie, M. Zou, Y. Shi and G. Cheng, *J. Antibiot.*, 2011, **64**(9), 625–634.
- S. R. Shah, A. M. Henslee, P. P. Spicer, S. Yokota, S. Petrichenko, S. Allahabadi, G. N. Bennett, M. E. Wong, F. K. Kasper and A. G. Mikos, *Pharm. Res.*, 2014, **31**(12), 3379–3389.
- M. Lamrayah, F. Charriaud, S. Hu, S. Megy, R. Terreux and B. Verrier, *Int. J. Pharm.*, 2019, **568**, 118569.
- K. Na-Bangchang, V. Banmairuroi, B. Kamanikom and D. Kiold, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 2006, **37**(1), 177–184.
- L. Thieme, M. Klinger-Strobel, A. Hartung, C. Stein, O. Makarewicz and M. W. Pletz, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2018, **73**(6), 1553–1561.
- H. Fabre, M. Ducret, O. Degoul, J. Rodriguez, E. Perrier-Groult, E. Aubert-Foucher, M. Padeloup, C. Auxenfans,



- C. McGuckin, N. Forraz and F. Mallein-Gerin, *Stem Cells Int.*, 2019, **2019**, 2186728.
- 40 M. Ducret, H. Fabre, J. C. Farges, O. Degoul, G. Atzeni, C. McGuckin, N. Forraz, F. Mallein-Gerin and E. Perrier-Groult, *J. Endod.*, 2015, **41**(9), 1492–1499.
- 41 J. Tao, S. F. Chow and Y. Zheng, *Acta Pharm. Sin. B*, 2019, **9**(1), 4–18.
- 42 M. Chorny, I. Fishbein, H. D. Danenberg and G. Golomb, *J. Controlled Release*, 2002, **83**(3), 389–400.
- 43 R. A. Bapat, C. P. Joshi, P. Bapat, T. V. Chaubal, R. Pandurangappa, N. Jnanendrappa, B. Gorain, S. Khurana and P. Kesharwani, *Drug Discovery Today*, 2019, **24**(1), 85–98.
- 44 M. Samiei, A. Farjami, S. M. Dizaj and F. Lotfipour, *Mater. Sci. Eng., C*, 2016, **58**, 1269–1278.
- 45 M. Polívková, T. Hubáček, M. Staszek, V. Švorčík and J. Siegel, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**(2), 419.
- 46 L. Chronopoulou, G. Nocca, M. Castagnola, G. Paludetti, G. Ortaggi, F. Sciubba, M. Bevilacqua, A. Lupi, G. Gambarini and C. Palocci, *New Biotechnol.*, 2016, **33**(1), 23–31.
- 47 J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz and P. Couvreur, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**(3), 1147–1235.
- 48 T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum and S. S. Davis, *J. Controlled Release*, 1999, **57**(2), 171–185.
- 49 T. S. Kashi, S. Eskandarion, M. Esfandyari-Manesh, S. M. Marashi, N. Samadi, S. M. Fatemi, F. Atyabi, S. Eshraghi and R. Dinavand, *Int. J. Nanomed.*, 2012, **7**, 221–234.
- 50 I. Brook, M. A. Lewis, G. K. Sándor, M. Jeffcoat, L. P. Samaranyake and J. Vera Rojas, *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.*, 2005, **100**(5), 550–558.
- 51 N. Dubey, J. Xu, Z. Zhang, J. E. Nör and M. C. Bottino, *J. Endod.*, 2019, **45**(7), 882–889.
- 52 A. A. Hoelscher, J. K. Bahcall and J. S. Maki, *J. Endod.*, 2006, **32**(2), 145–147.
- 53 M. H. Thornhill, M. J. Dayer, M. J. Durkin, P. B. Lockhart and L. M. Baddour, *J. Dent. Res.*, 2019, **98**(10), 1081–1087.
- 54 J. Chotitumnavee, T. Parakaw, R. L. Srisatjaluk, C. Pruksaniyom, S. Pisitpipattana, C. Thanathipanont, T. Amarasingh, N. Tiankhum, N. Chimchawee and N. Ruangsawasdi, *J. Dent. Sci.*, 2019, **14**(1), 7–14.
- 55 K. Schilcher, F. Andreoni, V. Dengler Haunreiter, K. Seidl, B. Hasse and A. S. Zinkernagel, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, **60**(10), 5957–5967.
- 56 S. N. Kaushik, B. Kim, A. M. Walma, S. C. Choi, H. Wu, J. J. Mao, H. W. Jun and K. Cheon, *Biomater. Res.*, 2016, **20**, 14.
- 57 M. Seifrtová, L. Nováková, C. Lino, A. Pena and P. Solich, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **649**(2), 158–179.
- 58 P. Neelakantan, M. Romero, J. Vera, U. Daood, A. U. Khan, A. Yan and G. S. P. Cheung, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**(8), 1748.
- 59 A. L. B. Maçon, S. Li, J. J. Chung, A. Nommets-Nomm, A. K. Solanki, M. M. Stevens and J. R. Jones, *J. Mater. Chem. B*, 2016, **4**(36), 6032–6042.
- 60 W. Ho, B. Tawil, J. C. Dunn and B. M. Wu, *Tissue Eng.*, 2006, **12**(6), 1587–1595.





FIBRIN-BASED SCAFFOLDS FOR DENTAL PULP REGENERATION: FROM BIOLOGY TO NANOTHERAPEUTICS

M. Ducret^{1,2,3,*}, A. Costantini^{1,2,3}, S. Gobert^{1,2}, J-C. Farges^{1,2,3} and M. Bekhouche^{1,2}

¹ Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique, UMR5305 CNRS/Université Lyon 1, UMS3444 BioSciences Gerland-Lyon Sud, Lyon, France.

² Université de Lyon, Université Lyon 1, Faculté d'Odontologie, Lyon, France.

³ Hospices Civils de Lyon, Service de Consultations et Traitements Dentaires, Lyon, France.

Abstract

Tissue engineering-based endodontic therapies, designed to regenerate the dental pulp (DP) in the devitalised endodontic space, have been proposed to improve tooth longevity compared to conventional root-filling therapies. Their aim is to restore tooth vitality and major DP functions necessary to maintain tooth health such as immunosurveillance, sensitivity and healing/repair/regenerative capacities. Several formulations based on the use of fibrin, the main component of the blood clot matrix, recently gave valuable results in the regeneration of the human DP. This review describes recent fibrin-based scaffolds designed for that purpose. After having presented the various strategies for DP regeneration, the main fibrin-based scaffolds reported so far for clinical use in endodontics were reviewed. Particular emphasis was given to hydrogel devices that may be improved by incorporation of bioactive molecules that stimulate vascularisation and tissue neof ormation or provide antibacterial properties. Data indicate that fibrin-based scaffolds constitute a highly favourable environment for mesenchymal stem cells, which is maintained upon functionalisation. Additional knowledge is needed to understand how fibrin and functionalising agents affect adhesion, survival, proliferation, migration and differentiation of cells incorporated in the scaffold or which will colonise it from neighbouring host tissues. This knowledge is needed to adapt the hydrogel formulation for various clinical conditions.

Keywords: Dental pulp, regeneration, fibrin, platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), tissue engineering, scaffold, hydrogel, mesenchymal stem cells (MSCs), nanotherapeutics.

***Address for correspondence:** Dr Maxime Ducret, Institut de biologie et Chimie des Protéines, 7 Passage du Vercors, 69007 Lyon, France.
Email: maxime.ducret@ibcp.fr

Copyright policy: This article is distributed in accordance with Creative Commons Attribution Licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

Abbreviations		PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)
3D	three-dimensional	PPP	platelet-poor plasma fraction
BMP	bone morphogenetic proteins	PRF	platelet-rich fibrin
CLIN	clindamycin	PRP	platelet-rich plasma
DP	dental pulp	SCF	stem cell factor
ECM	extracellular matrix	SEM	scanning electron microscope
EMA	European Medicines Agency	SDF1 α	stromal cell-derived factor 1 α
FDA	U.S. Food and Drug Administration	VEGF	vascular endothelial growth factor
FGF	fibroblast growth factor		
IL	interleukin		
LPS	lipopolysaccharide		
MSCs	mesenchymal stem cells		
NGF	nerve growth factor		
NPs	nanoparticles		
PDGF	platelet-derived growth factor		
PEG	polyethyleneglycol		
PLA	poly (D,L) lactic acid		

Introduction

The DP is the loose connective tissue located in the endodontic space present in the centre of the tooth. It is responsible for tooth vitality, pain sensation, immune defence and repair/regeneration upon injury. In caries disease, degradation and invasion of enamel and dentine by oral bacteria trigger



inflammatory/immune mechanisms in the DP that are notably characterised by a large increase of the intrapulpal interstitial pressure. Blood-vessel compression eventually leads to blood-flow arrest, DP necrosis and endodontic space invasion by bacteria (Farges *et al.*, 2015a; Farges *et al.*, 2015b). Since, in the absence of blood flow, the infected DP is inaccessible to the host immune defence, the intervention of a dental practitioner is required, whose goal is to remove the necrotic tissue, disinfect and then fill the endodontic space with a tight biomaterial to prevent future microorganism contamination. However, several studies have shown that tooth longevity is much shorter due to the absence of DP immune and sensory systems and repair/regenerative abilities, which makes the tooth more susceptible to re-infection and/or fracture (Mao *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2010). For this reason, tissue engineering-based therapeutic strategies, based on the use of scaffolds possibly containing stem cells, have been proposed to regenerate a fully functional DP in the endodontic space (Hargreaves *et al.*, 2014; Nygaard-Ostby and Hjortdal, 1971). However, none of these scaffolds was yet found to possess the ideal properties for DP regeneration, and designing innovative formulations is clearly required (Albuquerque *et al.*, 2014; Ducret *et al.*, 2017; Galler *et al.*, 2018).

Recently, fibrin-based scaffolds – in particular in the form of hydrogels – were demonstrated to be highly suitable for DP regeneration since they clearly support DP-like tissue neof ormation both *in vitro* and *in vivo* (Bekhouché *et al.*, 2020; Ducret *et al.*, 2019; Galler, 2016a; Galler *et al.*, 2018; Ruangsawasdi *et al.*, 2014; Ruangsawasdi *et al.*, 2017). The purpose of this review was to describe recent developments and future challenges of fibrin-based hydrogel formulations designed for DP regeneration. The first part exposes the current strategies considered for

DP regeneration, the second one describes the main fibrin-based hydrogels that have been experimentally tested. The third part reports several promising strategies of functionalisation recently implemented to improve fibrin-based hydrogel properties, with the ultimate goal is to use these hydrogels in future endodontic nanotherapeutics.

DP regeneration strategies

Revascularisation

Revascularisation was the first described strategy aimed at regenerating the DP in the devitalised endodontic space (Östby, 1961). It consists of inducing a bleeding from the periapical periodontal ligament, using an endodontic file, to form a blood clot in the endodontic space (Banchs and Trope, 2004) (Fig. 1). The endodontic space thus becomes full of an autologous natural fibrin scaffold, containing PDGFs, that promote vascularisation and blood clot replacement with a neotissue formed from infiltrating periodontal MSCs. Bleeding also brings numerous molecular (complement components, immunoglobulins, chemotaxins and antibacterial peptides) and cellular (polynuclear leukocytes and macrophages) actors of the innate and adaptive immunity that protect the blood clot from infections (Saoud *et al.*, 2016). Revascularisation presents the large benefit of not inducing a foreign-body immune response, since all players of the regeneration process originate from the patient (Dianat *et al.*, 2017; Jadhav *et al.*, 2012). Other advantages of this strategy are simplicity, rapidity, low cost, and clinical efficacy (Raddall *et al.*, 2019). Revascularisation has been indicated, for several years by both the American and European Associations of Endodontists, for the treatment of immature permanent teeth (Galler *et al.*

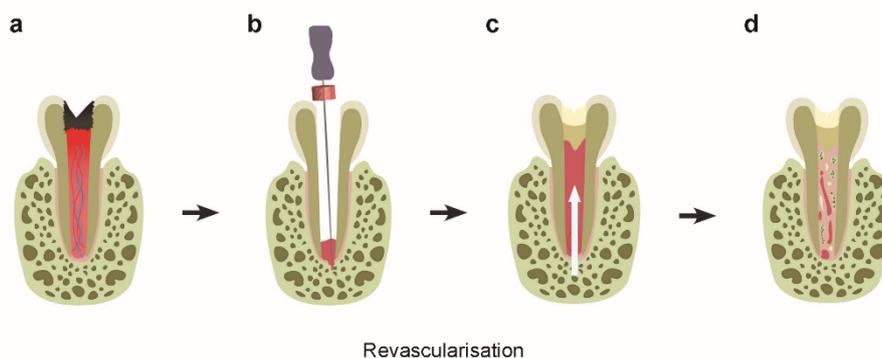


Fig. 1. Strategy of DP revascularisation. (a) Deep caries lesion (black) and DP with irreversible pulpitis (red). (b) Upon DP removal, the endodontic space is roughly cleaned, then an apical bleeding is triggered from the periapical periodontal ligament with an endodontic file, in order (c) to form a blood clot which completely fills the endodontic space. (d) The blood clot is replaced with a neotissue formed by incoming periodontal MSCs. The neotissue is a fibrous connective tissue more or less calcified, sometimes cementum-like, rather than true DP.

al., 2016b; Schmalz and Smith, 2014). However, its major limitation is that the neo-formed tissue in the endodontic space is either fibrous connective tissue or cellular cementum, rather than a regular DP tissue (Albuquerque *et al.*, 2014; Becerra *et al.*, 2014; Nygaard-Ostby and Hjortdal, 1971). This is a real disadvantage since, in the absence of an odontoblast layer at the pulp-dentine interface, dentine cannot be deposited on the endodontic wall to increase the robustness of the tooth and physically protect the new DP from external irritants. The absence of odontoblasts with long cell processes in dentine tubules also prevents the early sensing of external injuries (Farges *et al.*, 2015a; Farges *et al.*, 2015b). Finally, a risk has been reported of tooth-colour change following the formation of the blood clot with this technique (Becerra *et al.*, 2014; Nosrat *et al.*, 2012).

Cell-free and cell-based regeneration

More recently, following the development of multiple kinds of natural and synthetic scaffolds for tissue engineering (Moussa and Aparicio, 2019) and the discovery of various populations of MSCs in the DP and the periapical area (Ducret *et al.*, 2015a; Gronthos *et al.*, 2000; Kerkis *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2003; Sonoyama *et al.*, 2008), two additional strategies, described as cell-based and cell-free, have been proposed for regenerating the DP.

The cell-based regeneration strategy, based on the tissue engineering original triad (scaffold, stem

cells and growth factors) (Langer and Vacanti, 1993), consists of associating MSCs and a hydrogel-type biomaterial, possibly functionalised by bioactive molecules, to recreate a new DP tissue (Nakashima *et al.*, 2019) (Fig. 2). This strategy recently gave promising results both in animal models and humans when DP-derived MSCs were used (Nakashima *et al.*, 2017; Nakashima *et al.*, 2019; Ruangsawasdi *et al.*, 2017). Clinical trials reported the re-establishment of tooth sensitivity and the increase of root length, confirming the relevance of this strategy (Iohara *et al.*, 2018; Nakashima *et al.*, 2019; Xuan *et al.*, 2018). However, the standardisation of the protocols for human MSC isolation, characterisation, *ex vivo* amplification, storage and implantation in the host, in accordance with good manufacturing practices, is still a big challenge. This is before considering the cell-based regeneration approach (Ducret *et al.*, 2015a; Ducret *et al.*, 2017) for cell-based medicinal products by European authorities and the FDA (Ducret *et al.*, 2015b).

The cell-free regeneration strategy is characterised by the implantation of an uncellularised scaffold (Galler *et al.*, 2014; Widbiller *et al.*, 2018) into the endodontic space, functionalised with bioactive molecules such as growth factors that are released progressively. Passive diffusion through the root foramen will allow these factors to attract, into the hydrogel, host periodontal MSCs that will differentiate into DP cells (Conde *et al.*, 2015; Langer

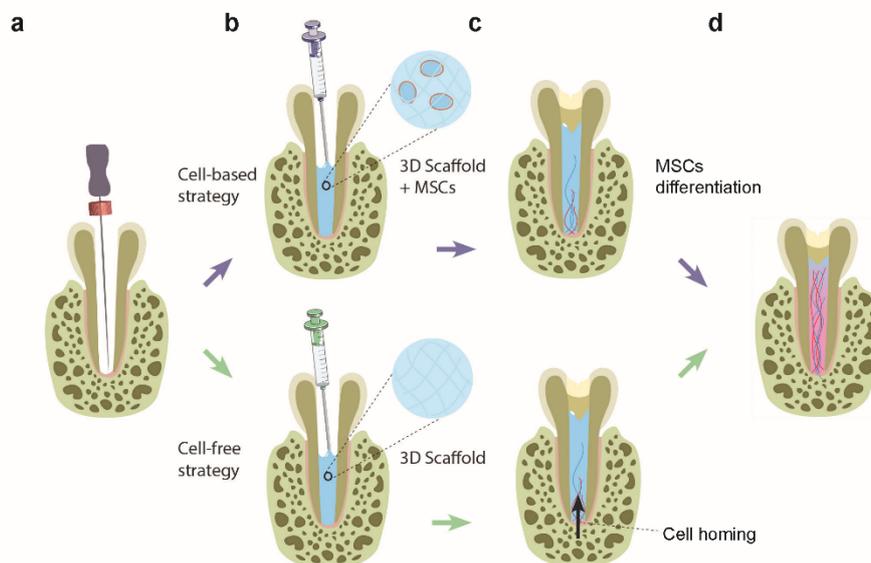


Fig. 2. Cell-free and cell-based DP regeneration. (a) Deep caries lesion (black) and DP with irreversible pulpitis (red). (b) Upon DP removal, the endodontic space is cleaned, disinfected and shaped. (c) A cell-free or cellularised scaffold formulation is then injected to get a 3D environment able to promote cell survival and vascularisation. (d) Progressive replacement of the scaffold leads to the formation of a vascularised and innervated neotissue expected to be a DP.

and Vacanti, 1993) (Fig. 2). This strategy appears to be an easier way than the cell-based approach since it does not involve isolation and manipulation of autologous or allogenic MSCs *in vitro* before implantation. Therefore, it is considered a relevant concept that may offer rapid clinical translation to human in the future (Huang and Garcia-Godoy, 2014; Yang *et al.*, 2015). However, since the tissue formed in the endodontic space rarely possess the characteristics of the DP tissue, it is not clear whether periodontal MSCs can differentiate into DP cells (Huang *et al.*, 2009).

Challenges for scaffold-based DP regeneration

Regenerative strategies are facing several challenges. One major difficulty is to obtain odontoblasts to produce dentine (Ducret *et al.*, 2017). Moreover, most if not all of the scaffolds designed for DP regeneration lack antibacterial activity. This may constitute a major obstacle to clinical use, since animal model studies have demonstrated that microorganisms remaining in the endodontic space hinder DP regeneration (Redl *et al.*, 1983; Verma *et al.*, 2017). As stated above, other important factors to consider for future clinical use are the cost of the technique, the biological properties of the scaffold and its ease of handling and storage (Ducret *et al.*, 2015a; Ducret *et al.*, 2017), making the scaffold a central player for the success of DP regeneration.

Biologically, an ideal scaffold must create a cell-friendly environment able to promote adhesion, survival and differentiation of MSCs that will progressively replace it by an ECM characteristic of the DP (Ducret *et al.*, 2017). Clinical requirements include low viscosity, allowing implantation into the small and anatomically complex endodontic space. Numerous kinds of scaffolds have been tested so far, including natural and synthetic polymers/co-polymers, hydroxyapatite/tricalcium phosphate powders, self-assembling peptide systems, PRP derivatives and decellularised tissue matrices (Conde *et al.*, 2015; Galler, 2016a; Huang and Garcia-Godoy, 2014; Jazayeri *et al.*, 2020; Nakashima *et al.*, 2019; Palma *et al.*, 2017; Proksch and Galler, 2018; Rosamma and Kavyashree, 2017). However, most of these scaffolds were found to regenerate a tissue lacking structural and functional properties of DP, which highlights the need to deeply investigate the initial cell-scaffold cross-talks regulating cell behaviour before considering clinical applications (Mangione *et al.*, 2017; Moussa and Aparicio, 2019). In this context, fibrin-derived biomaterials, used for decades in tissue engineering-based therapeutic strategies, appear to be promising tools for DP regeneration (Galler *et al.*, 2018).

A major advantage of fibrin-based scaffolds comes from the regulatory aspect, because plasma-rich fibrin, fibrin sealants and fibrin glues have been approved by the FDA and the EMA for use in humans. This will undoubtedly facilitate the clinical transfer of fibrin-based formulations

designed for DP regeneration (Ducret *et al.*, 2015b; Park and Woo, 2018). The recent development of nanobiotechnologies will, hopefully, help to provide fibrin with specific properties, including antibacterial ones, suitable for DP regeneration (Bekhouche *et al.*, 2020; Willyard, 2018).

From fibrin to fibrin-based scaffolds

Fibrin and blood clot formation

Fibrin is a plasma protein involved in the later stage of haemostasis and synthesised in the liver in the form of soluble fibrinogen (Woodson *et al.*, 2013). Briefly, when bleeding occurs, blood-stream exposure of the connective tissue surrounding blood vessel leads to the recruitment of platelets and the formation of the primary plug (Periayah *et al.*, 2017; Swieringa *et al.*, 2018). The so-called coagulation cascade is then triggered by the proteolytic activation of serine proteases, expressed by platelets and the endothelium or present in the plasma (Farges *et al.*, 2015b). Notably, the circulating thrombin cleaves the fibrinogen molecules into insoluble fibrin monomers which then self-associate to form a fibrin polymer (Fig. 3) (Periayah *et al.*, 2017). The latter is stabilised by the transglutaminase factor XIII which catalyses the formation of amide bonds between fibrin side chains, leading to a final cross-linked blood clot (Jobe *et al.*, 2005; Periayah *et al.*, 2017). During the wound healing process, the blood clot is progressively replaced with a neoformed tissue similar to the tissue of origin (Collen and Lijnen, 1991). Importantly, this process is mediated by cell activation through binding to fibrin. Cells of the blood clot interact with fibrin through a cell surface integrin-driven mechanism mediated by Arg-Gly-Asp (RGD) adhesive sequences (Moseson, 2005). Fibrin binds to integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (present on platelets) (Höök *et al.*, 2017), integrin $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ /Mac-1 (neutrophils, monocytes, macrophages and mast cells) (Gailit *et al.*, 1997) and integrin $\alpha_v\beta_3$ (fibroblasts, endothelial cells) (Flick *et al.*, 2004; Gawaz *et al.*, 1997) (Fig. 3). Cell binding leads to the activation of specific intracellular signalling pathways, which drive blood-clot formation and ECM remodelling, suggesting that cell adhesion to the fibrin matrix is a key step in the triggering of tissue regeneration. The interaction of DP-MSCs with fibrin and its cellular consequences remain totally unknown and should be investigated to clearly understand how DP neotissue formation is initiated, in order to be able to adapt the formulation of fibrin scaffolds to several pathological contexts.

Regulation of fibrin network formation

Polymerisation of fibrinogen molecules, during blood-clot formation, leads to the formation of a fibrillary network important for haemostasis and subsequent wound healing (Janmey *et al.*, 2009). Major parameters governing this formation are the local concentrations of fibrinogen, calcium and

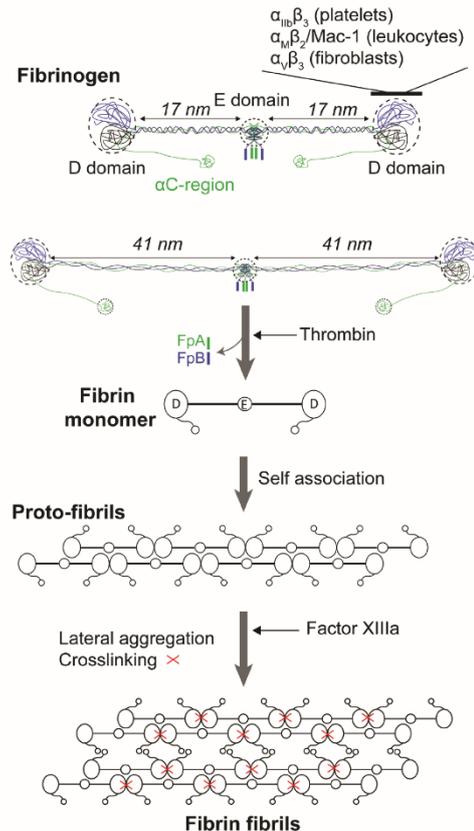


Fig. 3. Fibrin polymer formation from fibrinogen molecules. Plasma circulating fibrinogen is a dimeric molecule composed of α (green), β (blue) and γ (grey) chains forming D and E domains separated by a coiled-coil region implicated in fibrin elongation. The D domain is implicated in integrin-mediated binding of fibrin(ogen) onto fibroblasts, leukocytes and platelets. Cleavage of the N-terminal fibrinopeptides A (FpA) and B (FpB) by thrombin promotes the interaction between D and E domains which induces the lateral association of fibrin monomers as double stranded.

thrombin. *In vitro*, the structural and functional properties of the fibrin network can be modulated by varying these concentrations (Litvinov and Weisel, 2017; Man *et al.*, 2011). The modulation of fibrin scaffold properties, through adjusting the fibrinogen concentration, is probably the best example to illustrate how fibrin hydrogels could be fine-tuned. Highly-concentrated fibrinogen solutions (up to 60 mg/mL) have been used as sealants to achieve haemostasis, by application to bleeding wounds. Conversely, low-fibrinogen concentrations, of around 5-20 mg/mL, have been largely used to design scaffolds, sometimes in combination with other biomolecules, which promote the regeneration of

various tissues including the DP (Ducret *et al.*, 2017; Litvinov and Weisel, 2017). Interestingly, increasing the mechanical strength of the fibrin hydrogel by increasing fibrinogen concentration (9.5 to 141 mg/mL) reduced dorsal root ganglia neurite outgrowth in a fibrinolysis-dependent manner (Man *et al.*, 2011). This study demonstrated that a 10 mg/mL fibrinogen concentration confers to the scaffold physical and mechanical properties that enable the support of nerve-guidance conduits, an outstanding property toward a restoration of DP functionality. Fibrin hydrogels are sometimes stabilised by factor XIIIa, which increases crosslinking of fibrinogen molecules. However, factor XIIIa's use strongly slows down hydrogel lysis. The addition of 10 U/mL of factor XIIIa thus decreases the lysis rate by approximately 45 % (Francis and Marder, 1988; Wolberg *et al.*, 2012). A fine control of the lysis rate is crucial to allow proper tissue replacement in the context of DP regeneration. The degradation of the fibrin network should be synchronised with the development of a vascular system. A low degradation rate could potentially affect nutrient supply to stem cells and induce cell death, while fast degradation could create an empty environment that may constitute an ideal niche for bacterial expansion.

Fibrin-based scaffolds for DP regeneration

Fibrin-based scaffolds have been studied for decades in the field of tissue engineering (Noori *et al.*, 2017; Park and Woo, 2018; Sakiyama *et al.*, 1999; Schense *et al.*, 2000). Their advantages include excellent cytocompatibility, physiological degradation kinetics, non-toxicity of degradation products, and replacement with an ECM produced by incorporated or infiltrating stem cells within a few days (Roura *et al.*, 2017). Fibrin scaffolds possess excellent properties for tissue regeneration, as shown by preclinical and clinical studies (Borie *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2011; Miron *et al.*, 2017). In the field of DP regeneration, autologous fibrin-rich platelet concentrates and fibrin hydrogels manufactured *in vitro* have been used with valuable results in animal models and humans (Bezgin *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Ruangsawasdi *et al.*, 2014; Ruangsawasdi *et al.*, 2016). Beyond the intrinsic properties of fibrin, both offer the great advantage of being easily injectable into the mm-sized endodontic space using a fine needle (Bekhouche *et al.*, 2020; Ducret *et al.*, 2019).

PRP and PRF

PRP and PRF are platelet concentrates collected *in vivo* from the patient's own blood by centrifugation. PRP is collected at high G force (above 300 \times g) and is composed of low-density fibrin and cells, whereas PRF is collected at low G force (below 300 \times g) and is composed of high-density fibrin rich in cells and growth factors (Mohan *et al.*, 2019). Both PRP and PRF have been proposed for various therapeutic applications including DP regeneration, owing to the presence of large amounts of pro-angiogenic

growth factors and ease of handling (Bezgin *et al.*, 2015; Chow *et al.*, 1983; Miron *et al.*, 2017; Trevino *et al.*, 2011). Practically, the patient's blood is collected, mixed with anticoagulants and centrifuged. The PRP is then separated from the PPP to increase platelet concentration. On demand coagulation into the endodontic space is realised by the addition of autologous thrombin extracted from the PRF. Thrombin can be supplemented with calcium chloride and/or PPP to modulate the mechanical properties of the fibrin matrix. PRP is considered a valuable strategy for DP regeneration, mainly because it limits handling steps, and therefore the risk of pathogen transmission, and is cost effective (Raddall *et al.*, 2019). Interestingly, PRF combination with cell-sheet fragments of DP-MSCs allowed the regeneration of a vascularised DP-like tissue and the deposition of dentine after post-orthotopic transplantation in pulpectomised canals of canine premolars (Chen *et al.*, 2015). However, the ability of this DP-like tissue to harbour immune surveillance and nerve sensitivity is not known.

Fibrin-based hydrogels

In the last decade, fibrin purified from human plasma has been used to design hydrogels able to promote DP regeneration in a cell-free approach (Galler *et al.*, 2011; Galler *et al.*, 2018; Ruangsawasdi *et al.*, 2016). In a pioneer work, fibrin hydrogels were injected in the endodontic space of extracted human immature premolars implanted in rats. Results showed improved cell homing and cell-dentine interaction compared to empty root canals (Ruangsawasdi *et al.*, 2014). It was recently shown that a 10 mg/mL fibrin

scaffold forms a well-vascularised tissue *in vivo*, in a model of human root dentine cylinders implanted in the back of nude mice (Fig. 4). These results were in agreement with those obtained using PRF (Chen *et al.*, 2015).

Numerous studies have attempted to improve the structural and functional properties of the fibrin scaffolds by incorporating polymeric elements. These elements include PEG (Dikovskiy *et al.*, 2006), polyurethane, polyethylene oxide, polycaprolactone, heparin, PLA, PLGA, alginate, chitosan, hyaluronic acid and collagen (Brown and Barker, 2014; Litvinov and Weisel, 2017). Recently, Han *et al.* (2019) reported the development of a fibrin-based bio-ink incorporating gelatine, hyaluronic acid and glycerol for 3D co-printing. Current research also aims at providing the hydrogel with pro-regenerative, anti-inflammatory and anti-bacterial properties to overcome the challenges of DP regeneration described above.

Strategies to improve fibrin-based scaffold properties

Pro-regenerative properties

DP regeneration requires the concerted action of growth factors and other bioactive molecules that must be provided to the cells responsible for tissue neoformation in the endodontic space. In particular, the scaffold injected within the endodontic space must guide the spatio-temporal cell recruitment and differentiation into the various DP cell lineages needed to recreate a functional DP (Gong *et al.*, 2016).

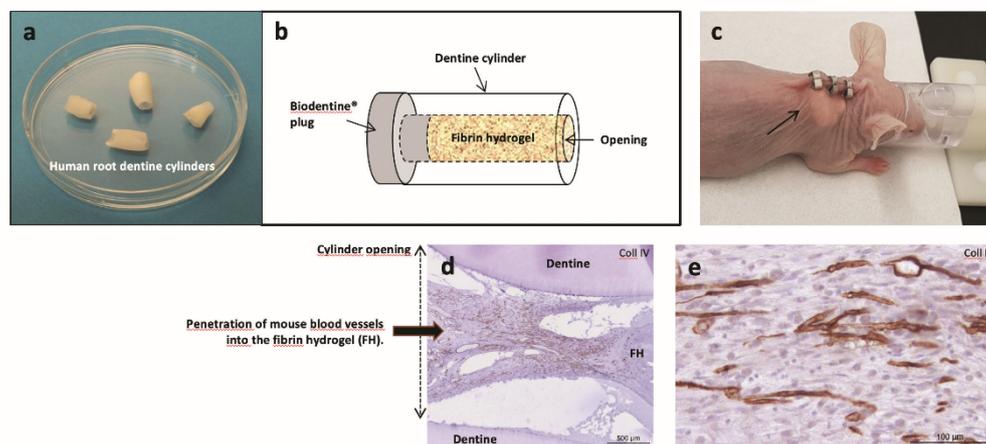


Fig. 4. Vascularisation of a cellularised fibrin hydrogel upon implantation *in vivo* for 7 weeks. (a) Human root dentine cylinders. (b) Schematic representation of a cylinder containing the cellularised fibrin hydrogel. (c) Subcutaneous implantation of a dentine cylinder filled with a DP-MSC-cellularised fibrin hydrogel in the back of a nude mouse. (d) Low magnification of a well-vascularised regenerated tissue into the cylinder. Blood vessels are identified by type IV collagen immunostaining. FH: fibrin hydrogel remnant. (e) High magnification of type IV collagen staining.

Several growth factors have been added to the fibrin scaffold to promote tissue regeneration, including pro-angiogenic factors such as VEGF, PDGF and FGF-2, factors inducing odontoblast differentiation such as BMP-2 and -4, nerve growth promoting factors such as the NGF and factors promoting MSC recruitment and growth such as SDF1 α and SCF (Abou Neel *et al.*, 2014; Ducret *et al.*, 2017; Kowalczewski and Saul, 2018; Ruangsawasdi *et al.*, 2017; Trevino *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2018). Dentine matrix molecules could also be incorporated in the fibrin scaffold before polymerisation to increase chemotaxis and pulp-like tissue formation in the endodontic space (Widbiller *et al.*, 2018). An alternative to the addition of exogenous molecules to promote DP regeneration is MSC preconditioning. DP-MSCs pretreatment with FGF-2 thus enhanced angiogenesis within subcutaneously implanted hydrogels, mimicking DP regeneration, by increasing VEGF and hepatocyte growth factor release (Gorin *et al.*, 2016). DP-MSCs hypoxic preconditioning could also enhance angiogenesis by inducing VEGF expression (Aranha *et al.*, 2010). Recently, exosomes isolated from human third molar DP cells, used as a delivery system for proteins, lipids, RNA and DNA, were proposed as another option to stimulate DP regeneration in a cell-free approach, since they stimulated the migration and proliferation of human bone marrow-derived MSCs *in vitro* in a fibrin hydrogel (Ivica *et al.*, 2020).

Anti-inflammatory properties

Another limitation of the current biomaterials used for DP regeneration is the inflammatory response that can occur after implantation. Indeed, inflammation often causes tissue damage at the material/host tissue interface (Colombo *et al.*, 2014; Farges *et al.*, 2015b; Willyard, 2018). “Good” and “bad” inflammations have been defined according to macrophage polarisation in a M2 or a M1 profile, respectively. While pro-inflammatory M1 macrophages cause tissue damage, anti-inflammatory M2 macrophages promote tissue repair (Mills, 2012; Vannella *et al.*, 2017). The formation of an inflammatory plug with abundant M1 macrophages at the root apical tip was reported to impede cell homing into the endodontic space and to induce resorption of the apical dentine (Zaky *et al.*, 2020). It is therefore important to control the M1/M2 balance to get adequate DP regeneration (Zaky *et al.*, 2020). Recently, early inflammatory/immune response and M1/M2 macrophage polarisation were investigated upon fibrin and fibrin-chitosan hydrogel implantation in pulpotomised rat incisors (Renard *et al.*, 2020). This study showed similar accumulation of neutrophil granulocytes at the hydrogel/residual DP interface with an enrichment of M2 but not M1 macrophages, suggesting that fibrin could promote M2-driven tissue regeneration (Renard *et al.*, 2020). This work is in agreement with a previous study suggesting that fibrin hydrogels, by promoting M2 polarisation

in cellulo, could have a favourable effect on DP regeneration (Hsieh *et al.*, 2017). PRF extracts were reported to attenuate DP-MSCs expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-8 upon treatment with LPS, which is also in favour of a possible role of fibrin in preventing inflammation (Kim *et al.*, 2017). The use of MSCs was also proposed to reduce inflammation during DP regeneration. Indeed, MSCs possess immunomodulatory properties through their inhibition of the T-cell response and their ability to modulate the M1/M2 ratio in favour of the M2 phenotype (Marei and El Backly, 2018). Altogether, data from the literature suggest that fibrin is a natural, biological biomaterial that limits inflammation and promote tissue regeneration.

Antibacterial properties

Recent studies have demonstrated that eradicating bacteria from the endodontic space with classical disinfectants (sodium hypochlorite or chlorhexidine) is very difficult because of the complex anatomy of the endodontic space, deep penetration of bacteria into dentine tubules, and bacterial organisation into biofilms (Vishwanat *et al.*, 2017). Several studies performed in animal models have demonstrated that residual bacteria hinder DP regeneration (Redl *et al.*, 1983), and the absence of antibacterial properties of the fibrin molecule or its degradation products may constitute an obstacle to the clinical use of hydrogel formulations made of fibrin alone. This obstacle could be overcome by incorporating drugs or molecules with antibacterial properties at the time of scaffold manufacture. Studies have been done in this context by incorporating metronidazole and/or ciprofloxacin into nanofibrous scaffolds (Kamocki *et al.*, 2015; Tagelsir *et al.*, 2016). If both drugs were shown to inhibit the growth of the endodontic bacteria *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas spp.* and *Fusobacterium nucleatum*, they were not able to eradicate a 3-week-old biofilm (Kamocki *et al.*, 2015; Tagelsir *et al.*, 2016). Antibacterial activity against an *E. faecalis* biofilm was observed when ciprofloxacin was associated with fibrin (Chotitumnavee *et al.*, 2019). Recently, chitosan, an antibacterial glycosaminoglycan derived from shrimp shells, was associated with fibrin to provide a fibrin hydrogel with antibacterial properties (Ducret *et al.*, 2019). Results showed that the fibrin-chitosan hydrogel strongly inhibited *E. faecalis* growth *in vitro* without affecting DP-MSCs viability, morphology, proliferation rate and type I/III collagen production capacity (Ducret *et al.*, 2019) (Fig. 5). Further studies are needed to deeply investigate the efficiency of such antibacterial scaffolds and notably on endodontic bacteria housed in the shelter of dentine tubules.

Nanotherapeutics

The recent development of nanobiotechnologies (Harilal *et al.*, 2019; Sinjari *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2020) offers great hope to deliver locally, in a spatially and temporarily controlled manner, antibacterial drugs in

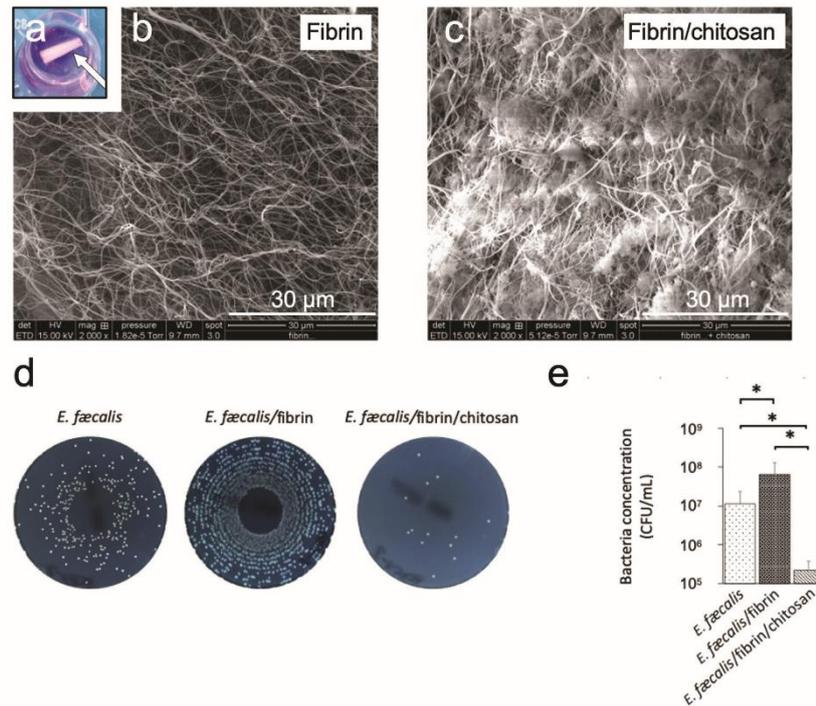


Fig. 5. Antibacterial properties of fibrin-chitosan hydrogels (Ducret *et al.*, 2019). (a) Photograph showing an example of fibrin hydrogel (opaque white) cast in a cylindrical-conical transparent plastic mould (white arrow) and covered with cell culture medium. SEM images showing the fibrin hydrogel network (b) and chitosan aggregates entrapped within the fibrin network (c). (d) Representative photographs of *E. faecalis* CFUs upon bacterial contact with fibrin or fibrin-chitosan hydrogels (far left: control, *i.e.* bacteria alone). (e) Bacterial concentrations determined by CFU counting. Reproduced from Ducret *et al.*, 2019, with permission from Elsevier.

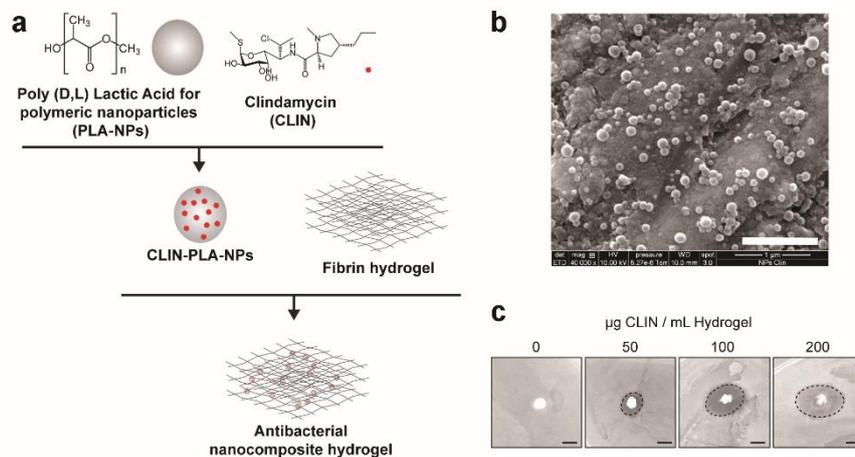


Fig. 6. Nanocomposite fibrin-based hydrogel containing CLIN-loaded PLA-NPs. (a) Schematic representation of the 2-step synthesis of the nanocomposite hydrogel. (b) Representative SEM image of CLIN-loaded PLA-NPs. Scale bar: 1 µm (bottom). (c) Representative pictures of agar diffusion assays in the presence of the fibrin-alone hydrogel (far left) or nanocomposite fibrin hydrogels containing PLA-NPs loaded with CLIN to get final concentrations of 50, 100 or 200 µg/mL CLIN. Scale bar is 10 mm. Reproduced from Bekhouche *et al.*, 2020, with permission from the Royal Society of Chemistry.

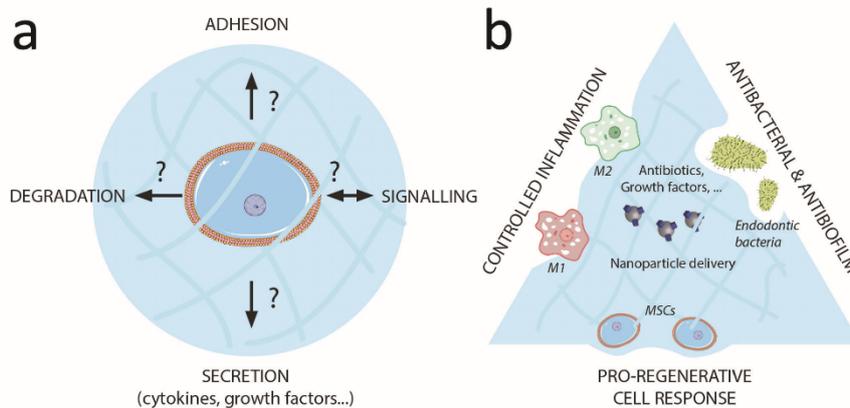


Fig. 7. Cellular and functional challenges in DP regeneration.

small-sized tissues such as the endodontic space and in difficult to areas reach such as dentine tubules. In particular, NPs are effective antibiotic carriers since they protect the drug in its native structure, conserve its therapeutic properties, can deliver large amounts of drug at the site of infection and limit side effects, when compared to other drug carrier systems and free antibiotic diffusion (Wang *et al.*, 2017). Interestingly, scaffolds incorporating antibacterial NPs such as CLIN-loaded hyperbranched NPs were developed for potential antibacterial applications (Wei *et al.*, 2020). Among the various types of NPs, PLA-NPs received considerable attention over recent decades because of their highly biocompatible and biodegradable nature and their low levels of immunogenicity and toxicity (Tyler *et al.*, 2016). A nanocomposite fibrin-based hydrogel containing CLIN-loaded PLA-NPs was recently designed for the purpose of safely bringing the antibiotic into contact with endodontic bacteria lining the dentine wall or residing within dentine tubules (Bekhouche *et al.*, 2020). Results demonstrated that the incorporation of CLIN-loaded NPs into a fibrin hydrogel gave it antibacterial and antibiofilm properties against *Enterococcus faecalis* without affecting DP-MSCs viability and function (Bekhouche *et al.*, 2020) (Fig. 6). Nanotherapeutic strategies thus appear valuable for DP regeneration.

Conclusions

Together, these data indicate that fibrin is a valuable biopolymer for scaffold-based strategies of DP regeneration. Its properties could be tuned to adapt the hydrogel for various clinical conditions. A major challenge will be to elucidate the mechanisms by which DP-MSCs regulate hydrogel degradation and replacement, in order to obtain a well-differentiated DP with structural and functional properties similar to the tissue of origin (Fig. 7). Addition of bioactive molecules to the fibrin scaffold will help to provide

a favourable environment for cell differentiation, promoting hydrogel replacement by a DP-like matrix, controlled inflammatory/immune response, and an aseptic environment. The controlled delivery of these active agents/molecules will benefit from the development of nanobiotechnologies and bring nanotherapeutics into the armamentarium of dental practitioners who aim at regenerating the human DP.

Acknowledgments

The authors would also like to thank Elsevier and the Royal Society of Chemistry for their permissions to reproduce their figures.

References

- Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim HW, Knowles JC (2014) Tissue engineering in dentistry. *J Dent* **42**: 915-928.
- Albuquerque MTP, Valera MC, Nakashima M, Nor JE, Bottino MC (2014) Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J Dent Res* **93**: 1222-1231.
- Aranha AMF, Zhang Z, Neiva KG, Costa CAS, Hebling J, Nör JE (2010) Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod* **36**: 1633-1637.
- Banchs F, Trope M (2004) Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* **30**: 196-200.
- Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM (2014) Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J Endod* **40**: 133-139.
- Bekhouche M, Bolon M, Charriaud F, Lamrayah M, Da Costa D, Primard C, Costantini A, Padeloup M, Gobert S, Mallein-Gerin F, Verrier B, Ducret M, Farges J-C (2020) Development of an antibacterial

- nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. *J Mater Chem B* **8**: 8422-8432.
- Bezgin T, Yilmaz AD, Celik BN, Kolsuz ME, Sonmez H (2015) Efficacy of platelet-rich plasma as a scaffold in regenerative endodontic treatment. *J Endod* **41**: 36-44.
- Borie E, Oliví DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltrán V, Fuentes R (2015) Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med* **8**: 7922-7929.
- Brown AC, Barker TH (2014) Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater* **10**: 1502-1514.
- Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, Liu NX, Lv X, Li Q, Chen FM, Zhang M (2015) Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res* **361**: 439-455.
- Chotitumnavee J, Parakaw T, Srisatjaluk RL, Pruksaniyom C, Pisitpipattana S, Thanathipanont C, Amarasingh T, Tiangkhum N, Chimchawee N, Ruangwaswadi N (2019) *In vitro* evaluation of local antibiotic delivery *via* fibrin hydrogel. *J Dent Sci* **14**: 7-14.
- Chow TW, McIntire L V., Peterson DM (1983) Importance of plasma fibronectin in determining PFP and PRP clot mechanical properties. *Thromb Res* **29**: 243-248.
- Collen D, Lijnen HR (1991) Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* **78**: 3114-3124.
- Colombo JS, Moore AN, Hartgerink JD, D'Souza RN (2014) Scaffolds to control inflammation and facilitate dental pulp regeneration. *J Endod* **40 Suppl 4**: S6-12.
- Conde MCM, Chisini L a., Demarco FF, Nör JE, Casagrande L, Tarquinio SBC (2015) Stem cell-based pulp tissue engineering: variables enrolled in translation from the bench to the bedside, a systematic review of literature. *Int Endod J* **49**: 543-550.
- Dianat O, Mashhadi Abas F, Paymanpour P, Eghbal MJ, Haddadpour S, Bahrololumi N (2017) Endodontic repair in immature dogs' teeth with apical periodontitis: blood clot *vs.* plasma rich in growth factors scaffold. *Dent Traumatol* **33**: 84-90.
- Dikovskiy D, Bianco-Peled H, Seliktar D (2006) The effect of structural alterations of PEG-fibrinogen hydrogel scaffolds on 3-D cellular morphology and cellular migration. *Biomaterials* **27**: 1496-1506.
- Ducret M, Fabre H, Farges J-C, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, Mallein-Gerin F, Perrier-Groult E (2015a) Production of human dental pulp cells with a medicinal manufacturing approach. *J Endod* **41**: 1492-1499.
- Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, Alliot-Licht B, Mallein-Gerin F, Perrier-Groult E, Farges J-C (2015b) Manufacturing of dental pulp cell-based products from human third molars: current strategies and future investigations. *Front Physiol* **6**: 213. DOI: 10.3389/fphys.2015.00213.
- Ducret M, Fabre H, Celle A, Mallein-Gerin F, Perrier-Groult E, Alliot-Licht B, Farges J-C (2017) Current challenges in human tooth revitalization. *Biomed Mater Eng* **28 Suppl 1**: S159-S168.
- Ducret M, Montembault A, Josse J, Padeloup M, Celle A, Benchrih R, Mallein-Gerin F, Alliot-Licht B, David L, Farges JC (2019) Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. *Dent Mater* **35**: 523-533.
- Farges J-C, Bellanger A, Ducret M, Aubert-Foucher E, Richard B, Alliot-Licht B, Bleicher F, Carrouel F (2015a) Human odontoblast-like cells produce nitric oxide with antibacterial activity upon TLR2 activation. *Front Physiol* **6**: 185. DOI: 10.3389/fphys.2015.00185.
- Farges J-C, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR (2015b) Dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. *Mediators Inflamm* **2015**: 230251. DOI: 10.1155/2015/230251.
- Flick MJ, Du X, Witte DP, Jirousková M, Soloviev DA, Busuttill SJ, Plow EF, Degen JL (2004) Leukocyte engagement of fibrin(ogen) *via* the integrin receptor α 5 β 1 is critical for host inflammatory response *in vivo*. *J Clin Invest* **113**: 1596-1606.
- Francis CW, Marder VJ (1988) Increased resistance to plasmin degradation of fibrin with highly crosslinked α -polymer chains formed at high factor XIII concentrations. *Blood* **71**: 1361-1365.
- Gailit J, Clarke C, Newman D, Tonnesen MG, Mosesson MW, Clark RA (1997) Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin α (v) β 3. *Exp Cell Res* **232**: 118-126.
- Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, Schmalz G (2011) Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod* **37**: 1536-1541.
- Galler KM, Eidt A, Schmalz G (2014) Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod* **40 Suppl 4**: S41-45.
- Galler KM (2016a) Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *Int Endod J* **49**: 926-936.
- Galler KM, Krastl G, Simon S, Van Gorp G, Meschi N, Vahedi B, Lambrechts P (2016b) European Society of Endodontology position statement: revitalization procedures. *Int Endod J* **49**: 717-723.
- Galler KM, Brandl FP, Kirchhof S, Widbiller M, Eidt A, Buchalla W, Göpferich A, Schmalz G (2018) Suitability of different natural and synthetic biomaterials for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A* **24**: 234-244.
- Gawaz M, Neumann F-J, Dickfeld T, Reiningger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A (1997) Vitronectin receptor (α (v) β 3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells. *Circulation* **96**: 1809-1818.
- Gong T, Heng BC, Lo ECM, Zhang C (2016) Current advance and future prospects of tissue engineering

- approach to dentin/pulp regenerative therapy. *Stem Cells Int* **2016**: 9204574. DOI: 10.1155/2016/9204574.
- Gorin C, Rochefort GY, Bascetin R, Ying H, Lesieur J, Sadoine J, Beckouche N, Berndt S, Novais A, Lesage M, Hosten B, Vercellino L, Merlet P, Le-Denmat D, Marchiol C, Letourneur D, Nicoletti A, Vital SO, Poliard A, Salmon B, Muller L, Chaussain C, Germain S (2016) Priming dental pulp stem cells with fibroblast growth factor-2 increases angiogenesis of implanted tissue-engineered constructs through hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor secretion. *Stem Cells Transl Med* **5**: 392-404.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13625-13630.
- Han J, Kim DS, Jang H, Kim HR, Kang HW (2019) Bioprinting of three-dimensional dentin-pulp complex with local differentiation of human dental pulp stem cells. *J Tissue Eng* **10**: 2041731419845849. DOI: 10.1177/2041731419845849.
- Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB (2014) Paradigm lost: a perspective on the design and interpretation of regenerative endodontic research. *J Endod* **40 Suppl 4**: S65-S69.
- Harilal S, Jose J, Parambi DGT, Kumar R, Mathew GE, Uddin MS, Kim H, Mathew B (2019) Advancements in nanotherapeutics for Alzheimer's disease: current perspectives. *J Pharm Pharmacol* **71**: 1370-1383.
- Höök P, Litvinov RI, Kim O V, Xu S, Xu Z, Bennett JS, Alber MS, Weisel JW (2017) Strong binding of platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$ to fibrin clots: potential target to destabilize thrombi. *Sci. Rep.* **7**: 13001. DOI: 10.1038/s41598-017-12615-w.
- Hsieh JY, Smith TD, Meli VS, Tran TN, Botvinick EL, Liu WF (2017) Differential regulation of macrophage inflammatory activation by fibrin and fibrinogen. *Acta Biomater* **47**: 14-24.
- Huang GT-J, Garcia-Godoy F (2014) Missing concepts in *de novo* pulp regeneration. *J Dent Res* **93**: 717-724.
- Huang GT-J, Gronthos S, Shi S (2009) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues *vs.* those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* **88**: 792-806.
- Iohara K, Utsunomiya S, Kohara S, Nakashima M (2018) Allogeneic transplantation of mobilized dental pulp stem cells with the mismatched dog leukocyte antigen type is safe and efficacious for total pulp regeneration. *Stem Cell Res Ther* **9**: 116. DOI: 10.1186/s13287-018-0855-8.
- Ivica, Ghayor, Zehnder, Valdec, Weber (2020) Pulp-derived exosomes in a fibrin-based regenerative root filling material. *J Clin Med* **9**: 491. DOI: 10.3390/jcm9020491.
- Jadhav G, Shah N, Logani A (2012) Revascularization with and without platelet-rich plasma in nonvital, immature, anterior teeth: a pilot clinical study. *J Endod* **38**: 1581-1587.
- Janmey PA, Winer JP, Weisel JW (2009) Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J R Soc Interface* **6**: 1-10.
- Jazayeri HE, Lee SM, Kuhn L, Fahimipour F, Tahriri M, Tayebi L (2020) Polymeric scaffolds for dental pulp tissue engineering: a review. *Dent Mater* **36**: e47-e58.
- Jobe SM, Leo L, Eastvold JS, Dickneite G, Ratliff TL, Lentz SR, Di Paola J (2005) Role of Fc γ and factor XIIIa in coated platelet formation. *Blood* **106**: 4146-4151.
- Kamocki K, Nör JE, Bottino MC (2015) Dental pulp stem cell responses to novel antibiotic-containing scaffolds for regenerative endodontics. *Int Endod J* **48**: 1147-1156.
- Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, Kim ES, Choung PH (2011) Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A* **17**: 349-359.
- Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* **184**: 105-116.
- Kim J-H, Woo S-M, Choi N-K, Kim W-J, Kim S-M, Jung J-Y (2017) Effect of platelet-rich fibrin on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells exposed to lipopolysaccharide. *J Endod* **43**: 433-438.
- Kowalczewski CJ, Saul JM (2018) Biomaterials for the delivery of growth factors and other therapeutic agents in tissue engineering approaches to bone regeneration. *Front Pharmacol* **9**: 1-15.
- Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* **260**: 920-926.
- Litvinov RI, Weisel JW (2017) Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix Biol* **60-61**: 110-123.
- Man AJ, Davis HE, Itoh A, Leach JK, Bannerman P (2011) Neurite outgrowth in fibrin gels is regulated by substrate stiffness. *Tissue Eng Part A* **17**: 2931-2942.
- Mangione F, EzEldeen M, Bardet C, Lesieur J, Bonneau M, Decup F, Salmon B, Jacobs R, Chaussain C, Opsahl-Vital S (2017) Implanted dental pulp cells fail to induce regeneration in partial pulpotomies. *J Dent Res* **96**: 1406-1413.
- Mao JJ, Kim SG, Zhou J, Ye L, Cho S, Suzuki T, Fu SY, Yang R, Zhou X (2012) Regenerative endodontics: barriers and strategies for clinical translation. *Dent Clin North Am* **56**: 639-649.
- Marei MK, El Backly RM (2018) Dental mesenchymal stem cell-based translational regenerative dentistry: from artificial to biological replacement. *Front Bioeng Biotechnol* **6**: 49. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00049.
- Mills CD (2012) M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol* **32**: 463-488.
- Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, Choukroun

- J (2017) Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig* **21**: 2619-2627.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5807-5812.
- Mohan S, Jaishangar N, Devy S, Narayanan A, Cherian D, Madhavan S (2019) Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in periodontal regeneration: a review. *J Pharm Bioallied Sci* **11 Suppl 2**: S126-S130.
- Mosesson MW (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* **3**: 1894-1904.
- Moussa DG, Aparicio C (2019) Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* **13**: 58-75.
- Nakashima M, Iohara K, Bottino MC, Fouad AF, Nör JE, Huang GTJ (2019) Animal models for stem cell-based pulp regeneration: foundation for human clinical applications. *Tissue Eng Part B Rev* **25**: 100-113.
- Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Arijji Y, Matsushita K (2017) Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther* **8**: 61. DOI: 10.1186/s13287-017-0506-5.
- Ng YL, Mann V, Gulabivala K (2010) Tooth survival following non-surgical root canal treatment: a systematic review of the literature. *Int Endod J* **43**: 171-189.
- Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ (2017) A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine* **12**: 4937-4961.
- Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K (2012) Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case. *J Endod* **38**: 1428-1434.
- Nygaard-Ostby B, Hjortdal O (1971) Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res* **79**: 333-349.
- Östby BN (1961) The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand* **19**: 323-353.
- Palma PJ, Ramos JC, Ferreira P, Ramos C (2017) Histologic evaluation of regenerative endodontic procedures with the use of chitosan scaffolds in immature dog teeth apical periodontitis. *J Endod* **43**: 1279-1287.
- Park CH, Woo KM (2018) Fibrin-based biomaterial applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Exp Med Biol* **1064**: 253-261.
- Periyah MH, Halim AS, Mat Saad AZ (2017) Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* **11**: 319-327.
- Proksch S, Galler KM (2018) Scaffold materials and dental stem cells in dental tissue regeneration. *Curr Oral Health Rep* **5**: 304-316.
- Raddall G, Mello I, Leung BM (2019) Biomaterials and scaffold design strategies for regenerative endodontic therapy. *Front Bioeng Biotechnol* **7**: 317.
- Redl H, Schlag G, Stanek G, Hirschl A, Seelich T (1983) *In vitro* properties of mixtures of fibrin seal and antibiotics. *Biomaterials* **4**: 29-32.
- Renard E, Amiaud J, Delbos L, Charrier C, Montebault A, Ducret M, Farges J-C, David L, Alliot-Licht B, Gaudin A (2020) Dental pulp inflammatory/immune response to a chitosan-enriched fibrin hydrogel in the pulpotomized rat incisor. *Eur Cell Mater* **40**: 74-87.
- Rosamma G, Kavyashree G (2017) Effect of four mouth rinses on microhardness of esthetic restorative material: an *in vitro* study. *J Int Oral Health* **9**: 55-59.
- Roura S, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A (2017) Fibrin, the preferred scaffold for cell transplantation after myocardial infarction? An old molecule with a new life. *J Tissue Eng Regen Med* **11**: 2304-2313.
- Ruangswasdi N, Zehnder M, Patcas R, Ghayor C, Siegenthaler B, Gjoksi B, Weber FE (2017) Effects of stem cell factor on cell homing during functional pulp regeneration in human immature teeth. *Tissue Eng Part A* **23**: 115-123.
- Ruangswasdi N, Zehnder M, Patcas R, Ghayor C, Weber FE (2016) Regenerative dentistry: animal model for regenerative endodontology. *Transfus Med Hemother* **43**: 359-364.
- Ruangswasdi N, Zehnder M, Weber FE (2014) Fibrin gel improves tissue ingrowth and cell differentiation in human immature premolars implanted in rats. *J Endod* **40**: 246-250.
- Saoud T, Ricucci D, Lin L, Gaengler P (2016) Regeneration and repair in endodontics – a special issue of the regenerative endodontics – a new era in clinical endodontics. *Dent J (Basel)* **4**: 3. DOI: 10.3390/dj4010003.
- Sakiyama S, Schense JC, Hubbell JA (1999) Incorporation of heparin-binding peptides into fibrin gels enhances neurite extension: an example of designer matrices in tissue engineering. *FASEB J* **13**: 2214-2224.
- Schense JC, Bloch J, Aebischer P, Hubbell JA (2000) Enzymatic incorporation of bioactive peptides into fibrin matrices enhances neurite extension. *Nat Biotechnol* **18**: 415-419.
- Schmalz G, Smith AJ (2014) Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *J Endod* **40 Suppl 4**: S2-S5.
- Sinjari B, Pizzicannella J, D'Aurora M, Zappacosta R, Gatta V, Fontana A, Trubiani O, Diomedea F (2019) Curcumin/liposome nanotechnology as delivery platform for anti-inflammatory activities *via* NFkB/ERK/pERK pathway in human dental pulp treated with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Front Physiol* **10**: 633. DOI: 10.3389/fphys.2019.00633.

- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GTJ (2008) Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* **34**: 166-171.
- Swieringa F, Spronk HMH, Heemskerk JWM, van der Meijden PEJ (2018) Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. *Res Pract Thromb Haemost* **2**: 450-460.
- Tagelsir A, Yassen GH, Gomez GF, Gregory RL (2016) Effect of antimicrobials used in regenerative endodontic procedures on 3-week-old *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* **42**: 258-262.
- Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, Diogenes A (2011) Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod* **37**: 1109-1115.
- Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H (2016) Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* **107**: 163-175.
- Vannella KM, Wynn TA (2017) Mechanisms of organ injury and repair by macrophages. *Annu Rev Physiol* **79**: 593-617.
- Verma P, Nosrat A, Kim JR, Price JB, Wang P, Bair E, Xu HH, Fouad AF (2017) Effect of residual bacteria on the outcome of pulp regeneration *in vivo*. *J Dent Res* **96**: 100-106.
- Vishwanat L, Duong R, Takimoto K, Phillips L, Espitia CO, Diogenes A, Ruparel SB, Kolodrubetz D, Ruparel NB (2017) Effect of bacterial biofilm on the osteogenic differentiation of stem cells of apical papilla. *J Endod* **43**: 916-922.
- Wang L, Hu C, Shao L (2017) The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine* **12**: 1227-1249.
- Wei S, Liu X, Zhou J, Zhang J, Dong A, Huang P, Wang W, Deng L (2020) Dual-crosslinked nanocomposite hydrogels based on quaternized chitosan and clindamycin-loaded hyperbranched nanoparticles for potential antibacterial applications. *Int J Biol Macromol* **155**: 153-162.
- Widbiller M, Driesen RB, Eidt A, Lambrichts I, Hiller KA, Buchalla W, Schmalz G, Galler KM (2018) Cell homing for pulp tissue engineering with endogenous dentin matrix proteins. *J Endod* **44**: 956-962.
- Willyard C (2018) Unlocking the secrets of scar-free skin healing. *Nature* **563**: S86-S88.
- Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR (2012) Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg* **114**: 275-285.
- Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR (2013) Coagulation factors, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1, are differentially regulated by yellow fever virus infection of hepatocytes. *Virus Res* **175**: 155-159.
- Xia H, Li X, Gao W, Fu X, Fang RH, Zhang L, Zhang K (2018) Tissue repair and regeneration with endogenous stem cells. *Nat Rev Mater* **3**: 174-193.
- Xuan K, Li B, Guo H, Sun W, Kou X, He X, Zhang Y, Sun J, Liu A, Liao L, Liu S, Liu W, Hu C, Shi S, Jin Y (2018) Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Sci Transl Med* **10**: eaaf3227. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf3227.
- Yang J, Zhang Y, Wan C, Sun Z, Nie S, Jian S, Zhang L, Song G, Chen Z (2015) Autophagy in SDF-1 α -mediated DPSC migration and pulp regeneration. *Biomaterials* **44**: 11-23.
- Zaky SH, AlQahtani Q, Chen J, Patil A, Taboas J, Beniash E, Ray H, Sfeir C (2020) Effect of the periapical "inflammatory plug" on dental pulp regeneration: a histologic *in vivo* study. *J Endod* **46**: 51-56.
- Zhao Z, Yang F, Zhang X, Sun J, He Z, Luo C (2020) Emerging nanotherapeutics for anti-thrombotic treatment. *Biomaterials* **255**: 120200. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120200.

Discussion with Reviewer

Franz Weber: The first clinical trials of pulp regeneration have been performed using a collagen-derived scaffold which appears coherent since the pulp tissue is made of collagen. Collagen hydrogels can also be combined with various molecules to improve antibacterial and other properties presented here in the context of the fibrin-derived scaffolds. So, what makes the authors believe the fibrin-derived scaffolds would be better than the collagen ones?

Authors: We agree with the reviewer's comment, collagen is the first material proposed for the regeneration of DP in clinical trials, based on its structural homology with DP tissue. However, like all other materials, none of the collagen-based scaffolds were found to possess the ideal properties as a biomaterial for DP regeneration. Indeed, the collagen origin, composition, methods of extraction and purification were reported to induce many different cellular responses, including inflammatory cellular reaction that is still poorly characterised (Barbeck *et al.*, 2015; Herrera-Vizcaino *et al.*, 2020; Stratton *et al.*, 2016; Udeabor *et al.*, 2020, additional references). In addition, collagen scaffolds lack mechanical strength, which requires their enhancement by physical or chemical methods, or by the development of multi-layered scaffolds (Dong and Lv, 2016; Stratton *et al.*, 2016, additional references). These points could be a major obstacle to a wide acceptance of this technique among the community of practitioners.

Inversely, fibrin is a natural scaffold biologically designed to induce tissue repair/regeneration and to promote cell response toward this purpose. Fibrin degradation products promote angiogenesis, induce a controlled inflammation, and its mechanical properties could be easily finely tuned without the need of extra-chemical agents. There is good

evidence that it is a promising biomaterial to guide DP regeneration, either alone or in combination with other materials, growth factors or nanomedicinal products.

Additional references

Barbeck M, Lorenz J, Kubesch A, Bohm N, Booms P, Choukroun J, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S (2015) Porcine dermis-derived collagen membranes induce implantation bed vascularization *via* multinucleated giant cells: a physiological reaction? *J Oral Implantol* **41**: e238-e251

Dong C, Lv Y (2016) Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. *Polymers (Basel)* **8**: 1-20.

Herrera-Vizcaino C, Al-Maawi S, Sader R, Kirkpatrick CJ, Choukroun J, Ghanaati S (2020)

Modification of collagen-based sponges can induce an upshift of the early inflammatory response and a chronic inflammatory reaction led by M1 macrophages: an *in vivo* study. *Clin Oral Investig* **24**: 3485-3500.

Stratton S, Shelke NB, Hoshino K, Rudraiah S, Kumbar SG (2016) Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioact Mater* **1**: 93-108.

Udeabor SE, Herrera-Vizcaino C, Sader R, Kirkpatrick CJ, Al-Maawi S, Ghanaati S (2020) Characterization of the cellular reaction to a collagen-based matrix: An *in vivo* histological and histomorphometrical analysis. *Materials (Basel)* **13**: 1-16.

Editor's note: The Scientific Editor responsible for this paper was Thimios Mitsiadis.

REFERENCES

1. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 2015;59:1–41.
2. Lorsch JR. Chapter One - Practical Steady-State Enzyme Kinetics. In: Lorsch J, editor. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2014 [cited 2023 Jun 1]. p. 3–15. (Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part A; vol. 536). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124200708000015>
3. Seibert E, Tracy TS. Fundamentals of Enzyme Kinetics: Michaelis-Menten and Non-Michaelis-Type (Atypical) Enzyme Kinetics. *Methods Mol Biol.* 2021;2342:3–27.
4. Schomburg I, Chang A, Placzek S, Söhngen C, Rother M, Lang M, et al. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D764–72.
5. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3784–8.
6. Graivier M, Hill D, Katz B, Boehm KA, Fisher J, Battista C. Collagenase *Clostridium histolyticum* for the Treatment of Cellulite in the Buttocks and Thigh: Early Insights From Clinical Practice. *Aesthetic Surgery Journal Open Forum.* 2022 Jan 1;4:ojac057.
7. Sheldon RA, Brady D. Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis. *ChemSusChem.* 2019 Jul 5;12(13):2859–81.
8. Schulze B, Wubbolts MG. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr Opin Biotechnol.* 1999 Dec;10(6):609–15.
9. Klivanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature.* 2001 Jan 11;409(6817):241–6.
10. Iregren A. Behavioral methods and organic solvents: questions and consequences. *Environ Health Perspect.* 1996 Apr;104 Suppl 2(Suppl 2):361–6.
11. van Rantwijk F, Sheldon RA. Biocatalysis in ionic liquids. *Chem Rev.* 2007 Jun;107(6):2757–85.
12. Park S, Kazlauskas RJ. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *J Org Chem.* 2001 Dec 14;66(25):8395–401.
13. Lozano P, de Diego T, Guegan JP, Vaultier M, Iborra JL. Stabilization of alpha-chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnol Bioeng.* 2001 Dec 5;75(5):563–9.
14. Laszlo JA, Compton DL. Alpha-chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnol Bioeng.* 2001 Oct 20;75(2):181–6.
15. Eckstein M, Sesing M, Kragl U, Adlercreutz P. At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents. *Biotechnology Letters.* 2002 Jun 1;24(11):867–72.
16. Hinckley G, Mozhaev VV, Budde C, Khmelnitsky YL. Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnology Letters.* 2002 Dec 1;24(24):2083–7.
17. Cooper GM. The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. *The Cell: A Molecular Approach* 2nd edition [Internet]. 2000 [cited 2023 Jan 11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/>
18. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Dec;15(12):786–801.
19. Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse JC. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Mar;49(3):199–202.
20. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Jan 1;4(1):a004903.
21. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Jan 1;3(1):a004978.

22. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):247–57.
23. Fratzl P, Weinkamer R. Nature's hierarchical materials. *Progress in Materials Science.* 2007 Nov 1;52(8):1263–334.
24. Zhang X, Xu S, Shen L, Li G. Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. *Journal of Leather Science and Engineering.* 2020 Aug 5;2(1):19.
25. Fallas JA, Gauba V, Hartgerink JD. Solution structure of an ABC collagen heterotrimer reveals a single-register helix stabilized by electrostatic interactions. *J Biol Chem.* 2009 Sep 25;284(39):26851–9.
26. Izzi V, Heljasvaara R, Heikkinen A, Karppinen SM, Koivunen J, Pihlajaniemi T. Exploring the roles of MACIT and multiplexin collagens in stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020 May;62:134–48.
27. Bella J, Hulmes DJS. Fibrillar Collagens. *Subcell Biochem.* 2017;82:457–90.
28. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem.* 2005;70:301–39.
29. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Nov 28;55(12):1531–46.
30. Wang W, Olson D, Liang G, Franceschi RT, Li C, Wang B, et al. Collagen XXIV (Col24 α 1) Promotes Osteoblastic Differentiation and Mineralization through TGF- β /Smads Signaling Pathway. *Int J Biol Sci.* 2012 Oct 25;8(10):1310–22.
31. Hjorten R, Hansen U, Underwood RA, Telfer HE, Fernandes RJ, Krakow D, et al. Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone.* 2007 Oct;41(4):535–42.
32. van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. *Arch Oral Biol.* 1983;28(4):339–45.
33. Amirrah IN, Lokanathan Y, Zulkiflee I, Wee MFMR, Motta A, Fauzi MB. A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold. *Biomedicines.* 2022 Sep 16;10(9):2307.
34. Bekhouche M, Colige A. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix Biol.* 2015 Jul;44–46:46–53.
35. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science.* 2005 Apr 1;118(Pt 7):1341–53.
36. Widmer C, Gebauer JM, Brunstein E, Rosenbaum S, Zaucke F, Drögemüller C, et al. Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Aug 14;109(33):13243–7.
37. Sun M, Chen S, Adams SM, Florer JB, Liu H, Kao WWY, et al. Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model. *J Cell Sci.* 2011 Dec 1;124(Pt 23):4096–105.
38. Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR. Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp Eye Res.* 1993 Jun;56(6):635–48.
39. Vallet SD, Ricard-Blum S. Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links. *Essays Biochem.* 2019 Sep 13;63(3):349–64.
40. Shaw LM, Olsen BR. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci.* 1991 May;16(5):191–4.
41. Schönborn K, Willenborg S, Schulz JN, Imhof T, Eming SA, Quondamatteo F, et al. Role of collagen XII in skin homeostasis and repair. *Matrix Biol.* 2020 Dec;94:57–76.
42. Mak KM, Mei R. Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. *Anat Rec (Hoboken).* 2017 Aug;300(8):1371–90.

43. Chan FL, Inoue S. Lamina lucida of basement membrane: An artefact. *Microscopy Research and Technique*. 1994;28(1):48–59.
44. Y W, G G. Complexity of type IV collagens: from network assembly to function. *Biological chemistry* [Internet]. 2019 Apr 24 [cited 2023 Feb 15];400(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30864416/>
45. Burgeson RE, Lunstrum GP, Rokosova B, Rimberg CS, Rosenbaum LM, Keene DR. The structure and function of type VII collagen. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;580:32–43.
46. Klein JA, Meng L, Zaia J. Deep Sequencing of Complex Proteoglycans: A Novel Strategy for High Coverage and Site-specific Identification of Glycosaminoglycan-linked Peptides*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2018 Aug 1;17(8):1578–90.
47. Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J*. 2021 Dec;288(24):6850–912.
48. Comper WD, Williams RP. Hydrodynamics of concentrated proteoglycan solutions. *Journal of Biological Chemistry*. 1987 Oct 5;262(28):13464–71.
49. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*. 2015 Mar 1;42:11–55.
50. Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J*. 2002;19(4–5):249–55.
51. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. Decorin: A Guardian from the Matrix. *The American Journal of Pathology*. 2012 Aug 1;181(2):380–7.
52. Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol*. 2018 Oct;71–72:40–50.
53. Nandadasa S, Foulcer S, Apte SS. The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. *Matrix Biology*. 2014 Apr 1;35:34–41.
54. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M. The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2009 Oct 1;1792(10):954–73.
55. Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *Journal of Endocrinology*. 2012 Sep 1;214(3):241–55.
56. To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2011 Sep 16;4:21.
57. Adams JC, Tucker RP. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: Diverse proteins with related roles in neuronal development. *Developmental Dynamics*. 2000;218(2):280–99.
58. Kale A, Rogers NM, Ghimire K. Thrombospondin-1 CD47 Signalling: From Mechanisms to Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan;22(8):4062.
59. Ducret M, Costantini A, Gobert S, Farges JC, Bekhouche M. Fibrin-based scaffolds for dental pulp regeneration: from biology to nanotherapeutics. *Eur Cell Mater*. 2021 Jan 2;41:1–14.
60. Janmey PA, Winer JP, Weisel JW. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J R Soc Interface*. 2009 Jan 6;6(30):1–10.
61. Höök P, Litvinov RI, Kim OV, Xu S, Xu Z, Bennett JS, et al. Strong Binding of Platelet Integrin α IIb β 3 to Fibrin Clots: Potential Target to Destabilize Thrombi. *Sci Rep*. 2017 Oct 11;7(1):13001.
62. Gailit J, Clarke C, Newman D, Tonnesen MG, Mosesson MW, Clark RA. Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin α (v) β 3. *Exp Cell Res*. 1997 Apr 10;232(1):118–26.
63. Flick MJ, Du X, Witte DP, Jiroušková M, Soloviev DA, Busuttill SJ, et al. Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor α _M β ₂/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. *J Clin Invest*. 2004 Jun 1;113(11):1596–606.
64. Swieringa F, Spronk HMH, Heemskerk JWM, van der Meijden PEJ. Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018 Jul;2(3):450–60.

65. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1894–904.
66. Roberts IV, Bukhary D, Valdivieso CYL, Tirelli N. Fibrin Matrices as (Injectable) Biomaterials: Formation, Clinical Use, and Molecular Engineering. *Macromol Biosci.* 2020 Jan;20(1):e1900283.
67. Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood.* 1991 Dec 15;78(12):3114–24.
68. Heissig B, Dhahri D, Eiamboonsert S, Salama Y, Shimazu H, Munakata S, et al. Role of mesenchymal stem cell-derived fibrinolytic factor in tissue regeneration and cancer progression. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Dec;72(24):4759–70.
69. Deryugina EI, Quigley JP. Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:564259.
70. Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20;275(42):33008–13.
71. Lelongt B, Bengatta S, Delauche M, Lund LR, Werb Z, Ronco PM. Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J Exp Med.* 2001 Apr 2;193(7):793–802.
72. Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol.* 2008 Feb;19(1):34–41.
73. Neuss S, Schneider RKM, Tietze L, Knüchel R, Jahnen-Dechent W. Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. *Cells Tissues Organs.* 2010;191(1):36–46.
74. Di Cera E. Serine proteases. *IUBMB Life.* 2009;61(5):510–5.
75. Ramírez-Larrota JS, Eckhard U. An Introduction to Bacterial Biofilms and Their Proteases, and Their Roles in Host Infection and Immune Evasion. *Biomolecules.* 2022 Feb;12(2):306.
76. Gomis-Rüth FX. Catalytic Domain Architecture of Metzincin Metalloproteases. *Journal of Biological Chemistry.* 2009 Jun 5;284(23):15353–7.
77. Bruschi F, Pinto B. The significance of matrix metalloproteinases in parasitic infections involving the central nervous system. *Pathogens.* 2013 Feb 19;2(1):105–29.
78. Yamakoshi Y, Simmer JP. Structural features, processing mechanism and gene splice variants of dentin sialophosphoprotein. *Japanese Dental Science Review.* 2018 Nov 1;54(4):183–96.
79. Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 2005;7(4):160–9.
80. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *The Biochemical Journal.* 2005 Feb 15;386(Pt 1):15–27.
81. Colige A, Ruggiero F, Vandenberghe I, Dubail J, Kesteloot F, Van Beeumen J, et al. Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *The Journal of Biological Chemistry.* 2005 Oct 14;280(41):34397–408.
82. Broder C, Arnold P, Vadon-Le Goff S, Konerding MA, Bahr K, Müller S, et al. Metalloproteases meprin α and meprin β are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Aug 27;110(35):14219–24.
83. Dupont L, Ehx G, Chantry M, Monseur C, Leduc C, Janssen L, et al. Spontaneous atopic dermatitis due to immune dysregulation in mice lacking Adamts2 and 14. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology.* 2018;70:140–57.
84. Colige A, Nuytinck L, Hausser I, van Essen AJ, Thiry M, Herens C, et al. Novel types of mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIC) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene. *The Journal of Investigative Dermatology.* 2004 Oct;123(4):656–63.

85. Malfait F, De Coster P, Hausser I, van Essen AJ, Franck P, Colige A, et al. The natural history, including orofacial features of three patients with Ehlers-Danlos syndrome, dermatosparaxis type (EDS type VIIC). *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2004 Nov 15;131(1):18–28.
86. Janssen L, Dupont L, Bekhouche M, Noel A, Leduc C, Voz M, et al. ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis. *Angiogenesis*. 2016 Jan;19(1):53–65.
87. Arning A, Hiersche M, Witten A, Kurlemann G, Kurnik K, Manner D, et al. A genome-wide association study identifies a gene network of ADAMTS genes in the predisposition to pediatric stroke. *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5231–6.
88. Lee CW, Hwang I, Park CS, Lee H, Park DW, Kang SJ, et al. Expression of ADAMTS-2, -3, -13, and -14 in culprit coronary lesions in patients with acute myocardial infarction or stable angina. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2012 May;33(4):362–70.
89. Goertsches R, Comabella M, Navarro A, Perkal H, Montalban X. Genetic association between polymorphisms in the ADAMTS14 gene and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2005 Jul;164(1–2):140–7.
90. Klimek K, Ginalska G. Proteins and Peptides as Important Modifiers of the Polymer Scaffolds for Tissue Engineering Applications—A Review. *Polymers*. 2020 Apr;12(4):844.
91. Ullah F, Othman MBH, Javed F, Ahmad Z, Akil HMD. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2015 Dec 1;57:414–33.
92. Mitrousis N, Fokina A, Shoichet MS. Biomaterials for cell transplantation. *Nat Rev Mater*. 2018 Nov;3(11):441–56.
93. Willyard C. Unlocking the secrets of scar-free skin healing. *Nature*. 2018 Nov;563(7732):S86–8.
94. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jan 1;15(1):13–27.
95. Nahás-Scocate ACR, de Moraes GFA, Nader HB, Vicente CM, Toma L. Analysis of proteoglycan expression in human dental pulp. *Arch Oral Biol*. 2018 Jun;90:67–73.
96. Iozzo RV, Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J*. 1996 Apr;10(5):598–614.
97. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:230251.
98. Richert R, Ducret M, Alliot-Licht B, Bekhouche M, Gobert S, Farges JC. A critical analysis of research methods and experimental models to study pulpitis. *Int Endod J*. 2022 Mar;55 Suppl 1:14–36.
99. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod*. 2014 Apr;40(4 Suppl):S46–51.
100. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015 May;94(5):650–8.
101. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res*. 2017 Apr 1;96(4):380–7.
102. Masson E. Immunité du parodonte [Internet]. EM-Consulte. [cited 2022 Jan 16]. Available from: <https://www.em-consulte.com/article/1098248/immunite-du-parodonte>
103. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol*. 2021 Jul;21(7):426–40.
104. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer’s disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv*. 2019 Jan;5(1):eaau3333.

105. He L, Kim SG, Gong Q, Zhong J, Wang S, Zhou X, et al. Regenerative Endodontics for Adult Patients. *J Endod.* 2017 Sep;43(9S):S57–64.
106. European Society of Endodontology (ESE) developed by:, Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S, El-Karim I, et al. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J.* 2019 Jul;52(7):923–34.
107. Ducret M, Fabre H, Celle A, Mallein-Gerin F, Perrier-Groult E, Alliot-Licht B, et al. Current challenges in human tooth revitalization. *Biomed Mater Eng.* 2017;28(s1):S159–68.
108. Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet JF. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. *J Endod.* 2000 Sep;26(9):525–8.
109. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Ariji Y, et al. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Mar 9;8(1):61.
110. Xuan K, Li B, Guo H, Sun W, Kou X, He X, et al. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Sci Transl Med.* 2018 Aug 22;10(455):eaaf3227.
111. Galler KM, Brandl FP, Kirchhof S, Widbiller M, Eidt A, Buchalla W, et al. Suitability of Different Natural and Synthetic Biomaterials for Dental Pulp Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A.* 2018 Feb;24(3–4):234–44.
112. Demarco FF, Conde MCM, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J.* 2011;22(1):3–13.
113. Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater.* 2012 Apr;28(4):341–8.
114. Jones TD, Kefi A, Sun S, Cho M, Alapati SB. An Optimized Injectable Hydrogel Scaffold Supports Human Dental Pulp Stem Cell Viability and Spreading. *Adv Med.* 2016;2016:7363579.
115. Palma PJ, Ramos JC, Martins JB, Diogenes A, Figueiredo MH, Ferreira P, et al. Histologic Evaluation of Regenerative Endodontic Procedures with the Use of Chitosan Scaffolds in Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1279–87.
116. Mangione F, EzEldeen M, Bardet C, Lesieur J, Bonneau M, Decup F, et al. Implanted Dental Pulp Cells Fail to Induce Regeneration in Partial Pulpotomies. *J Dent Res.* 2017 Nov 1;96(12):1406–13.
117. Li Y, Xiao Y, Liu C. The Horizon of Materiobiology: A Perspective on Material-Guided Cell Behaviors and Tissue Engineering. *Chem Rev.* 2017 Mar 8;117(5):4376–421.
118. Al Madhoun A, Sindhu S, Haddad D, Atari M, Ahmad R, Al-Mulla F. Dental Pulp Stem Cells Derived From Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 2021 [cited 2023 Mar 3];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.717624>
119. Simon SRJ, Tomson PL, Berdal A. Regenerative Endodontics: Regeneration or Repair? *Journal of Endodontics.* 2014 Apr 1;40(4):S70–5.
120. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. *J Dent Res.* 2009 Sep;88(9):792–806.
121. Sui B, Chen C, Kou X, Li B, Xuan K, Shi S, et al. Pulp Stem Cell–Mediated Functional Pulp Regeneration. *J Dent Res.* 2019 Jan 1;98(1):27–35.
122. Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, et al. Immunophenotyping Reveals the Diversity of Human Dental Pulp Mesenchymal Stromal Cells In vivo and Their Evolution upon In vitro Amplification. *Front Physiol.* 2016;7:512.
123. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Konoki R, Baba S. Promising advances in clinical trials of dental tissue-derived cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Dec;11(1):1–10.
124. Marei MK, El Backly RM. Dental Mesenchymal Stem Cell-Based Translational Regenerative Dentistry: From Artificial to Biological Replacement. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6:49.
125. Ducret M, Fabre H, Farges JC, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, et al. Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal Manufacturing Approach. *J Endod.* 2015 Sep;41(9):1492–9.

126. Fabre H, Ducret M, Degoul O, Rodriguez J, Perrier-Groult E, Aubert-Foucher E, et al. Characterization of Different Sources of Human MSCs Expanded in Serum-Free Conditions with Quantification of Chondrogenic Induction in 3D. *Stem Cells Int.* 2019;2019:2186728.
127. Gharaei MA, Xue Y, Mustafa K, Lie SA, Fristad I. Human dental pulp stromal cell conditioned medium alters endothelial cell behavior. *Stem Cell Res Ther.* 2018 Mar 21;9(1):69.
128. Fracaro L, Senegaglia AC, Herai RH, Leitolis A, Boldrini-Leite LM, Rebelatto CLK, et al. The Expression Profile of Dental Pulp-Derived Stromal Cells Supports Their Limited Capacity to Differentiate into Adipogenic Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 15;21(8):E2753.
129. Eckhard U, Marino G, Abbey SR, Matthew I, Overall CM. TAILS N-terminomic and proteomic datasets of healthy human dental pulp. *Data Brief.* 2015 Dec;5:542–8.
130. Ruangsawasdi N, Zehnder M, Weber FE. Fibrin gel improves tissue ingrowth and cell differentiation in human immature premolars implanted in rats. *J Endod.* 2014 Feb;40(2):246–50.
131. Ducret M, Montembault A, Josse J, Padeloup M, Celle A, Benchrih R, et al. Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. *Dent Mater.* 2019 Apr;35(4):523–33.
132. Roura S, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. Fibrin, the preferred scaffold for cell transplantation after myocardial infarction? An old molecule with a new life. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017 Aug;11(8):2304–13.
133. Thompson WD, Campbell R, Evans T. Fibrin degradation and angiogenesis: Quantitative analysis of the angiogenic response in the chick chorioallantoic membrane. *The Journal of Pathology.* 1985;145(1):27–37.
134. McKenzie R, Pepper DS, Kay AB. The generation of chemotactic activity for human leukocytes by the action of plasmin on human fibrinogen. *Thromb Res.* 1975 Jan;6(1):1–8.
135. Renard E, Amiaud J, Delbos L, Charrier C, Montembault A, Ducret M, et al. Dental pulp inflammatory/immune response to a chitosan-enriched fibrin hydrogel in the pulpotomised rat incisor. *Eur Cell Mater.* 2020 Aug 20;40:74–87.
136. Bekhouche M, Blum LJ, Doumèche B. Contribution of Dynamic and Static Quenchers for the Study of Protein Conformation in Ionic Liquids by Steady-State Fluorescence Spectroscopy. *J Phys Chem B.* 2012 Jan 12;116(1):413–23.
137. Bekhouche M, Doumèche B, Blum LJ. Chemical modifications by ionic liquid-inspired cations improve the activity and the stability of formate dehydrogenase in [MMIm][Me₂PO₄]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2010 Aug 1;65(1):73–8.
138. Bekhouche M, Blum LJ, Doumèche B. Ionic Liquid-Inspired Cations Covalently Bound to Formate Dehydrogenase Improve its Stability and Activity in Ionic Liquids. *ChemCatChem.* 2011;3(5):875–82.
139. Carter JLL, Bekhouche M, Noiriél A, Blum LJ, Doumèche B. Directed evolution of a formate dehydrogenase for increased tolerance to ionic liquids reveals a new site for increasing the stability. *Chembiochem.* 2014 Dec 15;15(18):2710–8.
140. Abdellaoui S, Bekhouche M, Noiriél A, Henkens R, Bonaventura C, Blum LJ, et al. Rapid electrochemical screening of NAD-dependent dehydrogenases in a 96-well format. *Chem Commun (Camb).* 2013 Jun 28;49(51):5781–3.
141. Leduc C, Dupont L, Joannes L, Monseur C, Baiwir D, Mazzucchelli G, et al. In vivo N-Terminomics Highlights Novel Functions of ADAMTS2 and ADAMTS14 in Skin Collagen Matrix Building. *Front Mol Biosci.* 2021;8:643178.
142. Rosell-García T, Paradela A, Bravo G, Dupont L, Bekhouche M, Colige A, et al. Differential cleavage of lysyl oxidase by the metalloproteinases BMP1 and ADAMTS2/14 regulates collagen binding through a tyrosine sulfate domain. *J Biol Chem.* 2019 Jul 19;294(29):11087–100.
143. Wang G, Muhl L, Padberg Y, Dupont L, Peterson-Maduro J, Stehling M, et al. Specific fibroblast subpopulations and neuronal structures provide local sources of Vegfc-processing components during zebrafish lymphangiogenesis. *Nat Commun.* 2020 Jun 1;11(1):2724.

144. Dupont L, Joannes L, Morfoisse F, Blacher S, Monseur C, Deroanne CF, et al. ADAMTS2 and ADAMTS14 can substitute for ADAMTS3 in adults for pro-VEGFC activation and lymphatic homeostasis. *JCI Insight* [Internet]. 2022 Apr 22 [cited 2023 Mar 21];7(8). Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/151509>
145. Fleming MD, Campagna DR, Haslett JN, Trenor CC, Andrews NC. A mutation in a mitochondrial transmembrane protein is responsible for the pleiotropic hematological and skeletal phenotype of flexed-tail (f/f) mice. *Genes Dev.* 2001 Mar 15;15(6):652–7.
146. Minjarez B, Calderón-González KG, Rustarazo MLV, Herrera-Aguirre ME, Labra-Barrios ML, Rincon-Limas DE, et al. Identification of proteins that are differentially expressed in brains with Alzheimer's disease using iTRAQ labeling and tandem mass spectrometry. *J Proteomics.* 2016 Apr 29;139:103–21.
147. Hildick-Smith GJ, Cooney JD, Garone C, Kremer LS, Haack TB, Thon JN, et al. Macrocytic anemia and mitochondriopathy resulting from a defect in sideroflexin 4. *Am J Hum Genet.* 2013 Nov 7;93(5):906–14.
148. Vinklarova L, Schmidt M, Benek O, Kuca K, Gunn-Moore F, Musilek K. Friend or enemy? Review of 17 β -HSD10 and its role in human health or disease. *J Neurochem.* 2020 Nov;155(3):231–49.
149. Baudier J. ATAD3 proteins: brokers of a mitochondria-endoplasmic reticulum connection in mammalian cells. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2018 May;93(2):827–44.
150. Tifoun N, Bekhouche M, De Las Heras JM, Guillaume A, Bouleau S, Guéna I, et al. A High-Throughput Search for SFXN1 Physical Partners Led to the Identification of ATAD3, HSD10 and TIM50. *Biology (Basel).* 2022 Aug 31;11(9):1298.
151. Verma P, Nosrat A, Kim JR, Price JB, Wang P, Bair E, et al. Effect of Residual Bacteria on the Outcome of Pulp Regeneration In Vivo. *J Dent Res.* 2017 Jan 1;96(1):100–6.
152. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine.* 2017 Feb 14;12:1227–49.
153. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2016 Dec 15;107:163–75.
154. Bekhouche M, Bolon M, Charriaud F, Lamrayah M, Da Costa D, Primard C, et al. Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. *J Mater Chem B.* 2020 Sep 23;8(36):8422–32.
155. Groen N, Guvendiren M, Rabitz H, Welsh WJ, Kohn J, de Boer J. Stepping into the omics era: Opportunities and challenges for biomaterials science and engineering. *Acta Biomater.* 2016 Apr 1;34:133–42.
156. Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, et al. Manufacturing of dental pulp cell-based products from human third molars: current strategies and future investigations. *Front Physiol.* 2015;6:213.
157. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):673–87.
158. Pang X, He X, Qiu Z, Zhang H, Xie R, Liu Z, et al. Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy. *Sig Transduct Target Ther.* 2023 Jan 2;8(1):1–42.
159. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):269–80.
160. Moreno-Layseca P, Icha J, Hamidi H, Ivaska J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat Cell Biol.* 2019 Feb 1;21(2):122–32.
161. Du J, Chen X, Liang X, Zhang G, Xu J, He L, et al. Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 7;108(23):9466–71.
162. Kleifeld O, Doucet A, Prudova A, auf dem Keller U, Gioia M, Kizhakkedathu JN, et al. Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. *Nature Protocols.* 2011 Sep 22;6(10):1578–611.

163. Prudova A, auf dem Keller U, Butler GS, Overall CM. Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2010 May;9(5):894–911.
164. Starr AE, Bellac CL, Dufour A, Goebeler V, Overall CM. Biochemical characterization and N-terminomics analysis of leukolysin, the membrane-type 6 matrix metalloprotease (MMP25): chemokine and vimentin cleavages enhance cell migration and macrophage phagocytic activities. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012 Apr 13;287(16):13382–95.
165. Colige A, Monseur C, Crawley JTB, Santamaria S, de Groot R. Proteomic discovery of substrates of the cardiovascular protease ADAMTS7. *J Biol Chem*. 2019 May 17;294(20):8037–45.
166. Becker-Pauly C, Barré O, Schilling O, Auf dem Keller U, Ohler A, Broder C, et al. Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Sep;10(9):M111.009233.
167. Jefferson T, Auf dem Keller U, Bellac C, Metz VV, Broder C, Hedrich J, et al. The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2013 Jan;70(2):309–33.
168. Bekhouche M, Leduc C, Dupont L, Janssen L, Delolme F, Vadon-Le Goff S, et al. Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2016;30(5):1741–56.
169. Sabino F, Egli FE, Savickas S, Holstein J, Kaspar D, Rollmann M, et al. Comparative Degradomics of Porcine and Human Wound Exudates Unravels Biomarker Candidates for Assessment of Wound Healing Progression in Trauma Patients. *J Invest Dermatol*. 2018 Feb;138(2):413–22.
170. Weng SSH, Demir F, Ergin EK, Dirnberger S, Uozie A, Tuscher D, et al. Sensitive Determination of Proteolytic Proteoforms in Limited Microscale Proteome Samples. *Mol Cell Proteomics*. 2019 Nov;18(11):2335–47.
171. Bini A, Itoh Y, Kudryk BJ, Nagase H. Degradation of Cross-Linked Fibrin by Matrix Metalloproteinase 3 (Stromelysin 1): Hydrolysis of the γ Gly 404–Ala 405 Peptide Bond. *Biochemistry*. 1996 Jan 1;35(40):13056–63.
172. Eba H, Murasawa Y, Iohara K, Isogai Z, Nakamura H, Nakamura H, et al. The Anti-Inflammatory Effects of Matrix Metalloproteinase-3 on Irreversible Pulpitis of Mature Erupted Teeth. *PLOS ONE*. 2012 Dec 20;7(12):e52523.
173. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):55–71.
174. Steffensen B, Häkkinen L, Larjava H. Proteolytic Events of Wound-Healing — Coordinated Interactions Among Matrix Metalloproteinases (MMPs), Integrins, and Extracellular Matrix Molecules. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2001 Sep 1;12(5):373–98.
175. Nissinen L, Koivunen J, Käpylä J, Salmela M, Nieminen J, Jokinen J, et al. Novel $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibitors reveal that integrin binding to collagen under shear stress conditions does not require receptor preactivation. *J Biol Chem*. 2012 Dec 28;287(53):44694–702.
176. Fray MJ, Dickinson RP, Huggins JP, Occeleston NL. A Potent, Selective Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-3 for the Topical Treatment of Chronic Dermal Ulcers. *J Med Chem*. 2003 Jul 1;46(16):3514–25.
177. Zheng K, Boccaccini AR. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017 Nov 1;249:363–73.
178. El Baakili S, El Mabrouk K, Bricha M. Acellular bioactivity and drug delivery of new strontium doped bioactive glasses prepared through a hydrothermal process. *RSC Adv*. 2022 May 17;12(24):15361–72.
179. Alghaithy RA, Qualtrough AJE. Pulp sensibility and vitality tests for diagnosing pulpal health in permanent teeth: a critical review. *Int Endod J*. 2017 Feb;50(2):135–42.

RESUME :

Les enzymes jouent un rôle primordial dans le remodelage physiopathologique du vivant notamment via la biocatalyse de modifications post-traductionnelles telle que la protéolyse. Leurs activités/fonctions sont intimement et réciproquement liées à leur environnement ; qu'il soit naturel (matrice extracellulaire, cellules) ou biomimétique (hydrogels, biomatériaux).

Lors d'une thèse en **enzymologie** appliquée à la biocatalyse, la relation structure/fonction d'une déshydrogénase a été étudiée dans un milieu non conventionnel ; les liquides ioniques (LIs) (Lyon, ICBMS, UMR CNRS 5246). Ces travaux ont permis de mieux comprendre l'influence de ces milieux dit "verts" sur l'activité enzymatique de type déshydrogénase.

Dans le domaine de la **matrice extracellulaire**, les fonctions des procollagènes N-protéinases (ADAMTS2, 3 et 14), participant à la maturation des collagènes fibrillaires, ont été étudiées par une méthode de **protéomique** spécifiquement adaptée à la protéolyse (N-terminomique) (LBTC, institut GIGA, Université de Liège, Belgique). Ces travaux ont conduit à l'identification de nombreux substrats autres que les collagènes fibrillaires, *in vitro* et *in vivo*, pour les ADAMTS2, 3 et 14 [1-2]. Ces études ont repoussé le dogme restreignant l'activité des procollagène N-protéinases aux collagènes fibrillaires et ouvert la possibilité de clivage de substrats impliqués dans la signalisation cellulaire, telle que la signalisation du TGF-beta.

Les recherches menées depuis 2018 au sein de l'équipe de Recherche Ostéoarticulaire et Dentaire (ROAD) du Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique (LBTI, UMR CNRS 5305) visent à étudier les **mécanismes enzymatiques** et à élaborer des **environnements matriciels** afin de conditionner la formation de tissus fonctionnels. Ces travaux ont pour modèle la régénération du tissu conjonctif vivant de la dent, la **pulpe dentaire (PD)**. Dans ce contexte, les procédures régénératives endodontiques (PRE), notamment celles basées sur l'utilisation d'un environnement matriciel associé à des cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire (CSM-PD), sont proposées pour le traitement des infections carieuses irréversibles [3]. Cependant, les environnements matriciels proposés ne permettent pas de produire une PD entièrement fonctionnelle en raison du manque d'asepsie et du manque de contrôle des mécanismes de régénération tissulaire qui restent encore mal compris. Un hydrogel antibactérien à base de fibrine a été développé afin de constituer un environnement aseptique pour favoriser la régénération au sein de la dent préalablement infectée [4]. En parallèle de ces recherches, des études sont menées afin de mieux comprendre les mécanismes biomoléculaires initiés par les CSM conduisant au remplacement du biomatériau de fibrine par une PD humaine fonctionnelle. Ces investigations utilisent des approches à large spectre (**multi-omiques**) et s'intéressent plus particulièrement aux événements protéolytiques conduisant à la dégradation du biomatériau ainsi qu'à la néosynthèse de matrice extracellulaire.

[1] Bekhouche M et al., FASEB J 2016 (doi: 10.1096/fj.15-279869.)

[2] Leduc C et al., Front. Mol. Biosci. 2021 (doi: 10.3389/fmolb.2021.643178.)

[3] Ducret M et al., eCM. 2021 (doi: 10.22203/eCM.v041a01.)

[4] Bekhouche M et al., J Mater Chem B 2020 (doi: 10.1039/d0tb00989j.)