

Université de Reims-Champagne Ardenne
UFR Médecine

Année 2005

N°

THESE

Présentée pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
DE REIMS-CHAMPAGNE ARDENNE**
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 04 octobre 2005

par

Stéphane JAISSON

**INFLUENCE DE LA CARBAMYLATION SUR LES PROPRIETES
STRUCTURALES DU COLLAGENE DE TYPE I ET SES INTERACTIONS
AVEC LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES HUMAINS**

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire
CNRS UMR 6198 - IFR 53 Biomolécules
UFR Médecine de Reims

Membres du Jury

Rapporteurs : Madame le Professeur Sylvie RICARD-BLUM (Lyon)
Monsieur le Professeur Eric RONDEAU (Paris)

Examineurs : Madame le Docteur Roselyne GARNOTEL (Reims)
Madame le Docteur Patricia SANSILVESTRI-MOREL (Paris)
Monsieur le Docteur William HORNEBECK (Reims)
Monsieur le Professeur Philippe NGUYEN (Reims)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Philippe GILLERY (Reims)

A mes grands-pères

A ma famille et belle-famille

A mes parents

A Valérie

Avant tout, je tiens à remercier Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart, directeur du laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire - CNRS UMR 6198, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail.

Je tiens ensuite à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Philippe Gillery pour avoir dirigé cette thèse. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité, vos conseils, votre rigueur scientifique, votre aide très précieuse pour la rédaction de ce manuscrit, et surtout, merci de vous être soucié de mon avenir. Pour tout cela, je vous en serai toujours extrêmement reconnaissant.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude à Madame le Docteur Roselyne Garnotel, tout d'abord pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse. J'ai beaucoup de raisons de te remercier, à commencer pour t'être sans cesse démenée pour trouver des donneurs, et pour t'être « sacrifiée » à plusieurs reprises... Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes conseils au quotidien. Merci pour tout...

Je remercie également Madame le Professeur Sylvie Ricard-Blum pour m'avoir fait profiter de son expérience du collagène par le biais de notre collaboration, mais aussi pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Eric Rondeau pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Merci à Monsieur le Professeur Philippe Nguyen pour sa participation à ce jury de thèse en tant qu'examinateur.

Merci à Monsieur le Docteur William Hornebeck d'avoir accepté de juger ce travail et de m'avoir permis de profiter de ses connaissances sur les MMP.

Merci à Madame le Docteur Patricia Sansilvestri-Morel. Je suis vraiment heureux que tu aies accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci de m'avoir suggéré à un moment important qu'il pourrait m'être bénéfique de poursuivre mon chemin dans le domaine de la recherche...

J'associe à ces remerciements les Professeurs P. Rieu et A. Randoux ainsi que les Docteurs G. Bellon, J. Cornillet, JC Monboisse, L. Ramont et Y. Wegrowski pour leurs remarques et conseils apportés au cours des réunions de laboratoire ou des discussions de couloir.

Un grand merci au Professeur V. Larreta-Garde, au Docteur S. Lorimier, au Docteur G. Sockalingdum, au Docteur G. Kegelaer et au Docteur H. Sartelet pour leur collaboration.

Merci à Coco, Martine et Aurélie pour leur gentillesse, leur aide technique et leurs conseils. Merci à François et Alain pour les acides aminés. Merci à Michèle et Colette.

Un merci particulier aux membres de l'autoproclamée « Collagen Team » : Fatou, Stéphane P, Nadia, Alex, Céline, et la dernière recrue, Emilie. Merci à tous d'avoir entretenu une telle ambiance dans ce groupe de travail.

Je tiens à remercier tous les étudiants du laboratoire, chacun d'entre eux pour des raisons différentes et personnelles. Un grand merci à Boris, Yann, Marie-France, Juju, Arnaud, Romain, Jessica, Fouad, Mehdi, Abdel, Alain, Eric, Sylvie et Stéphane B (même si vous n'êtes plus vraiment des étudiants).

Sans rancune pour les foteux supporters niortais, rémois et troyens, j'ai peut-être abusé parfois à trop vous chambrer, mais c'est parce que : « Les sedanais sont les meilleurs, les autres... » (Vous connaissez la chanson...).

Je remercie également Yves Gourdin, responsable du service de reprographie, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Merci à toutes les personnes qui ont bien voulu me donner quelques millilitres de sang pour mes expériences.

Merci au Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche pour son soutien financier et pour m'avoir permis de découvrir l'enseignement supérieur.

Je tiens à associer à ces remerciements mes amis ainsi que les membres de ma famille et de ma belle-famille.

Je dédie cette thèse à mes parents : merci pour votre amour, votre soutien inconditionnel, votre aide, vos conseils durant toutes ces années,... bref, tout ce que vous faites pour moi qui me donne le sentiment d'avoir des parents extraordinaires. Mille mercis...

Avant de tourner cette page, je terminerai par dédier cette thèse à la personne qui partage ma vie et à qui je tiens tellement : Valérie. Merci pour ton amour, ton soutien quotidien (surtout ces derniers temps), ta bonne humeur et tout ce qui fait que tu me rends la vie simple et belle. C'est une nouvelle étape, et j'espère pouvoir en franchir beaucoup d'autres à tes côtés...

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Jaisson S., Larreta-Garde V., Garnotel R., Bellon G., Hornebeck W., Gillery P. *Altered sensitivity of carbamylated collagen to proteolysis by collagenases and gelatinases.* Matrix Biology 2005 (En cours de rédaction).

Delevallée-Forte C., Garnotel R., **Jaisson S.**, Touré F., Rieu P., Gillery P. *Carbamylated albumin is a potent inhibitor of polymorphonuclear neutrophil oxidative functions.* Kidney International 2005 (Soumis)

Jaisson S., Lorimier S., Ricard-Blum B., Sockalingdum G., Delevallée-Forte C., Kegelaer G., Manfait M., Garnotel R., Gillery P. *Impact of carbamylation on type I collagen conformational structure and its ability to activate human polymorphonuclear neutrophils.* Chemistry & Biology 2005 (En cours de révision).

Garnotel R., Sabbah N., **Jaisson S.**, Gillery P. *Enhanced activation of and increased production of matrix metalloproteinase-9 by human blood monocytes upon adhering to carbamylated collagen.* FEBS Letters 2004 ; 563 : 13-6.

Sansilvestri-Morel P., Rupin A., **Jaisson S.**, Fabiani J.N., Verbeuren T.J., Vanhoutte P.M. *The synthesis of collagen is dysregulated in cultured fibroblasts derived from skin of subjects with varicose veins as it is in venous smooth muscle cells.* Circulation. 2002 ; 106 : 479-483.

COMMUNICATIONS ORALES

Jaisson S., Garnotel R., Delevallée-Forte C., Lorimier S., Gillery P. *La carbamylation inhibe l'explosion respiratoire des polynucléaires neutrophiles par le collagène de type I.* Forum des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims. Reims. 25 octobre 2004.

Jaisson S., Garnotel R., Delevallée-Forte C., Lorimier S., Gillery P. *Inhibition de l'explosion respiratoire des polynucléaires neutrophiles par le collagène de type I carbamylé.* XIII^{ème} réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif. Arcachon. 25-27 mars 2004.

Prix de la meilleure communication orale

Jaisson S., Garnotel R., Delevallée-Forte C., Gillery P.

La carbamylation modifie les propriétés structurales du collagène de type I et ses interactions avec les polynucléaires neutrophiles humains.

Journée des jeunes chercheurs de l'IFR53. Reims. 12 mai 2003.

COMMUNICATIONS PAR VOIE D’AFFICHE

Jaisson S., Garnotel R., Delevallée-Forte C., Gillery P.

Influence de la carbamylation sur les propriétés structurales du collagène de type I et ses interactions avec les polynucléaires neutrophiles humains.

Forum des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims. Reims. 21 mai 2003.

Jaisson S., Garnotel R., Delevallée-Forte C., Gillery P.

Influence de la carbamylation sur les propriétés structurales du collagène de type I et ses interactions avec les polynucléaires neutrophiles humains.

XII^{ème} réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif. Paris. 13-15 mars 2003.

Jaisson S., Garnotel R., Lorimier S., Gillery P.

Influence of carbamylation on type I collagen structural properties and its interactions with dermal fibroblasts.

Third symposium « Collagen and skin ». Reims. 21-23 novembre 2002.

SOMMAIRE

Liste des Illustrations	11
Liste des Abréviations	15
<u>Chapitre I : INTRODUCTION</u>	18
I.1. Situation du sujet	19
I.2. La matrice extracellulaire	21
<u>I.2.1. Composition de la matrice extracellulaire</u>	21
<u>I.2.2. Le collagène de type I</u>	26
I.2.2.1. Structure du collagène de type I	26
I.2.2.2. Biosynthèse du collagène de type I	27
I.2.2.3. Distribution tissulaire	33
I.2.2.4. Modifications post-traductionnelles tardives du collagène de type I	34
I.2.2.5. Caractéristiques physico-chimiques du collagène de type I	35
I.2.2.6. Catabolisme du collagène de type I	36
<u>I.2.3. Les métalloprotéinases matricielles (MMP)</u>	37
I.2.3.1. Classification des MMP	37
I.2.3.2. Structure des MMP	38
I.2.3.3. Activation des MMP	40
I.2.3.4. Rôle des MMP	41
I.2.3.5. Régulation de l'activité des MMP	42
I.3. Les polynucléaires neutrophiles	43
<u>I.3.1. Morphologie des polynucléaires neutrophiles</u>	43
<u>I.3.2. Fonctions des polynucléaires neutrophiles</u>	45
I.3.2.1. Mécanismes de recrutement des polynucléaires	46
I.3.2.2. La traversée de l'endothélium	46
I.3.2.3. Activation des PNN et phagocytose	49
<u>I.3.3. L'explosion respiratoire</u>	49
I.3.3.1. La NADPH-oxydase : composition et activation du complexe	50
I.3.3.2. Les espèces réactives de l'oxygène	53
<u>I.3.4. L'interaction entre collagène de type I et polynucléaires neutrophiles</u>	55
I.4. Insuffisance rénale chronique et carbamylation	57
<u>I.4.1. L'insuffisance rénale chronique (IRC)</u>	57

I.4.1.1. Physiopathologie et diagnostic clinique.....	58
I.4.1.2. Complications et traitements.....	59
I.4.1.3. Troubles infectieux et inflammatoires dans l'IRC.....	61
<u>I.4.2. La carbamylation des protéines.....</u>	62
I.4.2.1. Généralités sur la réaction de carbamylation.....	63
I.4.2.2. Carbamylation des protéines <i>in vivo</i> et processus physiopathologiques.....	65
I.4.2.2.1. <i>Cataracte</i>	65
I.4.2.2.2. <i>Insuffisance rénale chronique</i>	66
I.4.2.3. La carbamylation des protéines <i>in vitro</i>	68
<u>I.4.3. Rôle de la carbamylation des protéines dans la progression de l'insuffisance rénale chronique.....</u>	69
<u>I.5. Hypothèses de travail.....</u>	71
<u>Chapitre II : MATERIEL ET METHODES.....</u>	72
<u>II.1. Matériel et réactifs.....</u>	73
<u>II.1.1. Liste du matériel.....</u>	73
<u>II.1.2. Liste des réactifs.....</u>	74
<u>II.2. Méthodes.....</u>	76
<u>II.2.1. Extraction et carbamylation du collagène de type I.....</u>	76
II.2.1.1. Préparation du collagène de type I acido-soluble.....	76
II.2.1.2. Carbamylation du collagène de type I.....	77
<u>II.2.2. Méthodes d'étude des propriétés structurales du collagène.....</u>	77
II.2.2.1. Analyse électrophorétique.....	77
II.2.2.2. Analyse de la composition en acides aminés.....	78
II.2.2.3. Etude de la fibrillogenèse <i>in vitro</i>	80
II.2.2.4. Mesure de la température de fusion des gels de collagène.....	80
II.2.2.5. Analyse du collagène par dichroïsme circulaire (DC).....	81
II.2.2.6. Méthodes d'analyse spectroscopique du collagène carbamylé.....	81
II.2.2.7. Méthodes d'étude de l'hélicité du collagène.....	82
II.2.2.8. Microscopie électronique à balayage.....	83
II.2.2.9. Analyse des CB-peptides par électrophorèse bidimensionnelle.....	84
II.2.2.10. Purification des CB-peptides par IEF préparative.....	86
<u>II.2.3. Méthodes d'étude de la sensibilité du collagène vis à vis des protéinases.....</u>	88
II.2.3.1. Etudes de la dégradation du collagène par la collagénase bactérienne.....	88
II.2.3.2. Analyse par zymographie de la dégradation du collagène par les MMP.....	89
II.2.3.3. Analyse électrophorétique de la dégradation du collagène par les MMP.....	90
II.2.3.4. Analyse quantitative de la dégradation du collagène par les MMP.....	91
<u>II.2.4. Méthodes d'étude des interactions entre collagène et polynucléaires neutrophiles humains.....</u>	92

II.2.4.1. Préparation des polynucléaires neutrophiles humains.....	92
II.2.4.2. Préparation des plaques de culture.....	93
II.2.4.3. Mesure de l'adhésion des PNN par coloration des noyaux au violet cristal.....	93
II.2.4.4. Etude de la viabilité cellulaire.....	95
II.2.4.5. Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les PNN.....	95
II.2.4.6. Evaluation de l'effet « scavenger » du collagène carbamylé.....	97
II.2.4.7. Méthodes d'étude de l'interaction entre PNN et CB-peptides séparés par électrophorèse.....	98
II.2.4.8. Mise en évidence de l'implication d'une lysine dans le processus d'activation des PNN par le collagène.....	100
II.2.5. Analyse statistique.....	111

Chapitre III : RESULTATS..... 112

III.1. Analyse structurale du collagène de type I carbamylé..... 113

<u>III.1.1. Composition en acides aminés du collagène carbamylé</u>	113
<u>III.1.2. Propriétés électrophorétiques du collagène carbamylé</u>	114
<u>III.1.3. Sélectivité du processus de carbamylation</u>	116
III.1.3.1. Mise en évidence par SDS-PAGE.....	116
III.1.3.2. Mise en évidence par électrophorèse bidimensionnelle.....	117
<u>III.1.4. Analyse du collagène carbamylé par dichroïsme circulaire</u>	120
<u>III.1.5. Analyse du collagène carbamylé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)</u>	122
<u>III.1.6. Analyse du collagène carbamylé par spectroscopie Raman</u>	124
<u>III.1.7. Mesure de l'hélicité du collagène carbamylé par polarimétrie</u>	127
<u>III.1.8. Evaluation de la fibrillogenèse du collagène carbamylé <i>in vitro</i></u>	128
<u>III.1.9. Mesure de la température de fusion des gels de collagène carbamylé</u>	130
<u>III.1.10. Aspect morphologique du collagène carbamylé</u>	131
III.1.10.1. Etude de la structure des gels de collagène carbamylé.....	131
III.1.10.2. Aspect morphologique des fibres de collagène carbamylé en microscopie électronique à balayage.....	132

III.2. Sensibilité du collagène carbamylé à la protéolyse enzymatique..... 134

<u>III.2.1. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase bactérienne</u>	134
III.2.1.1. Mise en évidence par électrophorèse.....	134
III.2.1.2. Dosage de la 4-Hydroxyproline.....	136
<u>III.2.2. Dégradation du collagène carbamylé par les collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8 et MMP-13)</u>	137
III.2.2.1. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase-1 (MMP-1).....	137
III.2.2.2. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase-2 (MMP-8).....	142
III.2.2.3. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase-3 (MMP-13).....	146

<u>III.2.3. Dégradation du collagène carbamylé par les gélatinases (MMP-2 et MMP-9)</u>	149
III.2.3.1. Mise en évidence par zymographie	149
III.2.3.2. Dégradation du collagène marqué	150
<u>III.2.4. Dégradation du collagène carbamylé par la pepsine</u>	152
III.3. Influence de la carbamylation sur les interactions entre collagène et PNN	154
<u>III.3.1. Adhésion des polynucléaires neutrophiles au collagène carbamylé</u>	154
<u>III.3.2. Activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène carbamylé</u>	155
III.3.2.1. Etude de l'activation des PNN par réduction du NBT	157
III.3.2.2. Etude de l'activation des PNN par chimiluminescence	158
III.3.2.3. Activation des PNN au contact du collagène carbamylé par l'urée	160
III.3.2.4. Morphologie des PNN après contact avec le collagène carbamylé	161
III.3.2.5. Contrôle des préparations de collagène	162
<u>III.3.3. Mécanisme d'inhibition par le collagène carbamylé de la production de radicaux libres oxygénés par les polynucléaires neutrophiles</u>	163
III.3.3.1. Evaluation de la viabilité des PNN au contact du collagène carbamylé	163
III.3.3.2. Effet « scavenger » du collagène carbamylé	164
III.3.3.3. Rôle de la carbamylation du peptide α_1 CB6 dans l'interaction entre collagène et polynucléaires neutrophiles	165
III.3.3.4. Relation entre degré de carbamylation et activité du peptide α_1 CB6	169
III.3.3.5. Mise en évidence de l'implication d'un résidu de lysine dans l'activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène de type I	172
 <u>Chapitre IV : DISCUSSION</u>	 177
 <u>Chapitre V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	 201
 <u>Chapitre VI : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	 204

LISTE DES ILLUSTRATIONS

I. Liste des figures.

Figure 1. La triple hélice de collagène.

Figure 2. Représentation de l'assemblage supramoléculaire des membres de la famille des collagènes.

Figure 3. Représentation des domaines du procollagène de type I.

Figure 4. Biosynthèse du collagène de type I.

Figure 5. Fibrille de collagène en microscopie électronique à transmission.

Figure 6. Schématisation d'une fibre de collagène.

Figure 7. Présentation de la structure des différentes classes de MMP.

Figure 8. Processus d'activation des pro-MMP.

Figure 9. Morphologie du polynucléaire neutrophile.

Figure 10. La famille des intégrines : diversité et structure.

Figure 11. Les différentes étapes du processus de diapédèse.

Figure 12. Représentation schématique du mécanisme d'activation de la NADPH-oxydase.

Figure 13. Représentation schématique du métabolisme des espèces réactives de l'oxygène.

Figure 14. La réaction de carbamylation.

Figure 15. Chromatogrammes représentant la séparation des AA du collagène.

Figure 16. Electrophorèse bidimensionnelle des standards protéiques.

Figure 17. Gradient de pH obtenu après isoélectrofocalisation préparative.

Figure 18. Principe de l'isolement des PNN sur Polymorphprep[®].

Figure 19. Droite d'étalonnage entre le nombre de polynucléaires neutrophiles adhérents et l'absorbance à 560 nm.

Figure 20. Formule chimique des réactifs utilisés pour mettre en évidence la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Figure 21. Schéma explicatif de la technique d'étude des interactions entre PNN et CB-peptides séparés par électrophorèse.

Figure 22. Schéma explicatif du protocole de mutagenèse dirigée par la technique de PCR.

Figure 23. Vérification par électrophorèse de la présence de l'insert dans les plasmides des bactéries sélectionnées.

Figure 24. Vérification de l'efficacité de la mutagenèse dirigée par séquençage des inserts.

Figure 25. Mise en évidence par western-blot de la surexpression de la protéine de fusion GST.

Figure 26. Purification du peptide recombinant α_1 CB6.

Figure 27. Vérification de la pureté du peptide α_1 CB6 recombinant par SDS-PAGE.

Figure 28. Influence de la carbamylation sur la mobilité électrophorétique du collagène.

Figure 29. Influence de la carbamylation sur la mobilité électrophorétique des CB-peptides du collagène de type I.

Figure 30. Mise en évidence par électrophorèse bidimensionnelle de la carbamylation préférentielle du peptide α_1 CB6.

Figure 31. Analyse du collagène carbamylé par dichroïsme circulaire.

Figure 32. Analyse du collagène carbamylé par spectroscopie IR-TF.

Figure 33. Dendogramme obtenu après analyse statistique des dérivées secondes des spectres IR-TF des différents types de collagène.

Figure 34. Spectres Raman des collagènes témoin et carbamylé 24h.

Figure 35. Influence de la carbamylation sur le processus de fibrillogenèse du collagène.

Figure 36. Influence de la carbamylation sur la résistance des gels de collagène à la température.

Figure 37. Influence de la carbamylation sur la structure des gels de collagène.

Figure 38. Observation du collagène carbamylé en microscopie électronique à balayage.

Figure 39. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase bactérienne : SDS-PAGE.

Figure 40. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase bactérienne : quantification.

Figure 41. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-1 : zymographie.

Figure 42. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-1 : SDS-PAGE.

Figure 43. Influence du taux de carbamylation sur la résistance du collagène carbamylé à la MMP-1.

Figure 44. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-1 : quantification.

Figure 45. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-8 : SDS-PAGE.

Figure 46. Influence du taux de carbamylation sur la résistance du collagène carbamylé à la MMP -8.

Figure 47. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-8 : quantification.

Figure 48. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-13 : SDS-PAGE.

Figure 49. Influence du taux de carbamylation sur la résistance du collagène carbamylé à la MMP -13.

Figure 50. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-13 : quantification.

Figure 51. Dégradation du collagène carbamylé par les gélatinases : zymographie.

Figure 52. Dégradation du collagène carbamylé par les gélatinases : quantification.

Figure 53. Dégradation du collagène carbamylé par la pepsine : quantification.

Figure 54. Influence de la carbamylation sur l'adhésion des polynucléaires neutrophiles au collagène.

Figure 55. Cinétique d'activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène.

Figure 56. Effet de la carbamylation du collagène sur l'activation des polynucléaires neutrophiles (Test de réduction du NBT).

Figure 57. Influence de la carbamylation du collagène par l'urée sur l'activation des polynucléaires neutrophiles.

Figure 58. Modification de la morphologie des polynucléaires neutrophiles après interaction avec le collagène carbamylé.

Figure 59. Influence du collagène carbamylé sur la production d'ions superoxyde en système acellulaire.

Figure 60. Rôle de la carbamylation du peptide α_1 CB6 sur l'adhésion et l'activation des polynucléaires neutrophiles.

Figure 61. Influence du degré de carbamylation du peptide α_1 CB6 sur l'activation des polynucléaires neutrophiles.

Figure 62. Effet inhibiteur des différents peptides α_1 CB6 issus du collagène carbamylé 6h.

Figure 63. Effet inhibiteur des différents peptides α_1 CB6 issus du collagène carbamylé 24h.

Figure 64. Effet de l'acide 6-amino-hexanoïque sur l'activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène de type I.

Figure 65. Effet de l'acide 6-amino-hexanoïque sur l'adhésion des polynucléaires neutrophiles au collagène.

Figure 66. Alignement des séquences d'AA de l'extrémité C-terminale des peptides α_1 CB6 de différentes espèces.

Figure 67. Séquence primaire en acides aminés de la chaîne α_1 du collagène de type I humain (Source : Base de données Swiss Prot, entrée P02452).

Figure 68. Séquence primaire en acides aminés de la chaîne α_2 du collagène de type I humain (Source : Base de données Swiss Prot, entrée P08123).

Figure 69. Schéma explicatif de l'impact de la carbamylation sur les propriétés structurales du collagène de type I.

Figure 70. Schéma explicatif de l'impact de la carbamylation sur la sensibilité du collagène à la dégradation enzymatique.

II. Liste des tableaux.

Tableau 1. Facteurs capables de réguler la biosynthèse du collagène de type I.

Tableau 2. Constituants des granulations des PNN.

Tableau 3. Séquence des amorces de PCR utilisées pour l'étape de mutagenèse dirigée.

Tableau 4. Composition en résidus de lysine et d'homocitrulline des différentes préparations de collagène carbamylé.

Tableau 5. Identification des pHi des différents spots correspondant à α_1 CB6.

Tableau 6. Température de dénaturation des différentes préparations de collagènes.

Tableau 7. Identification des bandes présentes sur les spectres Raman des collagènes témoin et carbamylé 24h.

Tableau 8. Mesure de l'hélicité du collagène par polarimétrie.

Tableau 9. Détermination par chimiluminescence de l'effet de la carbamylation du collagène sur l'activation des polynucléaires neutrophiles.

Tableau 10. Dosage des endotoxines dans les différentes préparations de collagène.

Tableau 11. Effet du collagène carbamylé sur la viabilité des polynucléaires neutrophiles.

Tableau 12. Effet de l'acide 6-amino-hexanoïque sur la viabilité des polynucléaires neutrophiles.

Tableau 13. Evaluation par chimiluminescence de l'activation des polynucléaires neutrophiles par les peptides α_1 CB6 recombinants.

LISTE DES ABREVIATIONS

3Hyp	3-L-trans-hydroxyproline
4Hyp	4-L-trans-hydroxyproline
AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AHA	Acide 6-amino-hexanoïque
APMA	Acide phényl-mercuriacétique
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
C2h	Collagène carbamylé 2h
C6h	Collagène carbamylé 6h
C24h	Collagène carbamylé 24h
C-AA	α -carbamyl-acide aminé
CB-peptide	Peptide obtenu après dégradation du collagène par le CNBr
cf	Confère
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CNBr	Bromure de cyanogène
cpm	Coup par minute
Da, kDa	Dalton, kiloDalton
DC	Dichroïsme circulaire
DDR1	« Discoidin Domain Receptor 1 »
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphate
DTT	1,4-dithiothréitol
EDTA	Acide Ethylene-diamine-tetraacétique
<i>et al.</i>	Et autres (<i>et alii</i>)
GPI	Glycosylphosphatidyl inositol
GST	Glutathion-S-transférerase

h, min, s	heure, minute, seconde
Hb	Hémoglobine
HEPES	Acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthane sulfonique
HMW	Marqueurs de haute masse moléculaire
<i>i.e.</i>	C'est-à-dire (<i>Id est</i>)
IEF	Isoélectrofocalisation
IPG	Gradient de pH immobilisé
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
IRA	Insuffisance rénale aiguë
IRC	Insuffisance rénale chronique
LB	Milieu de culture « Luria Bertani »
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LPS	Lipopolysaccharide
M, mM, μM, nM	Mol/L, mmol/L, μmol/L, nmol/L
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MT-MMP	Métalloprotéinase matricielle de type membranaire
NADPH	Nicotinamide dinucléotide phosphate
NBT	Bleu de Nitrotétrazolium
NS	Non significatif
pb	Paires de bases
PBS	Phosphate buffered Saline (tampon phosphate + NaCl)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
pHi	Point isoélectrique
PMSF	Phénylméthylsulfonylfluorure
PNN	Polynucléaire neutrophile
psi	Livres par pouce carré (« pounds per square inch »)
PVDF	Difluorure de polyvinylidène
RLO	Radicaux libres oxygénés
RT	Transcription inverse
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	« Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis » (Electrophorèse de polyacrylamide en présence de SDS)

T	Collagène témoin
TEMED	N, N, N', N'-tetraméthyléthylènediamine
TIMP	Inhibiteur de métalloprotéinase de type tissulaire
tpm	Tour par minute
U	Unités d'activité enzymatique
u.a.	Unités arbitraires

Chapitre I

INTRODUCTION

I.1. SITUATION DU SUJET

La survie de la plupart des cellules de l'organisme est dépendante de leur adhésion à un support, quel qu'il soit. Au sein des tissus, ce rôle est tenu par la matrice extracellulaire qui assure ainsi leur cohésion structurale. Il est désormais acquis qu'en dehors de ce rôle architectural, les constituants de la matrice extracellulaire interviennent dans la régulation des fonctions cellulaires et, par ce biais, peuvent être responsables de multiples pathologies impliquant des dysrégulations de l'homéostasie cellulaire. Dans le but d'élucider les mécanismes impliqués dans ces processus de régulation, les composants de la matrice extracellulaire ont fait l'objet de nombreuses investigations qui ont permis de définir l'influence des interactions cellules-matrice sur le comportement cellulaire. Néanmoins, la plupart des études réalisées portent sur des protéines natives et/ou accordent peu d'importance à l'évolution des protéines au cours de leur vie biologique au sein des organismes vivants. En effet, dans tous les processus physiopathologiques, les protéines sont la cible de modifications post-traductionnelles tardives, caractérisées par la fixation non enzymatique de métabolites simples sur les groupements réactifs des chaînes latérales des acides aminés. Cette fixation peut conduire à une altération de la structure accompagnée d'une perte de fonction des protéines concernées.

Au cours de l'insuffisance rénale chronique, pathologie qui se définit par la diminution progressive et irréversible des fonctions rénales, divers métabolites, dont l'urée, s'accumulent dans le compartiment sanguin par défaut d'élimination rénale. Cette pathologie constitue donc un contexte favorable à ce type de modification post-traductionnelle. En effet, l'urée peut se décomposer en un dérivé très réactif, le cyanate, capable de se fixer sur n'importe quelle cible protéique, par la réaction dite de carbamylation. Malgré son impact potentiel, cette modification post-traductionnelle ne figure généralement pas parmi les complications métaboliques caractéristiques de l'insuffisance rénale chronique. Toutefois, elle doit être considérée pour sa contribution possible au développement des complications classiquement retrouvées, comme les troubles cardiovasculaires ou les infections répétées, qui constituent les causes majeures de décès des patients urémiques.

Chez le sujet sain, lors du processus infectieux, les polynucléaires neutrophiles constituent le premier rempart dans la lutte anti-bactérienne. Pour atteindre le foyer de l'infection et ainsi exercer leur rôle, les polynucléaires neutrophiles doivent traverser l'endothélium vasculaire puis interagir avec les constituants de la matrice extracellulaire sous-jacente. Parmi ceux-ci, le collagène de type I a été décrit comme étant capable de moduler les propriétés bactéricides de ces cellules.

Dans le cas des patients urémiques, des modifications des interactions entre matrice extracellulaire et polynucléaires neutrophiles pourraient participer à la survenue répétée d'infections. Dans cette hypothèse, les modifications post-traductionnelles citées précédemment pourraient ainsi contribuer à la dysrégulation des fonctions des polynucléaires via la modification des protéines matricielles.

Tous ces éléments nous ont amenés à évaluer l'impact de la carbamylation sur les propriétés structurales du collagène de type I, mais également sur les interactions entre collagène de type I et polynucléaires neutrophiles humains, afin de définir l'importance potentielle de ce phénomène *in vivo*, dans la dysrégulation des processus inflammatoires et infectieux observés au cours de l'insuffisance rénale chronique.

I.2. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

La matrice extracellulaire est la composante acellulaire du tissu conjonctif utilisée comme support par les cellules pour leur attachement et leur migration. Elle contribue au maintien de l'intégrité structurale des tissus et leur confère leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques. Des variations dans la proportion et l'organisation de ses différents constituants peuvent ainsi considérablement modifier les propriétés mécaniques du tissu : la peau et les vaisseaux sont élastiques en raison de leur richesse en fibres élastiques alors que l'os est rigide et incompressible de par la prépondérance de sa composante collagénique. La biosynthèse des constituants de la matrice extracellulaire est assurée par les cellules mésenchymateuses (fibroblastes, ostéoblastes, chondrocytes), qui sont chargées également de leur renouvellement [Rosso *et al.*, 2004]. Les anomalies de synthèse sont associées à de multiples pathologies affectant la majorité des tissus (fibroses, cicatrisation, vieillissement) [Labat-Robert, 2004].

Outre sa fonction de soutien mécanique, la matrice extracellulaire permet la régulation des fonctions cellulaires. Elle peut être par conséquent à l'origine des dérives de l'homéostasie cellulaire telles que l'apoptose, la différenciation ou la transformation maligne. La matrice extracellulaire est également le site de déploiement des systèmes de défense cellulaire.

I.2.1. Composition de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est constituée de quatre grandes classes de protéines possédant des propriétés très variées : l'élastine, les protéoglycannes, les glycoprotéines de structure et les collagènes. Chaque protéine exerce une fonction particulière et la combinaison de toutes ces protéines assure à la matrice extracellulaire des propriétés structurales diversifiées ainsi qu'une importante capacité de régulation de l'activité cellulaire [Bosman et Stamenkovic, 2003]. Par ailleurs, des fragments protéiques issus de la dégradation des macromolécules de la matrice extracellulaire, autrement appelés « **matricryptines** » ou encore « **matrikines** », sont également dotés d'activités régulatrices souvent différentes de celles exercées par la protéine dont ils sont issus [Davis *et al.*, 2000 ; Maquart *et al.*, 2005].

Nous aborderont uniquement les quatre grandes classes de protéines de la matrice extracellulaire en développant tout particulièrement les collagènes.

- **L'élastine**

L'élastine est un élément de la matrice extracellulaire qui, associé à une composante microfibrillaire constituée principalement de glycoprotéines, comme les fibrillines et les « Microfibril-Associated Glycoproteins » (MAGP), forme les fibres élastiques [Kielty *et al.*, 2002]. Ce polymère insoluble formé à partir d'un précurseur soluble, la tropoélastine, est synthétisé par les cellules mésenchymateuses [Rosenbloom *et al.*, 1993]. Les fibres élastiques, composées à 95 % d'élastine, assurent les propriétés de souplesse et d'élasticité de tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques tels que les artères, les poumons ou la peau. Par ailleurs, les peptides issus de la dégradation de l'élastine possèdent de multiples activités biologiques, comme un pouvoir chimiotactique sur les cellules phagocytaires, la régulation de la prolifération de nombreux types cellulaires ou encore la stimulation de l'angiogenèse *in vitro* [Duca *et al.*, 2004 ; Robinet *et al.*, 2005].

- **Les protéoglycannes**

Les protéoglycannes sont des macromolécules complexes de grande taille, constituées d'une chaîne polypeptidique appelée cœur protéique sur lequel sont greffées des chaînes de glycosaminoglycannes formées de résidus osidiques plus ou moins sulfatés. Les protéoglycannes peuvent être sécrétés, comme le perlecane et la décorine, ou membranaires comme le syndécanne. Les variations dans la composition des chaînes de glycosaminoglycannes et du cœur protéique sont à l'origine de fonctions biologiques très variées [Prydz et Dalen, 2000 ; Yoon et Halper, 2005]. Plus généralement, grâce aux fonctions acides de leurs chaînes de glycosaminoglycannes, les protéoglycannes peuvent piéger de l'eau, des cations ou divers métabolites et contribuent ainsi à l'hydratation des tissus [Iozzo, 2000]. Ils participent également à la cohésion de la matrice extracellulaire et à son organisation. Par exemple, la décorine intervient dans la régulation du diamètre des fibres de collagène [Ameye et Young, 2002 ; Keene *et al.*, 2000 ; Reed et Iozzo, 2002].

Les protéoglycannes sont par ailleurs capables de séquestrer et de relarguer séquentiellement des facteurs de croissance, agissant donc directement sur des comportements cellulaires tels que la migration, la prolifération ou la différenciation [Schlessinger *et al.*, 1995 ; Schonherr et Hausser, 2000 ; Villena et Brandan, 2004].

- **Les glycoprotéines de structure**

Les glycoprotéines de structure de la matrice extracellulaire possèdent des structures et des propriétés fonctionnelles très diverses. Le point commun de ces protéines est de comporter des motifs structuraux caractéristiques qui leur confèrent différentes fonctions. Les glycoprotéines les plus connues sont la fibronectine, les ténascines, la vitronectine ou encore les thrombospondines. Ces protéines spécifiques participent aux interactions matrice-matrice ou cellules-matrice, ce qui leur vaut également le nom de glycoprotéines d'adhérence. Elles sont par conséquent impliquées dans les phénomènes de migration et d'adhésion cellulaire [Johansson, 1996]. Comme pour les autres protéines de la matrice extracellulaire, plusieurs matrikines issues de cette classe de protéines matricielles ont été identifiées pour leurs activités biologiques et leur pouvoir de régulation des fonctions cellulaires [Maquart *et al.*, 2005].

- **Les collagènes**

Les protéines appartenant à la famille des collagènes sont les plus abondantes de l'organisme humain (25 à 30 % des protéines totales). Selon les tissus, elles peuvent représenter jusqu'à 80 % des protéines de la matrice extracellulaire et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité structurale des tissus et organes chez l'homme [Ricard-Blum et Ruggiero, 2005].

Le terme de collagène est attribué à toute protéine de la matrice extracellulaire présentant au sein de sa structure un ou plusieurs **domaines en triple hélice**. Cette structure particulière est issue de l'enroulement autour d'un même axe de trois chaînes polypeptidiques appelées **chaînes α** . Ces chaînes sont constituées, dans la partie hélicoïdale, d'une succession de triplets d'acides aminés (**Gly-X-Y**)_n où X et Y sont respectivement la proline (40 % des cas) et la 4-L-trans-hydroxyproline (4Hyp, 10 % des cas). Ce triplet est responsable de l'organisation en triple hélice. En effet, comme, dans ce type de structure, un acide aminé se trouve régulièrement au centre de l'hélice, seul le résidu glycine, dépourvu de chaîne latérale, peut occuper cette position (figure 1). La prépondérance des résidus prolines et hydroxyprolines confère à la triple hélice une rigidité caractéristique. Enfin, les groupements hydroxyles des résidus d'hydroxyproline participent à la formation de très nombreuses liaisons hydrogènes qui permettent de stabiliser l'ensemble de la structure [Kielty et Grant, 2002].

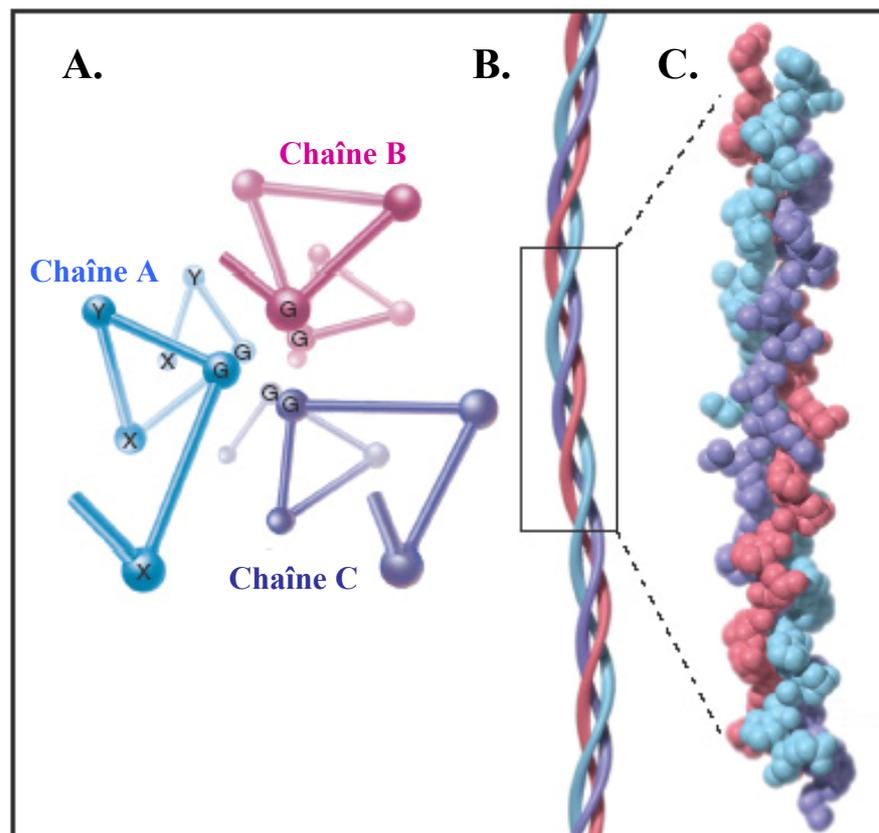


Figure 1. La triple hélice de collagène (D'après Pollard et Earnshaw, 2004).

(A) : Vue axiale de trois hélices gauches de type polyproline II centrées par des molécules de glycine (G). (B) : Représentation schématique longitudinale d'une triple hélice de collagène. (C) : Modèle tridimensionnel de la structure d'une triple hélice courte de collagène.

Les collagènes fibrillaires, comme le collagène de type I, sont organisés dans la quasi totalité de leur structure sous forme de triple hélice (zone « **collagénique** »), alors que d'autres collagènes présentent une alternance de ce motif avec d'autres zones appelées « **non collagéniques** ».

En 2005, 27 types de collagènes, numérotés de I à XXVII, ont été répertoriés et sont constitués de 42 chaînes distinctes notées $\alpha_x(X)$ (où x permet de différencier les chaînes α d'un même type de collagène et X désigne le type de collagène). Parallèlement, 20 autres protéines considérées comme non collagéniques mais possédant des domaines en triple hélice ont été identifiées [Myllyharju et Kivirikko, 2004]. Les collagènes ont été classés en différents groupes selon leur structure et leur fonction (figure 2).

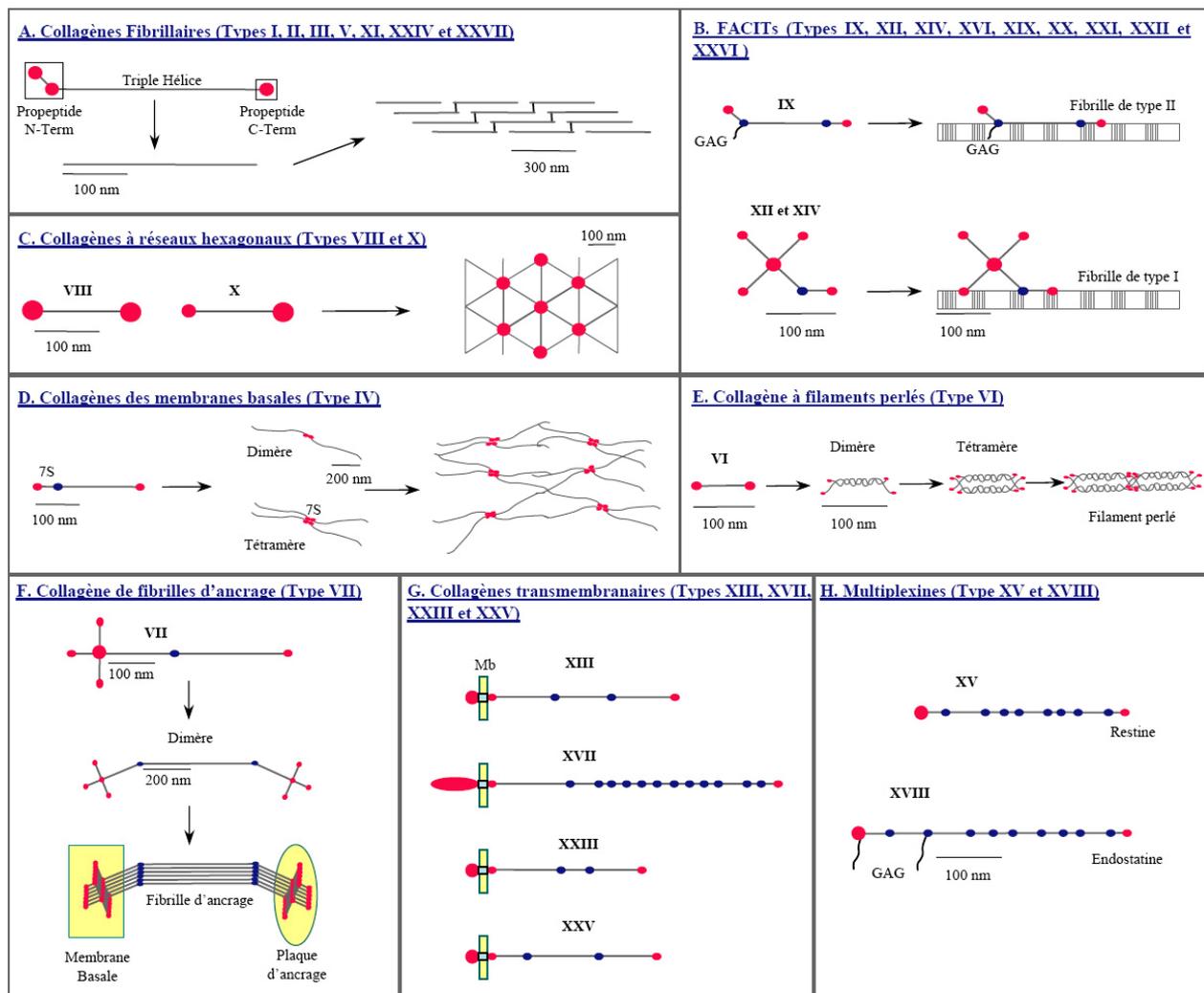


Figure 2. Représentation de l'assemblage supramoléculaire des membres de la famille des collagènes (Reproduit d'après Myllyharju et Kivirikko, 2004).

Les 27 types de collagènes sont classés en 8 groupes selon leur structure, leur fonction ou leur assemblage supramoléculaire. Sur cette figure, les propriétés structurales permettant la distinction des différents groupes sont mises en évidence par la représentation des zones collagéniques (traits gris) et des zones globulaires (points rouges et bleus). *Abréviations* : FACIT : « Fibril associated collagens with interrupted triple helix » ; GAG : chaînes de glycosaminoglycannes ; Mb : membrane plasmique ; Multiplexines : « Multiple triple helix domains and interruptions » .

Notre travail ayant pour but d'étudier l'interaction entre polynucléaires neutrophiles humains et collagène de type I modifié, nous nous attacherons à décrire plus particulièrement la structure et le métabolisme de ce collagène fibrillaire.

I.2.2. Le collagène de type I

I.2.2.1. Structure du collagène de type I

La molécule élémentaire de collagène de type I forme une structure cylindrique de 300 nm de long pour un diamètre de 1,4 nm. Cette entité est la résultante de l'association de deux chaînes $\alpha_1(I)$ et d'une chaîne $\alpha_2(I)$; sa formule moléculaire est donc notée : $[(\alpha_1(I))_2 \alpha_2(I)]$. Le collagène de type I existe également sous la forme d'un homotrimère $[(\alpha_1(I))_3]$ [Uitto, 1979]. Chaque chaîne s'organise en une hélice gauche de trois résidus par tour autrement appelée **hélice de type polyproline II** [Engel et Bachinger, 2005]. L'association des trois chaînes mène à la formation d'une superhélice droite de période 10 nm, soit 12 acides aminés par tour. Les chaînes α_1 et α_2 sont constituées chacune d'environ 1000 acides aminés pour une masse moléculaire approximative de 95 kDa [Ricard-Blum *et al.*, 2005].

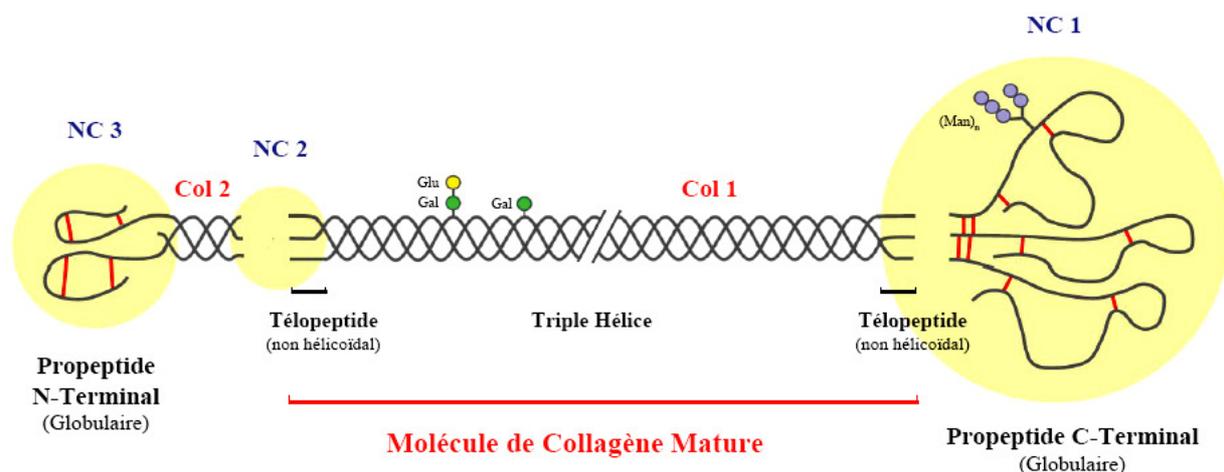


Figure 3. Représentation des domaines du procollagène de type I (Reproduit d'après Gelse *et al.*, 2003).

Le collagène I possède une structure exclusivement en triple hélice après clivage des propeptides N- et C-terminaux au cours de sa maturation. Il existe au sein de la triple hélice deux sites de glycosylation. La numérotation des zones collagéniques (Col) et des zones non collagéniques globulaires (NC) se fait à partir de l'extrémité C-terminale, contrairement à la numérotation habituelle des acides aminés d'une chaîne polypeptidique. *Abréviations* : Glu : glucose ; Gal : galactose ; Man : mannose.

Les chaînes α sont synthétisées sous la forme de longs précurseurs, appelés pro-chaînes α dont l'association permet la formation du **procollagène**. Ces précurseurs possèdent des zones

globulaires (ou **propeptides**) en position N- et C-terminale qui sont éliminées lors de la maturation (figure 3). La molécule de collagène mature obtenue possède une structure exclusivement en triple hélice flanquée à ses extrémités de deux régions non hélicoïdales d'environ vingt acides aminés, appelés **télopeptides** [Gelse *et al.*, 2003].

I.2.2.2. Biosynthèse du collagène de type I

Le collagène de type I est synthétisé et sécrété par les cellules mésenchymateuses. Cette biosynthèse, schématisée sur la figure 4, se distingue par le nombre élevé d'étapes de maturation de la protéine en vue de son assemblage dans la matrice extracellulaire. Ces modifications post-traductionnelles peuvent être divisées en deux groupes : les étapes intracellulaires aboutissant à la formation du procollagène et les étapes extracellulaires permettant l'assemblage des fibres de collagène.

a) Etapes intracellulaires

Le préprocollagène de type I est synthétisé à partir de la transcription des gènes nommés **COL1A1** et **COL1A2** (COL pour collagène, le premier nombre pour le type de collagène et AX pour la chaîne α correspondante). Ces gènes sont constitués d'un nombre important d'introns, séparant des exons, composé de multiples répétitions de 54 pb codant chacune une séquence de 18 acides aminés (AA), soit six triplets Gly-X-Y ou six tours d'une hélice de type polyproline II. Après l'épissage des transcrits d'introns, les ARN messagers matures sortent du noyau et s'associent aux ribosomes. Ils sont ensuite transloqués au sein du réticulum endoplasmique rugueux pour le début de la traduction.

La maturation intracellulaire débute par le clivage de la séquence signal par une signal peptidase. Le préprocollagène est alors transformé en procollagène constitué de chaînes α non repliées avec les propeptides non hélicoïdaux aux extrémités N- et C-terminales. Ce clivage est suivi de modifications co-traductionnelles, dont la plus caractéristique est l'hydroxylation de certains résidus de proline et de lysine. Les résidus hydroxyproline et hydroxylysine sont des AA caractéristiques et indispensables pour la molécule de collagène puisqu'ils participent à la stabilisation de la triple hélice par formation de liaisons hydrogènes. Selon les espèces, l'hydroxylation peut concerner jusqu'à 15 % des AA de la molécule de collagène [Gelse *et al.*, 2003]. Cette réaction est catalysée par trois groupes d'enzymes distinctes : plusieurs isoformes de **prolyl-4-hydroxylases** et de **prolyl-3-hydroxylases** ainsi que trois isoformes de **lysyl-**

hydroxylases [Myllyharju et Kivirikko, 2004]. L'activité de ces enzymes est dépendante de la présence cofacteurs comme les ions Fe^{2+} , le 2-cétoglutarate, l'oxygène moléculaire et l'acide ascorbique [Kivirikko et Myllylä, 1982].

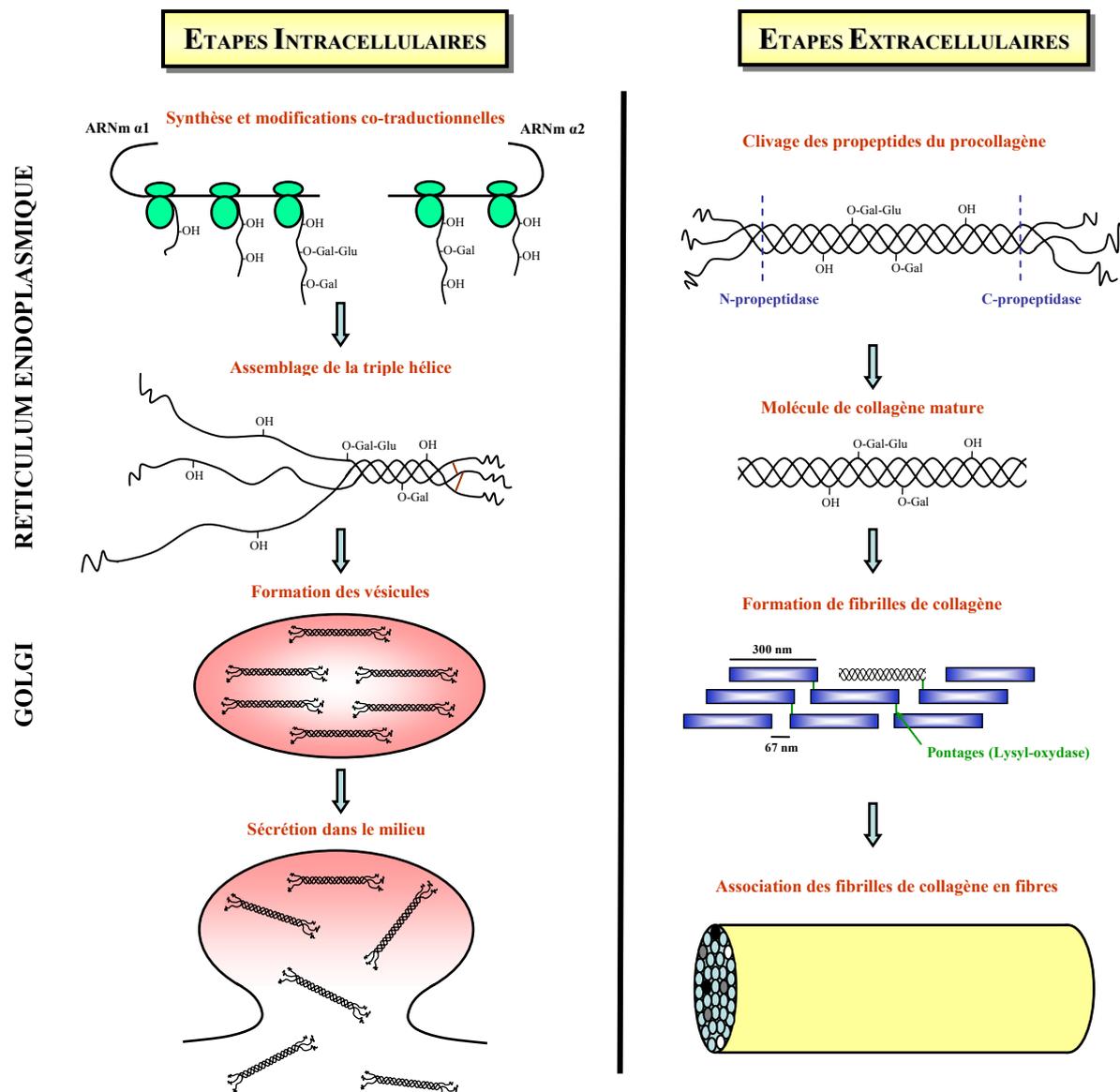


Figure 4. Biosynthèse du collagène de type I (Reproduit d'après Le Blay *et al.*, 1996).

Les pro-chaînes α de la molécule de procollagène sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique. Après hydroxylation de certains résidus de proline et de lysine, l'enroulement des 3 chaînes α débute par leur extrémité C-terminale. Les molécules de procollagène formées migrent vers l'appareil de Golgi pour être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Le collagène mature est généré par clivage des propeptides N- et C-terminaux par des endopeptidases spécifiques, puis les molécules de collagène s'organisent pour former des fibrilles de collagène. *Abréviations* : Glu : glucose ; Gal : galactose.

La prolyl 4-hydroxylase (P4H, procollagène proline 2-oxoglutarate 4-dioxygénase) est une enzyme localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique qui catalyse l'hydroxylation sur le carbone 4 des résidus de proline appartenant à la séquence consensus X-Pro-Gly [Myllyharju, 2003]. La fonction essentielle des résidus de **4-hydroxyproline** (4Hyp) dans la stabilisation de la triple hélice fait de la P4H une enzyme clé de la biosynthèse du collagène. La prolyl-3-hydroxylase (P3H, procollagène proline 2-oxoglutarate 3-dioxygénase) possède une spécificité stricte de substrat puisqu'elle catalyse l'hydroxylation sur le carbone 3 des résidus de proline uniquement lorsqu'ils se trouvent dans la séquence Pro-4Hyp-Gly. La **3-hydroxyproline** (3Hyp) est peu représentée au sein de la molécule de collagène de type I (un seul résidu 3Hyp par chaîne α) et sa fonction reste encore mal connue. Enfin, la lysyl hydroxylase (PLOD1, procollagène lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygénase) reconnaît la séquence X-Lys-Gly pour hydroxyler la lysine et former la **5-hydroxylysine**. Certains résidus d'hydroxylysine sont nécessaires à la formation de liaisons croisées entre molécules de collagène alors que d'autres sont utilisés comme sites de glycosylation [Kielty et Grant, 2002].

La glycosylation de type O-glycosidique de ces résidus est catalysée par deux enzymes spécifiques : **l'UDP-galactosyl hydroxylysine transférase** et **l'UDP-glucosyl galactosyl hydroxylysine transférase**. La première permet l'addition de galactose sur des résidus d'hydroxylysine générant des galactosylhydroxylysines alors que la seconde ajoute du glucose sur les résidus néoformés de galactosylhydroxylysines. Des liaisons de type N-glycosidiques se forment sur les propeptides mais sont éliminées au cours de la maturation. Le collagène de type I ne contient donc que deux groupements osidiques fixés aux hydroxylysines : galactose et glucosylgalactose. La fonction exacte de ces groupements osidiques n'est pas bien définie d'autant que, pour un même collagène, le taux de glycosylation est variable selon son origine tissulaire. Cependant, il semblerait que ces groupements interviennent dans l'assemblage des molécules de collagène ainsi que dans la régulation du diamètre des fibres [Kielty et Grant, 2002].

Ces étapes d'hydroxylation et de glycosylation sont suivies par le repliement du collagène dans le réticulum endoplasmique. Ce mécanisme débute par l'association des propeptides de l'extrémité C-terminale de trois chaînes α aboutissant à la formation d'une structure globulaire stabilisée par des résidus cystéine réunis par des ponts disulfure. La formation de ces ponts est catalysée par une enzyme appelée **protéine disulfure isomérase**. Ce domaine globulaire permet d'assurer la sélection adéquate des chaînes α (deux chaînes α_1 et une chaîne α_2) ainsi que l'alignement des premières séquences répétitives Gly-X-Y permettant

l'association en triple hélice des trois chaînes. Suite à la formation de ce domaine globulaire, les chaînes α de procollagène s'enroulent les unes autour des autres à partir de l'extrémité C-terminale comme une fermeture éclair. Cette étape d'assemblage de la triple hélice fait intervenir des protéines chaperones telles que HSP47 (« Heat shock protein » ou protéine du choc thermique) qui participent au repliement de la protéine et empêchent également les phénomènes d'agrégation [Pollard et Earnshaw, 2004].

Ensuite, les molécules de procollagène sortent du réticulum endoplasmique rugueux et migrent vers l'appareil de Golgi, où elles poursuivent leur maturation avant d'être regroupées dans des vésicules d'exocytose puis sécrétées dans le milieu extracellulaire.

b) Etapes extracellulaires

Dans le milieu extracellulaire, les propeptides N- et C-terminaux sont clivés par des endopeptidases spécifiques appelées respectivement **N- et C-propeptidases**. Cette étape qui permet la conversion de procollagène en collagène, est indispensable pour l'assemblage ultérieur des molécules de collagène entre elles. En effet, les propeptides ont été décrits comme inhibiteurs de la fibrillogenèse *in vitro* et empêcheraient donc une éventuelle fibrillogenèse intracellulaire [Fleischmajer *et al.*, 1987].

Dépourvues de leurs propeptides, les molécules de collagène matures vont s'assembler sous forme de fibrilles de collagène. Selon les modèles établis *in vitro*, la fibrille de collagène résulte de l'association de 6 molécules de collagène disposées parallèlement les unes par rapport aux autres avec un décalage de 67 nm (soit un quart de leur longueur). Les liaisons faibles de type hydrogène entre les molécules de collagène permettent l'auto-assemblage des fibrilles mais ne confèrent pas une résistance suffisante aux contraintes mécaniques d'un tissu, si bien que cette structure est renforcée par des liaisons covalentes. Leur formation est effectuée par une enzyme de la famille des **lysyl-oxydases** (ou protéine lysine 6-oxydase, cinq isoformes) qui catalyse la désamination oxydative de certains résidus de lysine ou d'hydroxylysine (figure 4) [Molnar *et al.*, 2003 ; Ricard-Blum *et Ville*, 1989]. Ces aldéhydes (l'allysine et l'hydroxyallysine) réagissent spontanément avec les chaînes latérales de résidus de lysine ou d'hydroxylysine de molécules de collagène adjacentes pour former des structures à noyaux pyridinium ou pyrrole [Eyre *et Wu*, 2005 ; Kagan *et Li*, 2003].

Cet arrangement caractéristique est à l'origine de l'aspect strié des fibres de collagènes fibrillaires observé en microscopie électronique à transmission (figure 5).

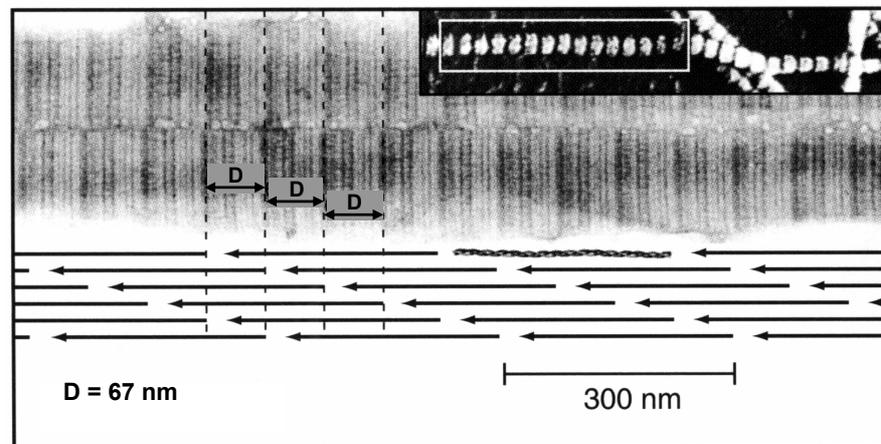


Figure 5. Fibrille de collagène en microscopie électronique à transmission (D'après Pollard et Earnshaw, 2004).

Aspect strié d'une fibrille de collagène de type I en microscopie électronique à transmission et schéma de l'assemblage supramoléculaire. D représente le décalage entre deux molécules de collagène adjacentes.

Les différentes fibrilles formées peuvent s'associer entre elles et à d'autres protéines comme les protéoglycannes pour former une entité supramoléculaire appelée **fibre de collagène** (figure 6). C'est ainsi que plusieurs types de collagène peuvent être représentés au sein d'une même fibre, et la proportion des différents types de collagènes au sein de la fibre est à l'origine de la spécificité de ses propriétés mécaniques [Kielty et Grant, 2002]. La formation de la fibre de collagène n'est pas issue d'une simple condensation des fibrilles. En effet, le processus d'agencement des fibrilles est relativement complexe. Par exemple, le diamètre de la fibre est finement contrôlé par des protéoglycannes comme la décorine, qui entourent les fibrilles de collagène, pour les associer ensuite aux autres molécules du tissu conjonctif. Le mécanisme n'est pas totalement éclairci, car quelques aspects de la genèse de la fibre sont encore à définir, comme le mécanisme d'arrangement des fibrilles de différents types de collagène les unes par rapport aux autres, ainsi que le contrôle de leurs proportions respectives.

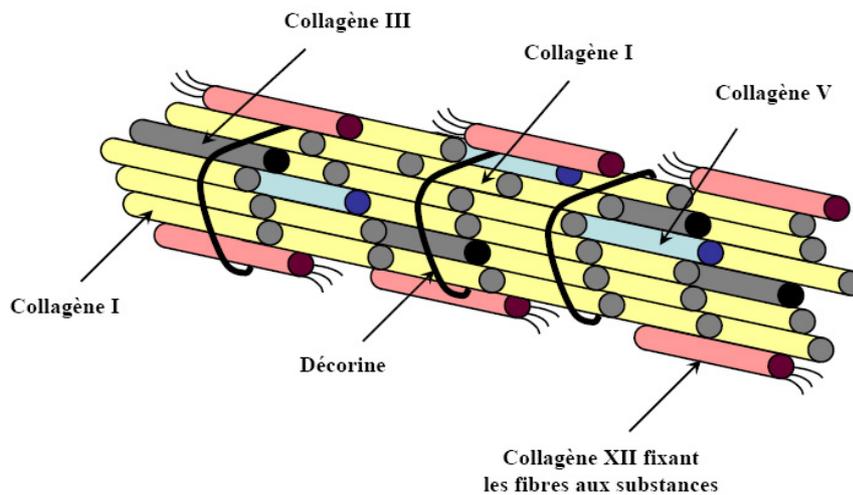


Figure 6. Schéma d'une fibre de collagène (Reproduit d'après Borel *et al.*, 1997).

Une fibre de collagène est la résultante de l'association de fibrilles de divers types de collagène, étroitement liées à des protéoglycannes qui interviennent directement dans la régulation du diamètre de la fibre. La proportion des différents constituants matriciels représentés au sein de la fibre lui confère ses propriétés mécaniques spécifiques.

c) Régulation de la biosynthèse du collagène de type I

Ce processus de biosynthèse long et complexe fait l'objet d'une régulation très fine impliquant de nombreux facteurs capables d'agir au niveau transcriptionnel, traductionnel ou par d'autres mécanismes (tableau 1). En dehors de ces différents facteurs, le processus de biosynthèse est également soumis à un rétrocontrôle exercé directement par la molécule de collagène. En effet, la culture de fibroblastes en matrice tridimensionnelle de collagène (ou lattis) entraîne une inhibition de la transcription des gènes de collagène de type I, ce qui n'est pas le cas lors des cultures en modèle bidimensionnel [Gillery *et al.*, 1992]. Un rôle inhibiteur de la transcription a également été attribué aux propeptides N- et C-terminaux libérés lors de la conversion du procollagène en collagène [Pinnel, 1982].

	Niveau Transcriptionnel	Niveau Traductionnel	Autres Mécanismes
Activateurs	Vitamine C TGF- β IGF-1 Glutamine Acétaldéhyde 5-azacytidine	Lactate Pyruvate	EGF GABA NH ₄ OH Terpénoïdes Alcaloïde du betel Phénytoïne Bléomycine Histamine
Inhibiteurs	TNF- α Interférons PGE2 $\alpha\beta\gamma$ Glucocorticoïdes Hormone parathyroïdienne Dihydrocalciférol Acide rétinolique Propeptides N et C-terminaux Transformation virale	Interleukine-1	AMP-cyclique Glucose (fortes concentrations) Héparine Protamine Acide anthranilique Adriamycine Pénicilline

Tableau 1. Facteurs capables de réguler la biosynthèse du collagène de type I (d'après Borel, 1993 et Ghosh, 2002).

Ce tableau regroupe les agents activateurs ou inhibiteurs de la biosynthèse du collagène de type I agissant au niveau transcriptionnel, traductionnel ou par le biais de mécanismes encore inconnus. *Abréviations* : TGF- β : « Transforming Growth Factor- β » ; IGF-1 : « Insulin like Factor-1 » ; TNF- α : « Tumor Necrosis Factor α » ; PGE2 : Prostaglandine E2 ; EGF : « Epithelial Growth Factor » ; GABA : « gamma aminobutyric acid ».

I.2.2.3. Distribution tissulaire

Le collagène de type I, le plus abondant des collagènes, est représenté au sein de la quasi totalité des tissus de l'organisme, associé à d'autres types de collagène. Comme nous l'avons mentionné précédemment (§ I.2.2.2b), la variabilité concernant la composante collagénique d'un tissu est impliquée dans la spécificité de ses propriétés mécaniques. Ainsi, dans certains tissus, comme les os et les tendons, parmi tous les types de collagène, seul le type I est représenté (plus de 99 % de la totalité des collagènes) [Bateman *et al.*, 1986 ; Tsuzaki *et al.*, 1993]. Dans d'autres tissus, comme la peau, la cornée ou les vaisseaux, il est présent en plus faible proportion mais reste néanmoins le collagène majeur, où il représente respectivement 85 %, 89 % et 60 % de la composante collagénique [Borel et Bellon, 1985 ; Lee et Davison, 1984 ; Smith *et al.*, 1986].

D'une manière générale, il est présent dans tous les tissus conjonctifs interstitiels, en dehors de quelques exceptions comme le cerveau ou le corps vitreux [Gelse *et al.*, 2003].

I.2.2.4. Modifications post-traductionnelles tardives du collagène de type I

Après leur synthèse, les protéines subissent, au cours de leur vie biologique, des modifications **post-traductionnelles tardives** caractérisées par la formation non enzymatique d'adduits, qui altèrent leurs propriétés structurales et fonctionnelles. Lorsque des études sur les propriétés des protéines sont menées *in vitro*, ce phénomène de « **vieillessement** » n'est pas suffisamment pris en compte malgré son importance *in vivo*. En effet, les protéines vont rencontrer dès le début de leur vie biologique de nombreux métabolites capables d'interagir avec elles. Ce phénomène peut donc intervenir en dehors de tout contexte pathologique, comme par exemple au cours du vieillissement physiologique. Cependant, certaines pathologies métaboliques peuvent favoriser ce type de modifications post-traductionnelles. Par exemple, au cours du diabète sucré, qui se caractérise par une élévation de la glycémie, le glucose interagit avec les protéines environnantes, c'est la réaction de **glycation**. Sa fixation s'accompagne de processus oxydatifs entraînant la formation de composés carbonylés (aldéhydes ou cétones), intermédiaires réactifs qui génèrent par la suite des produits avancés de glycation (ou AGE pour « Advanced Glycation End Products ») conduisant à l'altération des protéines concernées. Une autre modification post-traductionnelle a été mise en évidence plus récemment, la **carbamylation**, qui intervient au cours de l'insuffisance rénale chronique. Cette réaction consiste en la fixation d'un dérivé réactif de l'urée, dont les concentrations sériques sont plus élevées chez le patient urémique, sur les protéines, selon un processus comparable à celui de la glycation. Nous développerons plus particulièrement cette réaction de carbamylation par la suite (§ I.4.2).

L'importance de ces modifications post-traductionnelles *in vivo* provient de leur caractère **cumulatif**. En effet, la fixation des métabolites sur les protéines est généralement **irréversible**, si bien que, pour une même protéine, les modifications peuvent s'amplifier au cours du temps et ainsi conduire progressivement à l'altération des fonctions de la protéine. La fréquence des modifications post-traductionnelles est dépendante de plusieurs facteurs tels que la **concentration** du métabolite susceptible de se fixer (augmentée dans certaines situations pathologiques) ou la **durée de vie** de la protéine (l'exposition de la protéine étant corrélée à sa demi-vie).

Comme la plupart des protéines de la matrice extracellulaire, le collagène de type I possède une demi-vie relativement longue estimée à 15 ans [Verzijl *et al.*, 2000]. Son renouvellement au sein du tissu conjonctif est régi par un équilibre fin entre processus de synthèse et de dégradation. Des variations modérées de cet équilibre surviennent fréquemment, mais sont généralement rapidement compensées, comme par exemple au cours des phénomènes de réparation tissulaire. Cependant, un déséquilibre plus important, non contrôlé, peut entraîner le développement de pathologies telles que la fibrose dans le cas d'une augmentation de synthèse ou au contraire à des dégradations tissulaires.

Les modifications post-traductionnelles tardives peuvent interférer avec cet équilibre et perturber le renouvellement équilibré du collagène au sein de la matrice extracellulaire. En effet, le collagène se comporte alors différemment vis à vis des mécanismes de dégradation, ce qui suffit à déstabiliser l'équilibre physiologique et à entraîner le développement de manifestations pathologiques liées à des anomalies de renouvellement des protéines de la matrice extracellulaire. D'autre part, ces modifications peuvent perturber les interactions entre le collagène et les cellules environnantes, et ainsi engendrer une dysrégulation des fonctions cellulaires.

I.2.2.5. Caractéristiques physico-chimiques du collagène de type I

Le collagène de type I possède plusieurs particularités physico-chimiques remarquables. Tout d'abord, sa structure fibrillaire le différencie de la plupart des protéines de l'organisme qui possèdent généralement une structure globulaire. Cette particularité lui permet de former des assemblages supramoléculaires, selon un processus d'assemblage caractéristique des collagènes fibrillaires appelé « **fibrillogenèse** ». La formation de fibrilles n'est effective que si des conditions de pH et température sont réunies [Wood et Keech, 1960]. Ainsi, la température doit être supérieure à 20°C et le pH proche des valeurs physiologiques. Cette particularité est utilisée *in vitro* pour réaliser des matrices tridimensionnelles de collagène fibrillaire (appelées lattis) et étudier le comportement cellulaire dans un environnement plus physiologique que les modèles traditionnels de culture bidimensionnelle [Bell *et al.*, 1979 ; Gillery *et al.*, 1986]. En revanche, le collagène est soluble à 4°C et à pH acide, d'où son nom de collagène acido-soluble. C'est pourquoi, les méthodes conventionnelles d'extraction des collagènes fibrillaires présentent toutes une étape d'extraction en milieu acide et à froid [Kielty et Grant, 2002]. Enfin, le collagène de type I est transformé en **gélatine** après dénaturation, notamment par chauffage.

Une autre caractéristique du collagène, utilisée au cours de notre travail expérimental, est liée à sa structure en triple hélice, qui lui confère une résistance à l'activité de certaines protéinases non spécifiques comme la pepsine. Cependant, celle-ci ne s'exprime que dans des conditions bien définies de température, de pH et de rapport enzyme/substrat. Dans ces conditions, seuls les télopeptides du collagène sont clivés, la triple hélice restant intacte, il s'agit du « **collagène pepsiné** ». Cette particularité est souvent utilisée dans les protocoles de purification des collagènes fibrillaires [Carmichael *et al.*, 1977].

I.2.2.6. Catabolisme du collagène de type I

a) Catabolisme intracellulaire

Les cellules mésenchymateuses, responsables de la synthèse du collagène de type I, sont dotées d'un système de contrôle qualité très efficace qui permet d'éviter la production de collagène anormal d'un point de vue structural. En effet, ce catabolisme intracellulaire concerne environ 15 % du collagène néosynthétisé qui est ainsi dégradé avant même d'être sécrété [Bienkowski, 1983 ; Rennard *et al.*, 1982]. Ce pourcentage de dégradation basal peut être augmenté lorsque le collagène présente systématiquement une anomalie structurale, comme c'est le cas pour certaines maladies génétiques telles que l'ostéogenèse imparfaite [Bateman *et al.*, 1984].

b) Catabolisme extracellulaire

La dégradation du collagène de type I est liée à sa structure en triple hélice. En effet, cette structure particulière le rend résistant aux protéinases non spécifiques comme la pepsine ou la trypsine (cf § I.4.2.4). Les enzymes capables de dégrader le collagène sont appelées **collagénases**. Très rapidement, des collagénases très actives, appelées collagénases bactériennes, ont été identifiées dans les germes (*Clostridium histolyticum*) responsables des gangrènes. Ces collagénases sont dites liquéfiantes car elles clivent le collagène en tellement de points à la fois (entre glycine et proline) que les molécules sont instantanément coupées en fragments de très petite taille [Bond et Van Wart, 1984 ; Borel, 1993]. Les collagénases bactériennes sont couramment utilisées *in vitro*, mais ne sont pas impliquées dans la dégradation du collagène *in vivo* qui est assurée par des collagénases beaucoup plus spécifiques appartenant à la famille des **métalloprotéinases matricielles**.

I.2.3. Les métalloprotéinases matricielles (MMP)

Les métalloprotéinases matricielles ou MMP (pour « Matrix metalloproteinases ») composent une famille d'au moins 26 membres répertoriés à ce jour. Elles présentent plusieurs caractéristiques communes comme la présence au sein de leur domaine catalytique d'un site de fixation d'un atome de zinc, de fortes homologies structurales, leur sécrétion sous forme d'une proenzyme inactive et la capacité de dégrader quasiment l'ensemble des constituants de la matrice extracellulaire [Somerville *et al.*, 2003].

I.2.3.1. Classification des MMP

Les MMP sont classiquement réparties en six classes distinctes en fonction de leur structure et de leur spécificité de substrat [Visse et Nagase, 2003] :

⇒ Les **collagénases interstitielles** (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18) interviennent dans la dégradation des collagènes fibrillaires (types I, II et III). Ce clivage conduit à la libération de deux fragments hélicoïdaux correspondant aux $\frac{3}{4}$ et au $\frac{1}{4}$ de la longueur de la molécule de collagène.

⇒ Les **gélatinases** (MMP-2, MMP-9) sont dotées d'une activité protéolytique envers la gélatine mais également envers d'autres types de collagène tels que le collagène de type IV des membranes basales. Une caractéristique structurale de cette classe de MMP est la présence, à proximité de leur domaine catalytique, de trois répétitions d'un domaine fibronectine de type II qui permettent la liaison de l'enzyme à son substrat préférentiel, la gélatine.

⇒ Les **stromélysines** (MMP-3, MMP-10, MMP-11) sont proches des collagénases interstitielles d'un point de vue structural. Elles sont essentiellement exprimées par les cellules épithéliales et participent à la dégradation de nombreuses glycoprotéines et protéoglycannes ainsi qu'à l'activation des collagénases interstitielles.

⇒ Les **matrilysines** (MMP-7, MMP-26) sont les MMP structurellement les plus simples car elles ne contiennent pas de domaine hémopexine, présent chez toutes les autres MMP. Ce domaine possède des homologies structurales avec l'hémopexine, protéine plasmatique impliquée de la dégradation de l'hémoglobine. Ces enzymes sont produites par les cellules cancéreuses d'origine épithéliale et sont décrites comme étant impliquées dans la dégradation non spécifique de la matrice extracellulaire.

⇒ Les **métalloprotéinases membranaires** (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) présentent la caractéristique d'être ancrées à la membrane plasmique par un domaine transmembranaire ou par un groupement GPI (glycosylphosphatidyl inositol). Ces protéinases participent à la dégradation directe de la matrice extracellulaire et jouent un rôle essentiel dans l'activation d'autres MMP.

⇒ L'**élastase leucocytaire** (MMP-12) ou métallo-élastase, est sécrétée principalement par les macrophages. Son principal substrat est l'élastine.

Les MMP dont les substrats et les rôles sont encore imprécis sont regroupées dans un ensemble hétérogène.

I.2.3.2. Structure des MMP

Sur le plan structural, les MMP se caractérisent par la présence de domaines communs ayant une distribution ubiquitaire au sein de la famille et d'autres domaines plus spécifiques, qui permettent d'identifier les différentes classes (figure 7) [Chantrain et De Clerck, 2002].

Les domaines structuraux communs à l'ensemble de la famille des MMP sont :

⇒ Le **peptide signal** : cette séquence signal permet l'ancrage de la préproenzyme nouvellement synthétisée à la membrane du réticulum endoplasmique. Son clivage intervient très tôt lors de la synthèse pour permettre la libération de la proenzyme dans la lumière du réticulum endoplasmique.

⇒ Le **prodomaine** (ou propeptide) : ce domaine d'environ 80 acides aminés est capable de maintenir la proenzyme sous forme latente, par l'intermédiaire d'une séquence PRCGXPD qui interagit avec le domaine catalytique. L'activation de l'enzyme nécessite le clivage de ce prodomaine.

⇒ Le **domaine catalytique** : ce domaine est composé approximativement de 170 acides aminés et capable de fixer un atome de zinc par le biais d'une séquence spécifique HEXXHXXGXXH. La présence de l'ion métallique est indispensable à l'activité de l'enzyme.

⇒ Le **domaine hémopexine** : ce domaine situé à l'extrémité C-terminale de la protéine est relié au domaine catalytique par une région dite charnière. Par son implication dans l'interaction de l'enzyme et son substrat, il est responsable de la spécificité des MMP.

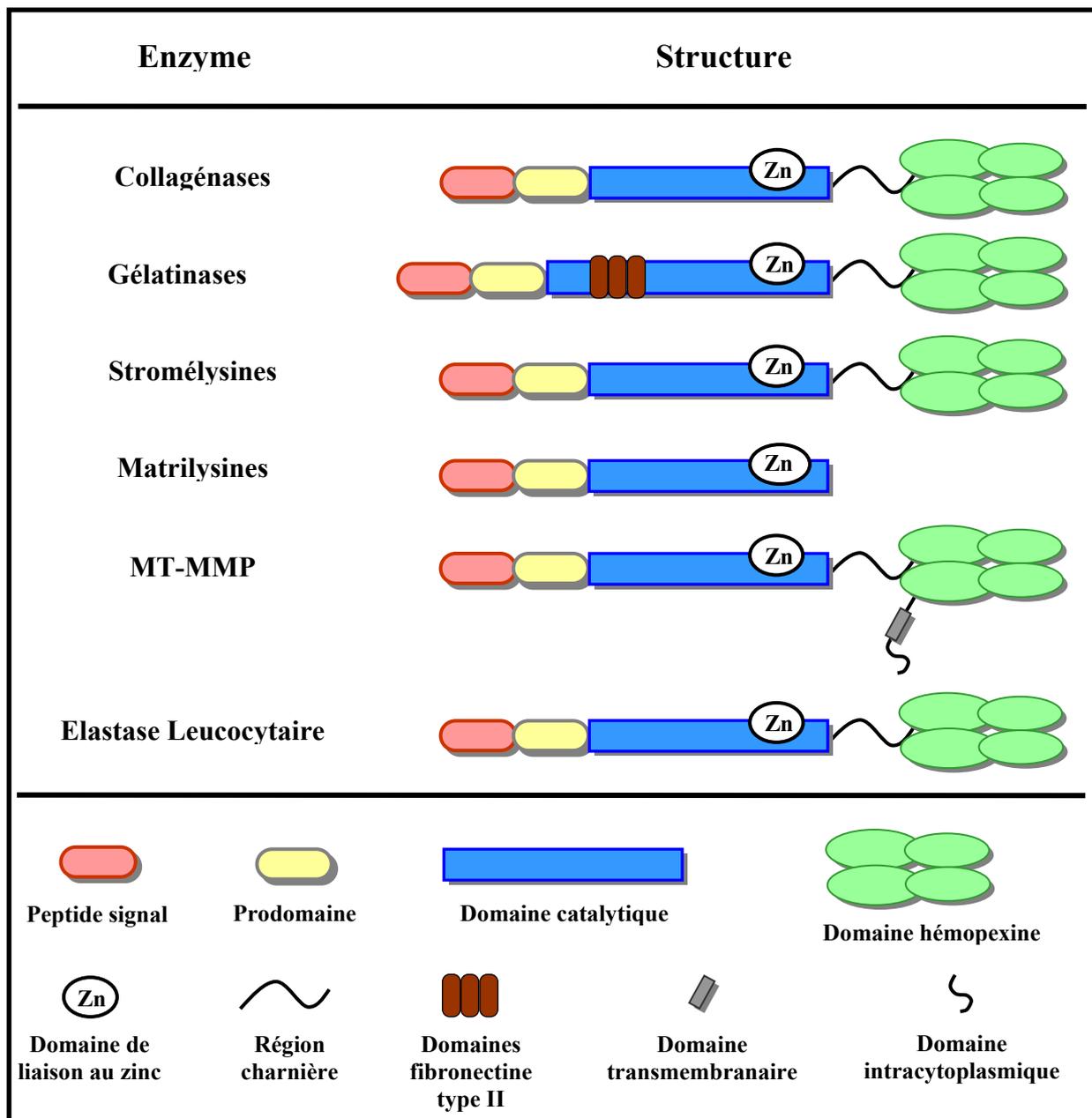


Figure 7. Présentation de la structure des différentes classes de MMP.

Les principaux domaines structuraux sont : le *peptide signal* permettant l'ancrage de la préproenzyme à la membrane du réticulum endoplasmique ; le *prodomaine* qui maintient la forme proenzyme à l'état latent ; le *domaine catalytique* comprenant un site de fixation au zinc indispensable à l'activité de l'enzyme ; le *domaine hémopexine* impliqué dans la détermination de la spécificité de substrat ; une *région charnière* reliant le domaine hémopexine au domaine catalytique.

D'autres domaines représentés sont spécifiques de certaines classes de MMP : le *domaine fibronectine de type II* responsable de la liaison des gélatinases à leur substrat ; le *domaine transmembranaire*, point d'ancrage des MT-MMP à la membrane plasmique.

Parallèlement à ces domaines hautement conservés, d'autres domaines sont propres à certaines classes de MMP :

⇒ Le **domaine fibronectine de type II** (ou CBD pour « collagen binding domain »): trois répétitions de ce motif sont présentes au sein du domaine catalytique des gélatinases. Ces domaines spécifiques permettent l'interaction des MMP-2 et -9 avec la gélatine et les collagènes.

⇒ Un **site de clivage par la furine** (protéinase intracellulaire de la famille des proprotéine convertases), situé à l'extrémité du prodomaine de la MMP-11 ou des MT-MMP. Le clivage permet l'activation des proenzymes.

⇒ Un **domaine transmembranaire**, spécifique des MT-MMP et responsable de l'ancrage de cette classe de MMP à la membrane plasmique.

I.2.3.3. Activation des MMP

Les MMP étant sécrétées sous forme de proenzymes inactives, l'apparition de l'activité enzymatique nécessite le clivage du prodomaine qui recouvre le site catalytique. Le mécanisme d'activation des pro-MMP le mieux admis est le modèle « cystéine switch », au cours duquel le clivage protéolytique déstabilise l'interaction entre le groupement thiol du résidu cystéine appartenant à la séquence consensus du prodomaine et l'atome de zinc du domaine catalytique, ce qui conduit à l'exposition du site actif [Van Wart et Birkedal-Hansen, 1990].

Ce processus d'activation est initié par le clivage protéolytique du prodomaine (figure 8). *In vivo*, il existe différents mécanismes d'activation des pro-MMP, dont voici quelques exemples :

⇒ Le clivage du prodomaine par des sérine-protéinases telles que la plasmine et la cathepsine G ou d'autres MMP [Visse et Nagase, 2003].

⇒ Un mécanisme d'activation intracellulaire : les pro-MMP-11 et -14 possèdent au sein de leur prodomaine une séquence consensus RXKR de clivage par la furine [Pei et Weiss, 1995].

⇒ L'activation de la proenzyme au niveau membranaire : la pro-MMP-2 peut être activée par la MT1-MMP suite à la formation d'un complexe pro-MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP au niveau membranaire. [Butler *et al.*, 1998]. Ce modèle d'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP peut également faire intervenir des récepteurs membranaires de la famille des intégrines et en particulier l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [Brooks *et al.*, 1996].

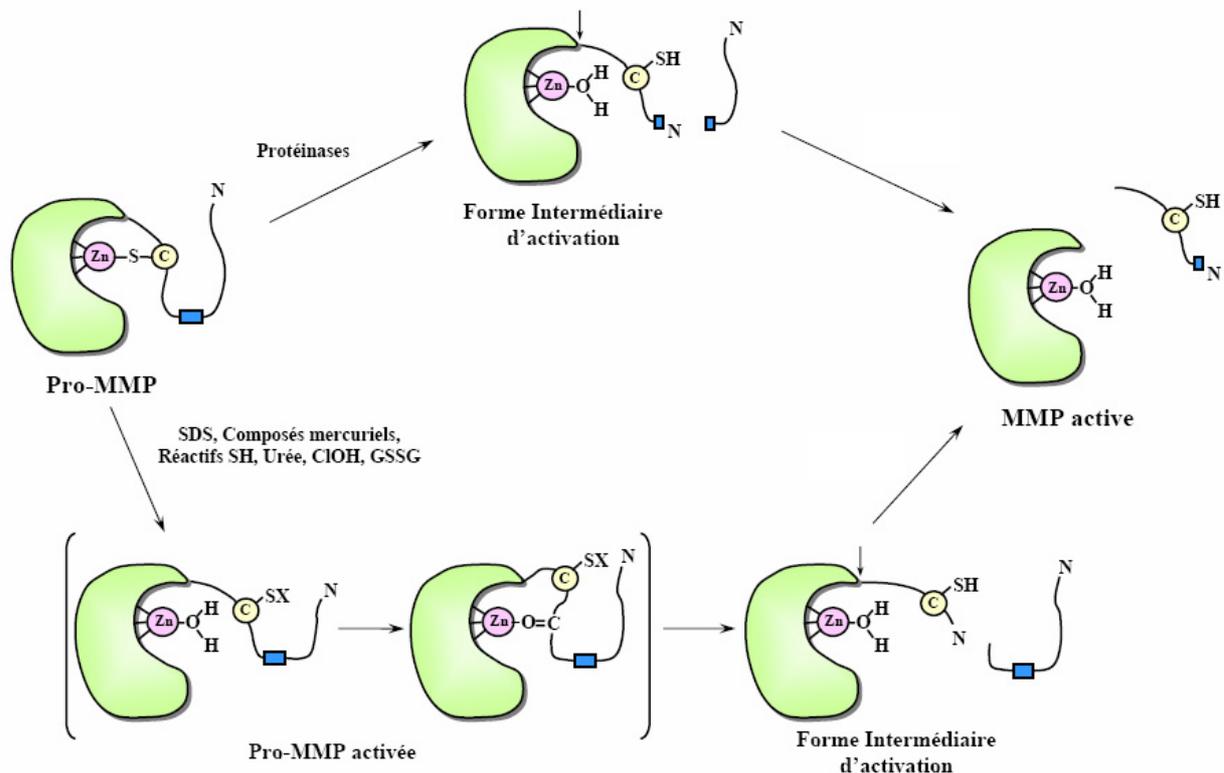


Figure 8. Processus d'activation des pro-MMP (Reproduit d'après Nagase, 1997).

La première étape du processus d'activation des pro-MMP consiste en un clivage protéolytique partiel du prodomaine obtenu soit par l'action d'une protéinase soit après autoclivage par l'enzyme suite à l'action d'agents chimiques qui déstabilisent l'interaction cystéine/zinc. Le processus d'activation se poursuit par le passage de la forme intermédiaire à la forme active après l'autoclivage final du prodomaine par la MMP.

Par ailleurs, les pro-MMP peuvent également être activées *in vitro* par des agents de différentes natures tels que les dérivés organomercuriels, les radicaux libres oxygénés, le SDS, l'urée ou la chaleur, qui induisent la dissociation de la liaison entre le groupement thiol de la cystéine et l'atome de zinc, ce qui conduit à l'autoprotéolyse du prodomaine [Nagase, 1997].

I.2.3.4. Rôle des MMP

Les MMP sont impliquées dans de nombreux événements physiologiques et physiopathologiques. Sur le plan physiologique, elles participent au renouvellement tissulaire, à la reproduction (ovulation, développement mammaire, cycle menstruel) et au développement (morphogénèse rénale, implantation des blastocytes).

Sur le plan physiopathologique, elles sont décrites dans les processus de destruction tissulaire, de fibroses rénale et hépatique ou encore dans les pathologies du système vasculaire telles que l'athérosclérose ou l'infarctus du myocarde. Actuellement, de nombreuses études s'attachent à démontrer le rôle des MMP dans le cancer, aussi bien au cours de l'invasion que de l'angiogenèse tumorale [Sternlicht et Werb, 2001].

I.2.3.5. Régulation de l'activité des MMP

Compte tenu de leur important potentiel de dégradation de la matrice extracellulaire, l'activité des MMP fait l'objet d'une régulation très fine *in vivo*.

Ce contrôle est réalisé par des inhibiteurs tissulaires spécifiques, appelés TIMP (« Tissue Inhibitor of Metalloproteinases ») qui interagissent avec les formes actives des MMP en formant des complexes équimoléculaires. L'interaction entre le domaine N-terminal des TIMP et le domaine catalytique des MMP bloque l'accès à la poche contenant l'atome de zinc [Bode *et al.*, 1999]. Quatre TIMP (TIMP-1 à TIMP-4) ont été identifiés jusqu'à présent et décrits comme capables d'inhiber l'activité des MMP avec des degrés de spécificité variables [Woessner, 2002].

Il existe d'autres types d'inhibiteurs, comme l' α_2 -macroglobuline, mais leur spécificité vis à vis des MMP est très faible.

Le rôle grandissant des MMP dans de multiples processus physiopathologiques a mené au développement d'inhibiteurs synthétiques. Les inhibiteurs les plus connus sont des dérivés d'hydroxamate (Batimastat[®], Marimastat[®]). Leur potentiel inhibiteur a été démontré *in vitro* mais, tout comme pour l' α_2 -macroglobuline, leur spécificité est faible [Chantrain et De Clerck, 2002].

I.3. LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) constituent 45 à 70 % des leucocytes en circulation dans le sang. La fonction principale des PNN est d'assurer la destruction d'agents pathogènes exogènes, notamment bactériens, et de cellules ou molécules endogènes altérées. Les PNN prennent naissance dans la moelle osseuse, à partir d'une cellule souche pluripotente, au terme d'un processus complexe de maturation et de différenciation appelé **granulopoïèse**. Ils sont ensuite en transit dans le sang jusqu'à ce qu'ils soient amenés à intervenir dans le milieu interstitiel. Leur temps de séjour est de 6 à 8 heures dans le système vasculaire, où sont représentés les PNN « circulants » et les PNN accolés à l'endothélium dits « marginés », qui peuvent soit repasser dans la circulation sanguine, soit migrer irréversiblement vers le secteur extravasculaire.

I.3.1. Morphologie des polynucléaires neutrophiles

Les PNN sont des cellules inflammatoires de taille intermédiaire entre les lymphocytes et les monocytes, d'un diamètre d'environ 10 à 15 μm et d'un volume approximatif de 450 μm^3 . Les polynucléaires sont définis et reconnaissables par deux caractéristiques structurales :

- ⇒ Un **noyau polylobé** constitué de 2 à 5 lobes reliés par des filaments de chromatine. Cette architecture nucléaire faciliterait la traversée de l'endothélium vasculaire.
- ⇒ De multiples **granulations** disséminées dans le cytoplasme (figure 9).

La membrane plasmique des PNN renferme de nombreuses enzymes parmi lesquelles la NADPH-oxydase, système clé de l'activité bactéricide, ainsi que des récepteurs nécessaires aux interactions cellulaires ou à l'adhésion à divers substrats. Elle possède des propriétés de déformation qui permettent aux PNN d'émettre des pseudopodes lors de l'adhésion ou encore de s'infiltrer entre les cellules endothéliales au cours du processus de diapédèse [Zittoun *et al.*, 1992].

A.



B.

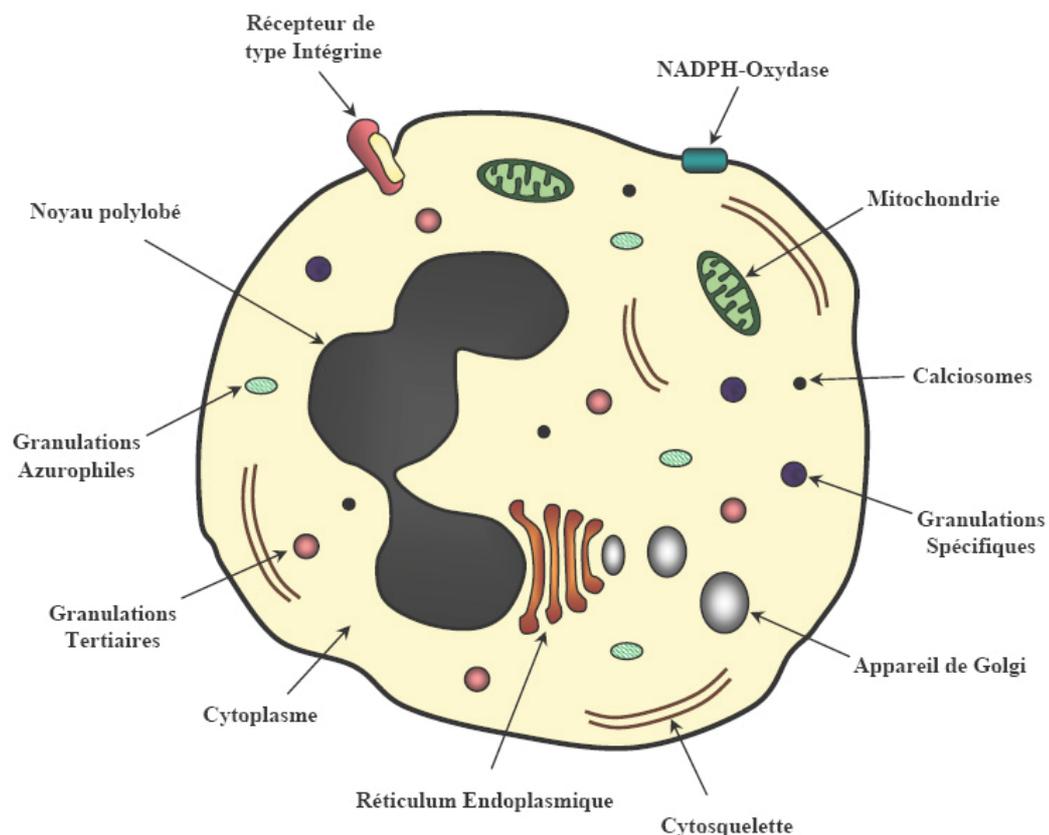


Figure 9. Morphologie du polynucléaire neutrophile.

(A) Photographie d'un polynucléaire neutrophile humain (flèche) en microscopie optique après coloration au May Grunwald Giemsa (Grossissement X 500). (B) : Représentation schématique des constituants cellulaires d'un PNN.

Le compartiment cytoplasmique renferme l'ensemble des organites ou molécules nécessaires à la synthèse protéique, c'est-à-dire le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries, les ribosomes et les ARN messagers.

Le maintien de l'architecture structurale de la cellule est assuré par un réseau fibrillaire constitué de protéines du cytosquelette (actine, tubuline). Le processus de polymérisation-dépolymérisation de ce réseau est essentiel à de nombreuses fonctions dont l'adhésion, le déplacement des PNN ou encore la phagocytose.

Les granulations présentes au sein du cytoplasme sont de véritables vacuoles formées d'une bicouche lipidique et contenant différents constituants, essentiellement enzymatiques, répertoriés dans le tableau 2. Il existe trois types de granulations : **azurophiles**, **spécifiques** et **tertiaires** [Hakim, 1994].

Granulations Azurophiles (ou primaires)	Granulations Spécifiques (ou secondaires)	Granulations Tertiaires (ou autres)
Myéloperoxydase Lysozyme Elastase Cathepsines B, D et G Protéinases Hydrolases acides Défensines Protéines cationiques Inactivateur de C5a	Lactoferrine Transcobalamine Cytochrome b559 Collagénases Activateur du complément Activateur du plasminogène Chimio-attractant des monocytes Inhibiteur de protéine kinase C Récepteurs du fMet-Leu-Phe Récepteurs du C3bi (CR3)	Gélatinases Récepteurs du C3b Cytochrome b559 Phosphatase alcaline

Tableau 2. Constituants des granulations des PNN (d'après Hakim, 1994).

I.3.2. Fonctions des polynucléaires neutrophiles

La fonction principale des PNN est d'assurer, en collaboration avec les macrophages, l'élimination de particules étrangères comme les bactéries au sein du milieu interstitiel. Ce processus de défense met en jeu des propriétés spécifiques aux PNN comme l'adhésion aux cellules endothéliales, la diapédèse et la phagocytose.

I.3.2.1. Mécanismes de recrutement des polynucléaires

L'accumulation des PNN sur le site inflammatoire ou infectieux résulte du déplacement de PNN circulants vers le tissu interstitiel, après réception et réponse à des signaux émis par la cible. Ce phénomène d'attraction des PNN est appelé « **chimiotactisme** ». Les agents chimiotactiques ont diverses origines et peuvent provenir des bactéries (par exemple les peptides N-formylés comme le fMet-Leu-Phe) ou être émis par des PNN ou des macrophages déjà présents sur le site inflammatoire ou infectieux [Zittoun *et al.*, 1992]. Les facteurs chimiotactiques les plus connus sont les cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-8), les facteurs du système du complément activé (comme le facteur C5a), le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), le facteur activateur des plaquettes (PAF) ou encore le leucotriène B4. L'étape de recrutement précède la traversée de l'endothélium vasculaire, qui débute par l'adhésion des PNN aux cellules endothéliales [Smith, 1993].

I.3.2.2. La traversée de l'endothélium

Suite à un signal chimiotactique, les PNN entrent en contact avec les cellules endothéliales, sur lesquelles elles se déplacent selon un phénomène connu sous le nom de « **rolling** ». Ils adhèrent ensuite à ces mêmes cellules endothéliales par des molécules d'adhésion spécifiques. Les PNN activés expriment à leur surface plusieurs récepteurs de type sélectines ou intégrines (« Lymphocyte Function-associated Antigen-1 » (LFA-1) et « Macrophage antigen-1 » (Mac-1)).

Les **intégrines** forment une famille de récepteurs cellulaires, assurant les interactions cellules-cellules et cellules-matrice, impliqués dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques qui nécessitent une étape d'adhésion cellulaire. Ces glycoprotéines transmembranaires sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α associée de façon non covalente à une sous-unité β . A l'heure actuelle, au moins seize sous-unités α et huit sous-unités β différentes ont été dénombrées (figure 10A). La sous-unité β détermine le nom des sous-familles [Hynes, 2002 ; White *et al.*, 2004]. Les intégrines de la famille β_2 sont exprimés uniquement par les leucocytes et interviennent dans les interactions PNN-matrice et PNN-cellules endothéliales.

D'un point de vue structural, la sous-unité α contient, dans sa partie extracellulaire, un domaine I (pour inséré) pour certaines d'entre elles et un domaine β constitué de sept répétitions

d'une séquence impliquée dans la fixation des ions Ca^{2+} nécessaire à l'activité (figure 10B). La partie intracellulaire de cette sous-unité comporte un motif GFFKR intervenant dans l'association des deux sous-unités et dans la reconnaissance du ligand. La sous-unité β présente, dans sa partie extracellulaire, des régions riches en cystéine ainsi qu'un domaine appelé « I-like » de par son analogie avec le domaine I de la sous-unité α . Le regroupement des sous-unités (appelé également « clustering ») permet l'interaction entre les domaines I et I-like qui mène à la formation d'un site MIDAS (« Metal Ion-Dependent Adhesion Site »). Ce site fixe des ions Mg^{2+} ou Mn^{2+} et assure la liaison entre le ligand et l'intégrine grâce à la création de liaisons de coordination entre ces ions et des résidus acides du ligand [Heino, 2000].

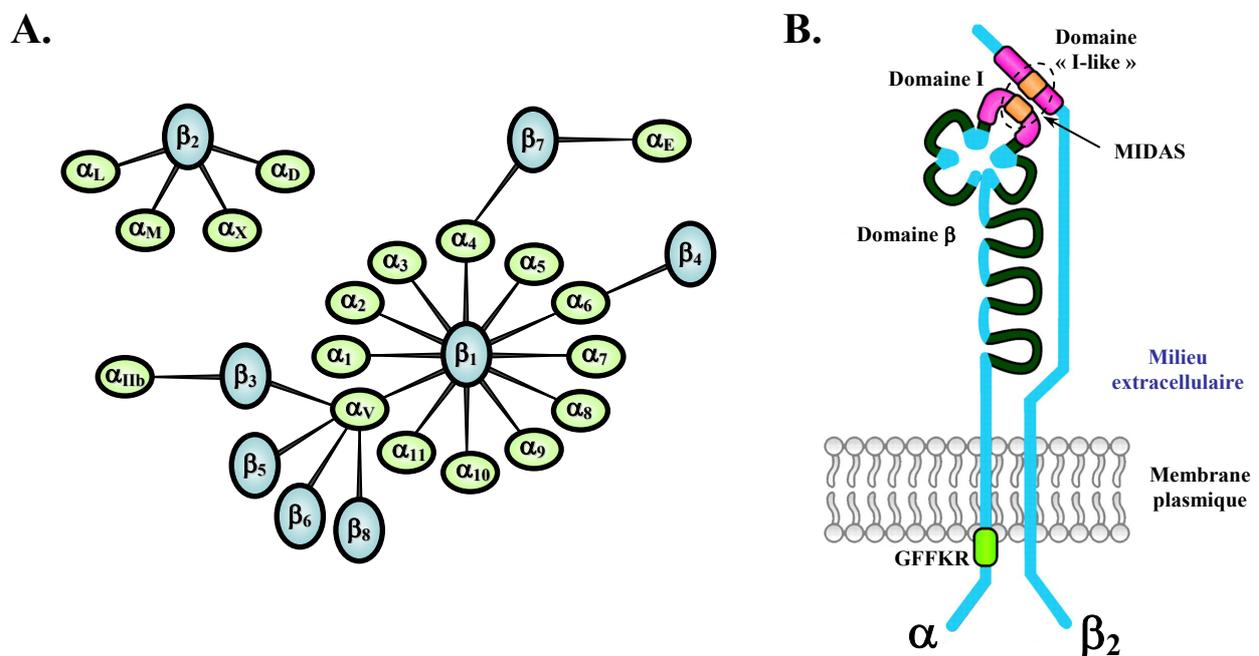


Figure 10. La famille des intégrines : diversité et structure (D'après Harris *et al.*, 2000 et Shimaoka *et al.*, 2002).

(A) Représentation des différents hétérodimères formés par l'association d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (B) : Structure d'une intégrine de la famille β_2 . Les sept répétitions de la sous-unité α situées côté extracellulaire formant le domaine β sont représentées en marron. Le regroupement des domaines I et I-like (en rose) aboutit à la formation du site MIDAS (en orange) responsable de la liaison du ligand à l'intégrine. Enfin, la séquence GFFKR impliquée dans l'association des deux sous-unités est représentée en vert.

Les intégrines exprimées à la surface des PNN sont reconnues par les cellules endothéliales par l'intermédiaire de récepteurs membranaires de type ICAM (« intracellular adhesion molecule ») ou de type sélectine [Godin *et al.*, 1993].

Après avoir adhéré aux cellules endothéliales, les PNN doivent traverser la paroi vasculaire pour se diriger vers le foyer inflammatoire ou infectieux localisé dans les tissus sous-jacents. Le passage entre les cellules endothéliales, appelé « **diapédèse** », est permis grâce aux mouvements amiboïdes réalisés par les PNN (figure 11) [Imhof et Dunon, 1997].

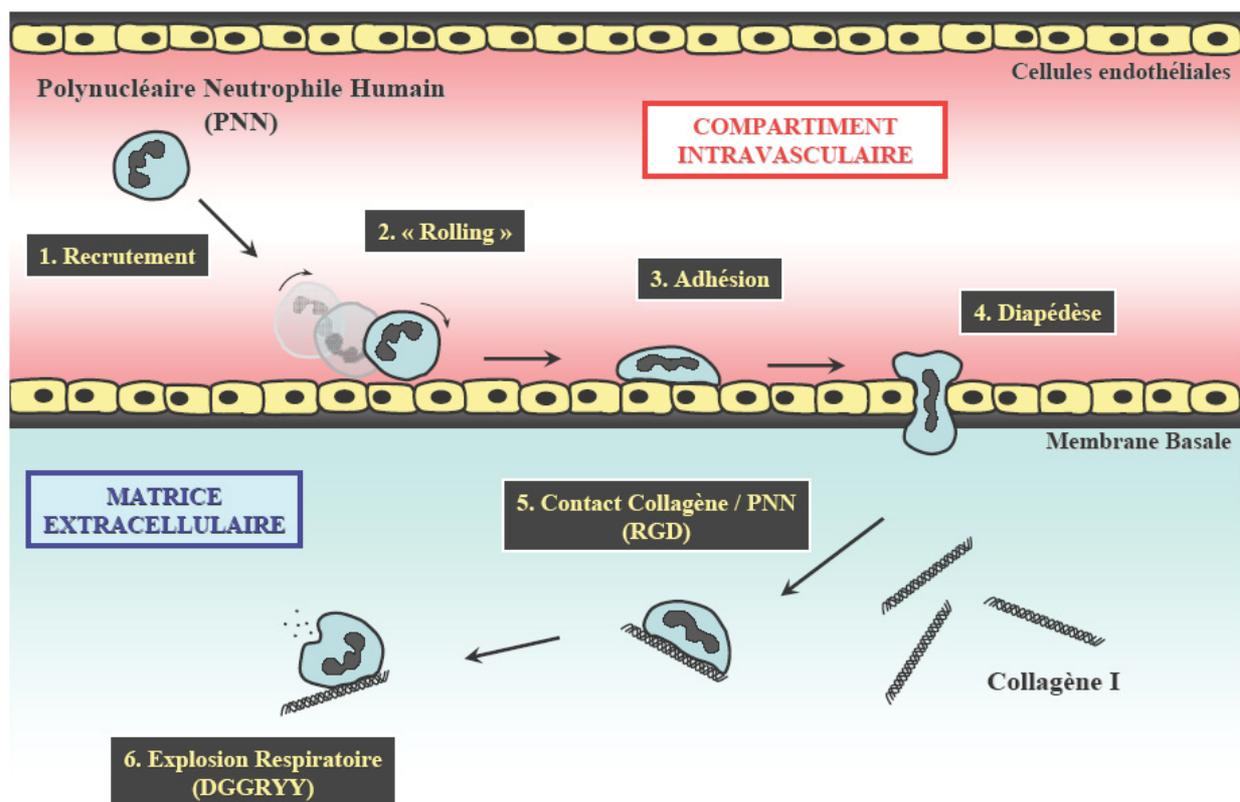


Figure 11. Les différentes étapes du processus de diapédèse (Reproduit d'après Moslen, 1994).

Les PNN sont recrutés suite à un signal chimiotactique (1) puis se rapprochent de la paroi (2) pour ensuite adhérer aux cellules endothéliales (3). Ils franchissent la paroi vasculaire en s'infiltrant entre les cellules endothéliales par le phénomène de diapédèse (4) puis se dirigent vers le foyer inflammatoire ou infectieux en utilisant les protéines de la matrice extracellulaire, notamment les collagènes, comme support pour leur déplacement (5) ou comme substrat d'activation (6) [Monboisse *et al.*, 1990].

Indépendamment du chimiotactisme, une partie des PNN circulants adhère aux cellules endothéliales, puis retourne dans la circulation sanguine sans passer dans le milieu interstitiel, c'est le phénomène de « **margination** » des PNN.

I.3.2.3. Activation des PNN et phagocytose

L'état d'activation est le reflet d'une stimulation des systèmes de défense des PNN pour parvenir à la destruction de l'agent infectieux. Ces phénomènes de dégradation dépendent de deux mécanismes complémentaires, l'un dépendant de l'oxygène et l'autre indépendant de celui-ci.

Le premier système consiste en la sécrétion d'enzymes lytiques contenues dans les granulations, c'est le phénomène d'**exocytose** ou de **dégranulation**. Le second représente toute une série de réactions enzymatiques consommant de l'oxygène aboutissant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, c'est l'**explosion respiratoire**. Nos études portant plus particulièrement sur ce deuxième processus, nous avons choisi de le détailler ultérieurement (§ I.3.3).

La destruction des corps étrangers peut être facilitée par leur séquestration dans les PNN, par le phénomène de **phagocytose**, qui comporte deux étapes : la reconnaissance de la particule à éliminer et son englobement proprement dit. Lors de l'englobement, la membrane des PNN enveloppe complètement la particule dans une vacuole appelée **phagosome**. La destruction des corps étrangers se fait alors par la production d'espèces réactives de l'oxygène dans la vacuole phagocytaire ou par la fusion de la membrane du phagosome avec celle des granulations. Ainsi, lors de cette fusion membranaire, les enzymes contenues dans les granulations sont déversées dans le phagosome et procèdent à la destruction du corps étranger [Hakim, 1994].

I.3.3. L'explosion respiratoire

Le terme d'explosion respiratoire représente l'ensemble des réactions enzymatiques dépendantes de l'oxygène conduisant à la formation d'**espèces réactives de l'oxygène**. Ce processus est primordial pour les activités de défense assurées par les PNN. En effet, les patients atteints de granulomatose septique chronique, maladie héréditaire caractérisée par une déficience quasi totale de l'activité NADPH-oxydase (enzyme-clé de l'explosion respiratoire) des cellules phagocytaires, développent des infections à répétition [Smith et Curnutte, 1991].

I.3.3.1. La NADPH-oxydase : composition et activation du complexe

La **NADPH-oxydase** est une enzyme spécifique des cellules phagocytaires qui catalyse la production d'ions superoxyde (O_2^-) à partir de l'oxygène et du NADPH [Babior *et al.*, 1973]:



La NADPH-oxydase est un complexe enzymatique formé de plusieurs sous-unités localisées, au repos, dans la membrane plasmique ou le cytoplasme [Babior *et al.*, 2002 ; Vignais, 2002]:

⇒ Le complexe membranaire est composé des constituants suivants :

Le **cytochrome b558**, obtenu après l'association de deux sous-unités : une glycoprotéine de 91 kDa (gp91^{phox} ou sous-unité β), dont le rôle est d'assurer le transfert des électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire, et une petite protéine non glycosylée de 22 kDa appelée p22^{phox} ou sous-unité α .

La protéine **Rap 1A**, qui participe à la désactivation de la NADPH-oxydase.

⇒ Les sous-unités cytoplasmiques :

La protéine **p47^{phox}** : la phosphorylation de cette protéine lui permet d'assurer le transport des autres sous-unités cytoplasmiques vers le complexe membranaire lors de l'activation. Si cette sous-unité n'est pas indispensable à l'activité de la NADPH-oxydase, elle agit en tant que protéine adaptatrice en augmentant de 50 à 100 fois l'affinité entre les deux autres sous-unités cytoplasmiques (p67^{phox} et p40^{phox}).

La protéine **p67^{phox}** : elle permet le transfert des électrons à l'intérieur du cytochrome b558 grâce à son site de liaison au NADPH.

La protéine **p40^{phox}** : déjà phosphorylée à l'état quiescent, elle subit de nouvelles phosphorylations lors de l'activation du complexe. Son rôle est jusqu'alors mal connu mais elle pourrait exercer un rôle inhibiteur en maintenant le complexe cytoplasmique à l'état inactif. Au repos, les trois sous-unités cytoplasmiques p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} forment un complexe d'environ 250 kDa.

La protéine **p21rac** (ou Rac2) : protéine de la famille des Rho GTPases. Après activation, par échange GDP/GTP, cette protéine peut interagir avec la p67^{phox} et participer également à la translocation membranaire des sous-unités cytoplasmiques.

La distribution de ces composants dans deux compartiments cellulaires distincts permet à l'enzyme de rester sous forme inactive dans les cellules au repos [Bokoch et Knaus, 2003 ; Delbosc *et al.*, 2001].

Mécanisme d'activation du complexe :

Le mécanisme d'activation de la NADPH-oxydase correspond à la translocation des sous-unités cytoplasmiques au complexe membranaire, ce qui conduit à la production d'**ions superoxyde** (O_2^-) par le biais de l'oxydation du NADPH en $NADP^+$ (figure 12). Ce processus débute par la phosphorylation de la sous-unité cytoplasmique $p47^{phox}$ qui s'associe aux autres membres de la partie cytoplasmique du complexe ($p67^{phox}$ et $p40^{phox}$) pour les conduire à la membrane. Parallèlement, la petite protéine G $p21rac$ est activée par échange GDP/GTP puis migre vers la membrane plasmique [Roos *et al.*, 2003 ; Takeya et Sumimoto, 2003].

Après activation, le complexe procède au transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire, effectué par la sous-unité β du cytochrome b558 et plus particulièrement par ses deux groupements hémiques et le cofacteur FAD (Flavine adénine dinucléotide). Cette chaîne de transport d'électrons est mise en place grâce à des changements conformationnels du cytochrome b558 induits lors de son interaction avec les sous-unités cytoplasmiques [Nauseef, 2004 ; Wientjes et Segal, 1995]. Ces dernières sont donc indispensables au bon fonctionnement du complexe enzymatique, et plus particulièrement $p67^{phox}$ qui a pour fonction de réguler le flux d'électrons qui traverse le flavocytochrome [Dang *et al.*, 2001].

Il est désormais acquis que les voies de signalisation conduisant à la phosphorylation de $p47^{phox}$, première étape de l'activation du complexe enzymatique, impliquent des kinases de la famille des **Protéine Kinases C** (PKC). Ces PKC sont activées soit par la libération de calcium intracellulaire, soit par le diacylglycérol (DAG), médiateur intracellulaire issu de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) par une phospholipase C (PLC) [Gamaley et Klyubin, 1999 ; Karlsson et Dahlgren, 2002].

Les ions superoxyde formés par la NADPH-oxydase à partir de l'oxygène peuvent être rapidement convertis par réaction enzymatique en différents composés regroupés sous l'appellation d'« **espèces réactives de l'oxygène** » responsables de la destruction des agents pathogènes.

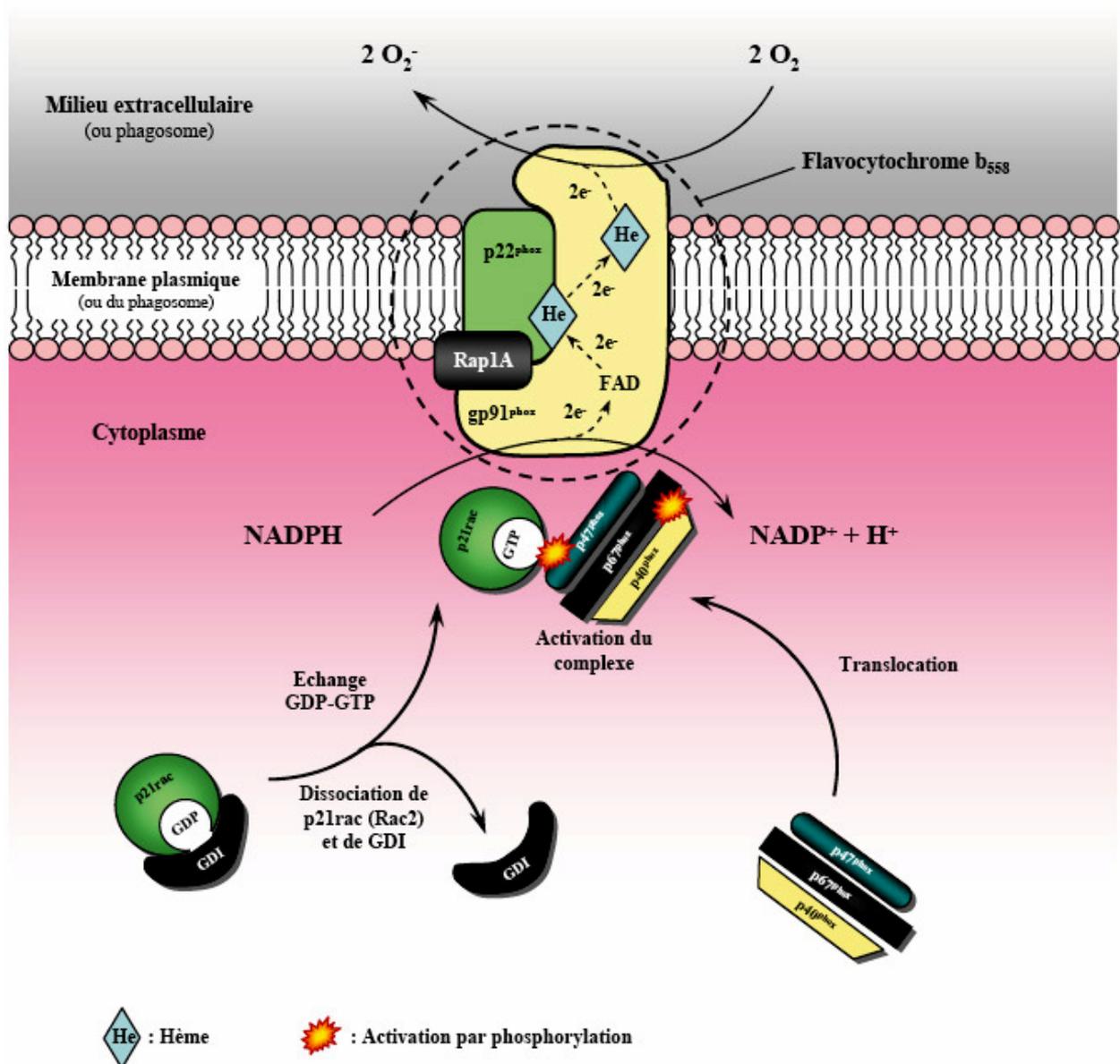


Figure 12. Représentation schématique du mécanisme d'activation de la NADPH-oxydase (Adapté d'après Shatwell *et al.*, 1996 et Bokoch et Knaus, 2003).

L'activation du complexe débute par la translocation des sous-unités cytoplasmiques ($p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$) et de $p21^{\text{rac}}$ activé vers la membrane plasmique. Leur interaction avec le complexe membranaire induit des changements conformationnels du cytochrome $b558$ qui permettent le transfert des électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire via la sous-unité $gp91^{\text{phox}}$ du cytochrome $b558$.

I.3.3.2. Les espèces réactives de l'oxygène

Les ions superoxyde (O_2^-) issus de la réduction de l'oxygène moléculaire par la NADPH-oxydase sont peu réactifs. En revanche, ils peuvent subir de nombreuses transformations, essentiellement enzymatiques, aboutissant à la formation d'autres espèces de l'oxygène beaucoup plus réactives (figure 13). La première de ces réactions est catalysée par la superoxyde dismutase et permet la conversion de l'ion superoxyde en eau oxygénée (H_2O_2) [Jones et al., 2000]. Ensuite, la transformation de l' H_2O_2 en présence d'ions Fe^{2+} (Réaction d'Haber-Weiss initialement appelée réaction de Fenton) génère le radical hydroxyle (OH^\bullet), très toxique de par sa puissante activité oxydante. En plus de ces espèces réactives de l'oxygène, l'ion superoxyde est directement ou indirectement à l'origine des oxydants chlorés qui comprennent l'hypochlorite (OCl^- , produit en présence d'halogénures par la myéloperoxydase), de chloramines et de formes réactives de l'azote comme le peroxydinitrite ($ONOO^-$) formé à partir du monoxyde d'azote [Babior, 2000].

Parallèlement à la production d'espèces toxiques dérivées de l'oxygène, certaines enzymes comme la catalase et la myéloperoxydase sont chargées de la détoxification en catalysant la transformation de l' H_2O_2 en eau [Delbosc *et al.*, 2001].

Ces espèces réactives de l'oxygène sont toxiques car elles sont responsables de l'oxydation de nombreuses molécules telles que les protéines, les lipides, les glucides et les acides nucléiques. Parmi celles-ci, les lipides constituent une cible privilégiée pour les espèces réactives de l'oxygène, et en particulier les acides gras désaturés. Ces phénomènes d'oxydation peuvent engendrer des conséquences fonctionnelles irréversibles comme par exemple la modification des membranes plasmiques liée à l'oxydation des lipides ou la perte d'activité enzymatique secondaire à l'oxydation de protéines [Moslen, 1994].

Parallèlement au processus d'oxydation, les dérivés issus de l'action de la myéloperoxydase (hypochlorite, aldéhydes, chloramines) peuvent halogéner les protéines cibles (notamment des bactéries) conduisant à des modifications structurales et fonctionnelles irréversibles [Hakim, 1994].

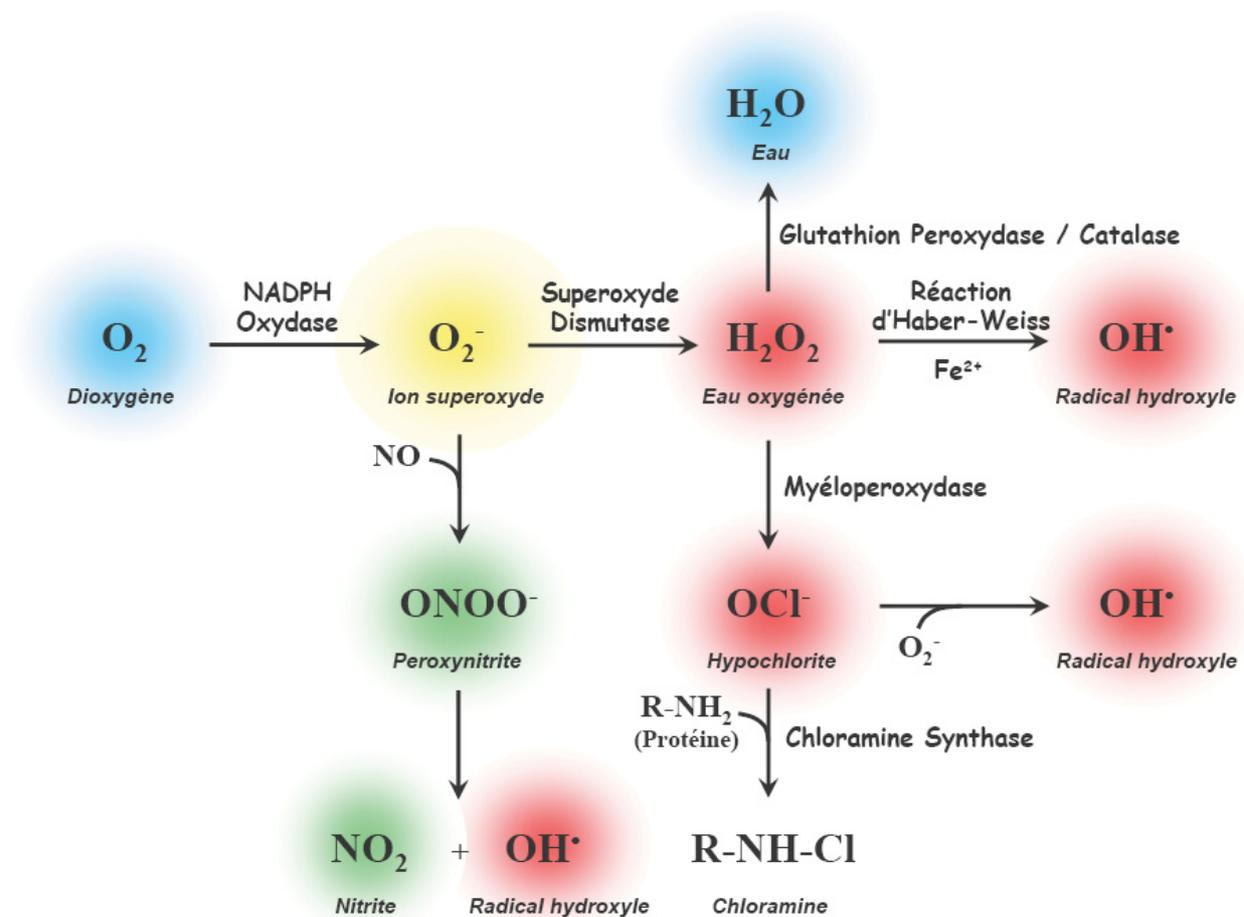


Figure 13. Représentation schématique du métabolisme des espèces réactives de l'oxygène (Reproduit d'après Delbosc *et al.*, 2001).

La réduction du dioxygène par la NADPH-oxydase produit l'ion superoxyde, précurseur de la formation de l'ensemble des espèces réactives de l'oxygène. La superoxyde dismutase catalyse ensuite la formation d'eau oxygénée, elle-même potentiellement transformée en radical hydroxyle (Réaction d'Haber-Weiss) ou en dérivé hypochlorite par la myéloperoxydase. En absence de superoxyde dismutase, le radical hydroxyle peut également être formé à partir de l'ion superoxyde. Parallèlement, la réaction entre l'ion superoxyde et le monoxyde d'azote conduit aux formes réactives de l'azote (peroxynitrite, nitrite). Le processus de détoxification est assuré par la catalase ou la glutathion peroxydase et aboutit à la formation d'eau à partir de l'eau oxygénée. Sur le schéma, sont représentés en bleu : les espèces non toxiques ; en jaune : le précurseur (ion superoxyde) peu toxique ; en rouge : les espèces réactives de l'oxygène très toxiques ; en vert : les espèces réactives azotées. Les réactions présentées dans ce schéma ne sont pas équilibrées.

I.3.4. L'interaction entre collagène de type I et polynucléaires neutrophiles

Dans l'organisme, les polynucléaires neutrophiles sont amenés à interagir fréquemment avec différents types de collagène, et plus particulièrement le collagène de type I, très abondant au sein des tissus conjonctifs interstitiels (§ I.2.2.3). Lors de la maturation dans la moelle osseuse, les précurseurs hématopoïétiques entrent en contact avec les collagènes de type I, III et IV. Après leur passage dans la circulation sanguine et réception d'un signal chimiotactique, les PNN interagissent avec les collagènes lors de la traversée de la membrane basale (collagène de type IV) puis dans la matrice extracellulaire sous-jacente (collagènes de type I et III). Comme les PNN exercent principalement leurs activités biologiques au sein du tissu conjonctif, le collagène de type I peut jouer un rôle important dans la régulation de leurs fonctions [Pasco *et al.*, 2003]. Par exemple, dans le cas de la LAD (« Leucocytes Adhesion Deficiency »), pathologie caractérisée par un défaut d'adhésion des leucocytes en raison d'une anomalie d'expression des intégrines de type β_2 , l'absence de contact avec les constituants matriciels du tissu conjonctif, et notamment les collagènes, engendre l'incapacité des PNN à atteindre le foyer infectieux et à parvenir à la destruction de l'agent infectieux [Rosenzweig et Holland, 2004].

Différents récepteurs exprimés par les PNN peuvent être impliqués dans ces interactions. Les **intégrines de la famille β_2** ont été les premières à être caractérisées pour leur implication dans l'adhésion des PNN à l'endothélium et aux molécules du tissu extravasculaire [Forslund et Sundqvist, 1994]. Ensuite, certains auteurs ont montré que la migration des PNN dans le compartiment extravasculaire n'impliquait pas uniquement des intégrines de type β_2 mais également celles de la famille β_1 [Sixt *et al.*, 2001 ; Werr *et al.*, 2000b]. Ces différents types de récepteurs œuvrent ensemble à la migration des PNN, puisqu'une étude a révélé que l'expression des intégrines β_1 pourrait être régulée positivement par l'activation des intégrines β_2 [Werr *et al.*, 2000a].

Plus récemment, d'autres récepteurs, les **récepteurs à domaine discoïdine de type 1** (ou DDR1 pour « Discoidin Domain Receptors 1 ») ont été identifiés comme intervenant dans la régulation de l'interaction entre leucocytes et collagène [Abdulhussein *et al.*, 2004]. Ces récepteurs à activité tyrosine kinase interagissent avec le collagène pour faciliter l'adhésion, la migration ou la maturation des leucocytes [Kamohara *et al.*, 2001 ; Yoshimura *et al.*, 2005].

Par conséquent, Les interactions entre les PNN et les constituants matriciels lors de leur déplacement dans l'espace extravasculaire n'impliquent pas une seule famille de récepteurs, mais résultent de la collaboration de différents types de récepteurs à la régulation de fonctions distinctes.

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que le collagène de type I stimule la libération d'ions superoxyde par les polynucléaires neutrophiles humains [Monboisse *et al.*, 1987], par l'intermédiaire de deux séquences spécifiques : **RGD** et **DGGRYY**, situées dans la région C-terminale de la chaîne α_1 du collagène de type I [Monboisse *et al.*, 1990]. Plusieurs séquences de type RGD, connues pour leur interaction avec les récepteurs de la famille des intégrines [Masson-Gadais *et al.*, 2001], ont été identifiées sur la molécule de collagène de type I, alors que la séquence DGGRYY est unique. Des expériences réalisées à l'aide d'anticorps bloquants ont montré que l'intégrine « **Lymphocyte Function-associated Antigen-1** » (LFA-1 ou $\alpha_L\beta_2$ ou CD11a/CD18) était impliquée dans l'interaction des PNN avec ces séquences spécifiques du collagène [Garnotel *et al.*, 1995]. A l'heure actuelle, aucune donnée bibliographique ne permet de définir précisément le degré de participation d'autres récepteurs tels que les DDR1 dans le processus d'activation des PNN par le collagène de type I.

En résumé, lorsque les PNN arrivent sur le site infectieux, ils adhèrent (séquences RGD) au collagène de type I, dégradé ou non, puis sont stimulés (séquence DGGRYY) par ce même collagène, ce qui les place dans un état d'activation propice à la destruction des agents infectieux (figure 11).

I.4. INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE ET CARBAMYLATION

Le rein est l'organe responsable de l'homéostasie des fluides de l'organisme par la régulation de leur volume et de leur composition ionique. Il représente la principale **voie d'excrétion des déchets métaboliques** potentiellement toxiques tels que l'urée ou l'acide urique. Il permet également l'élimination de nombreux produits chimiques exogènes (médicaments ou toxines) ainsi que de leurs métabolites. Parallèlement à l'épuration des fluides organiques, d'autres fonctions lui sont attribuées, comme le catabolisme des protéines de petite masse moléculaire ou la participation aux fonctions endocrines de l'organisme.

L'insuffisance rénale est une pathologie qui se caractérise par une atteinte des fonctions rénales. Si la dysfonction rénale est brutale et se constitue en quelques heures, l'insuffisance rénale est dite **aiguë** et peut être réversible. En revanche, lorsque la dysfonction est progressive et se met en place sur une plus longue période (plusieurs années), on parle d'**insuffisance rénale chronique** (IRC).

I.4.1. L'insuffisance rénale chronique (IRC)

L'insuffisance rénale chronique est caractérisée par une diminution de la filtration glomérulaire (reflet des capacités d'épuration du rein) en rapport avec une réduction permanente et définitive du nombre de néphrons fonctionnels. L'évolution clinique est typiquement progressive avec une perte régulière et inexorable du nombre de néphrons fonctionnels aboutissant à l'insuffisance rénale dite « terminale ». Le délai entre le début de la maladie et l'insuffisance rénale terminale varie considérablement non seulement entre les différentes formes d'atteintes rénales, mais aussi entre patients souffrant d'une pathologie rénale identique.

En France, environ 2 à 3 millions de personnes sont atteintes d'IRC à un stade pré-terminal. Comme dans l'ensemble des pays développés, l'incidence et la prévalence de cette pathologie sont en progression constante, principalement à cause du vieillissement de la population et de l'impact grandissant des pathologies vasculaires et métaboliques (hypertension

artérielle et diabète) à retentissement rénal. L'IRC terminale touche environ 50 000 patients en France [Jungers *et al.*, 2004].

I.4.1.1. Physiopathologie et diagnostic clinique

L'IRC est le reflet d'une réduction du nombre de néphrons faisant intervenir un mécanisme à deux étapes dont la première est la destruction de néphrons fonctionnels. La néphropathie initiale est la résultante de nombreuses situations pathologiques dont les plus courantes sont :

- ⇒ Les glomérulonéphrites (cas le plus fréquent)
- ⇒ Le diabète
- ⇒ Les pathologies du système vasculaire (hypertension artérielle)
- ⇒ Les néphropathies héréditaires (polykystoses, syndrome d'Alport)
- ⇒ Les néphropathies interstitielles (lésions fibrotiques ou inflammatoires de l'interstitium rénal)

Les néphrons endommagés puis exclus vont imposer un travail d'élaboration urinaire supplémentaire aux néphrons sains restants. Ces derniers sont capables de s'adapter en développant un état d'hyperfonctionnement (ou hypertrophie). Cependant, cette adaptation a des limites, si bien que, dans le cas où le travail métabolique reste inchangé, les néphrons hypertrophiés subissent à leur tour des lésions conduisant à leur destruction. Il s'installe alors un véritable cercle vicieux, qui ne peut être freiné que par la réduction du travail métabolique effectué par le rein [Jungers *et al.*, 2000].

La destruction fonctionnelle des reins, conséquence de multiples agressions organiques, est extrêmement fréquente et reste longtemps cliniquement asymptomatique. C'est pourquoi il faut porter une attention particulière au dépistage précoce du dysfonctionnement rénal. Ce dépistage est préconisé pour les personnes âgées, les diabétiques, les personnes souffrant d'anomalies urinaires et les personnes atteintes de pathologies du système cardiovasculaire ou d'hypertension.

L'exploration de la fonction rénale se fait par la mesure du débit de filtration glomérulaire, estimé à partir de la clairance de la **créatinine**. La créatinine est un déchet métabolique azoté, produit terminal du catabolisme de la créatine musculaire, éliminé dans l'urine par filtration glomérulaire et ne subissant pratiquement aucune réabsorption tubulaire. Sa clairance urinaire est un bon reflet du niveau de fonctionnement rénal et peut être facilement

déterminée par la mesure directe de la concentration plasmatique et urinaire de créatinine. Toutefois, le recueil urinaire (analyse sur des urines de 24 heures) est souvent la principale source d'erreur de cette mesure. Pour éviter les erreurs liées au recueil des urines et mieux rendre compte de la relation créatinine plasmatique-filtration glomérulaire, tout en intégrant l'âge et le sexe du patient, une méthode d'estimation indirecte de la clairance de la créatinine a été élaborée par Cockcroft et Gault [Cockcroft et Gault, 1976] :

$$\text{Clairance de la créatinine (mL/min)} = \frac{[140 - \text{âge}] \times \text{masse corporelle} \times k}{\text{Créatininémie } (\mu\text{mol/L})}$$

Age en années
Masse en kg
k (homme) = 1,25
k (femme) = 1,08

Cependant, il est important de noter que la créatinine est endogène et faiblement sécrétée par les tubules, ce qui peut fausser le calcul de la clairance en cas d'IRC. Il existe par ailleurs des situations cliniques dans lesquelles la formule est inapplicable, notamment pour les enfants et les patients âgés et/ou obèses. Seule la clairance de l'**inuline** (substance exogène uniquement filtrée) est un marqueur précis d'IRC mais son dosage est coûteux et difficile à mettre en œuvre. Par conséquent, seules des mesures indirectes sont actuellement employées en pratique quotidienne pour témoigner du fonctionnement rénal à défaut de marqueurs directs, précis et facilement dosables. Récemment, un nouveau marqueur a fait son apparition : l'iohexol, produit iodé exclusivement filtré, mais des études sont en cours pour définir sa réelle utilité [Gaspari *et al.*, 1998].

I.4.1.2. Complications et traitements

La progression de l'IRC est variable. Les facteurs de risque d'une progression rapide sont soit invariables (âge, sexe, néphropathie initiale) soit modifiables (hypertension artérielle, régime alimentaire, tabagisme). Le retentissement clinique de l'IRC peut s'exprimer par divers types de complications [Le Meur *et al.*, 1998] :

⇒ Les complications **cardiovasculaires** : les maladies cardiaques représentent une des principales causes de décès des patients urémiques. Plusieurs facteurs contribuent au développement de pathologies vasculaires comme l'hypertension artérielle et les anomalies métaboliques lipidiques.

⇒ Les altérations **immunologiques** : la réponse immunitaire est altérée chez la majorité des patients ayant une IRC à un stade avancé. Leur susceptibilité vis à vis des infections est augmentée et associée à un **syndrome inflammatoire** chronique (des informations complémentaires sur cet aspect des complications sont présentées au § I.4.1.3).

⇒ Les anomalies **hématologiques** : l'anémie est quasiment constante au cours de l'IRC terminale. Le défaut de sécrétion d'érythropoïétine est le principal facteur mis en cause.

⇒ Les désordres **hydroélectrolytiques** deviennent majeurs au stade terminal (hyperkaliémie, hyponatrémie, acidose métabolique).

⇒ Les anomalies **osseuses** regroupées sous le terme d'ostéodystrophie rénale. Il s'agit d'une cause majeure d'impotence au cours de l'IRC due à un défaut d'hydroxylation de la vitamine D.

⇒ Les **troubles digestifs** associés à des nausées qui favorisent la dénutrition.

⇒ Des anomalies **neurologiques**.

Face à de telles complications, des traitements spécifiques paraissent indispensables pour tenter de ralentir la progression de l'insuffisance rénale. Il est difficile de diagnostiquer les néphropathies initiales puisque les premières étapes de l'insuffisance rénale sont souvent asymptomatiques, si bien que les manifestations cliniques ne s'expriment que lorsque les deux tiers du capital fonctionnel du rein sont détruits. C'est pourquoi un dépistage précoce s'impose pour permettre ainsi de lutter rapidement contre les facteurs d'aggravation de l'insuffisance rénale qui conduisent au développement de complications. L'hypertension artérielle est le facteur de progression le plus délétère et le contrôle de la pression artérielle par voie pharmacologique représente un point capital du traitement. D'autres mesures sont préconisées comme la prescription d'un régime alimentaire pauvre en protéines et en sel pour diminuer l'activité d'élimination des déchets azotés et de sodium, ou encore éviter la prescription de médicaments néphrotoxiques.

Lorsque l'IRC atteint le stade terminal, le traitement consiste à procéder régulièrement à l'épuration extra-rénale (par hémodialyse ou par dialyse péritonéale), dans l'attente d'une transplantation rénale si celle-ci est possible et souhaitée par le patient. Ce type de traitement est appliqué à deux tiers des patients en IRC terminale. Le tiers restant regroupe les patients soignés par transplantation rénale [Jungers *et al.*, 2004].

I.4.1.3. Troubles infectieux et inflammatoires dans l'IRC

Le syndrome inflammatoire occupe une place importante au sein des complications associées à la progression de l'IRC, si bien que cette pathologie est souvent qualifiée de maladie inflammatoire chronique. Les causes de cet état inflammatoire sont multiples. Tout d'abord, la néphropathie initiale ainsi que la diminution de la clairance des cytokines pro-inflammatoires constituent une première source d'inflammation. D'autre part, la réponse immunitaire peut être stimulée par l'apparition de néoantigènes. Plusieurs réactions comme la carbamylation, la glycoxydation ou encore l'oxydation, peuvent être responsables de la modification de ces antigènes [Rieu, 2003].

Le **stress oxydant** est une composante majeure de l'inflammation associée à l'IRC, et se définit comme un déséquilibre entre production d'espèces réactives de l'oxygène et activité des systèmes anti-oxydants [Galle, 2001]. La survenue de ce stress oxydant peut être liée à deux principaux phénomènes. Le premier se caractérise par l'action stimulatrice des toxines urémiques (urée, AGE ou autres) sur la production d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules phagocytaires [Descamps-Latscha, 2003]. Le second résulte de l'activation de ces cellules phagocytaires par contact avec la membrane de dialyse ou suite à la contamination du dialysat par des fragments d'endotoxines bactériennes [Khan et Catto, 1993 ; Rieu, 2003]. Les radicaux libres oxygénés formés interagissent alors avec les protéines environnantes générant des **produits d'oxydation avancée des protéines** (ou AOPP pour « Advanced Oxidation Protein Products ») qui se révèlent être de véritables toxines urémiques, médiatrices de l'inflammation [Witko-Sarsat, 1998]. L'inflammation chronique de l'IRC est à l'origine de nombreuses complications comme l'anémie, l'apparition de douleurs ou encore la malnutrition, mais participe surtout à l'amplification des complications cardiovasculaires. Par exemple, l'oxydation des LDL est un facteur important dans le développement de l'athérosclérose. Cet état inflammatoire permanent et l'accumulation des toxines urémiques conduisent à une immunodépression qui peut favoriser le développement d'infections [Stenvinkel, 2002].

La survenue d'infections est, avec les complications cardiovasculaires, une des principales causes de mortalité des patients urémiques [Berman, 2001 ; Montgomerie *et al.*, 1968]. Cependant, la définition des facteurs mis en cause dans la survenue répétée d'infections chez les patients urémiques fait l'objet de divergences parmi les néphrologues. En effet, certains d'entre eux considèrent ce phénomène comme la conséquence du syndrome inflammatoire évoqué précédemment alors que d'autres retiennent également la participation d'autres

mécanismes comme une altération des fonctions des PNN. Il est vrai que la pratique courante de la dialyse facilite l'exposition aux germes, mais les problèmes infectieux ne concernent pas uniquement les patients dialysés. C'est pourquoi les recherches se sont orientées vers l'exploration des fonctions des cellules immunitaires au cours de l'urémie. Les résultats obtenus font état de divergences concernant les éventuels dysfonctionnements des PNN. Toutefois, une analyse réalisée en 1993 par Vanholder et Ringoir sur 34 études portant sur les fonctions des PNN issus de patients urémiques, a montré que, dans 77 % des cas, les PNN présentaient des anomalies fonctionnelles (notamment de phagocytose, de production d'espèces réactives de l'oxygène ou des défauts de chimiotactisme) [Vanholder et Ringoir, 1993]. Depuis, d'autres études ont permis de préciser ces déficits fonctionnels, dont les principaux décrits dans la littérature sont les suivants :

⇒ Diminution des capacités de phagocytose décrite chez les patients dialysés ou non [Hirabayashi *et al.*, 1988 ; Sharma *et al.*, 2000 ; Vanholder *et al.*, 1991].

⇒ Inhibition de la production d'espèces réactives de l'oxygène [Hirabayashi *et al.*, 1988 ; Porter *et al.*, 1997 ; Sharma *et al.*, 2000]. Cette inhibition peut être liée à un dysfonctionnement des voies métaboliques nécessaires à l'activité de la NADPH oxydase.

⇒ Augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène [Martin-Mateo *et al.*, 1999].

⇒ Perte de rigidité des PNN qui interfère avec le déroulement de la diapédèse [Skoutelis *et al.*, 2000].

Toutes ces éléments permettent donc d'affirmer que la dysrégulation des processus infectieux et inflammatoires observés au cours de l'IRC est incontestablement liée à une dysrégulation d'origine **multifactorielle** des fonctions des cellules phagocytaires.

I.4.2. La carbamylation des protéines

L'insuffisance rénale chronique est classiquement appelée « **urémie** » en raison de l'accumulation d'urée dans le sang. Une augmentation de l'urémie (concentration sérique d'urée) apparaît comme un signe de dysfonctionnement rénal. L'urée est une petite molécule de 60 Da dérivée de la dégradation de la partie azotée des acides aminés, qui constitue la forme majeure d'élimination de l'azote chez l'homme. Il s'agit donc du produit final du catabolisme des

protéines alimentaires et endogènes. L'urée est très soluble dans l'eau et diffuse dans tous les compartiments hydriques de l'organisme, soit 60 % de la masse du corps chez l'adulte. Elle n'est pas toxique par elle-même mais peut se décomposer spontanément en un dérivé beaucoup plus réactif, l'**acide isocyanique**, capable d'interagir avec les protéines environnantes.

I.4.2.1. Généralités sur la réaction de carbamylation

La **carbamylation** ou **carbamoylation** (les deux termes sont utilisés indifféremment) est une réaction décrite au début des années 60 par George Stark [Stark *et al.*, 1960]. Il s'agit d'une **modification chimique non enzymatique post-traductionnelle** des groupements aminés des protéines (et des acides aminés libres) caractérisée par la fixation d'acide isocyanique provenant de la décomposition spontanée de l'urée.

La concentration sérique d'urée est de l'ordre de 5 mM pour un sujet sain et peut atteindre 30 mM ou plus en cas d'insuffisance rénale chronique. En milieu aqueux et à 37°C, l'urée peut se décomposer spontanément en ammoniacque (NH_4^+) et en ion cyanate (CNO^-). Le cyanate se transforme ensuite rapidement en une forme plus stable, l'acide isocyanique (figure 14). Cet équilibre, qui est déplacé en faveur de l'urée à 99,2 %, est stable à 37°C, si bien que dès qu'une molécule d'acide isocyanique réagit avec une protéine, une nouvelle molécule se forme à partir de l'urée pour respecter l'équilibre. Les concentrations plasmatiques de cyanate sont d'environ 141 nM pour des patients urémiques avant dialyse et 45 nM pour des patients non urémiques [Nilsson *et al.*, 1996].

L'acide isocyanique formé réagit avec les groupements NH_2 des acides aminés ou des protéines pour former respectivement des α -carbamil-acides aminés (C-AA) et des **protéines carbamylées** (figure 14). La fixation d'acide isocyanique sur les groupements NH_2 est un processus **irréversible** alors qu'elle est réversible lorsqu'elle a lieu sur les groupements thiols (résidus cystéine) ou hydroxyles (résidus sérine, thréonine et tyrosine). Deux types de groupements NH_2 peuvent être impliqués dans la réaction de carbamylation : le groupement α - NH_2 de l'acide aminé libre ou en position N-terminale d'une protéine et le groupement ϵ - NH_2 de la chaîne latérale des résidus de lysine. Lorsque la fixation a lieu sur ce dernier groupement, l'acide aminé ainsi formé est nommé ϵ -amino-carbamil-lysine ou **homocitrulline** [Stark, 1967].

L'acide isocyanique présente une réactivité différente vis à vis de ces deux types de groupements NH_2 . En effet, la réaction, qui dépend du pKa du groupement, est cent fois plus

rapide avec le groupement α -NH₂ qu'avec le groupement ε -NH₂ [Stark, 1965]. La vitesse de cette réaction dépend également de l'exposition et de l'accessibilité du groupement.

Les quantités importantes d'urée trouvées dans le sérum des patients souffrant d'IRC constituent donc un « pool » précurseur de cyanate représentant un potentiel de carbamylation important. Le cyanate peut être considéré comme une véritable toxine urémique capable d'interagir avec les protéines circulantes et tissulaires, entraînant des modifications de leurs propriétés structurales et fonctionnelles. D'autre part, la carbamylation des acides aminés libres peut interférer avec le métabolisme protéique et notamment la synthèse protéique [Kraus LM et Kraus AP, 2001].

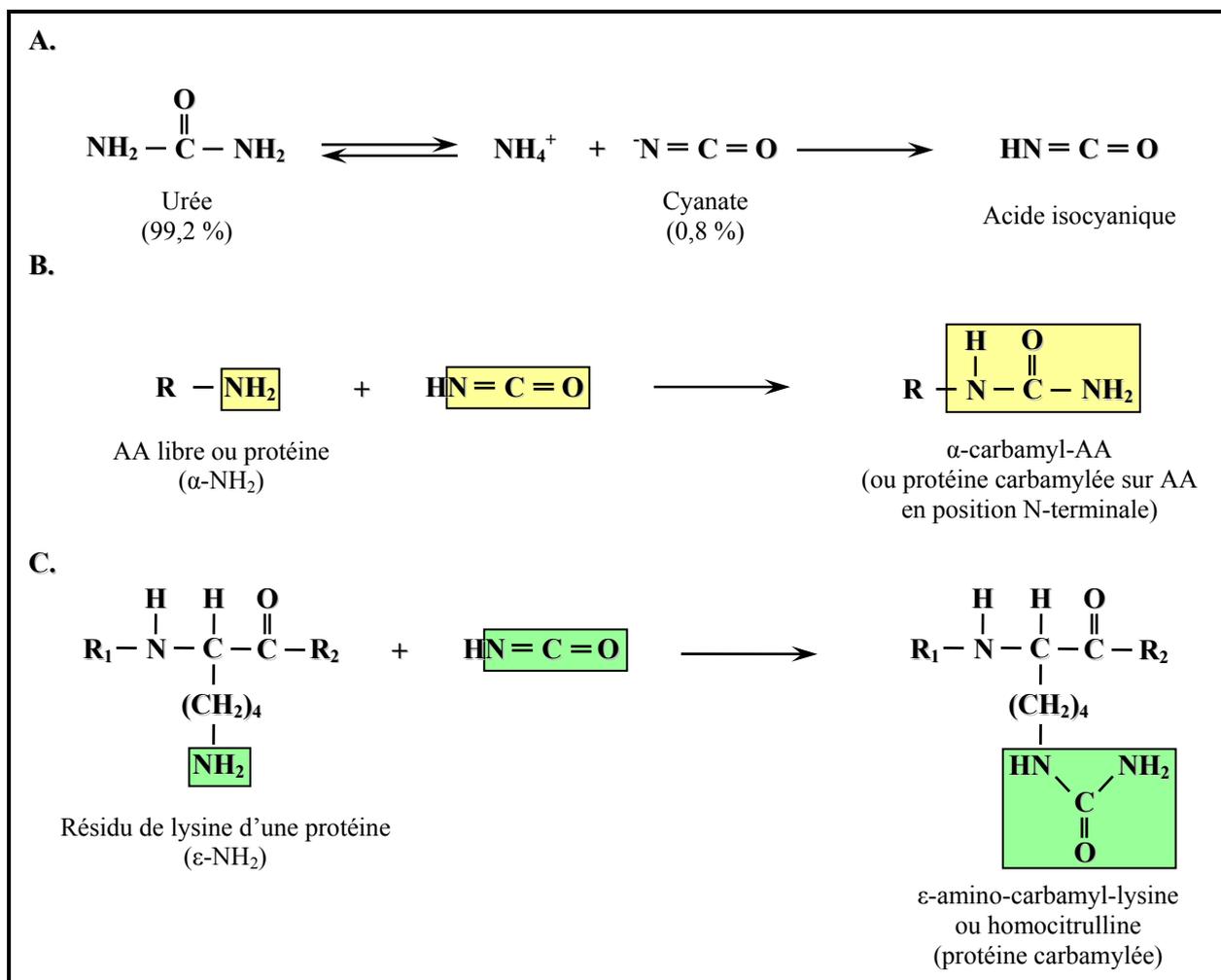


Figure 14. La réaction de carbamylation (Reproduit d'après Kraus LM et Kraus AP, 1998).

L'urée se décompose spontanément en ammoniacque et cyanate qui est immédiatement transformé en acide isocyanique (A). L'acide isocyanique interagit avec les groupements α -NH₂ des AA libres ou des protéines (B) ou ε -NH₂ (C) pour former respectivement des α -carbamil-acides aminés ou des résidus homocitrulline caractéristiques des protéines carbamylées.

I.4.2.2. Carbamylation des protéines *in vivo* et processus physiopathologiques

La carbamylation des protéines par l'acide isocyanique a été mise en évidence *in vivo* de manière indirecte dans les années 70, lorsque l'urée était utilisée comme traitement contre les effets indésirables de la drépanocytose. Cette maladie est caractérisée par la morphologie particulière des hématies (en forme de faucilles) due à la polymérisation et à l'agrégation d'une forme mutée de l'hémoglobine, l'HbS [Merciris *et al.*, 2000]. Le traitement par l'urée permettait de contrecarrer ces effets en inhibant la falciformation des globules rouges. L'élucidation du mécanisme d'action de l'urée a montré que l'acide isocyanique, produit de décomposition de l'urée, interagissait avec le groupement α -NH₂ de l'acide aminé situé en position N-terminale des chaînes α et β de l'HbS. Cette interaction provoque un changement conformationnel [Simons *et al.*, 1976] influençant les fonctions de l'hémoglobine S en augmentant son affinité pour l'oxygène tout en inhibant son agrégation [Cerami et Manning, 1971 ; Nigen *et al.*, 1974]. Cependant, l'utilisation d'urée dans le traitement des symptômes de la drépanocytose fut par la suite stoppée à cause de l'apparition d'effets secondaires parmi lesquels une augmentation du nombre de cataractes [Nicholson *et al.*, 1976].

Ces observations eurent néanmoins pour intérêt de montrer pour la première fois que l'urée présente dans le compartiment sanguin était capable d'interagir avec les protéines circulantes, provoquant des modifications de leurs propriétés structurales et fonctionnelles.

I.4.2.2.1. Cataracte

Compte-tenu de la corrélation entre le traitement par l'urée dans la drépanocytose et le développement de cataractes, certains auteurs se sont intéressés à l'influence de la carbamylation sur les protéines du cristallin.

Qin *et al.* ont montré que la carbamylation des α -cristallines, protéines du cristallin, impliquait les sept résidus de lysine de la protéine et que ces résidus possédaient différents degrés de réactivité [Qin *et al.*, 1992]. La transformation des résidus de lysine en homocitrulline induit une diminution du nombre de charges positives de la protéine, entraînant un changement conformationnel à l'origine de l'agrégation des α -cristallines et de l'altération de l'interaction protéine-protéine et protéine-eau nécessaire au maintien de la transparence du cristallin [Beswick et Harding, 1984 ; Martin et Harding, 1989]. La sévérité de la cataracte est corrélée au nombre de résidus de lysine carbamylés [Qin *et al.*, 1992].

L'apparition progressive de l'opacité du cristallin est liée au syndrome urémique, comme en témoigne l'incidence plus élevée de cataractes chez les patients atteints d'IRC [Berlyne *et al.*, 1972].

Par ailleurs, la carbamylation des protéines du cristallin a permis d'apporter des informations essentielles sur cette modification post-traductionnelle. En effet, en raison de leur renouvellement pratiquement nul et du caractère cumulatif de la carbamylation, les protéines du cristallin constituent des cibles préférentielles, si bien que le cristallin a même été proposé comme reflet des mécanismes de vieillissement [Harding *et al.*, 1989]. Ces données suggèrent l'impact majeur du processus de carbamylation sur les protéines à demi-vie longue.

I.4.2.2.2. Insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique, caractérisée par une urémie élevée, reste le contexte pathologique le plus favorable au processus de carbamylation. Les protéines carbamylées, identifiées à l'heure actuelle dans le cadre d'une IRC, sont pour la plupart circulantes, mais la carbamylation des protéines tissulaires est désormais envisagée. Les principales protéines carbamylées décrites jusqu'à présent dans la littérature sont les suivantes :

- **L'hémoglobine**

L'hémoglobine est la protéine du compartiment sanguin qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études à l'heure actuelle. Elles ont porté non seulement sur l'impact structural de la carbamylation (§ I.4.2.2), mais aussi sur la caractérisation des relations entre hémoglobine carbamylée et urémie.

Une corrélation avait été établie entre l'hémoglobine glyquée (HbA_{1c}) et la concentration d'urée des patients IRC avant dialyse par Flückiger *et al.* en 1981, mais cette observation était liée à l'interférence de l'hémoglobine carbamylée sur le dosage de l'hémoglobine glyquée.

Par la suite, le dosage spécifique de l'hémoglobine carbamylée par chromatographie liquide haute performance (mesure de la carbamyl-valine NH₂-terminale), a permis de démontrer une relation linéaire entre hémoglobine carbamylée et concentration d'urée plasmatique chez les sujets insuffisants rénaux chroniques non dialysés [Kwan *et al.*, 1990]. De plus, les dosages d'hémoglobine carbamylée réalisés chez des sujets sélectionnés à différents stades de l'insuffisance rénale ont montré globalement que les taux d'hémoglobine carbamylée étaient faibles dans l'IRA et élevés en cas d'IRC [Han *et al.*, 1997 ; Kwan *et al.*, 1992]. D'une manière

générale, la relation entre urée et hémoglobine carbamylée est linéaire dans l'IRA et exponentielle dans l'IRC [Stim *et al.*, 1995]. Par conséquent, la carbamylation de l'hémoglobine est dépendante de la concentration urémique moyenne mais également de la durée d'exposition à l'urée [Davenport *et al.*, 1993].

A partir de ces constatations, certains auteurs ont proposé l'hémoglobine carbamylée comme marqueur biologique permettant d'établir une distinction entre insuffisance rénale aiguë et chronique [Davenport *et al.*, 1993 ; Tasanarong *et al.*, 2002 ; Wynckel *et al.*, 2000]. De la même manière que le dosage de l'hémoglobine glyquée dans le suivi du diabète, le dosage de l'hémoglobine carbamylée a également été proposé comme moyen de contrôle de l'efficacité de l'hémodialyse des patients IRC [Davenport *et al.*, 1996 ; Hasuike *et al.*, 2002 ; Tarif *et al.*, 1997], mais il reste jusqu'à présent assez peu utilisé en pratique clinique.

- **Les autres protéines des cellules sanguines**

Le cyanate peut également interagir directement avec les protéines membranaires des hématies ou des leucocytes, entraînant des modifications de leur comportement. La carbamylation des protéines membranaires altère les propriétés rhéologiques de la membrane des érythrocytes [Pieniazek et Gwozdinski, 2003 ; Trepanier *et al.*, 1996]. Le même phénomène a été observé pour les leucocytes isolés de patients urémiques. De plus, la carbamylation des protéines cytoplasmiques a été corrélée à une altération des fonctions des neutrophiles, à savoir une diminution de leur capacité de libération d'espèces réactives de l'oxygène [Kraus *et al.*, 1994].

- **Les lipoprotéines de faible densité (« Low Density Lipoproteins »)**

Chez les patients insuffisants rénaux chroniques, les troubles cardiovasculaires sont en partie expliqués par une hyperlipoprotéïnémie, et notamment une concentration élevée de lipoprotéines de faible densité (LDL) [Kumar et Shah, 2005 ; Roxborough et Young, 1995]. La carbamylation des LDL est relativement faible *in vivo* en raison de leur courte demi-vie, mais leur comportement est néanmoins différent de celui des LDL normales, et se traduit par une diminution de leur clairance et un catabolisme plus lent [Hörkkö *et al.*, 1992 ; Hörkkö *et al.*, 1994]. Plus récemment, les LDL carbamylés ont même été décrits pour leur capacité à induire l'apoptose des cellules endothéliales, ce qui pourrait contribuer à l'accélération des processus athérosclérotiques observés chez les sujets urémiques [Ok *et al.*, 2005].

D'autre part, Gonen *et al.* ont montré que la carbamylation d'environ 10 % des résidus de lysines des LDL suffisait à leur reconnaissance par les récepteurs « scavengers » présents à la surface des macrophages [Gonen *et al.*, 1983].

- **Les autres protéines plasmatiques**

Les protéines plasmatiques dans leur ensemble sont carbamylées au cours de l'insuffisance rénale chronique [Oimomi *et al.*, 1983 ; Oimomi *et al.*, 1985] et chez les patients hémodialysés [Balion *et al.*, 1998].

- **Les protéines matricielles**

La demi-vie des protéines étant un élément essentiel dans le processus de carbamylation des protéines *in vivo*, Kraus *et al.* ont émis l'hypothèse que les protéines de la matrice extracellulaire constitueraient des cibles de choix pour cette modification post-traductionnelle. Ils ont ainsi montré à l'aide d'un anticorps anti-homocitrulline, la présence de protéines carbamylées au sein du tissu conjonctif de reins de patients atteints d'IRC [Kraus *et al.*, 2001]. Cette étude montre qu'au-delà des protéines circulantes, toutes les protéines de l'organisme sont susceptibles d'être carbamylées pourvu qu'elles présentent une demi-vie suffisamment longue.

I.4.2.3. La carbamylation des protéines *in vitro*

La démonstration de la pertinence *in vivo* du processus de carbamylation a conduit à mener toute une série d'études *in vitro* sur l'identification des modifications structurales et fonctionnelles induites par la carbamylation de diverses protéines. Les travaux ont porté principalement sur :

- ⇒ Des **protéines du cytosquelette** : l'actine carbamylée présente un défaut de polymérisation [Kuckel *et al.*, 1993], tout comme la tubuline, incapable de s'assembler en microtubules après carbamylation [Mellado *et al.*, 1982].

- ⇒ Différents types d'**enzymes** (6-phosphogluconate déshydrogénase, pepsine, superoxyde dismutase, MMP-2) : la carbamylation de ces enzymes est systématiquement associée à une inhibition partielle ou complète de leur activité [Cocco *et al.*, 1982 ; Ganea et Harding, 1996 ; Kraus *et al.*, 2001 ; Rimon et Perlmann, 1968].

⇒ Des **hormones** : l'insuline [Oimomi *et al.*, 1987], de même que l'érythropoïétine perdent leur activité biologique *in vivo* chez le rat après carbamylation *in vitro* [Mun et Golper, 2000 ; Park *et al.*, 2004].

D'une manière générale, l'altération des propriétés structurales ou fonctionnelles des protéines étudiées fait suite à la transformation d'un faible nombre de résidus. La carbamylation d'un seul groupement du TIMP-2 (α -NH₂ de la cystéine N-terminale) suffit lui faire perdre son activité inhibitrice et sa capacité à activer la pro-MMP-2 via son interaction avec la MT1-MMP [Higashi et Miyazaki, 1999].

En conclusion, l'ensemble des protéines circulantes mais également les protéines tissulaires peuvent être concernées par ce phénomène, pourvu que leur **accessibilité** et leur **demi-vie** soient compatibles avec les paramètres qui régissent la réaction de carbamylation.

I.4.3. Rôle de la carbamylation des protéines dans la progression de l'insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique est la conséquence de nombreuses maladies rénales ou générales. Divers facteurs non spécifiques concourent à la **progression de l'insuffisance rénale** vers le stade terminal, même si la cause initiale de la maladie a disparu ou est contrôlée par un traitement adapté. L'enjeu de la néphrologie moderne est de réussir à contrôler et à ralentir cette progression par le biais de différentes stratégies thérapeutiques.

Plusieurs de ces facteurs ont été décrits comme favorisant le développement de l'IRC, parmi lesquels sont répertoriés [Combe *et al.*, 2000] :

⇒ La **néphropathie initiale** : la progression de l'IRC est plus rapide au cours des néphropathies glomérulaires et du diabète qu'au cours des néphropathies interstitielles.

⇒ La **pression artérielle** : elle est un facteur déterminant de la progression de l'IRC. Toutefois, un contrôle pharmacologique adéquat permet de s'affranchir de ses effets néfastes.

⇒ La **protéinurie** : son importance conditionne le rythme de progression de l'IRC, d'où la nécessité d'élaborer des régimes visant à diminuer la protéinurie, qui ont généralement un effet favorable sur la progression.

⇒ Des facteurs invariables tels que le **sexe** et la **race**. Les personnes de sexe masculins et de race noire présentent une progression plus rapide de l'IRC.

⇒ Le **tabac** : le tabagisme augmente considérablement le risque de progression vers le stade terminal.

A ces différents facteurs, il convient d'ajouter l'accumulation de déchets métaboliques, regroupés sous le terme de **toxines urémiques**, qui inhibent divers processus physiologiques ou biochimiques et conduisent à l'aggravation des complications caractéristiques de l'IRC (§ I.4.1.2) [Vanholder, 2003]. Parmi ces toxines, sont répertoriés tous les composés obtenus après modification post-traductionnelle des protéines, comme les produits avancés de glycation (autrement appelés « glycotoxines » [Vlassara, 1997]) ou les produits d'oxydation avancée des protéines.

A l'heure actuelle, nous n'avons pas suffisamment d'éléments nous permettant de définir l'implication des protéines carbamylées, en tant que toxines urémiques, dans la progression de l'IRC. La carbamylation des protéines *in vivo* a été mise en évidence, et l'IRC a été définie comme étant un contexte pathologique propice à ce type de réaction. Toutefois, il n'existe pas de données bibliographiques permettant d'établir un lien direct entre l'existence de protéines carbamylées et l'apparition de troubles cliniques chez des patients urémiques. Malgré tout, certaines expériences menées *in vitro* permettent d'envisager l'implication des protéines carbamylées dans l'apparition des complications de l'IRC. Par exemple, Ok *et al.* ont montré récemment que les LDL carbamylés induisent l'apoptose des cellules endothéliales et stimulent parallèlement la prolifération des cellules musculaires lisses, représentant un facteur potentiel d'athérosclérose chez les patients urémiques [Ok *et al.*, 2005].

I.5. HYPOTHESES DE TRAVAIL

Les éléments bibliographiques ont permis de montrer que la carbamylation, amplifiée au cours de l'IRC, était un processus cumulatif donc susceptible d'affecter préférentiellement les protéines à demi-vie longue. La carbamylation des protéines tissulaires a été peu étudiée jusqu'à présent, essentiellement par manque de techniques fiables et suffisamment sensibles de dosage de l'homocitrulline. Or, les protéines de la matrice extracellulaire, de par leur durée de vie relativement longue, représentent des cibles préférentielles pour cette modification post-traductionnelle. Parmi celles-ci, le collagène de type I, qui est un élément structural important participant à l'architecture globale du tissu conjonctif, est un candidat privilégié, par ailleurs modifié par d'autres réactions de ce type comme la glycation.

L'objectif de ce travail était de déterminer le rôle du collagène de type I carbamylé dans certains mécanismes de progression de l'IRC. Dans un premier temps, nous avons évalué de quelle manière la carbamylation affectait le collagène en tant qu'entité structurale du tissu conjonctif, et quelles répercussions elle pouvait entraîner *in vivo*, comme par exemple l'altération des propriétés mécaniques des tissus ou les processus fibrotiques. Ensuite, nous avons étudié la possible contribution de la carbamylation à l'apparition des troubles infectieux et inflammatoires au cours de l'IRC, en évaluant la capacité du collagène carbamylé à réguler les fonctions cellulaires des polynucléaires neutrophiles.

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé différents modèles expérimentaux permettant d'évaluer *in vitro* l'impact de la carbamylation sur les propriétés du collagène de type I, et plus particulièrement par l'étude :

- ⇒ des **modifications structurales et des caractéristiques physico-chimiques** du collagène I carbamylé, par des méthodes d'étude physiques et biochimiques.
- ⇒ de la résistance du collagène carbamylé à la **dégradation enzymatique**, pour envisager son renouvellement *in vivo* au sein de la matrice extracellulaire.
- ⇒ des **interactions entre collagène de type I carbamylé et PNN**, pour évaluer le degré de participation possible de la carbamylation à l'apparition des syndromes infectieux et inflammatoires observés au cours de l'IRC.

Chapitre II

MATERIEL & METHODES

II.1. MATERIEL ET REACTIFS

L'ensemble du matériel et des réactifs utilisés pour réaliser les différentes expériences ainsi que leur provenance ont été répertoriés dans les tableaux présentés ci-après (listes alphabétiques).

II.1.1. Liste du matériel

Matériel	Utilisation	Fournisseur
Appareil à point critique IFC 1100	Point critique	Jeol
Bandelettes IPG	IEF analytique	Biorad
Boudins de dialyse (MWCO 12-14 kDa)	Dialyse	Medicell Int.
Centrifugeuse	Centrifugation	Eppendorf
Centrifugeuse	Centrifugation	Beckman
Compteur à β -scintillation Tricarb 2100TR	Radioactivité	Packard
Elutatube	Extraction d'ADN	Fermentas
Hémacytomètre de Neubauer	Culture cellulaire	Dominique Dutscher
Hotte à flux laminaire MSC12	Culture cellulaire	Jouan
HPLC L8800	Chromatographie	Hitachi
Lecteur de microplaques Multiskan Plus	Spectrophotométrie	Titertek
Logiciel d'analyse densitométrique BioProfil	Traitement des données	Vilbert Lourmat
Logiciel OPUS NT	Spectroscopie FTIR	Bruker Optics
Logiciel PDQuest 4.0	Traitement des données	Biorad
Luminomètre Lumac3M	Mesure de la luminescence	Biocounter
Lyophilisateur	Lyophilisation	Edman
Membrane en difluorure de polyvinylidène Immobilon-P	Transfert	Millipore
Microscope électronique à balayage JSM 5400 LV	Observation au MEB	Jeol
Microspectromètre Raman Lab Ram	Spectroscopie	Jobin Yvon
Mini Protean 3	Electrophorèse	Biorad
pH-mètre	pH	Metler Toledo
Plaques de culture Nuncleon Delta	Culture cellulaire	Dominique Dutscher
Polarimètre	Polarimétrie	Jasco
Protean IEF cell	IEF analytique	Biorad

ROTOFOR	IEF préparative	Biorad
Spectromètre CD6	Dichroïsme circulaire	Jobin Yvon
Spectromètre Equinox 55 (Spectroscopie IR)	Spectroscopie	Bruker Optics
Spectrophotomètre DU640	Spectrophotométrie	Beckman
Thermocycleur	PCR	Eppendorf
Transblot	Transfert	Biorad

II.1.2. Liste des réactifs

Les différents réactifs chimiques et solvants utilisés au cours des expériences sont de qualité analytique et ont été fournis respectivement par Euromedex et Prolabo, à l'exception de ceux mentionnés dans la liste ci-dessous.

Réactifs	Fournisseurs
β -mercaptoéthanol	Sigma
[³ H]-NaBH ₄ (Activité Spécifique : 20-40 Ci/mmol)	Amersham
1,4-dithiothréitol (DTT)	Sigma
4-chloro-1-naphtol	Sigma
4-L-trans-hydroxyproline	Merck
Acide Ethylene-diamine-tetraacétique (EDTA)	Sigma
Acide phényl-mercuriacétique (APMA)	Sigma
Acide ϵ -amino-caproïque (AHA)	Sigma
Amorces pour PCR	MWG Biotech
Ampholytes Bio-Lytes	Biorad
Anticorps anti-intégrines	Santa Cruz
Azide de sodium (NaN ₃)	Sigma
Benzamidine	Sigma
Bleu de Coomassie (R-250 et G-250)	Sigma
Bleu de Nitrotétrazolium	Sigma
Bleu trypan	Sigma
Bromure de cyanogène (CNBr)	Sigma
Collagénase bactérienne qualité CLSPA	Roche Diagnostics
Désoxynucléotides triphosphates (dNTP)	Invitrogen
Diéthylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma
Enzymes de restriction EcoRI et NotI	Invitrogen
Glutaraldéhyde	Sigma
Glutathion réduit	Sigma
Glycérol	Sigma
Huile minérale	Biorad
Hypoxanthine	Sigma
Luminol	Sigma

Milieu de culture « Luria Bertani » (LB)	Invitrogen
N-Ethyl-Maléimide	Sigma
para-amino-phényl-mercuriacétate	Sigma
Pepsine	Sigma
Phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF)	Sigma
Phosphatase alcaline bactérienne	Fermentas
Phosphate de pyridoxal	Sigma
Plasmide pGEX-4T-3	Amersham
Polymorphprep [®]	AbCys
Pro-MMP-1 (Activité spécifique > 15 mU/mg)	Calbiochem
Pro-MMP-13 (Activité spécifique > 50 mU/mg)	Calbiochem
Pro-MMP-2 (Activité spécifique > 600 mU/mg)	Calbiochem
Pro-MMP-8 (Activité spécifique > 40 mU/mg)	Calbiochem
Pro-MMP-9 (Activité spécifique > 1000 mU/mg)	Calbiochem
Protéinase K	Sigma
Rapid DNA ligation kit	Roche
Résine glutathion-sépharose	Amersham
RNasine	Promega
Standards protéiques de hautes masses moléculaires	Sigma
Standards protéiques pour électrophorèse 2D	Biorad
Tampon Ecoreact3	Invitrogen
Tampon phosphate PBS	Gibco
Taq Polymérase (5 U/μL)	Invitrogen
Thrombine (AS = 2 000 U/mg)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween-20	Sigma
Violet cristal	Sigma
Xanthine oxydase	Sigma

II.2. METHODES

II.2.1. Extraction et carbamylation du collagène de type I

II.2.1.1. Préparation du collagène de type I acido-soluble

Le collagène de type I est extrait à partir de tendons de queues de rat (type Sprague Dawley) conservées congelées à -20°C [Piez *et al.*, 1963]. Au moment de l'extraction, les queues sont plongées dans l'éthanol 70 % (v/v) pendant 5 min pour être désinfectées. Les tendons sont extirpés en tirant sur l'extrémité de la queue à l'aide d'une pince et sont ensuite plongés 24 h à 4°C sous agitation dans un tampon d'extraction (Tris-HCl 10 mM ; NaCl 150 mM ; EDTA 10 mM ; NaN₃ 1 ‰ (m/v) ; pH 7,4) en présence d'inhibiteurs de protéases : benzamidine 5 mM ; PMSF 1 mM ; N-éthyl-maléimide 5 mM.

Après centrifugation (10 000 g ; 30 min ; 4°C), les tendons sont placés dans l'acide acétique 500 mM pendant 48 h à 4°C sous agitation. Au volume de surnageant obtenu après centrifugation (10 000 g ; 30 min ; 4°C) est ajouté un volume égal d'acide acétique 500 mM contenant 1,4 M NaCl (0,7 M final : précipitation spécifique des collagènes fibrillaires). Après 24 h d'agitation à 4°C, un précipité de collagène se forme. Ce précipité est centrifugé (10 000 g ; 30 min ; 4°C) puis solubilisé dans de l'acide acétique 18 mM pendant 24 h à 4°C. Le collagène soluble est ensuite dialysé contre de l'eau distillée pendant 5 jours à 4°C puis lyophilisé. Sous sa forme lyophilisée, le collagène peut être conservé pendant plusieurs mois à - 80°C.

Avant toute utilisation, le collagène lyophilisé est stérilisé par des bains successifs d'éthanol 70 % (v/v) (2 bains de 30 min et 1 bain de 24 h à 4°C). L'éthanol est ensuite éliminé et le collagène séché sous hotte stérile pendant 30 min, pour éliminer l'excédent d'éthanol, puis solubilisé à la concentration de 2 mg/mL dans une solution d'acide acétique 18 mM sous agitation pendant 24 h à 4°C.

Pour vérifier l'absence d'endotoxines dans nos préparations de collagène, un dosage d'endotoxines est réalisé à la suite de l'étape de solubilisation (dosage effectué au laboratoire d'hématologie du Pr Nguyen, CHU de Reims). Par ailleurs, la pureté du collagène préparé est vérifiée par électrophorèse et par analyse de la composition en acides aminés.

II.2.1.2. Carbamylation du collagène de type I

Les conditions de carbamylation ont été déterminées d'après les travaux de Qin *et al.* [Qin *et al.*, 1992]. La carbamylation s'effectue par incubation du collagène pendant 2, 6 ou 24 h à 37°C dans un tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) 150 mM pH 7,4 contenant 100 mM de KCNO. Parallèlement, le collagène est incubé dans les mêmes conditions en remplaçant le KCNO par du KCl ; ce collagène sert de collagène témoin. Les solutions de collagène sont ensuite dialysées contre l'eau du robinet (24 h à 4°C), contre de l'eau distillée (3 jours à 4°C) puis contre de l'acide acétique 18 mM (24 h à 4°C). Après lyophilisation, les collagènes témoin et carbamylé sont conservés à -80°C.

Pour certaines expériences, l'urée a été utilisée à la place du KCNO comme agent de carbamylation. Dans celles-ci, le collagène a été incubé pendant 3 ou 6 mois à 37°C en tampon phosphate pH 7,4 contenant 50 mM d'urée.

Dans le cas de l'analyse structurale et de la dégradation protéolytique du collagène, les expériences ont été réalisées à partir d'un même lot de collagènes carbamylés. En revanche, pour l'étude de l'interaction avec les PNN, un nouveau lot est préparé approximativement tous les trois mois, car une plus longue conservation entraîne une perte progressive de la capacité du collagène à activer les PNN.

II.2.2. Méthodes d'étude des propriétés structurales du collagène

II.2.2.1. Analyse électrophorétique

Le collagène est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (ou SDS-PAGE) selon le protocole décrit par Laemmli [Laemmli, 1970] qui permet une séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente. Un gel de séparation à 5 ou 12,5 % (m/v) de polyacrylamide (selon les échantillons à analyser) est préparé (en tampon Tris-HCl 375 mM ; SDS 0,1 % (m/v) ; APS 0,05 % (m/v) ; TEMED 0,05 % (v/v) ; pH 8,8) et coulé entre deux plaques de verres séparées d'un espaceur. Après polymérisation du gel de séparation, un gel de concentration à 4 % (m/v) de polyacrylamide est préparé (en tampon Tris-HCl 125 mM ; SDS 0,1 % (m/v) ; APS 0,05 % (m/v) ; TEMED 0,05 % (v/v) ; pH 6,8) et déposé sur le premier gel.

Les protéines à analyser sont mélangées volume à volume avec du tampon de Laemmli (Tris-HCl 125 mM ; SDS 4 % (m/v) ; glycérol 10 % (v/v) ; bleu de bromophénol 0,01 % (m/v) ; pH 6,8). Les échantillons sont ensuite réduits par 1 % (v/v) de β -mercaptoéthanol puis dénaturés par chauffage (3 min à 90°C) avant d'être déposés. Le gel est placé dans une cuve à électrophorèse en présence de tampon de migration (Tris-HCl 25 mM ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1 % (m/v)) et soumis à un courant de 100 V pendant 2 h à 4°C.

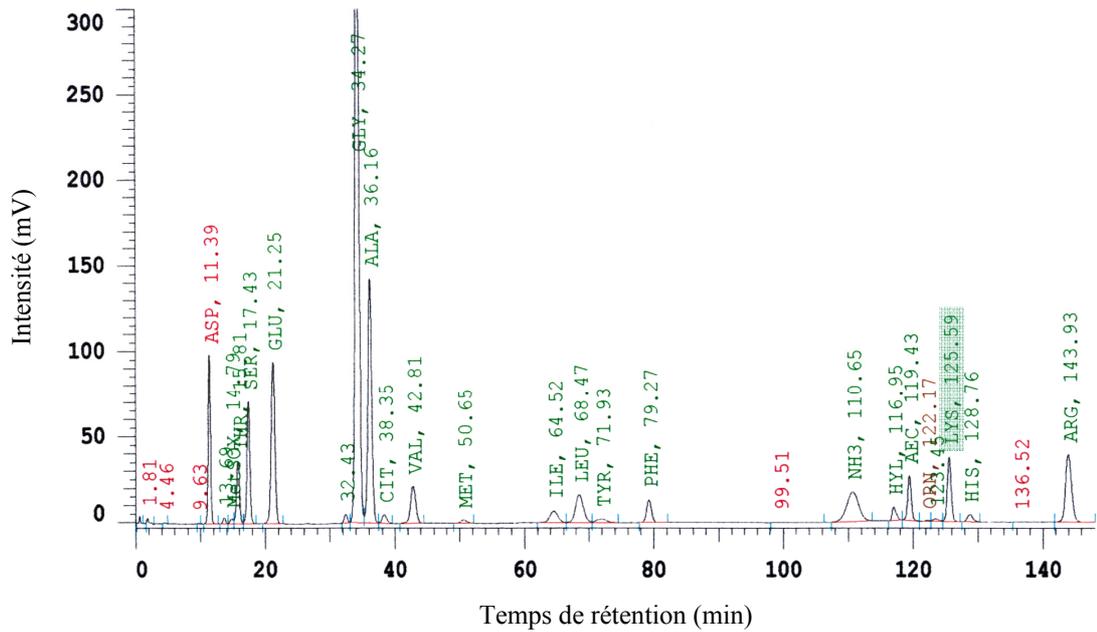
A la fin de la migration, le gel est démoulé puis incubé dans une solution de coloration (acide acétique 7 % (v/v) ; méthanol 40 % (v/v) ; bleu de Coomassie R-250 0,05 % (m/v)) pendant 20 min sous agitation. La décoloration du gel est effectuée par des bains successifs d'acide acétique 10 % (v/v).

II.2.2.2. Analyse de la composition en acides aminés

Le collagène est hydrolysé dans les conditions suivantes : 200 μ L d'une solution de collagène à 2 mg/mL sont dilués au demi avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 12 M et incubés pendant 18 h à 110°C dans une ampoule de verre scellée. Les hydrolysats sont ensuite évaporés sous azote et les résidus repris dans 200 μ L d'eau distillée. Les échantillons sont analysés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) échangeuse de cations au Laboratoire de Biochimie du CHU de Reims sur analyseur Hitachi 8800 (ScienceTec, Les Ullis, France). La séparation des AA est effectuée selon leur charge sous haute pression (100-105 bar), ce qui permet de garantir une bonne résolution et une quantification précise des AA. L'appareil est étalonné à l'aide d'un mélange d'acides aminés physiologiques acides, basiques et neutres, supplémenté en homocitrulline.

En sortie de colonne, les AA sont détectables, après avoir réagi avec la ninhydrine à 136°C, par spectrophotométrie à deux longueurs d'onde différentes : 570 nm pour les AA possédant des groupements amines primaires (NH_2) et 440 nm pour les AA possédant des groupement amines secondaires (NH). Le traitement des données, ainsi que la gestion de l'automate, sont effectués grâce au logiciel ASM (« Amino acid System Manager »). Les résultats sont présentés sous la forme de chromatogrammes, sur lesquels apparaissent les pics correspondant aux différents AA (figure 15).

A.



B.

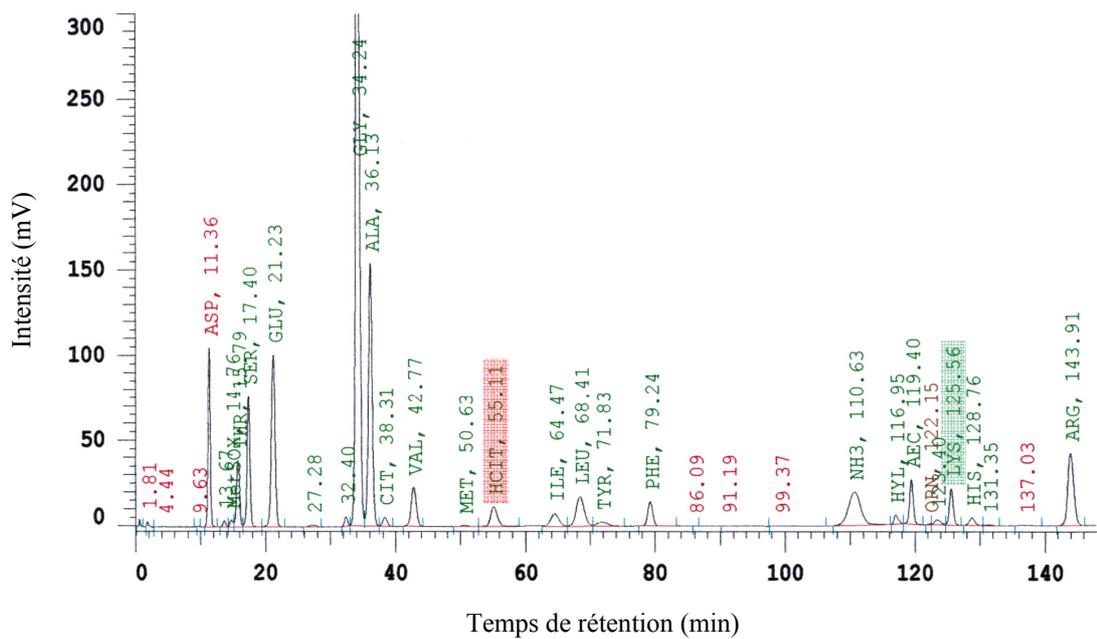


Figure 15. Chromatogrammes représentant la séparation des AA du collagène.

Le collagène témoin (A) ou carbamylé 24h (B) est hydrolysé en milieu acide, puis les AA sont séparés par chromatographie échangeuse de cations. Après réaction avec la ninhydrine, les AA sont détectés par spectrophotométrie, dans un ordre qui dépend de leur pHi. Les pics correspondant à l'homocitrulline et à la lysine ont été surlignés.

II.2.2.3. Etude de la fibrillogenèse *in vitro*

L'effet de la carbamylation sur les propriétés de fibrillogenèse du collagène a été mise en évidence par deux tests différents :

Dans le premier test, la capacité du collagène à fibriller *in vitro* est déterminée par mesure des variations d'absorbance à 400 nm. Ce test consiste à mélanger 500 µL d'une solution de collagène à 1 mg/mL (dans l'acide acétique 18 mM) avec un volume identique de tampon phosphate 150 mM pH 7,4. Ce mélange est transféré dans une microcuve placée dans le compartiment thermostaté d'un spectrophotomètre. La température est maintenue à 30°C tout au long de la cinétique de fibrillogenèse et l'absorbance à 400 nm est mesurée à intervalles réguliers. La formation du gel de collagène est caractérisée par une augmentation de la turbidité du milieu, proportionnelle à l'absorbance à 400 nm (Turbidité à 400 nm = absorbance à 400 nm x 2,303 [Wood et Keech, 1960]). Dans ces expériences, une solution de collagène préalablement dénaturé par chauffage (60°C ; 30 min) est utilisée comme contrôle négatif de fibrillogenèse.

Le second test de fibrillogenèse permet d'évaluer l'homogénéité des gels de collagène. 1 mL de collagène en solution à 2 mg/mL dans l'acide acétique 18 mM est mélangé à 4°C à 150 µL NaOH 100 mM et 1,15 mL de tampon phosphate 150 mM pH 7,4. 300 µL de cette solution sont déposés dans les puits d'une plaque 24 puits afin d'obtenir un gel d'une épaisseur finale de 1 mm. Les plaques sont incubées durant 2 h à 37°C pour permettre la formation des gels, qui sont ensuite séchés une nuit à température ambiante sous une hotte à flux laminaire. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, les gels sont soit colorés au bleu de Coomassie R-250 (Acide acétique 7 % (v/v) ; méthanol 40 % (v/v) ; bleu de Coomassie 5 % (m/v)) soit directement observés en microscopie électronique à balayage (cf protocole de préparation des échantillons § II.2.2.7).

II.2.2.4. Mesure de la température de fusion des gels de collagène

Une solution de collagène à 1 mg/mL (en acide acétique 18 mM) est mélangée à volume égal de tampon phosphate 150 mM pH 7,4 comme décrit pour le test de fibrillogenèse (§ II.2.2.3) puis incubée pendant 90 min à 30°C afin d'obtenir un gel de collagène. Une fois formé, le gel est soumis à une augmentation constante de température (+ 0,5°C/min) jusqu'à ce que la température interne de la cuve atteigne 56°C. La turbidité à 400 nm est mesurée régulièrement pour suivre la dissociation progressive du gel. La température de fusion du gel correspond à la

température pour laquelle la turbidité à 400 nm est égale à la moitié de sa valeur maximale [Delorenzi *et al.*, 1996].

II.2.2.5. Analyse du collagène par dichroïsme circulaire (DC)

Le dichroïsme circulaire permet de donner des informations concernant la structure secondaire d'une protéine. Ces expériences ont été réalisées par le Pr. Sylvie Ricard-Blum à l'institut de biologie structurale JP Ebel (CNRS UMR 5075) de l'université Joseph Fourier de Grenoble.

Avant d'être analysées, les solutions contenant 200 µg/mL de collagène sont dialysées contre de l'acide acétique 50 mM. Les spectres de DC (190-260 nm) sont enregistrés à température ambiante à l'aide d'un spectromètre CD6 dans une cuve en quartz de trajet optique 1 mm. Les spectres obtenus représentent la moyenne de deux spectres pour chaque type de collagène, auxquels a été soustrait le spectre de l'acide acétique 50 mM. Pour mesurer la dénaturation de la triple hélice de collagène par la température, l'ellipticité molaire à 221 nm est mesurée au cours d'une augmentation progressive de température (de 20 à 65°C) selon un gradient linéaire de 2°C/min. La température de dénaturation de la triple hélice de collagène est déterminée grâce au point d'inflexion de ces courbes.

II.2.2.6. Méthodes d'analyse spectroscopique du collagène carbamylé

Les techniques de spectroscopie vibrationnelle donnent des informations structurales sur les protéines à un niveau moléculaire en mesurant les modes et intensités de vibration des liaisons covalentes des protéines. Les différentes analyses spectroscopiques ont été réalisées en collaboration avec les Drs. Ganesh Sockalingum et Grégory Kegelaer de l'unité MéDIAN (CNRS UMR 6142) à la faculté de pharmacie de l'université de Reims Champagne-Ardenne.

a) Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IR-TF)

Les spectres infra-rouge sont enregistrés en mode transmission sur des échantillons de collagènes compressés en fines pastilles. Ces pastilles sont préparées à partir d'un mélange d'environ 1 mg de collagène et de 99 mg de KBr comprimé sous une pression de 10 000 à 15 000 psi. Les échantillons apparaissent alors comme de fines pastilles transparentes qui permettent d'obtenir des spectres avec des valeurs comprises entre 0 et 1,5 unités d'absorbance.

Les mesures sont réalisées sur un spectromètre Equinox 55 (Bruker Optics, France) et l'acquisition des spectres est effectuée entre 4000 et 400 cm^{-1} en moyennant 64 accumulations à une résolution de 4 cm^{-1} à l'aide du logiciel OPUS NT (Bruker Optics). L'analyse statistique des spectres est réalisée en utilisant le programme IDENT du logiciel OPUS NT.

b) Spectroscopie Raman

Les spectres Raman sont enregistrés directement sur les fibres de collagène à l'aide d'un microspectromètre Raman (LabRam, Jobin-Yvon HORIBA, France). Une onde de 785 nm issue d'un laser de type Ti :Sa est utilisée comme source d'excitation. La puissance du laser sur l'échantillon est d'environ 80 mW et les paramètres expérimentaux restent constants pour chaque mesure : des séries de 10 acquisitions de 10 secondes chacune ; un microscope (Olympus BX40) équipé d'un objectif confocal (X100, ON = 0,9 μm) pour focaliser le laser et collecter la lumière diffusée ; un réseau de 950 lignes/mm pour disperser la lumière sur un détecteur type CCD. Ces paramètres permettent l'obtention de spectres d'une résolution spatiale de 6 μm et d'une résolution spectrale de 6-8 cm^{-1} . Les données Raman sont enregistrées pour une région spectrale comprise entre 1800 et 400 cm^{-1} puis traitées à l'aide du logiciel Labspec 4.04.

II.2.2.7. Méthodes d'étude de l'hélicité du collagène

Ces études ont été réalisées par le Pr. Véronique Larreta-Garde, du laboratoire ERRMECE de l'université de Cergy-Pontoise.

La polarimétrie permet de mesurer le pouvoir rotatoire d'une protéine. Ce pouvoir rotatoire est spécifique pour le collagène de type I, grâce à sa structure caractéristique en hélice de type polyproline, et révèle une structure en hélice gauche adoptée par les chaînes α individuelles. La torsion due à la formation de la triple hélice a peu d'effet sur la rotation optique mais la dénaturation de la structure individuelle de chaque chaîne α entraîne une diminution importante du pouvoir rotatoire. Celui-ci peut également varier avec le pH, la force ionique ou une augmentation de température. Par conséquent, la mesure du pouvoir rotatoire permet de fournir directement des informations sur l'état de la triple hélice de collagène [Giraudier *et al.*, 2004].

Toutes les expériences ont été réalisées à l'aide d'un polarimètre, muni d'un filtre à 435 nm et d'une cuve cylindrique thermostatée de 1 cm de trajet optique, piloté par le logiciel Spectra Manager. Toutes les mesures sont effectuées à 27°C sur des solutions de collagène à 2

mg/mL solubilisé dans l'acide acétique 18 mM, préalablement maintenues à cette température pendant 2 h avant la mesure.

L'appareil utilisé permet une lecture directe de l'angle de rotation α_λ exprimé en degrés. Cette grandeur est reliée au pouvoir rotatoire par l'équation suivante :

$$[\alpha]_\lambda = \alpha_\lambda / c \cdot l$$

où c est la concentration en soluté en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ et l la longueur du trajet optique en dm.

Pour toute valeur de α supérieure à 300 nm, l'information fournie par le pouvoir rotatoire est constante. Une longueur d'onde de 435 nm est choisie pour les mesures (référence habituelle pour le collagène).

Le taux d'hélices (X) au sein de la molécule de collagène est déterminé en appliquant la formule ci-après [Giraudier *et al.*, 2004] :

$$X = \frac{[\alpha]_\lambda^{\text{obs}} - [\alpha]_\lambda^{\text{dénat}}}{([\alpha]_\lambda^{100\% \text{ hélices}} - [\alpha]_\lambda^{\text{dénat}})}$$

Dans nos expériences, la valeur mesurée pour le collagène témoin est considérée comme le taux maximum d'hélices.

II.2.2.8. Microscopie électronique à balayage

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Sandrine Lorimier du laboratoire des biomatériaux (INSERM ERM 0203) de la faculté d'odontologie de Reims.

Les observations en microscopie électronique à balayage concernent plusieurs expériences nécessitant différentes conditions de préparation des échantillons. Ainsi, l'état de fibrillation du collagène a été analysé à partir d'un gel de collagène polymérisé sur lamelle de verre ; la structure des fibres a été observée à partir de collagène lyophilisé, préalablement congelé dans l'azote liquide puis délicatement fracturé ; et enfin, la morphologie des PNN après contact avec le collagène a été évaluée après une incubation de 2 h des cellules sur une lamelle de verre recouverte d'un tapis de collagène (cf protocole de préparation du tapis de collagène § II.2.4.2).

Systématiquement, la préparation des échantillons débute par une phase de lavages en tampon phosphate PBS suivie d'une étape de fixation par addition d'une solution de glutaraldéhyde 2,5 % (v/v) pendant 1 heure à température ambiante. Après plusieurs rinçages en

PBS, les échantillons sont déshydratés par passages successifs dans des solutions alcooliques de concentration croissante : éthanol à 50 % (v/v), 10 min ; éthanol à 70 % (v/v), 10 min ; éthanol à 95 % (v/v), 10 min et éthanol à 100 % (v/v), 2 fois 10 min. Les lamelles sont ensuite plongées dans une solution d'alcool-acétone (volume à volume) pendant 15 min puis dans une solution d'acétone pur pendant 2 fois 10 min. Les prélèvements sont amenés au point critique (41°C, 73 atmosphères). A volume constant, la température du CO₂ liquide est élevée au-dessus de celle du point critique permettant un passage continu de la phase liquide à la phase gazeuse et ceci à l'aide d'un appareil à point critique.

Les échantillons sont finalement métallisés à l'or palladium dans un évaporateur cathodique et observées à l'aide d'un microscope électronique à balayage.

II.2.2.9. Analyse des CB-peptides par électrophorèse bidimensionnelle

a) Digestion du collagène par le bromure de cyanogène (CNBr)

Les peptides issus de la dégradation du collagène par le bromure de cyanogène (CB-peptides) ont été préparé selon le protocole décrit par Epstein *et al.* [Epstein *et al.*, 1971]. Le collagène est solubilisé à une concentration de 10 mg/mL dans l'acide formique 70 % (v/v) puis incubé en présence de 5g de CNBr pendant 4 h à 30°C sous agitation douce. L'acide formique est évaporé sous azote puis le culot repris par 1 mL d'eau distillée. Les CB-peptides sont ensuite lyophilisés et solubilisés dans l'eau distillée à une concentration de 4 mg/mL.

Les CB-peptides ont été étudiés par électrophorèse bidimensionnelle, technique qui permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique ou pHi (première dimension : isoélectrofocalisation ou IEF) et leur masse moléculaire (seconde dimension : SDS-PAGE). Elle comporte plusieurs étapes :

b) Réhydratation des bandelettes

Le support pour l'isoélectrofocalisation est constitué de bandelettes de gels pré-coulés à gradient de pH immobilisé (IPG) qui garantissent la reproductibilité des gradients de pH. Les bandelettes utilisées lors de nos expériences mesurent 7 cm et permettent d'établir un gradient allant de 3 à 10 unités pH. Avant de procéder à l'isoélectrofocalisation, les bandelettes doivent être réhydratées en présence de l'échantillon. Pour cela, 300 µg de CB-peptides sont repris par

250 μ L de tampon de réhydratation (urée 8 M ; CHAPS 4% (m/v) ; ampholytes Bio-Lytes (pH 3-10) 0,2 % (v/v) ; DTT 200 mM) puis déposés dans le compartiment à IEF. Une bandelette d'IPG est mise en contact avec l'échantillon puis recouverte d'huile minérale afin d'éviter toute déshydratation. La réhydratation s'effectue sous un courant de 50 V pendant 10 h à température ambiante.

c) Première dimension : isoélectrofocalisation

Suite à l'étape de réhydratation, des papiers filtres humidifiés sont disposés entre la bandelette d'IPG et les électrodes, afin de collecter l'excès de sels, puis la bandelette est à nouveau recouverte d'huile minérale. La focalisation s'effectue en trois étapes : le conditionnement (250 V pendant 15 min à 20°C), la montée en voltage qui s'effectue de manière linéaire jusqu'à 4 000 V et la focalisation finale (20 000 volts/h pendant 5 h).

d) Etape d'équilibration

Avant d'effectuer l'électrophorèse, les bandelettes d'IPG sont équilibrées dans un tampon d'équilibration (Tris-HCl 375 mM ; urée 6 M ; glycérol 20 % (m/v) ; SDS 2 % (m/v) ; pH 8,8) contenant 130 mM de DTT pendant 15 min à température ambiante. Ensuite, afin de minimiser la réoxydation des protéines au cours de l'électrophorèse, les bandelettes sont incubées dans le tampon d'équilibration contenant 135 mM d'iodoacétamide durant 20 min à température ambiante puis rincées plusieurs fois dans le tampon d'équilibration.

e) Seconde dimension : SDS-PAGE

Un gel de séparation à 12,5 % (m/v) de polyacrylamide est tout d'abord préparé. La bandelette d'IPG est déposée sur le gel puis recouverte d'une solution à 1 % (m/v) d'agarose contenant 0,1 % (m/v) de bleu de bromophénol préalablement chauffée. Après refroidissement, l'agarose englobe la bandelette pour former un pseudo-gel de concentration. Parallèlement, des marqueurs de masse moléculaire sont déposés à une des extrémités de la bandelette. La migration s'effectue en tampon Tris-HCl 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0,1 % (m/v) sous un voltage constant de 100 V pendant 15 min pour l'élution des protéines à partir de la bandelette, puis à 200 V pendant environ 1 heure. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R-250.

f) Détermination du pHi des protéines séparées par électrophorèse 2D

Après coloration, le pHi des protéines isolées peut être déterminé à l'aide du logiciel PDQuest[®]. Pour cela, une électrophorèse bidimensionnelle d'un mélange de protéines connues est réalisée parallèlement à l'analyse des échantillons (figure 16). Cette électrophorèse permet la calibration du logiciel indispensable pour l'évaluation ultérieure du pHi des protéines ou peptides étudiés.

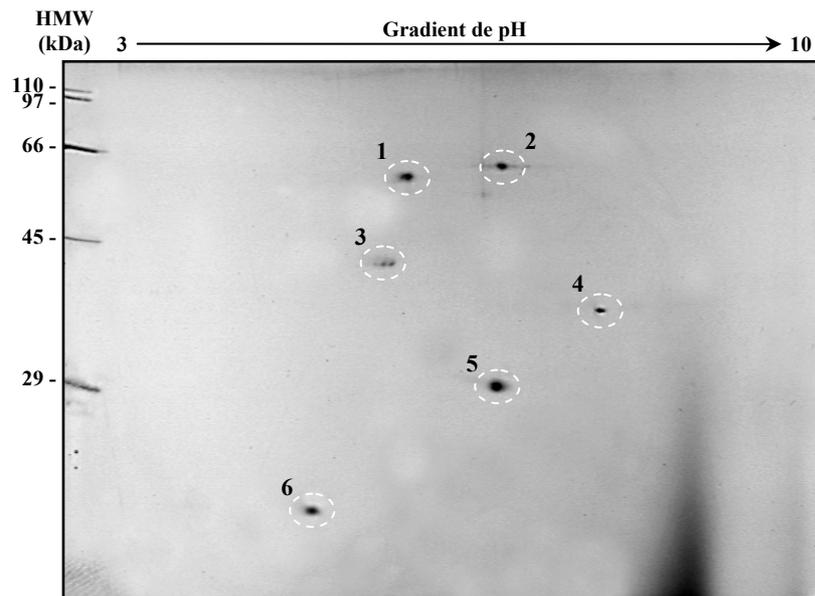


Figure 16. Electrophorèse bidimensionnelle des standards protéiques.

5 μ L d'un mélange de protéines de pHi et masse moléculaire connus est soumis à une électrophorèse bidimensionnelle (IEF : pHi de 3 à 10 et SDS-PAGE 12,5 % (m/v) polyacrylamide). Après coloration au bleu de Coomassie R-250, les différentes protéines sont identifiées : (1) : albumine, 66 kDa / pHi : 5,5 ; (2) : conalbumine, 76 kDa / pHi : 6,3 ; (3) : actine, 43 kDa / pHi : 5,1 ; (4) : glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, 36 kDa / pHi : 8,3 ; (5) : anhydrase carbonique, 31 kDa / pHi : 6,0 ; (6) : inhibiteur de trypsine, 21,5 kDa / pHi : 4,5. Des marqueurs de masse moléculaire (HMW) sont déposés parallèlement sur l'extrémité gauche du gel.

II.2.2.10. Purification des CB-peptides par IEF préparative

a) Principe et description de l'appareil

L'IEF préparative a été réalisée à l'aide d'un ROTOFOR[®], appareil qui permet de séparer les protéines en veine liquide selon leur point isoélectrique (pI ou pHi). Cet appareil est constitué

d'une chambre de focalisation cylindrique de 55 mL, réfrigérée en son centre par un tube de céramique refroidi par circulation d'eau. Cette chambre est divisée en 20 compartiments par 19 membranes en polyester et entourée par les réservoirs de l'anode (H_3PO_4 100 mM) et de la cathode (NaOH 100 mM). Sous l'effet d'un courant électrique, un gradient de pH est établi grâce à des ampholytes de type Bio-Lytes[®] (pH : 4 à 8).

b) Isoélectrofocalisation préparative

Avant d'effectuer le montage, la chambre de focalisation est abondamment rincée à l'eau distillée pour éliminer toutes traces d'électrolytes. Dès que le système de focalisation est assemblé, la chambre est remplie par 45 mL d'eau distillée, 2 mL de glycérol et 1 mL d'ampholytes. Le ROTOFOR est mis sous tension (12 W limitants, ampérage et voltage au maximum). Lorsque la tension est stabilisée, la solution de CB-peptides à 10 mg/mL est déposée (après arrêt du courant) dans la chambre puis la focalisation se poursuit sous agitation (1 tpm).

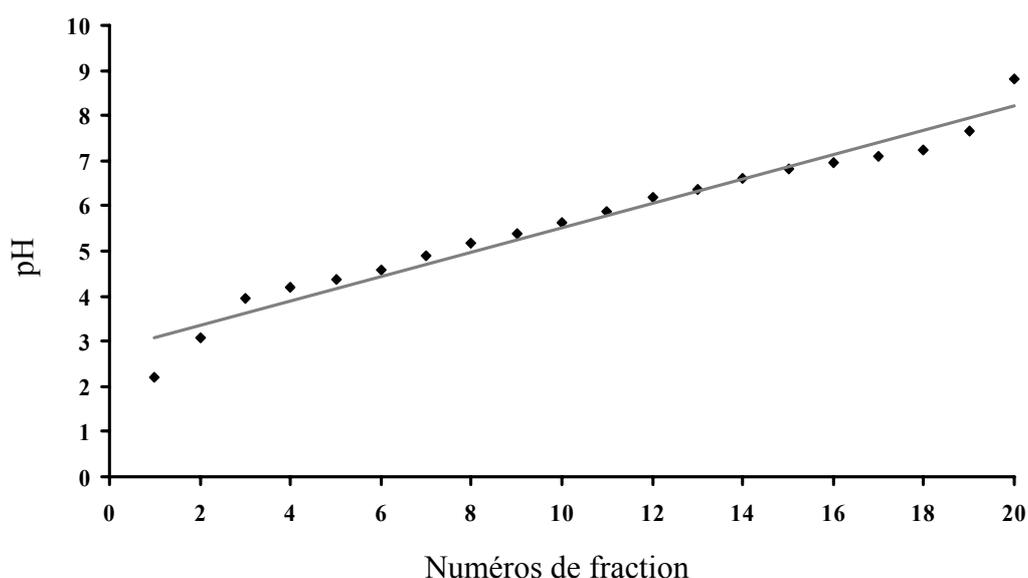


Figure 17. Gradient de pH obtenu après isoélectrofocalisation préparative.

Après l'isoélectrofocalisation, les 20 fractions sont récoltées et leur pH respectif est mesuré. La linéarité du gradient est vérifiée en traçant la droite $\text{pH} = f(\text{numéros de fractions})$. Dans ce cas, le coefficient de régression linéaire R^2 est égal à 0,96.

Lorsque la tension est à nouveau stabilisée, les fractions correspondant aux compartiments de la chambre sont recueillies par aspiration dans des tubes à hémolyse. Le pH de chacune d'entre elles est mesuré pour vérifier la linéarité du gradient (figure 17). Chaque fraction

est dans un second temps analysée par SDS-PAGE. La résolution de la séparation peut être améliorée par le biais d'une seconde isoélectrofocalisation réalisée directement à partir de fractions sélectionnées (contenant les protéines d'intérêt), ce qui permet d'affiner le gradient de pH.

II.2.3. Méthodes d'étude de la sensibilité du collagène vis à vis des protéinases

II.2.3.1. Etudes de la dégradation du collagène par la collagénase bactérienne

a) Etude de la dégradation du collagène par dosage de la 4-Hydroxyproline

Pour ce premier test de dégradation, 2 mL d'une solution de collagène à 2 mg/mL dans l'acide acétique 18 mM sont dilués dans un volume identique de tampon Tris-HCl 100 mM ; NaCl 300 mM ; CaCl₂ 10 mM ; pH 7,4 contenant 6 unités/mL de collagénase bactérienne (extraite de *Clostridium histolyticum*, qualité CLSPA). Les échantillons sont incubés à 37°C sous agitation et des prélèvements sont effectués à différents temps d'incubation. On ajoute, à chaque échantillon, quatre volumes d'éthanol 100 % (v/v) pour précipiter le collagène non dégradé. La précipitation à 80 % (v/v) d'éthanol qui s'effectue durant une nuit à - 20°C est suivie d'une centrifugation (10 000 g ; 30 min ; 4°C). Le surnageant contenant la fraction de collagène dégradé est évaporé sous un courant d'azote et repris par 1 mL d'eau distillée. Le culot précipité par l'éthanol, contenant le collagène non dégradé, est dissous dans 1 mL d'acide acétique 18 mM.

Une hydrolyse acide de chaque fraction (culot et surnageant) est réalisée pour déterminer la quantité d'hydroxyproline de chaque échantillon. Pour cela, 200 µL de fraction, mélangés à 200 µL d'HCl 12 M, sont placés dans une ampoule scellée pendant 18 h à 110°C puis évaporés à sec sous azote. Suite à l'hydrolyse acide, chaque échantillon est repris par 2 mL d'eau distillée puis le dosage est réalisé sur chaîne Technicon (Laboratoire de Biochimie - CHU Reims). Ce dosage est basé sur la réaction d'oxydation du noyau pyrrole de la 4Hyp par la chloramine T en solution à 1,75 % (m/v) dans un tampon acétate citrate (Citrates trisodique, 3H₂O 136 mM ; acide citrique 25 mM ; acétate de sodium 420 mM ; Brij-35 0,1 % (m/v) ; isopropanol 38 % (v/v) ; pH 6,0) [Szymanowicz *et al.*, 1979]. L'oxydation est arrêtée par ajout d'une solution de para-diméthylaminobenzaldéhyde (15 % (m/v) ; acide perchlorique 20 % (v/v) ; isopropanol 80 % (v/v)) qui réagit avec le noyau pyrrole oxydé en formant un composé de couleur rouge détectable

à 550 nm. La concentration en 4Hyp en (exprimée en µg/échantillon) est calculée à l'aide d'une gamme d'étalonnage effectuée parallèlement avec une solution commerciale de 4Hyp de concentration connue.

b) Etude de la dégradation du collagène par électrophorèse

Ce test consiste à analyser, par électrophorèse, les fragments de la protéolyse du collagène par la collagénase bactérienne. Pour cela, 5 µg de collagène sont incubés pendant 2, 6 et 24 heures à 37°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM ; NaCl 150 mM; CaCl₂ 10 mM ; pH 7,4 contenant 0,2 unités de collagénase bactérienne par µg de collagène. La réaction est stoppée par addition d'un volume identique de tampon de Laemmli (cf § II.2.2.1) puis par chauffage (3 min à 90°C). La dégradation des chaînes α du collagène de type I est mise en évidence par SDS-PAGE à 6 % (m/v) de polyacrylamide. Après coloration du gel, l'analyse densitométrique des différentes bandes a été réalisée à l'aide du système d'analyse d'image BioProfil associé au logiciel BioCapt. La disparition progressive des bandes correspondant aux chaînes α du collagène permet d'établir un pourcentage de dégradation par comparaison avec le collagène non dégradé (sans collagénase).

II.2.3.2. Analyse par zymographie de la dégradation du collagène par les MMP

a) Principe

Nous avons utilisé la technique de zymographie pour mettre en évidence des différences de sensibilité du collagène carbamylé vis à vis des différentes protéinases. La particularité de cette technique d'électrophorèse est l'incorporation d'un substrat protéique (ici le collagène) dans le gel de séparation avant sa polymérisation. La séparation électrophorétique des protéinases est réalisée en fonction de leur masse moléculaire apparente, comme dans une SDS-PAGE classique. Les protéinases sont renaturées après élimination du SDS et les gels sont incubés 18 h à 37°C dans un tampon permettant le développement de l'activité enzymatique. La dégradation du substrat par les protéinases est ensuite mise en évidence, après coloration des gels au bleu de Coomassie, par l'apparition de bandes blanches sur fond bleu. L'intensité de dégradation est corrélée à la surface de la plage de lyse et donc proportionnelle à la quantité de protéinases présentes (dans une certaine zone de linéarité).

b) Zymographie en gel de collagène

Dans nos expériences, nous avons reproduit la technique décrite par Gogly [Gogly *et al.*, 1998] qui consiste à utiliser le collagène comme substrat protéique. L'utilisation de collagène comme substrat protéique impose certaines contraintes dans la préparation du gel de séparation. En effet, le gel de séparation à 10 % (m/v) de polyacrylamide contenant 0,5 mg/mL de collagène est préparé à 4°C puis soniqué pendant 5 secondes pour garantir une bonne homogénéisation du mélange sans pour autant dégrader le collagène. Après polymérisation du gel, des quantités variables de pro-MMP, diluées dans du tampon de Laemmli (cf § II.2.2.1), sont soumises à l'électrophorèse.

A la fin de la migration, le gel est rincé deux fois 30 min dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (m/v) sous agitation puis incubés pendant 18 h à 37°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,6. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie G-250 (acide acétique 10 % (v/v) ; méthanol 50 % (v/v) ; bleu de Coomassie G-250 0,5 % (m/v)) puis décoloré (acide acétique 10 % (v/v) ; méthanol 20 % (v/v)).

II.2.3.3. Analyse électrophorétique de la dégradation du collagène par les MMP

a) Activation des pro-MMP

Les pro-MMP sont préalablement activées par incubation en présence de 2 mM de para-amino-phényl-mercuriacétate (APMA) pendant 2 h à 37°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,6. Pour l'ensemble des expériences, les concentrations finales d'enzyme ont été choisies afin d'obtenir une digestion partielle du collagène, permettant de visualiser les fragments issus de la protéolyse en électrophorèse.

b) Analyse électrophorétique des fragments obtenus après digestion du collagène par les MMP

5 µg de collagène sont incubés pendant 18 heures à 37°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM ; NaCl 150 mM ; CaCl₂ 10 mM ; pH 7,4 avec différentes MMP préactivées par l'APMA (concentrations finales : 12,8 nM pour la MMP-1 et la MMP-13 ; 9 nM pour la MMP-8). La réaction est stoppée par addition de tampon de Laemmli (cf § II.2.2.1) puis par chauffage (3 min

à 90°C). La dégradation des chaînes α du collagène de type I est mise en évidence par SDS-PAGE à 6 % (m/v) de polyacrylamide.

II.2.3.4. Analyse quantitative de la dégradation du collagène par les MMP

a) Marquage du collagène au [^3H]-NaBH₄

Le collagène en solution à 2 mg/mL dans l'acide acétique 18 mM est dialysé pendant une nuit à 4°C contre du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM pH 7,5. La solution est ensuite incubée avec du phosphate de pyridoxal (25 mM en concentration finale) pendant 1 h sur la glace et à l'abri de la lumière [Harris et Krane, 1972]. Le [^3H]-NaBH₄ (1 mCi/mg de collagène) est ajouté et l'ensemble est incubé pendant 2 h sur la glace. La réaction est stoppée par addition d'acide acétique 1,8 M. La radioactivité libre est ensuite éliminée par dialyse intensive contre de l'acide acétique 18 mM. L'activité spécifique des différentes préparations de collagène marqué, déterminée à l'aide d'un compteur à β -scintillation, est comprise entre 5.10^6 et 7.10^6 cpm/mg de collagène.

b) Test quantitatif de dégradation du [^3H]-collagène par les MMP

10 μg de [^3H]-collagène mélangés à 40 μg de collagène non marqué sont incubés pendant 18 h à 37°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM ; NaCl 150 mM ; CaCl₂ 10 mM ; pH 7,4 en présence de différentes concentrations de MMP préactivées par l'APMA (concentrations finales : 76,9 nM pour la MMP-1 et la MMP-13 ; 53,2 nM pour la MMP-8 ; 55,6 nM pour la MMP-2 ; 21,7 nM pour la MMP-9). Parallèlement, une digestion du collagène par la pepsine est réalisée en incubant le collagène en présence de 150 nM de pepsine pendant 18 h à 4°C dans l'acide acétique 1,8 M. Les concentrations finales d'enzyme ont été choisies afin d'obtenir une digestion partielle du collagène, avoisinant les 50 % de dégradation.

A la fin de l'incubation, 150 μg de collagène froid sont ajoutés au milieu réactionnel qui est ensuite précipité à l'éthanol à 80 % (v/v) pendant une nuit à - 20°C. Les échantillons sont centrifugés (10 000 g ; 30 min ; 4°C) et la radioactivité est comptée dans les surnageants et les culots à l'aide du compteur à β -scintillation. La radiolyse spontanée est évaluée, en parallèle de chaque expérience, et ne doit pas dépasser 10 % de la radioactivité totale.

II.2.4. Méthodes d'étude des interactions entre collagène et polynucléaires neutrophiles humains

II.2.4.1. Préparation des polynucléaires neutrophiles humains

Les PNN ont été isolés à partir de sang total selon la technique décrite en 1980 par Ferrante et Thong [Ferrante et Thong, 1980]. Pour cela, le sang veineux est prélevé en tubes contenant de l'héparinate de lithium chez des sujets volontaires sains ayant donné leur consentement éclairé. 6 mL de sang total sont déposés délicatement sur 6 mL de Polymorphprep[®] pour obtenir deux phases distinctes. Le Polymorphprep[®] est un mélange de 13,8 % (m/v) de métrizoate de sodium et de 8 % (m/v) de dextran 500, dont les caractéristiques physico-chimiques sont une densité de $1,113 \pm 0,001$ g/L et une osmolarité de 460 ± 5 mosm. Grâce à ses propriétés physico-chimiques, le Polymorphprep[®] permet la séparation des cellules sanguines en fonction de leur taille.

Après centrifugation (750 g ; 30 min ; 20°C), plusieurs phases apparaissent : une phase supérieure qui correspond au plasma, une phase intermédiaire contenant les leucocytes et une phase inférieure qui représente le culot érythrocytaire (figure 18). La phase intermédiaire se divise en deux parties : une bande située à l'interface entre le plasma et le Polymorphprep[®] contenant les cellules mononuclées et un anneau inférieur regroupant les PNN.

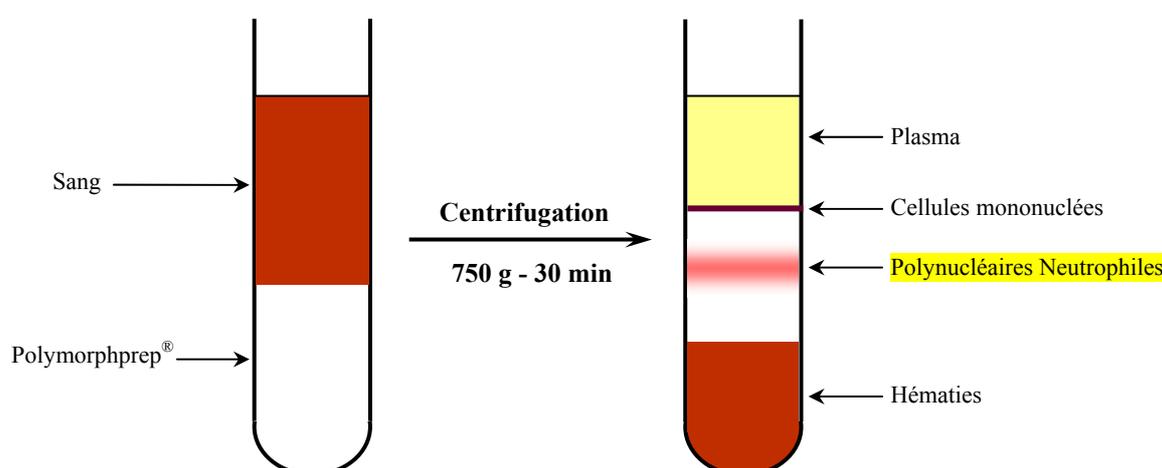


Figure 18. Principe de l'isolement des PNN sur Polymorphprep[®].

Le sang total est déposé sur le Polymorphprep[®] puis centrifugé (750 g ; 30 min ; 20°C). La centrifugation permet la séparation des différents types de cellules sanguines et l'apparition d'un anneau caractéristique regroupant les PNN.

Le plasma et les cellules mononuclées sont éliminés à l'aide d'une pipette automatique puis les PNN sont prélevés et transférés dans un nouveau tube. Les cellules sont lavées par 15 mL d'une solution de Dulbecco (NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; HEPES 30 mM ; glucose 10 mM ; CaCl₂ 1,3 mM ; MgCl₂ 1 mM ; pH 7,5) afin d'éliminer le polymorphprep entourant les cellules. Une nouvelle centrifugation (900 g ; 5 min ; 20°C) permet d'obtenir un culot contenant les PNN et éventuellement quelques globules rouges (il peut subsister quelques hématies lorsque la séparation n'est pas totale). Le surnageant est alors éliminé et le culot repris par 1 mL de solution de Dulbecco. Les hématies sont ensuite lysées par choc osmotique par addition de 6 volumes d'une solution de NH₄Cl 15 mM. Les échantillons sont à nouveau centrifugés (900 g ; 5 min ; 20°C) et le culot de PNN (dépourvu de globules rouges) est remis en suspension dans 3 mL de solution de Dulbecco.

Les cellules sont comptées à l'aide d'un hémacytomètre de Neubauer. Les suspensions cellulaires obtenues présentent une pureté supérieure à 95 % et un taux de viabilité supérieur à 98 % évalué par le test d'exclusion du bleu Trypan (cf § II.2.4.4.a).

II.2.4.2. Préparation des plaques de culture

Dans nos expériences, nous avons utilisé des plaques de culture en plastique de type Nunclon Delta[®] qui présentent l'avantage de limiter les phénomènes d'adhésion et de stimulation non spécifiques des PNN.

Après stérilisation et solubilisation, une solution de collagène à 250 µg/mL est déposée dans les puits des plaques de culture à raison de 2,5 µL/mm² (soit 125 µg par puits d'une plaque 24 puits). Les plaques sont placées sous une hotte à flux laminaire stérile jusqu'à évaporation totale de l'acide acétique. Chaque puits est ensuite rincé plusieurs fois avec la solution de Dulbecco avant l'utilisation des plaques.

II.2.4.3. Mesure de l'adhésion des PNN par coloration des noyaux au violet cristal

La quantification des PNN ayant adhéré au collagène a été réalisée grâce à la technique de coloration au violet cristal décrite par Kueng *et al.* [Kueng *et al.*, 1989]. Les PNN sontensemencés dans les plaques 96 puits à raison de 200 000 cellules par puits dans 100 µL de solution de Dulbecco et laissés en contact avec le collagène pendant 2 h à 37°C. Les PNN n'ayant pas adhéré sont éliminés par trois lavages successifs avec 100 µL de solution de Dulbecco. Les cellules adhérentes sont fixées pendant 30 min à température ambiante par 100

μL d'une solution de glutaraldéhyde à 1,1 % (v/v) en tampon phosphate 150 mM, pH 7,4. L'étape de fixation est suivie d'une série de trois lavages en eau distillée, après lesquels les noyaux des cellules fixées sont colorés par addition de 100 μL d'une solution de violet cristal 0,1 % (m/v) en tampon HEPES 200 mM, pH 6,0 durant 30 min. Le colorant non fixé est éliminé par plusieurs lavages en eau distillée et les plaques sont séchées à l'air. La révélation se fait par addition de 100 μL d'acide acétique 1,8 M (qui solubilise le colorant) et l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 560 nm.

Pour vérifier l'existence d'une corrélation entre le nombre de PNN adhérents et l'absorbance à 560 nm, une gamme d'étalonnage a été réalisée avec des quantités croissantes de PNN (figure 19). La droite d'étalonnage, dont l'équation est : Absorbance (560 nm) = 0,0016 x (Nombre de PNN) - 0,0002, possède un coefficient de corrélation égal à 0,998. Cette méthode de coloration au violet cristal permet donc de quantifier de manière fiable l'adhésion des PNN.

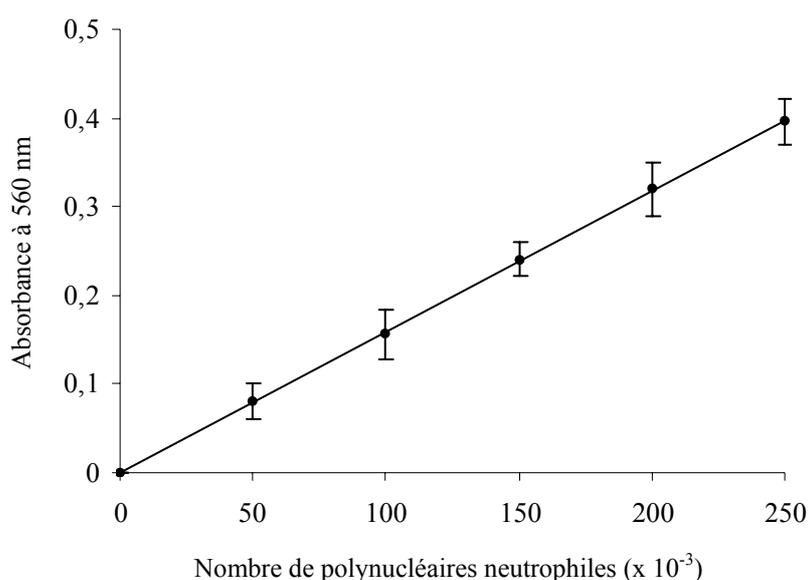


Figure 19. Droite d'étalonnage entre le nombre de polynucléaires neutrophiles adhérents et l'absorbance à 560 nm.

Les PNN sont incubés pendant 2 h à 37°C en plaque 96 puits, et le nombre de PNN ayant adhéré est déterminé par la méthode de coloration au violet cristal. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm écart-types (n = 4).

II.2.4.4. Etude de la viabilité cellulaire

a) Test d'exclusion du bleu Trypan

Le bleu Trypan est un colorant qui permet de colorer spécifiquement les cellules mortes car la cellule vivante est capable de le relarguer dans le milieu extracellulaire. Les suspensions de PNN sont incubées en présence d'un quart de volume de bleu trypan 0,4 % (m/v). Après 10 min d'incubation à température ambiante, le nombre de cellules colorées ou non est évalué par comptage à l'aide d'un hémacytomètre de Neubauer, ce qui permet de calculer le pourcentage de cellules viables.

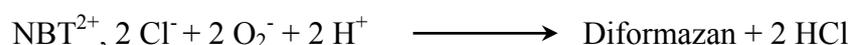
b) Dosage de l'activité lactate déshydrogénase (LDH)

Le dosage de l'activité lactate déshydrogénase, enzyme intracellulaire, dans les surnageants de culture permet de rendre compte de la lyse cellulaire. Les surnageants de culture sont prélevés après incubation des PNN en contact avec le collagène pendant 2 h à 37°C. Un dosage colorimétrique est ensuite effectué sur analyseur automatique (Hitachi 717 - Roche Diagnostics, Meylan, France) au Laboratoire de Biochimie Pédiatrique de l'American Memorial Hospital du CHU Reims. Le principe de ce dosage repose sur la transformation du pyruvate en lactate par la LDH. Cette transformation s'accompagne de l'oxydation du NADH + H⁺ en NAD⁺. La vitesse d'oxydation du NADH, mesurée par spectrophotométrie à 340 nm et 546 nm, est directement proportionnelle à l'activité LDH.

II.2.4.5. Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les PNN

a) Technique de réduction du bleu de nitrotétrazolium

Le bleu de nitrotétrazolium (NBT) est un réactif chimique électrophile capable de capter des électrons, ce qui conduit à sa réduction en diformazan (figure 20). Cette réduction nécessite l'apport de 2 électrons et de 4 protons :



En solution aqueuse, la présence d'espèces réactives de l'oxygène conduit à la réduction du NBT, qui entraîne une diminution de sa solubilité et sa précipitation. Cette précipitation s'accompagne d'une modification de son spectre d'absorption dans le visible puisqu'il passe d'une couleur jaune pour la forme oxydée à une couleur bleu-violette.

Le NBT est capable de diffuser à l'intérieur de la cellule, si bien qu'il rend compte de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les milieux intra- et extracellulaires. Cette technique de mesure a été adaptée à partir de la méthode décrite par Pick [Pick, 1989]. Le NBT est ajouté au milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 167 μM . La production d'espèces réactives de l'oxygène par les PNN est mise en évidence par la mesure directe de l'absorbance à 560 nm du diformazan, à l'aide d'un lecteur de microplaques.

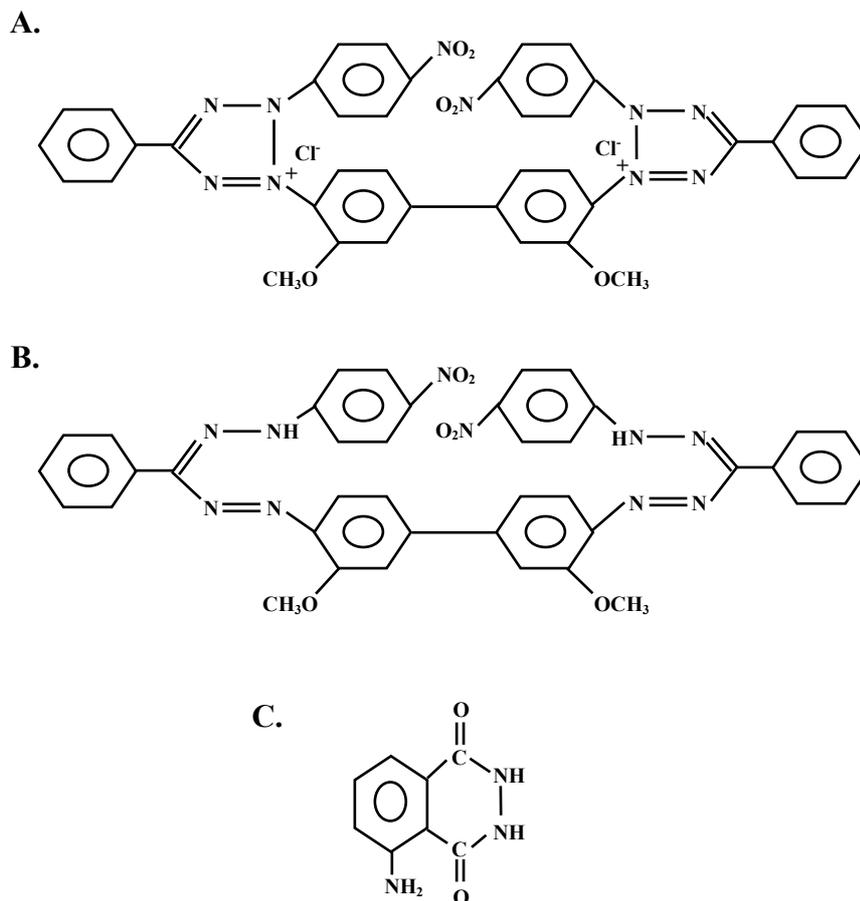


Figure 20. Formule chimique des réactifs utilisés pour mettre en évidence la production d'espèces réactives de l'oxygène.

(A) Bleu de nitrotétrazolium, forme oxydée ; (B) Diformazan, forme réduite du NBT ; (C) Luminol.

b) Etude de l'activation des PNN par chimiluminescence

Les espèces réactives de l'oxygène produites dans le milieu extracellulaire par les PNN peuvent interagir avec le luminol (figure 20). Cette interaction entraîne l'excitation temporaire du luminol, suivie du retour à l'état basal qui s'accompagne d'une émission de photons quantifiable et corrélée à la production d'espèces réactives de l'oxygène.

L'activation des PNN par le collagène mise en évidence par chimiluminescence a été réalisée en suspension ou en plaque sur tapis de collagène [Dechatelet *et al.*, 1982]. Pour cela, les PNN sont mis en suspension dans une solution de Dulbecco contenant 28 μ M de luminol, puis incubés à 37°C en présence de collagène. A la fin de l'incubation, la chimiluminescence est mesurée dans les milieux à l'aide d'un luminomètre. Les résultats obtenus sont exprimés en unité arbitraires.

Cette technique de mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène est beaucoup plus sensible que la technique de réduction du NBT mais délivre un signal transitoire qui n'est quantifiable qu'avec un luminomètre, ce qui n'est pas adapté à certains types d'expériences qui nécessitent une trace d'activation, obtenue dans le cas de la réduction du NBT en diformazan (cf § II.2.4.7).

II.2.4.6. Evaluation de l'effet « scavenger » du collagène carbamylé

L'effet « scavenger » du collagène correspond à sa capacité à capter les espèces réactives de l'oxygène. Pour mesurer cet effet, nous avons utilisé un système acellulaire de production d'ions superoxyde : le système xanthine oxydase-hypoxanthine [Monboisse *et al.*, 1988].

Le milieu réactionnel est composé de tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 contenant 0,5 mM d'hypoxanthine et 1,67 mM d'EDTA. Le dosage est effectué dans une cuve de spectrophotomètre dans laquelle sont ajoutés successivement 1 mL de milieu réactionnel, 200 μ L d'une solution de NBT 1,67 mM, 200 μ L de collagène dénaturé à 2 mg/mL et 75 mU/mL de xanthine oxydase. Le volume est ensuite ajusté à 2 mL avec du tampon phosphate 50 mM, pH 7,8.

Après incubation à température ambiante durant 10 min, la réduction du NBT est mesurée à 560 nm.

II.2.4.7. Méthodes d'étude de l'interaction entre PNN et CB-peptides séparés par électrophorèse

Cette technique, schématisée figure 21, permet d'évaluer l'adhésion et l'activation des PNN au contact des CB-peptides de collagène séparés par électrophorèse [Garnotel *et al.*, 1993].

a) Electrophorèse des CB-peptides et transfert

Les CB-peptides sont soumis à une SDS-PAGE à 12,5 % (m/v) de polyacrylamide. Après migration, le gel est équilibré pendant 20 min dans le tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM ; glycine 192 mM ; méthanol 7,5 % (v/v) ; pH 8,2). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidifluorure (PVDF) sous une tension de 80 V pendant 1 h à 4°C. Après le transfert, la membrane est saturée par incubation dans un tampon TBST (Tris-HCl 50 mM ; NaCl 150 mM ; Tween-20 0,05 % (v/v); pH 7,6) contenant 5 % (m/v) d'albumine sérique bovine sous agitation douce pendant une nuit à 4°C.

b) Mise en contact des PNN avec la membrane

Après saturation, la membrane est rincée par plusieurs bains de TBST puis par la solution de Dulbecco. Parallèlement, les PNN sont isolés à partir de sang total et mis en contact avec la membrane pendant 30 min à 37°C, à raison de 250 000 cellules par cm² de membrane.

c) Etude de l'activation

Pour mesurer l'activation des PNN au contact des différents peptides, 167 µM de NBT sont ajoutés à la suspension cellulaire. Ainsi, après réduction, le NBT précipite et laisse une trace d'activation sur la membrane. Il est ensuite possible d'identifier, par analogie avec l'électrophorèse, les peptides responsables de l'activation.

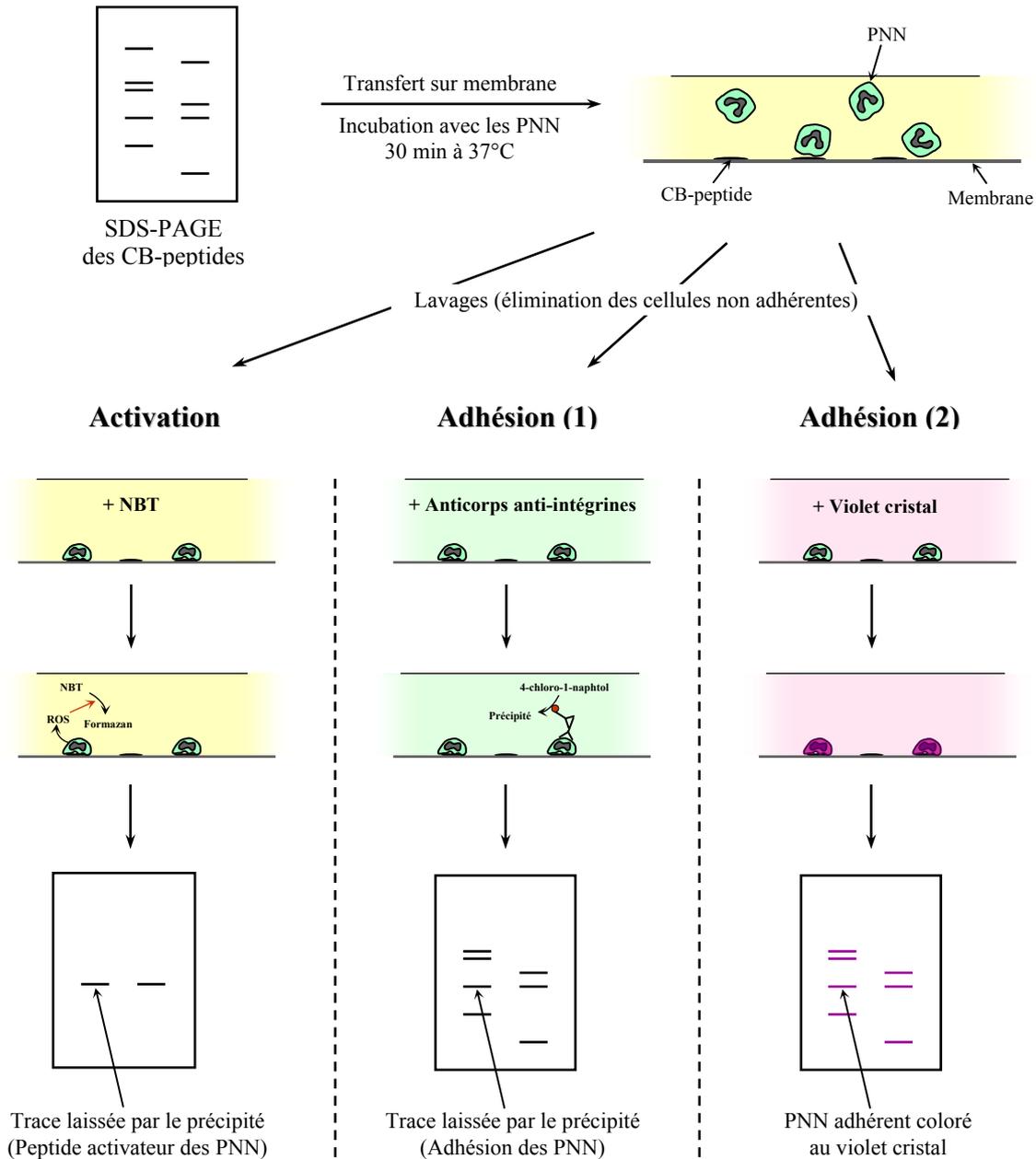


Figure 21. Schéma explicatif de la technique d'étude des interactions entre PNN et CB-peptides séparés par électrophorèse.

Les CB-peptides sont séparés par électrophorèse puis transférés sur membrane de polyvinylidifluorure. Les CB-peptides fixés à la membrane sont incubés en présence des PNN durant 30 min à 37°C. L'étude de l'activation est réalisée en présence de NBT, qui lorsqu'il est réduit par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) forme un précipité (formazan), visualisable sur la membrane. L'étude de l'adhésion s'effectue soit à l'aide d'anticorps spécifiques des intégrines exprimées par les PNN soit par coloration des cellules au violet cristal. Dans le premier cas, la révélation s'effectue grâce à des anticorps secondaires couplés à la peroxydase, capable de transformer le 4-chloro-1-naphtol en un précipité révélant l'adhésion des PNN.

d) Etude de l'adhésion

L'adhésion au contact des peptides peut être mise en évidence par deux techniques différentes : soit par utilisation d'anticorps spécifiques, soit par coloration des cellules au violet cristal.

Dans le premier cas, la membrane est délicatement rincée après l'incubation, pour éliminer les cellules non adhérentes puis incubée pendant 1 h à 37°C avec une solution de Dulbecco contenant un mélange d'anticorps anti-CD11a, anti-CD11b et anti-CD11c (spécifiques des intégrines présentes à la surface des PNN). La membrane est rincée par la solution de Dulbecco pour limiter les fixations non spécifiques.

La détection des anticorps liés aux intégrines des PNN est réalisée grâce à un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. L'activité peroxydasique est révélée par addition d'une solution de 4-chloro-1-naphtol.

L'adhésion peut également être mise en évidence par coloration des cellules au violet cristal. Pour cela, après l'incubation, la membrane est rincée par une solution de Dulbecco et les cellules adhérentes sont fixées par une solution à 1,1 % (v/v) de glutaraldéhyde en tampon phosphate 150 mM, pH 7,4 pendant 30 min à température ambiante. Après plusieurs rinçages, les cellules sont colorées par une solution de violet cristal 0,1 % (m/v) en tampon HEPES 200 mM, pH 6,0 durant 30 min à température ambiante. Le colorant non fixé est éliminé par plusieurs lavages en eau distillée puis les membranes sont séchées à l'air.

II.2.4.8. Mise en évidence de l'implication d'une lysine dans le processus d'activation des PNN par le collagène

a) Compétition avec l'acide ϵ -amino-hexanoïque

L'implication de résidus de lysine dans le processus d'activation des PNN par le collagène de type I a été tout d'abord démontrée par l'utilisation d'un analogue de lysine non métabolisable par la cellule : l'acide ϵ -amino-caproïque ou acide 6-amino-hexanoïque (AHA). Dans ces expériences, les PNN sont incubés au contact du collagène en présence de NBT (§ II.2.4.5.a) et de concentrations croissantes d'AHA (12,5 à 200 mM).

b) *Activation des PNN par le CB-peptide α_1 CB6 recombinant muté*

La seconde démarche employée pour mettre en évidence l'implication d'un résidu de lysine dans l'action des PNN par le collagène, a consisté à produire un peptide α_1 CB6 recombinant, muté sur un résidu de lysine situé à proximité de la séquence activatrice des PNN. La production de ce peptide a été effectuée en système procaryote après avoir inséré l'ADNc codant α_1 CB6 dans un plasmide de type pGEX4T3, permettant la synthèse d'une protéine de fusion GST (protéine couplée à la glutathion-S-transférase). Avant d'aboutir à la purification du peptide, plusieurs étapes sont nécessaires :

⇒ **Extraction des ARN totaux de fibroblastes dermiques humains :**

Les ARN totaux sont extraits à partir de fibroblastes dermiques humains en culture primaire, selon la technique décrite par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987). Après avoir éliminé le milieu des boîtes de culture, les cellules sont rincées par trois bains de PBS. 1 mL de TriReagent[®], contenant de l'isothiocyanate de guanidinium et du phénol, est introduit dans chacune des boîtes puis la couche de fibroblastes est grattée puis récupérée. Après 5 min d'incubation à température ambiante, 200 μ L de chloroforme sont ajoutés au lysat cellulaire puis le mélange est agité vigoureusement pendant 15 s. Après 15 min d'incubation, le mélange est centrifugé (12 000 g ; 15 min ; 4°C), ce qui permet la formation de trois phases. La phase supérieure est prélevée, puis les ARN qu'elle contient sont précipités par addition de 500 μ L d'isopropanol et incubation de 10 min dans la glace. Après centrifugation (10 000 g ; 10 min ; 4°C), l'isopropanol est éliminé et le précipité est lavé par 1 mL d'éthanol à 75 % (v/v). Après centrifugation (12 000 g ; 5 min ; 4°C), l'éthanol est éliminé et le précipité est séché puis solubilisé dans de l'eau distillée traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC).

La concentration en ARN totaux est calculée après mesure de l'absorbance à 260 nm (une unité d'absorbance correspond à 40 μ g/mL d'ARN) et l'intégrité des ARN est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose.

⇒ **Mutagenèse dirigée :**

L'étape préalable à la construction du plasmide était la synthèse de l'ADNc codant le collagène de type I. Pour cela, nous avons réalisé une transcription inverse (RT) des ARN totaux.

La préparation du milieu RT nécessite les réactifs suivants : 4 µL de tampon 10X (KCl 500 mM ; Tris-HCl 100 mM ; pH 8,3), 2 µL de MgCl₂ 100 mM, 16 µL d'un mélange de 4 dNTP à 2,5 nM, 4 µL de DTT 100 mM, 2 µL de RNase (10 U/µL), 2 µL de transcriptase inverse (200 U), 2 µL d'un mélange d'hexanucléotides dégénérés et 4 µL d'une solution d'ARN (1 µg), préalablement dénaturés pendant 3 min à 95°C. La transcription inverse est réalisée à 42°C pendant 45 min dans un thermocycleur puis les échantillons sont conservés à - 20°C jusqu'à utilisation.

L'ensemble de la procédure de mutagenèse dirigée est schématisé sur la figure 22. La première étape consiste à amplifier par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), à partir du milieu RT, un ADNc de 1070 pb comportant la séquence codante de α₁CB6 à l'aide d'amorces spécifiques, répertoriées dans le tableau 3. L'amplification de cet ADNc est réalisée à partir du mélange réactionnel suivant : 2,25 µL de tampon 10 X (KCl 500 mM ; Tris-HCl 100 mM ; pH 8,3), 0,75 µL de MgCl₂ 100 mM, 1 µL d'un mélange de 4 dNTP à 2,5 nM, 10,92 µL d'eau DEPC, 1,25 µL de DMSO, 1,13 µL de tampon W1 (stabilisateur de la Taq polymérase), 5 µL d'amorces spécifiques, 0,2 µL de Taq polymérase (5 U/µL) et 2,5 µL de milieu RT.

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur pour l'amplification de l'ADNc par PCR, qui nécessite 30 à 35 cycles identiques, comprenant chacun une étape de dénaturation (92°C ; 30 s), une étape d'hybridation des amorces (température variable selon les amorces, 30 s) et une étape d'élongation (72°C ; 30 s à 1 min selon la longueur du fragment à amplifier).

Nom de l'amorce	Séquence	Taille du fragment amplifié (pb)
A1(5)	5' TGG TCA GAG AGG AGA GAG A 3'	1070
A1(3)	5' TGT CCT TGG GGT TCT TGC T 3'	
A2(5)	5' AAA CAA GGT CCC TCT GGA GCA AGT GGT GAA CGT 3'	700
A2(3)	5' TAG TAG CGG CCA CCA TCG TGA GCC CCC TCT TGA 3'	
A3(5)	5' TCG TGA ATT CAC CTG GAT TGG CTG GA 3'	660
A3(3a)	5' ATC AGC CCG GTA GTA GCG GCC ACC AT 3'	
A3(3b)	5' ACT AAG CGG CCG CTA TCA GCC CGG TA 3'	

Tableau 3. Séquence des amorces de PCR utilisées pour l'étape de mutagenèse dirigée.

Les amorces ont été synthétisées par l'entreprise MWG-Biotech. Leur utilisation est détaillée dans la figure 22.

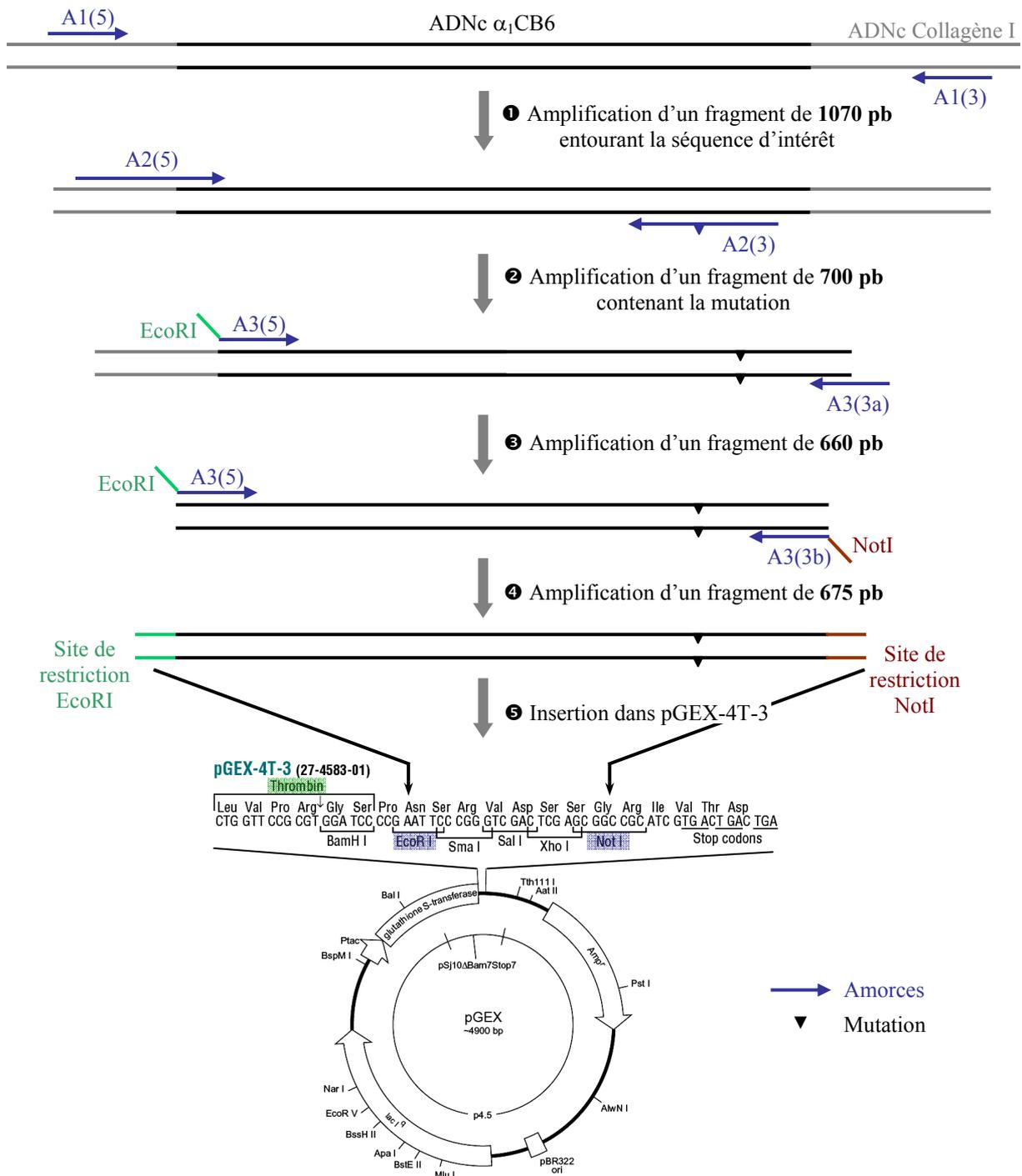


Figure 22. Schéma explicatif du protocole de mutagenèse dirigée par la technique de PCR.

Le fragment d'ADNc de 1070 pb contenant la séquence codant α_1 CB6 est obtenu après RT-PCR réalisée sur les ARN totaux de fibroblastes dermiques humains. La mutation de l'ADNc est réalisée à partir du fragment commun de 1070 pb, par l'intermédiaire d'une succession de PCR (étapes 2 et 3) utilisant une amorce contenant la mutation. La dernière PCR (étape 4) a pour objectif d'ajouter de part et d'autre du fragment d'intérêt les sites de restriction EcoRI et NotI, en vue de son insertion dans le plasmide pGEX-4T-3 (étape 5). Pour obtenir le plasmide contenant l'ADNc non muté, seules les étapes 1, 4 et 5 sont réalisées.

La première PCR permet d'amplifier un fragment de 1070 pb à partir du milieu RT. Ce fragment, qui contient la séquence d'intérêt, est utilisé comme matrice pour la mutagenèse dirigée afin de limiter au maximum les réactions non spécifique. L'étape suivante consiste à amplifier par PCR le fragment d'intérêt à l'aide d'amorces permettant de générer la mutation. Cette étape permet d'obtenir un fragment de 700 pb. Ces amorces ne permettant pas de recouvrir la totalité de la séquence d'intérêt, une troisième PCR est effectuée dans le but d'allonger l'ADNc codant α_1 CB6. Enfin, une dernière PCR est réalisée pour ajouter de part et d'autre du fragment d'intérêt les sites de restriction EcoRI et NotI, qui permettront son insertion dans le plasmide.

Parallèlement à l'amplification de l'ADNc muté, un ADNc témoin est amplifié par PCR à partir du fragment de 1070 pb, en utilisant directement les amorces comportant les sites de restriction.

⇒ **Insertion du fragment dans le plasmide pGEX-4T-3 :**

Après l'amplification des fragments par PCR, l'intégrité de l'ADNc (muté ou non) est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % (m/v). La bande correspondant au fragment d'intérêt est découpée, puis l'ADN est extrait de l'agarose sous l'effet d'un champ électrique à l'aide d'un Elutatube[®] (tube de plastique comportant deux parois constituées d'une membrane de dialyse). L'ADN est ensuite précipité par 50 % (v/v) d'isopropanol et 5 % (v/v) d'acétate de potassium 3 M pendant une nuit à -20°C, puis est solubilisé dans 10 μ L d'eau stérile et digéré par 20 U de EcoRI et 20 U de NotI dans un tampon EcoReact3[®] pendant 2 h 30 à 37°C.

Parallèlement, le plasmide pGEX-4T-3 est soumis à une digestion enzymatique dans les mêmes conditions. Le plasmide est déphosphorylé par 1 U de phosphatase alcaline bactérienne pendant 60 min à 60°C. La réaction de suite déphosphorylation est stoppée par incubation pendant 30 min à 37°C en présence de 35 ng de protéinase K.

La ligation est réalisée selon le protocole « Rapid DNA ligation Kit ». 2 μ L de plasmide digéré sont mélangés à 8 μ L d'insert digéré, 10 μ L de tampon de ligation 2X et 5 U de ligase. La ligation se déroule à température ambiante durant 20 min.

⇒ **Transformation des bactéries et sélection des clones :**

Le produit de ligation est mélangé à 100 μ L de bactéries JM109DE3 rendues compétentes par un traitement au CaCl_2 100 mM. Après une incubation de 30 min sur la glace, le mélange bactéries / produit de ligation subit un choc thermique de 90 s à 42°C, suivi d'un refroidissement brutal sur glace. Les bactéries sont pré-incubées pendant 1 h 30 à 37°C dans du milieu Luria Bertani (LB, 20 mg/L), puis étalées sur boîte de Petri contenant 10 mL de LB composé de 1,5 % (m/v) d'agar et de 100 μ g/mL d'ampicilline. Les boîtes de Petri sont placées pour la nuit à 37°C. Le lendemain, plusieurs colonies sont prélevées,ensemencées dans 20 mL de LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline, utilisée pour la sélection des bactéries possédant le plasmide, puisque celui-ci apporte à la bactérie le gène de résistance, puis incubées à 37°C pour la nuit sous agitation.

Les plasmides sont ensuite extraits des bactéries issues des colonies sélectionnées, pour vérifier la présence de l'insert dans le plasmide. Pour cela, les suspensions bactériennes sont centrifugées (900 g ; 15 min ; 4°C) et le culot bactérien est repris par 400 μ L de tampon P1 (Tris-HCl 50 mM ; EDTA 10 mM ; pH 8,0) contenant 100 μ g/mL de RNase A auxquels sont ajoutés 400 μ L d'une solution de lyse P2 (NaOH 200 mM ; SDS 1 % (m/v)). Le mélange est laissé 4 min à température ambiante puis incubé 1 min sur glace. Le milieu est neutralisé par addition de 400 μ L d'acétate de potassium 3 M ; pH 5,5, puis incubé de nouveau sur glace pendant 10 min. Après centrifugation (10 000 g ; 10 min ; 4°C), le surnageant est prélevé et transféré dans un tube de 2 mL. Le plasmide est alors précipité par addition de 0,7 volume d'isopropanol. Après centrifugation (10 000 g ; 15 min ; 4°C), le précipité est lavé par 1 mL d'éthanol 75 % (v/v). Enfin, après une nouvelle centrifugation (10 000 g ; 10 min ; 4°C), le culot est séché et le plasmide solubilisé dans 50 μ L d'eau stérile.

Afin de vérifier la présence de l'insert dans la plasmide pGEX-4T-3, 1 μ g de plasmide est digéré par les enzymes EcoRI et NotI. Les fragments obtenus après digestion sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % (m/v) (figure 23). L'électrophorèse permet de confirmer la présence de l'insert codant α_1 CB6 (témoin ou muté) dans les plasmides extraits.

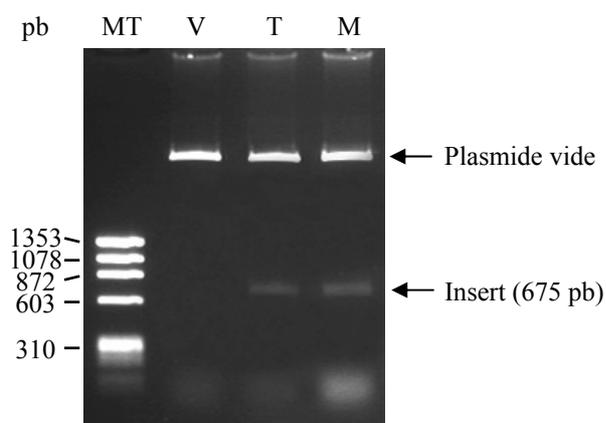


Figure 23. Vérification par électrophorèse de la présence de l'insert dans les plasmides des bactéries sélectionnées.

Les bactéries sont mises en présence du produit de ligation puis cultivées sur gélose + ampicilline pendant une nuit à 37°C, et les colonies sont sélectionnées puis ensemencées en suspension dans du milieu LB. Après multiplication des bactéries, les plasmides sont extraits puis digérés par les enzymes de restriction EcoRI et NotI. Le produit de dégradation est ensuite analysé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % (m/v) contenant du bromure d'éthidium. La visualisation des bandes est réalisée sous lampe UV. *Abréviations* : pb : paires de base ; MT : marqueur de taille ; V : plasmide pGEX-4T-3 vide ; T : plasmide contenant l'insert témoin ; M : plasmide contenant l'insert muté.

Pour vérifier à la fois la séquence complète de l'insert et l'efficacité de la mutagenèse dirigée, l'insert a été séquencé (société Genome Express), selon la technique de Sanger, à partir de 5 µg de plasmide non digéré solubilisé dans 30 µL d'eau stérile. Les résultats ont permis de valider la séquence complète de l'insert et de vérifier la mutation (2G pour 2A) qui correspond, au niveau de la protéine, à la mutation glycine pour lysine (figure 24).

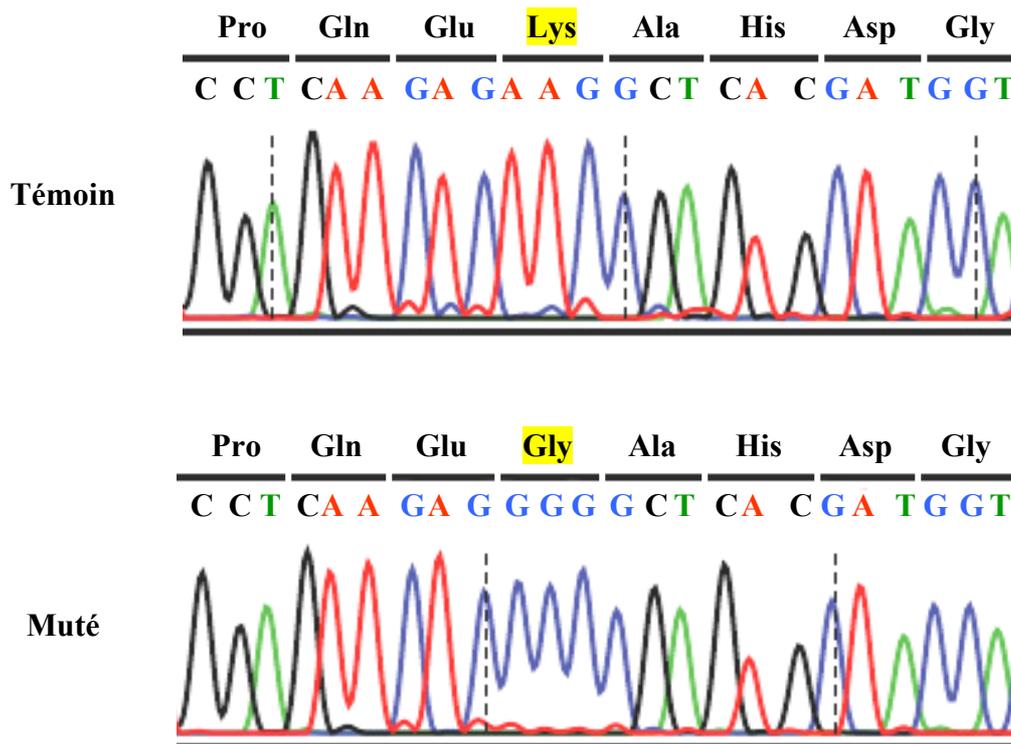


Figure 24. Vérification de l'efficacité de la mutagenèse dirigée par séquençage des inserts.

Le séquençage a été effectué à partir de 5 µg de plasmide non digéré solubilisé dans 30 µL d'eau stérile.

⇒ Production et purification du peptide recombinant :

Les bactéries JM109DE3, transformées par le plasmide d'expression pGEX-4T-3 contenant l'insert codant α_1 CB6, sont mises en pré-culture dans 25 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline, pendant une nuit et sous agitation à 37°C. Après la pré-culture, la suspension bactérienne est diluée dans 100 mL de milieu LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline, de manière à obtenir une culture dont l'absorbance est égale à 0,15. Les bactéries sont ensuite incubées sous agitation à 37°C, jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm soit comprise entre 0,5 et 0,7.

L'induction de la synthèse de la protéine recombinante est déclenchée par l'addition d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) à une concentration finale de 0,4 mM. Après 4h d'induction, la suspension est centrifugée (900 g ; 15 min ; 4°C) et le culot de bactéries repris par 2 mL de tampon Tris-HCl 50 mM ; EDTA 1 mM ; pH 8,0. Les bactéries sont lysées par trois cycles de 15 s de sonication sur glace. Après avoir éliminé les débris cellulaires par

centrifugation (10 000 g ; 5 min ; 4°C), le lysat est récupéré puis analysé par SDS-PAGE à 10 % (m/v) de polyacrylamide puis par western-blot (figure 25), pour vérifier l'expression de la protéine de fusion avant de débiter sa purification.

Sur l'électrophorèse, on observe qu'une surexpression de la protéine GST seule (plasmide vide), sans surexpression de la protéine de fusion GST- α_1 CB6. C'est pourquoi, la surexpression de la protéine de fusion a été vérifiée par western-blot, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la glutathion-S-transférase (figure 25).

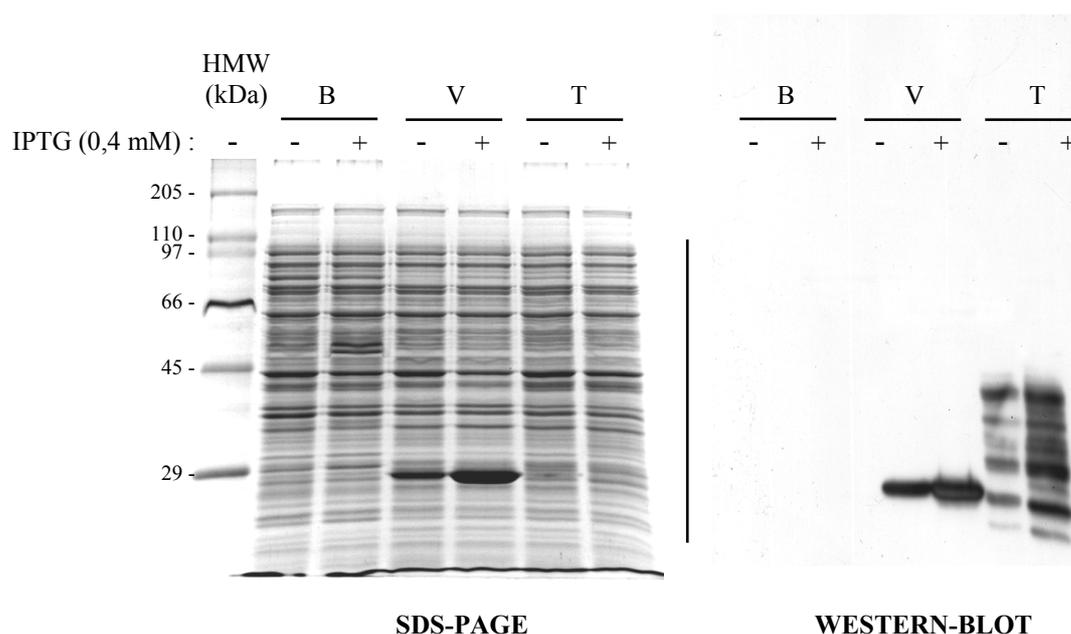


Figure 25. Mise en évidence par western-blot de la surexpression de la protéine de fusion GST.

Les bactéries sont mises en culture pendant une nuit à 37°C puis la production de protéine recombinante est induite (ou non) par l'IPTG 0,4 mM. Après lyse les bactéries par sonication, 10 μ g de protéines intracellulaires sont analysées par SDS-PAGE à 10 % (m/v) d'acrylamide, puis par western-blot avec un anticorps dirigé contre la GST. *Abréviations* : HMW : marqueurs de haute masse moléculaire ; B : bactéries JM109DE3 sans plasmide ; V : bactéries possédant le plasmide vide ; T : bactéries possédant le plasmide contenant l'insert témoin codant α_1 CB6 témoin.

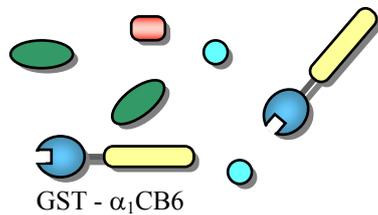
Pour le western-blot, 10 μ g de protéines intracellulaires (2 μ g pour les conditions « plasmide vide » afin d'éviter une saturation du film au moment de la révélation) ont été séparées par SDS-PAGE à 10 % (m/v) de polyacrylamide puis transférées sur une membrane de PVDF. La membrane a d'abord été saturée pendant 1 h à température ambiante dans un tampon

TBST (Tris-HCl 50 mM ; NaCl 150 mM ; Tween-20 0,05 % (v/v); pH 7,6) contenant 5 % (m/v) d'albumine, puis lavée par plusieurs bains de TBST, et incubée pendant une nuit à 4°C en présence d'un anticorps monoclonal anti-GST dilué au 1/2000^{ème} dans du TBST contenant 1 % (m/v) d'albumine. Après trois lavages en TBST, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire (anti-souris) dilué au 1/10 000^{ème} dans du TBST contenant 1 % (m/v) d'albumine. Après plusieurs rinçages, la révélation se fait par chimiluminescence.

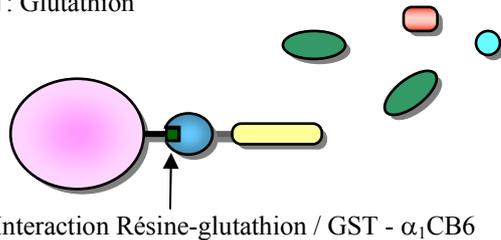
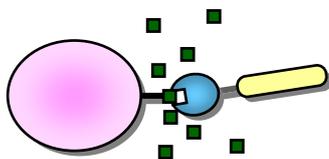
Le western-blot montre la surexpression d'une protéine de fusion d'environ 45 kDa après induction par l'IPTG, avec quelques formes de dégradation. Même si elle n'est pas visible en SDS-PAGE, cette protéine est exprimée par les bactéries et peut donc être purifiée.

Nous avons choisi de produire de manière recombinante le peptide α_1 CB6 sous la forme d'une protéine de fusion GST- α_1 CB6 pour faciliter sa purification. En effet, la protéine de fusion peut être facilement obtenue par chromatographie d'affinité sur résine de glutathion-sépharose. Le peptide d'intérêt peut ensuite être libéré par action de la thrombine sur la protéine de fusion (figure 26).

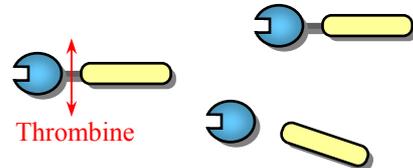
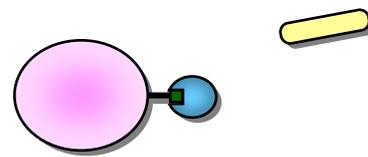
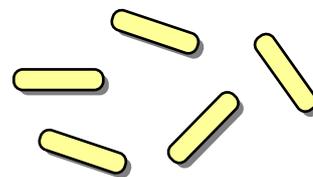
Le lysat de bactéries est incubé pendant une nuit à 4°C en présence d'1 mL de résine glutathion-sépharose. La résine est déposée sur une colonne puis abondamment rincée par 100 volumes de tampon Tris-HCl 50 mM ; EDTA 1 mM ; pH 8,0. La protéine de fusion est éluée par 10 mL d'une solution de Tris-HCl 50 mM ; EDTA 1 mM ; pH 8,0 contenant 30 mM de glutathion réduit, puis quantifiée et incubée en présence de thrombine (20 U/mg de protéine), pendant une nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est alors incubé avec la résine pour séparer la GST du peptide α_1 CB6 recombinant. Le peptide recombinant est élué séparément de la GST, dialysé pendant trois jours contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

① Obtention du lysat bactérien**② Mise en contact avec la résine**

■ : Glutathion

**③ Lavages puis élution de GST - α_1 CB6**

Elution par compétition avec le glutathion libre

④ Clivage de la protéine de fusion par la thrombine**⑤ Mise en contact avec la résine****⑥ Elution de α_1 CB6 recombinant****Figure 26. Purification du peptide recombinant α_1 CB6.**

Les bactéries sont mises en culture pendant une nuit à 37°C, puis la production de protéine recombinante est induite par l'IPTG 0,4 mM pendant 4 h. Le culot bactérien est soumis à sonication pour obtenir les protéines intracellulaires (①). Le lysat est mis en contact avec la résine glutathion-sépharose (②). Après plusieurs lavages, la protéine de fusion GST- α_1 CB6 est éluee par compétition avec 30 mM de glutathion réduit libre (③). La protéine de fusion obtenue est quantifiée puis incubée pendant 20 h à température ambiante en présence de 20 U/mg de thrombine pour libérer le peptide α_1 CB6 de la GST (④). Le produit de digestion est incubé avec la résine (⑤). Le peptide α_1 CB6 est éluee et séparé de GST, retenue par la résine (⑥). *Abréviations* : GST : Glutathion-S-transférase.

Un dosage de protéines est réalisé pour déterminer la quantité de peptide purifié, puis 5 µg de peptide sont analysés par SDS-PAGE à 15 % (m/v) de polyacrylamide (figure 27). L'électrophorèse montre d'une part que le peptide est pur et d'autre part, que la taille affichée correspond à la taille théorique attendue, c'est-à-dire 22 kDa.

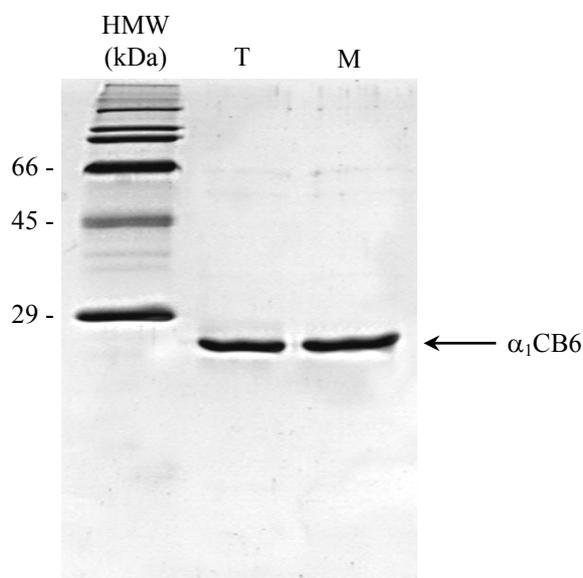


Figure 27. Vérification de la pureté du peptide $\alpha_1\text{CB6}$ recombinant par SDS-PAGE.

5 µg de CB-peptide ont été soumis à une électrophorèse à 15 % (m/v) de polyacrylamide en conditions réductrices. La révélation des protéines est effectuée par coloration au bleu de Coomassie R-250. *Abréviations* : HMW : marqueurs de haute masse moléculaire ; T : $\alpha_1\text{CB6}$ témoin ; M : $\alpha_1\text{CB6}$ muté.

II.2.5. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm écart-type. Les calculs ont été réalisés à l'aide du test t de Student. La significativité des différences entre les valeurs des moyennes a été schématisée de la manière suivante : NS : différence non significative ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

Chapitre III

RESULTATS

III.1. ANALYSE STRUCTURALE DU COLLAGÈNE DE TYPE I CARBAMYLE

Cette première partie a pour objectif de caractériser, grâce à l'utilisation de méthodes physiques et biochimiques, les effets de la carbamylation sur les propriétés structurales et physico-chimiques du collagène de type I.

III.1.1. Composition en acides aminés du collagène carbamylé

L'analyse de la composition en acides aminés (AA) permet d'identifier les AA modifiés par carbamylation après incubation du collagène en présence d'urée ou de cyanate de potassium (KCNO). Cette analyse est réalisée après hydrolyse acide du collagène et consiste en la séparation et la quantification des AA par chromatographie liquide haute performance (CLHP) échangeuse de cations.

La fixation de cyanate sur le groupement α -NH₂ ou la chaîne latérale d'un AA entraîne un changement de son pHi, responsable d'une modification de son comportement en chromatographie échangeuse d'ions. Sur le chromatogramme, ce phénomène se manifeste par la disparition progressive du pic correspondant à l'AA carbamylable et par l'apparition d'un nouveau pic correspond à l'AA carbamylé. Dans le cas du collagène carbamylé, seuls les résidus de lysine constituent une cible pour le cyanate, car les autres AA ne varient pas d'un point de vue quantitatif (figure 15).

Le collagène témoin est composé de 2,6 % de résidus de lysine, soit 26 résidus par chaîne α , constituée d'approximativement 1000 AA (tableau 4). Après carbamylation, la composition en AA du collagène révèle l'apparition d'un nouveau résidu d'AA, l'homocitrulline, concomitante d'une diminution du nombre de lysines, démontrant la transformation des résidus de lysine en résidus d'homocitrulline. Cette transformation est progressive et dépendante du temps de carbamylation. En effet, il y a formation de 1, 4 et 11 résidus d'homocitrulline pour des temps respectifs de carbamylation de 2, 6 et 24 h avec le KCNO 100 mM.

Collagène	Traitement	Lysine	Homocitrulline
Témoïn	KCl 100 mM - 24h	26,1 ± 0,8	n.d.
	KCNO 100 mM - 2h	24,6 ± 0,5	1,0 ± 0,2
	KCNO 100 mM - 6h	21,8 ± 0,6	3,9 ± 0,1
Carbamylé	KCNO 100 mM - 24h	14,7 ± 0,3	11,2 ± 0,6
	Urée 50 mM - 3 mois	24,8 ± 0,4	1,5 ± 0,3
	Urée 50 mM - 6 mois	23,2 ± 0,5	2,9 ± 0,7

Tableau 4. Composition en résidus de lysine et d'homocitrulline des différentes préparations de collagène carbamylé.

Après carbamylation par l'urée ou le KCNO, les collagènes sont soumis à une hydrolyse acide puis leur composition en AA est déterminée par CLHP échangeuse de cations. Les valeurs représentent les moyennes ± écart-types (n=3) calculés à partir de l'analyse complète en AA de chaque préparation de collagène et sont exprimés en nombre de résidus pour 1000. *Abréviation* : n.d. : non détectable.

Pour estimer la réactivité de l'urée par rapport à celle du cyanate de potassium, nous avons également incubé le collagène avec de l'urée à une concentration de 50 mM. Après 3 et 6 mois de traitement, 1,5 et 3 résidus de lysine, respectivement, sont transformés en homocitrulline. Ce processus est plus lent que dans le cas du traitement par le KCNO puisque le temps d'incubation pour obtenir un seul résidu homocitrulline est en moyenne de 2 h en présence de KCNO (100 mM) et de 2 mois en présence d'urée (50 mM). Pour des raisons pratiques, nous avons choisi d'utiliser le plus souvent, dans nos expériences, du collagène de type I carbamylé par le KCNO.

III.1.2. Propriétés électrophorétiques du collagène carbamylé

Pour vérifier l'intégrité du collagène après carbamylation, les différentes préparations sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions réductrices (figure 28). Cette électrophorèse a également pour objectif d'évaluer l'influence de la carbamylation sur la mobilité électrophorétique du collagène.

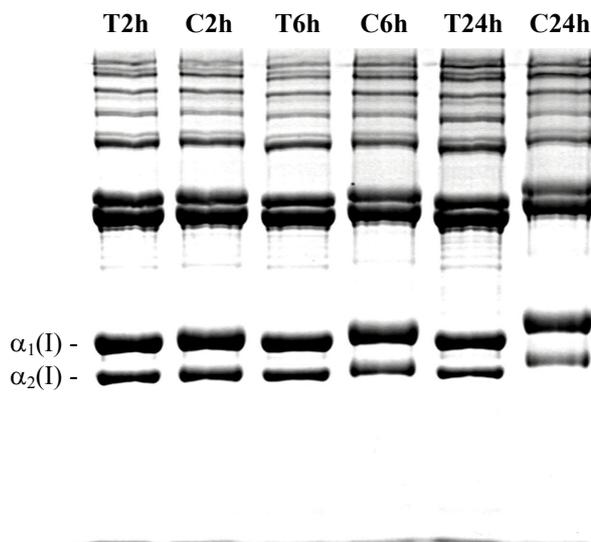


Figure 28. Influence de la carbamylation sur la mobilité électrophorétique du collagène.

5 μg de collagène sont soumis à une électrophorèse à 5 % (m/v) de polyacrylamide en conditions réductrices. Les collagènes analysés ont été préalablement incubés à 37°C pendant 2, 6 et 24 heures respectivement en présence de 100 mM KCl (T2h, T6h et T24h) et de 100 mM KCNO (C2h, C6h, C24h). La révélation des protéines est effectuée par coloration au bleu de Coomassie R-250.

Le collagène de type I natif possède un profil électrophorétique caractéristique qui permet de distinguer deux bandes majoritaires correspondant aux chaînes $\alpha_1(\text{I})$ et $\alpha_2(\text{I})$, ainsi que des bandes de plus haute masse moléculaire, représentant des complexes (non dissociés) formés par l'association de plusieurs chaînes α .

Lorsque le collagène est carbamylé pendant 2, 6 ou 24 heures, il présente le même profil électrophorétique, avec notamment les bandes caractéristiques correspondant aux chaînes $\alpha_1(\text{I})$ et $\alpha_2(\text{I})$. La carbamylation du collagène n'entraîne donc pas de dégradation du collagène.

En revanche, on observe un retard de migration du collagène carbamylé par rapport au collagène témoin, proportionnel au temps de carbamylation.

III.1.3. Sélectivité du processus de carbamylation

III.1.3.1. Mise en évidence par SDS-PAGE

L'analyse de la composition en AA montre que la carbamylation du collagène se traduit par la transformation de résidus de lysine en résidus d'homocitrulline. Toutefois, même si le nombre de résidus modifiés, pour un temps d'incubation donné, est relativement constant, les résultats obtenus ne nous permettent pas d'évaluer la sélectivité de cette réaction.

Pour répondre à cette question, nous avons digéré le collagène par le bromure de cyanogène (CNBr), afin d'évaluer le retard de migration préférentiel de certains peptides (figure 29).

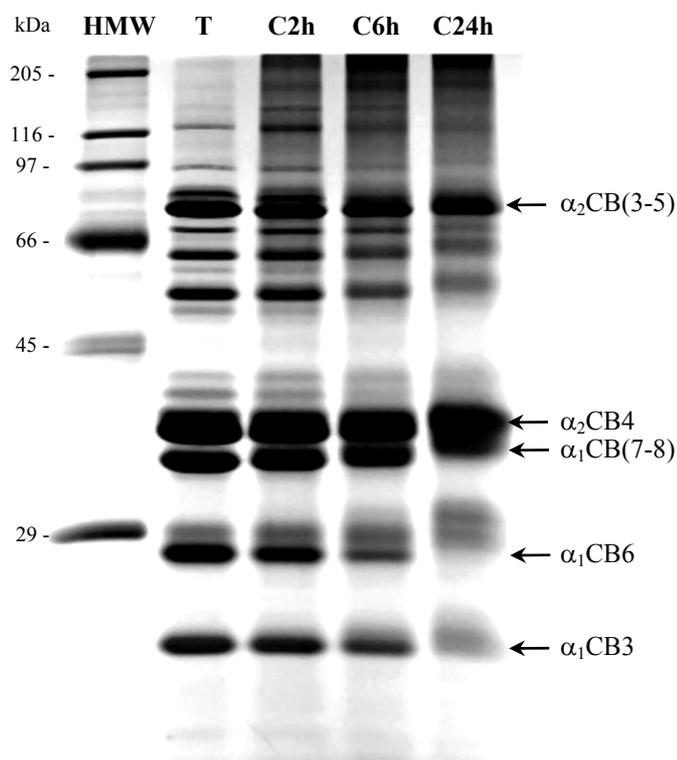


Figure 29. Influence de la carbamylation sur la mobilité électrophorétique des CB-peptides du collagène de type I.

50 μ g de CB-peptides ont été préparés à partir de collagène témoin (T), carbamylé 2h (C2h), 6h (C6h) ou 24h (C24h) puis soumis à une électrophorèse à 12,5 % (m/v) de polyacrylamide en conditions réductrices. La révélation des protéines est effectuée par coloration au bleu de Coomassie R-250. *Abréviation* : HMW : marqueurs de haute masse moléculaire.

Le clivage du collagène par le bromure de cyanogène (qui clive après les résidus de méthionine) permet la formation de fragments appelés CB-peptides. Dans le cas du collagène de type I, la séparation électrophorétique de ces fragments donne lieu à un profil caractéristique permettant de distinguer les CB-peptides suivants : α_1 CB3, α_1 CB6, α_1 CB(7-8), α_2 CB4 et α_2 CB(3-5), qui ont été identifiés par analogie avec les données de la littérature [Butkowski *et al.*, 1982].

Après 24 heures de carbamylation en présence de KCNO, tous les CB-peptides présentent un retard de migration électrophorétique. En revanche, pour des temps plus courts de carbamylation (c'est-à-dire 2 ou 6 heures), seuls certains CB-peptides migrent moins loin que les CB-peptides du collagène témoin, particulièrement les CB-peptides α_1 CB6 et α_1 CB(7-8), pour lesquels le retard de migration apparaît dès deux heures de traitement. Ces résultats montrent que la fixation de cyanate sur les groupements ϵ -NH₂ des résidus de lysine n'est pas un phénomène aléatoire et qu'il existe des sites préférentiels de carbamylation au sein de la molécule de collagène de type I.

III.1.3.2. Mise en évidence par électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse de la figure 29 a permis de montrer, de manière indirecte, que certains CB-peptides étaient préférentiellement carbamylés. Nous avons ensuite caractérisé ces peptides à l'aide d'une technique plus résolutive, l'électrophorèse bidimensionnelle. Le principe de cette technique est de séparer dans un premier temps les CB-peptides en fonction de leur point isoélectrique ou pHi (isoélectrofocalisation ou IEF), avant de les séparer en fonction de leur masse moléculaire (SDS-PAGE). L'étape d'isoélectrofocalisation permet de mettre en évidence la carbamylation des différents CB-peptides, puisque la modification des groupements ϵ -NH₂ des résidus de lysine entraîne une diminution du pHi. Ainsi, plus le nombre de résidus de lysine modifiés est important, plus le pHi du peptide est faible, et l'intensité du déplacement des spots vers des pHi plus faibles est directement liée au taux de carbamylation du peptide.

Les gels obtenus après séparation des CB-peptides par électrophorèse bidimensionnelle (figure 30) ont été analysés à l'aide du logiciel PDQuest, qui a permis, à partir de standards protéiques (figure 16), de déterminer les pHi des différents spots correspondant aux peptides analysés.

Parmi l'ensemble des CB-peptides, α_1 CB6 est le seul à présenter un déplacement précoce de ses spots vers des pHi plus faibles. Nous nous sommes particulièrement intéressé à l'évolution du taux de carbamylation de ce peptide, parce qu'il est spécialement impliqué dans l'interaction avec les PNN [Monboisse *et al.*, 1990].

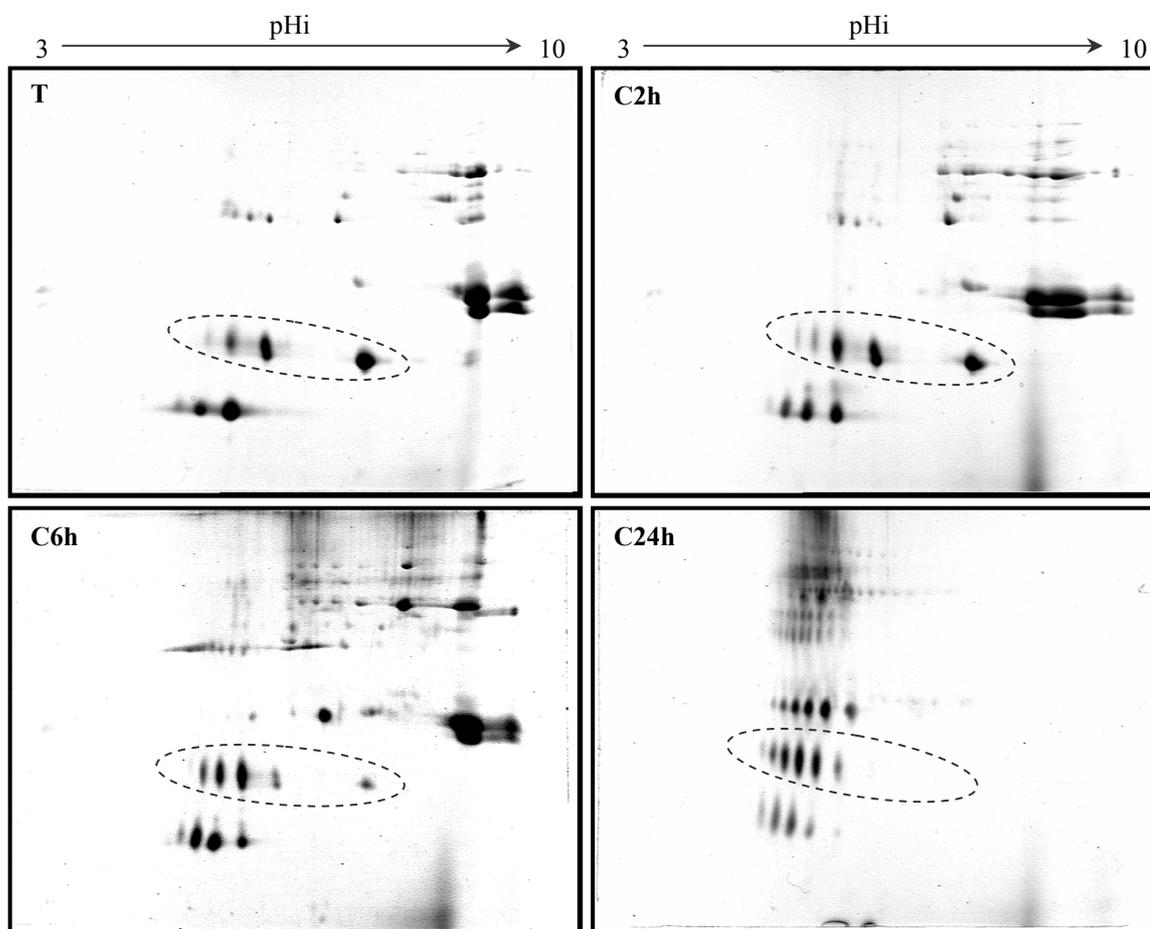


Figure 30. Mise en évidence par électrophorèse bidimensionnelle de la carbamylation préférentielle du peptide α_1 CB6.

300 μ g de CB-peptides sont séparés par électrophorèse bidimensionnelle. La première dimension est une IEF avec un gradient de pH compris entre 3 et 10, et la seconde dimension est une SDS-PAGE à 12,5 % (m/v) de polyacrylamide. Après la migration, les gels sont colorés au bleu de Coomassie R-250. Les spots correspondant au peptide α_1 CB6 sont entourés en pointillés. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2 h ; C6h : collagène carbamylé 6 h ; C24h : collagène carbamylé 24 h.

La séparation des CB-peptides du collagène témoin fait apparaître quatre spots dont trois majoritaires pour α_1 CB6, deux spots majeurs de pHi 8,1 et 6,6 et deux spots moins prononcés de pHi 6,1 et 5,8 (tableau 5). Après 2 h de carbamylation, le nombre de spots visibles passe à cinq.

On retrouve les quatre spots décrits pour le collagène témoin, mais aussi un nouveau, moins visible, possédant un pHi plus faible (*i.e.* 5,5).

Pour les CB-peptides du collagène carbamylé 6h, les spots caractéristiques du collagène témoin deviennent minoritaires, au profit de spots de pHi plus faible, déjà visualisables après 2 h de carbamylation. Après 24 h de carbamylation, on note la disparition complète des spots de pHi élevé et l'apparition de trois nouveaux spots de pHi respectivement égal à 5,3, 5,1 et 4,9.

CB-Peptides	pHi des différents spots correspondant à α_1 CB6
Collagène témoin	8,1
	6,6
	<i>6,1</i>
	<i>5,8</i>
Collagène carbamylé 2h	8,1
	6,6
	6,1
	<i>5,8</i>
Collagène carbamylé 6h	<i>5,5</i>
	<i>8,1</i>
	<i>6,6</i>
	6,1
Collagène carbamylé 24h	5,8
	5,5
	<i>6,1</i>
	<i>5,8</i>
Collagène carbamylé 24h	5,5
	5,3
	5,1
	4,9

Tableau 5. Détermination des pHi des différents spots correspondant à α_1 CB6.

Les gels obtenus après séparation des CB-peptides par électrophorèse bidimensionnelle sont analysés à l'aide du logiciel PDQuest qui permet de déterminer le pHi des CB-peptides à partir d'un mélange de standards protéiques (figure 16). Légende : les chiffres en gras représentent les spots majoritaires et les chiffres en italique les minoritaires.

Le pHi des autres CB-peptides est peu modifié après carbamylation, hormis pour les CB-peptides issus du collagène carbamylé 24h, qui présentent tous un taux de carbamylation élevé.

Ces résultats montrent que le peptide α_1 CB6 constitue une cible préférentielle pour la réaction de carbamylation, par rapport à d'autres CB-peptides, comme α_2 CB(3-5) ou α_2 CB4, pour lesquels la carbamylation n'est visible qu'après 24 h de traitement par le KCNO.

III.1.4. Analyse du collagène carbamylé par dichroïsme circulaire

Après avoir vérifié et caractérisé la réaction de carbamylation du collagène, nous avons évalué son impact structural. Dans un premier temps, la conformation de la triple hélice de collagène carbamylé a été déterminée par dichroïsme circulaire (DC). En effet, l'hélice de type polyproline formée par les chaînes α du collagène donne un signal caractéristique en DC, si bien que toute altération de la structure générale de cette hélice peut être décelée grâce à cette technique.

Les spectres de DC obtenus pour les collagènes carbamylés présentent la même allure que le spectre correspondant au collagène témoin, avec des valeurs minimale et maximale d'ellipticité molaire (θ) à 198 nm et 221 nm, respectivement, et un point de croisement (« crossover ») à 213 nm (figure 31).

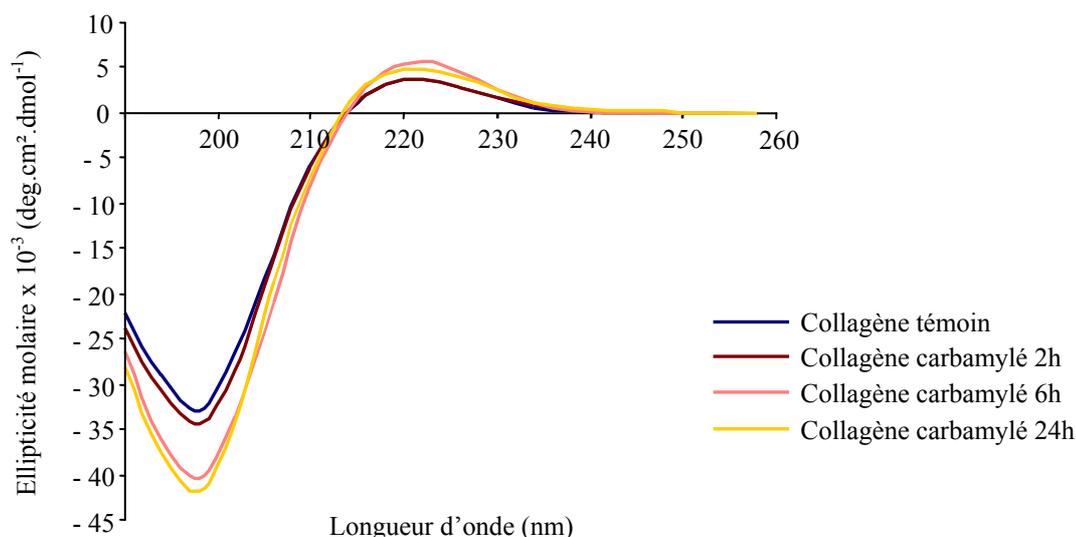


Figure 31. Analyse du collagène carbamylé par dichroïsme circulaire.

Les différents spectres de DC représentent la moyenne de deux spectres enregistrés à température ambiante à partir de préparations de collagène solubilisé dans l'acide acétique 50 mM. Le spectre de l'acide acétique 50 mM est ensuite soustrait des spectres correspondant aux différents collagènes.

Ces spectres sont en accord avec une structure en hélice de type polyproline, en particulier la bande à 221 nm qui est couramment utilisée pour caractériser l'hélicité du collagène. D'après ces résultats, la carbamylation n'induit pas de dénaturation de la structure en hélice, typique du collagène. Cependant, les spectres des collagènes carbamylés présentent quelques différences par rapport à celui du collagène témoin, dont des variations des valeurs d'ellipticité molaire à 198 nm et 221 nm, qui s'amplifient avec le temps de carbamylation. En effet, les collagènes carbamylé 6h et carbamylé 24h présentent un spectre avec une augmentation de la bande positive (221 nm) et une diminution de la bande négative (198 nm), par rapport aux collagènes témoin et carbamylé 2h. Les modifications les plus visibles interviennent donc entre les temps 2h et 6h de carbamylation. En revanche, aucune différence significative n'est observée entre les spectres de collagènes carbamylé 6h et carbamylé 24h.

Pour déterminer si les variations d'ellipticité molaire avaient une incidence sur la stabilité de la triple hélice, nous avons testé sa résistance à la température, en prenant comme indicateur la température de dénaturation (tableau 6).

Collagène	Température de dénaturation (°C)
Témoin	40,8
Carbamylé 2h	39,8
Carbamylé 6h	40,3
Carbamylé 24h	38,8

Tableau 6. Température de dénaturation des différentes préparations de collagènes.

Pour évaluer la dénaturation de la triple hélice de collagène par la température, l'ellipticité molaire à 221 nm est mesurée au cours d'une augmentation progressive de température selon un gradient linéaire de 2°C/min. La température de dénaturation de la triple hélice de collagène est déterminée grâce au point d'inflexion des courbes.

Les températures de dénaturation obtenues pour les collagènes témoin, carbamylé 2h et carbamylé 6h sont respectivement 40,8°C, 39,8°C et 40,3°C. Ces valeurs quasiment similaires sont légèrement supérieures à la température de dénaturation du collagène carbamylé 24h (*i.e.* 38,8°C), indiquant que le collagène carbamylé 24h perd plus rapidement sa structure en triple hélice que les autres collagènes sous l'effet d'une augmentation de température.

III.1.5. Analyse du collagène carbamylé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

Les informations obtenues en DC ont permis de montrer que le collagène conserve sa structure en hélice après carbamylation tout en évoquant de possibles modifications conformationnelles « mineures » non détectables avec cette technique, mais ayant une répercussion sur la stabilité de la triple hélice. Pour mettre en évidence ces modifications, les différents types de collagène carbamylé ont été analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (figure 32). Cette technique de spectroscopie vibrationnelle donne des informations structurales à un niveau moléculaire en mesurant les modes et intensités de vibration des liaisons covalentes des protéines.

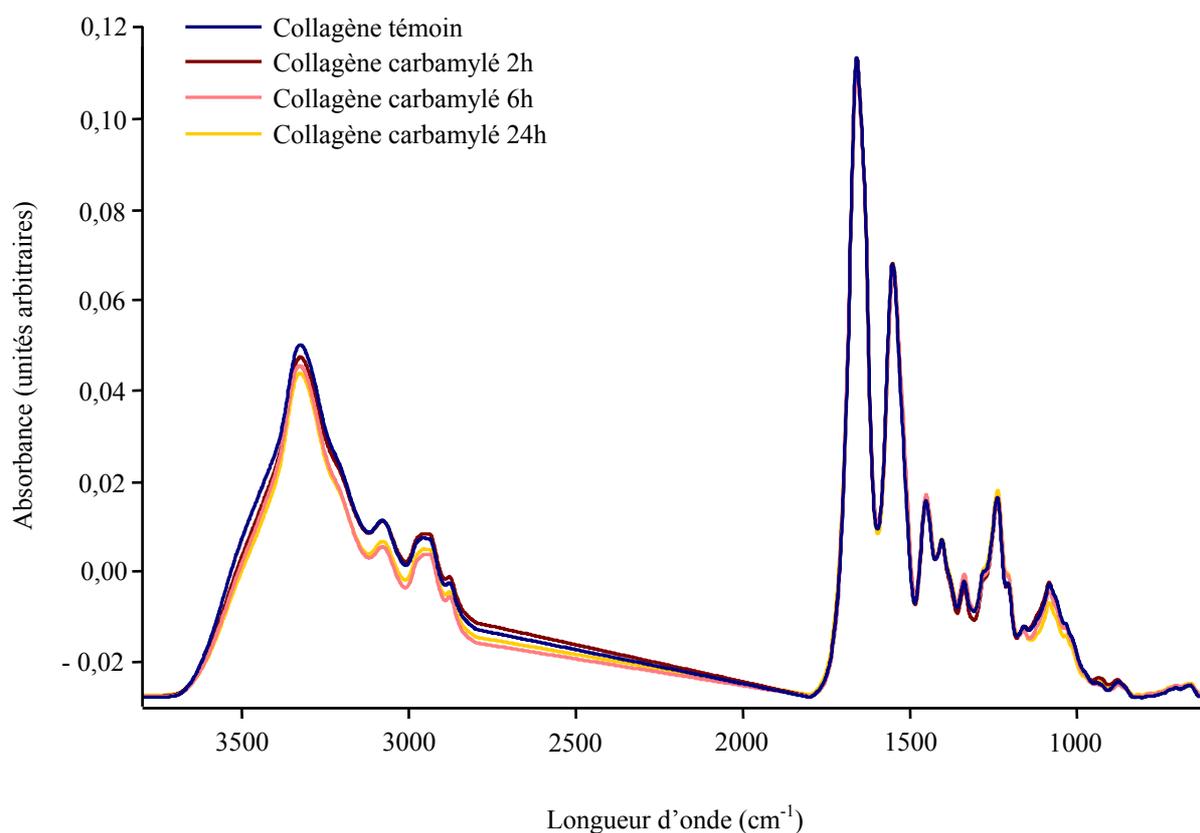


Figure 32. Analyse du collagène carbamylé par spectroscopie IR-TF.

Les spectres IR-TF sont enregistrés sur la région 4000-400 cm⁻¹ à température ambiante à partir de pastilles obtenues après compression d'un mélange de collagène et de KBr.

L'analyse visuelle des spectres des collagènes témoin et carbamylés obtenus par spectroscopie IR-TF ne montre que de très faibles différences. Ces spectres sont même superposés au niveau de la région caractéristique des liaisons peptidiques, située entre 1500 et 1700 cm^{-1} .

Le calcul des dérivées secondes des spectres permet, après analyse statistique multivariée, de déterminer un coefficient d'hétérogénéité entre les différents spectres, et de les classer en plusieurs groupes. L'étude statistique, de type HCA (pour « hierarchical cluster analysis » ou analyse par répartition hiérarchique), consiste à calculer la distance entre deux spectres sur une zone de longueur d'onde donnée, et à représenter les résultats sous forme d'un dendogramme faisant apparaître les homologues existant entre les différents groupes de spectres (figure 33). Cette approche permet de classer les spectres, même si les différences spectrales ne sont pas détectables visuellement.

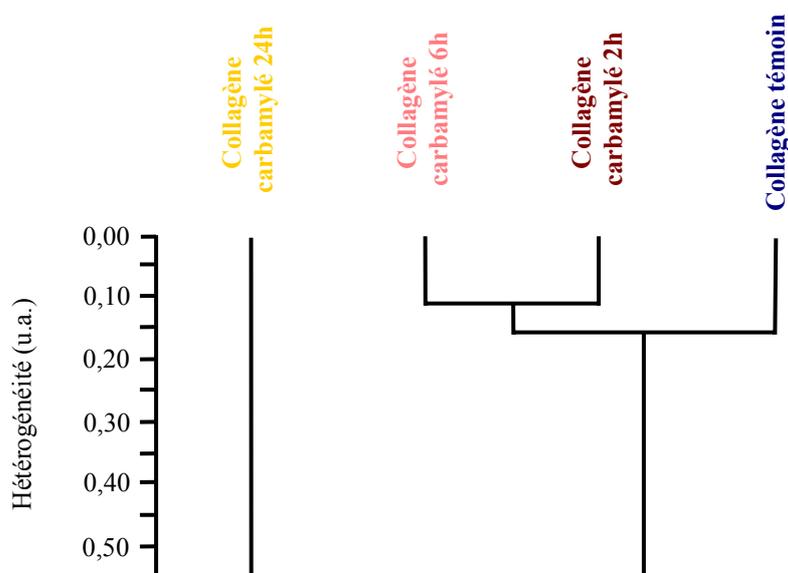


Figure 33. Dendogramme obtenu après analyse statistique des dérivées secondes des spectres IR-TF des différents types de collagène.

L'analyse statistique de type HCA est effectuée à partir des dérivées secondes des spectres normalisés des collagènes témoin, carbamylé 2h, 6h et 24h (4 spectres par type de collagène), sur la région amide I ($1680-1740 \text{ cm}^{-1}$). La normalisation, qui permet de comparer la même quantité de matière, est effectuée sur tous les spectres, après correction de la ligne de base, par la méthode vectorielle, qui consiste à amener la surface des spectres à une même valeur arbitraire. La répartition en différents groupes est basée sur le calcul de la distance entre les spectres, qui permet de définir un coefficient d'hétérogénéité. *Abréviation* : u.a. : unités arbitraires.

L'analyse par HCA des dérivées secondes des spectres IR-TF des quatre types de collagène a été réalisée sur la région 1680-1740 cm^{-1} . Cette région du spectre est caractéristique de la bande amide I, et plus particulièrement de la déformation du groupement C=O de la liaison peptidique. Comme le montre le dendogramme de la figure 33, les spectres IR-TF sont répartis en deux groupes distincts avec une très nette différenciation entre le collagène carbamylé 24h et les autres collagènes, indiquant des modifications spectrales entre ces deux groupes dans la région amide I. Au sein du second groupe de spectres, un sous-groupe, formé des collagènes carbamylé 2h et carbamylé 6h, peut être différencié du collagène témoin. La reproductibilité des résultats de cette analyse statistique réalisée sur 16 spectres (4 par type de collagène, dont la moyenne est représentée sur le dendogramme) permet de valider l'existence de modifications du mode de vibration de certaines liaisons, dues à un changement conformationnel du collagène après carbamylation.

III.1.6. Analyse du collagène carbamylé par spectroscopie Raman

Par rapport à la spectroscopie IR-TF, la spectroscopie Raman permet d'apporter des informations complémentaires concernant les modes de vibration de certaines liaisons, plus difficilement détectables par la méthode précédente. Ainsi, cette technique permet de mieux visualiser toute modification du mode de vibration (c'est-à-dire un déplacement du pic) ou de l'intensité relative de vibration d'une liaison covalente, engendrant un changement conformationnel ou la dénaturation de la protéine.

Pour faciliter l'interprétation, nous avons comparé uniquement le collagène témoin et le collagène carbamylé 24h, qui présentent le plus grand degré d'hétérogénéité en spectroscopie IR-TF.

Les bandes majoritaires de chaque spectre sont repérées, et un mode de vibration leur est attribué à partir des données de la littérature [Badii et Howell, 2003 ; Ikoma *et al.*, 2003]. Dans leur ensemble, les variations entre les deux spectres sont de faible importance en terme d'intensité et de changement de fréquence (figure 34, tableau 7).

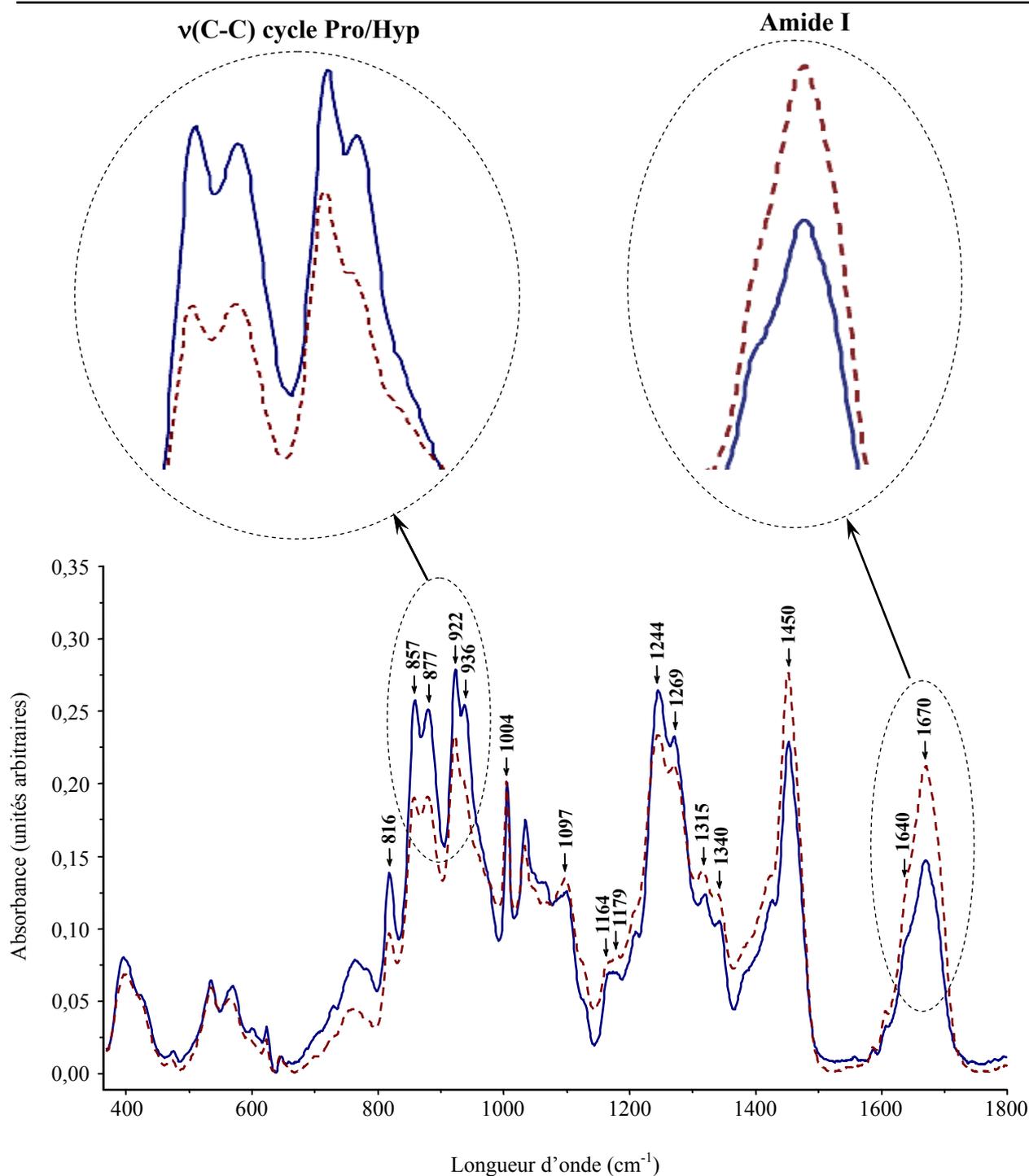


Figure 34. Spectres Raman des collagènes témoin et carbamylé 24h.

Chaque spectre Raman représente la moyenne de trois enregistrements distincts effectués sur la région 400-1800 cm^{-1} puis normalisés. La normalisation est effectuée sur la totalité de la zone spectrale en amenant la surface totale de tous les spectres à une même valeur arbitraire. Cette figure permet la comparaison entre les spectres Raman du collagène témoin (ligne bleue continue) et du collagène carbamylé 24h (ligne rouge en pointillés). Deux régions importantes du spectre ont été agrandies : la région amide I et les deux doublets de pics correspondant à la vibration du cycle des résidus de proline et d'hydroxyproline.

Collagène témoin (cm ⁻¹)	Collagène carbamylé 24 h (cm ⁻¹)	Attribution
1670	1670	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$
1640	1640	Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$
1606	1606	Phe, Tyr
1586	1586	Pro, Hyp
1452	1450	$\delta(\text{CH}_2)$
1425	1423	$\nu(\text{COO}^-)$
1342	1340	$\gamma_w(\text{CH}_2)$
1317	1315	$\gamma_t(\text{CH}_2)$
1269	1269	Amide III $\delta(\text{NH}_2)$
1244	1244	Amide III $\delta(\text{NH}_2)$
1208	1206	Hyp, Tyr
1178	1179	NH_3^+
1164	1164	NH_3^+
1125	1122	$\nu(\text{C}-\text{N})$
1098	1097	$\nu(\text{C}-\text{N})$
1062	1062	Groupement carboxyle OH
1046	1046	n.a.
1033	1031	Phe
1004	1004	Phe
936	936	$\nu(\text{C}-\text{C})$ du squelette protéique
922	922	$\nu(\text{C}-\text{C})$ du cycle de la Pro
877	877	$\nu(\text{C}-\text{C})$ du cycle de l'Hyp
857	857	$\nu(\text{C}-\text{C})$ du cycle de la Pro
816	816	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$; $\nu(\text{C}-\text{C})$ du squelette protéique

Tableau 7. Identification des bandes présentes sur les spectres Raman des collagènes témoin et carbamylé 24h.

Chaque pic constituant les spectres de la figure 34 est repéré puis un type de vibration caractéristique lui est attribué sur la base des données de la littérature. Les modes de vibration répertoriés dans ce tableau sont les suivants : ν : élongation ; δ : déformation dans le plan ; γ_w : déformation hors du plan ; γ_t : cisaillement. Les bandes qui apportent des informations concernant les modifications conformationnelles induites par la carbamylation sont surlignées en gris. *Abréviations* : n.a. : non attribué ; Hyp : hydroxyproline ; Pro : proline ; Phe : phénylalanine ; Tyr : tyrosine.

La comparaison des deux spectres porte sur trois points majeurs : les régions représentatives des liaisons peptidiques en général (bandes amide I et III), la vibration de la chaîne latérale des résidus de lysine et les vibrations qui témoignent de la conformation générale de la triple hélice.

Parmi les vibrations généralement étudiées pour les protéines, la bande amide I correspond à l'élongation du C=O de la liaison peptidique. La présence de cette bande mesurée à 1670 cm^{-1} pour les deux spectres permet d'affirmer que la structure générale est relativement bien conservée pour le collagène carbamylé 24h, même si l'intensité de vibration de cette bande est significativement augmentée. Cette augmentation peut s'expliquer par la présence de groupements C=O supplémentaires ou par des différences dans l'arrangement des fibres de collagène. La stabilité de la conformation générale de la protéine est confirmée de la même manière par la persistance de la bande amide III à $1244\text{-}1269\text{ cm}^{-1}$ pour le collagène carbamylé 24h.

La fixation de cyanate sur la chaîne latérale des résidus de lysine se manifeste par une modification du mode de vibration et de l'intensité des bandes correspondant aux groupements CH_2 (1317 , 1352 et 1452 cm^{-1}) et aux liaisons C-N (1098 et 1125 cm^{-1}). Ces décalages de fréquence démontrent l'alourdissement de la chaîne latérale des résidus de lysine dû à la fixation de cyanate.

Par ailleurs, des changements dans l'intensité de vibration des liaisons C-C du squelette protéique et des hétérocycles des résidus de proline et d'hydroxyproline sont mis en évidence par les bandes situées dans la région $816\text{-}936\text{ cm}^{-1}$ du spectre. Ce phénomène se manifeste par la modification du rapport d'intensité des doublets ($936/922$ et $877/857$), traduisant une modification de l'environnement local de ces groupements.

Tous ces éléments permettent d'affirmer que la carbamylation n'entraîne pas de dénaturation du collagène mais génère des modifications conformationnelles « locales » de la triple hélice.

III.1.7. Mesure de l'hélicité du collagène carbamylé par polarimétrie

Pour compléter et vérifier les informations structurales fournies par les méthodes spectroscopiques, l'hélicité du collagène a été mesurée par polarimétrie. La valeur du pouvoir

rotatoire du collagène à 435 nm procure des indications sur l'état de la triple hélice, plus précises que celles obtenues en dichroïsme circulaire, et permet de déterminer si le collagène conserve sa structure en triple hélice après carbamylation.

A 27°C, le collagène témoin en solution dans l'acide acétique 18 mM possède un pouvoir rotatoire de $-463^\circ \pm 9^\circ$ (tableau 7). Des valeurs comparables sont obtenues pour les collagènes carbamylé 2h et carbamylé 6h, alors que le pouvoir rotatoire du collagène carbamylé 24h est de $-365^\circ \pm 7^\circ$, et se rapproche de celui de la gélatine et du collagène dénaturé (*i.e.* respectivement $-222^\circ \pm 2^\circ$ et $-226^\circ \pm 5^\circ$), qui ont perdu leur structure hélicoïdale. Ces résultats montrent qu'entre 6h et 24h de carbamylation, le collagène perd 40 % de sa structure en triple hélice.

Collagène	$[\alpha]_{435\text{nm}}$ à 27°C	Taux d'hélicité (en % par rapport au collagène témoin)
Témoin	$-463^\circ \pm 9^\circ$	100
Carbamylé 2h	$-465^\circ \pm 8^\circ$	100
Carbamylé 6h	$-473^\circ \pm 9^\circ$	100
Carbamylé 24h	$-365^\circ \pm 7^\circ$	60
Gélatine	$-222^\circ \pm 6^\circ$	0
Dénaturé 30 min à 60°C	$-226^\circ \pm 5^\circ$	0

Tableau 7. Mesure de l'hélicité du collagène par polarimétrie.

Le pouvoir rotatoire $[\alpha]$ des différentes préparations de collagène, mesuré à 435 nm et à 27°C, est présenté sous la forme moyenne \pm écart-type ($n=3$) et exprimé en degrés. Le taux d'hélices (en pourcentages) de chaque collagène est calculé par rapport au collagène témoin (100 %). La gélatine et le collagène dénaturé par chauffage à 60°C pendant 30 min sont utilisés comme témoins négatifs.

III.1.8. Evaluation de la fibrillogenèse du collagène carbamylé *in vitro*

Après avoir mis en évidence des modifications conformationnelles locales de la triple hélice après carbamylation, nous avons testé la capacité du collagène à former des agrégats supramoléculaire (ou fibres) dans des conditions bien définies de pH et de température [Wood et Keech, 1960].

Le phénomène de fibrillogenèse du collagène peut être suivi par turbidimétrie car la formation du gel génère un trouble à 400 nm proportionnel à sa densité. Pour le collagène témoin, ce phénomène est caractérisé par une courbe de type sigmoïde et comprend trois phases : une phase de latence, une phase exponentielle qui correspond à l'assemblage du gel, et un plateau qui reflète la densité et la stabilité du gel formé (figure 35). Un collagène dénaturé (c'est-à-dire ayant perdu sa structure en triple hélice) est incapable de former des fibrilles et ne présente aucune augmentation de la turbidité en fonction du temps d'incubation.

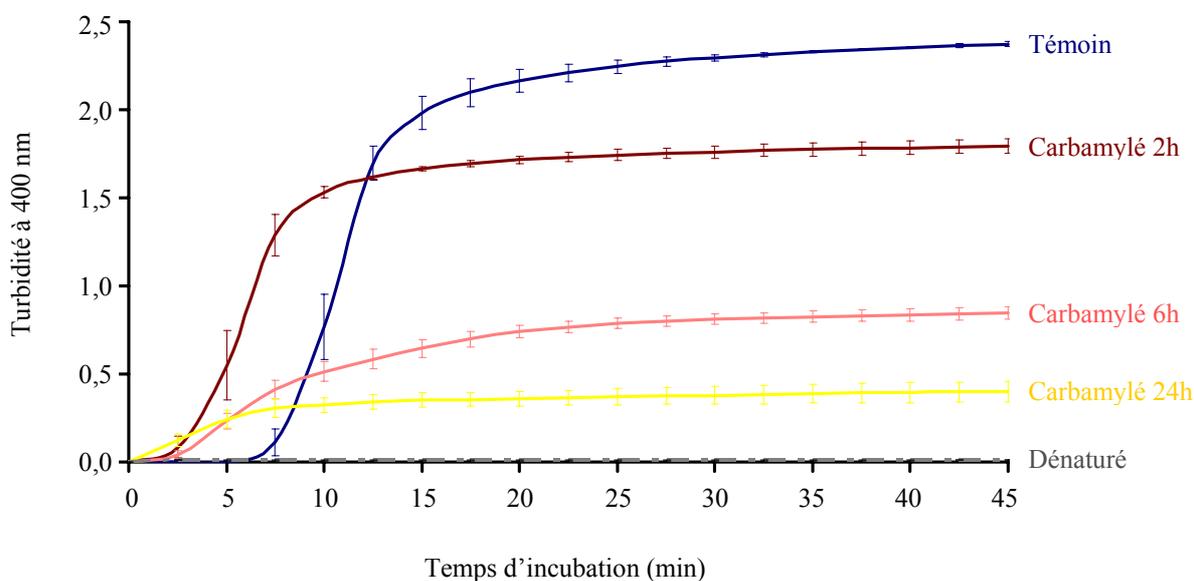


Figure 35. Influence de la carbamylation sur le processus de fibrillogenèse du collagène.

Les solutions de collagène sont diluées dans un tampon phosphate à pH physiologique puis incubées à 30°C. La turbidité à 400 nm est régulièrement mesurée pour suivre le processus de fibrillogenèse. Chaque point de la courbe représente la moyenne \pm écart-types de 3 expériences indépendantes. Le collagène dénaturé par chauffage à 60°C pendant 30 min est utilisé comme témoin négatif de fibrillogenèse.

Pour les collagènes carbamylés, la fibrillogenèse est caractérisée par une réduction de la phase de latence, suggérant un assemblage des molécules de collagène plus rapide que pour le collagène témoin. De plus, les courbes de fibrillogenèse présentent une très nette diminution de la pente de la phase exponentielle, dépendante du temps de carbamylation, ainsi que des valeurs maximales de turbidité atteintes au plateau, qui sont, dans le cas des collagènes carbamylés 6h et 24h, quatre à cinq fois inférieures à celles obtenues pour le collagène témoin.

Ces résultats suggèrent que la carbamylation entraîne un assemblage rapide mais anarchique des molécules de collagène, aboutissant à une baisse de densité des gels formés, probablement due à une diminution du nombre de fibres.

III.1.9. Mesure de la température de fusion des gels de collagène carbamylé

Pour évaluer la répercussion du défaut de fibrillogenèse sur la stabilité des gels de collagène, nous avons testé leur résistance à la température. Des gels de collagène, formés dans les mêmes conditions qu'au paragraphe III.1.8., sont soumis à une augmentation croissante de température, et la turbidité à 400 nm est régulièrement mesurée (figure 36). Les courbes obtenues lors de ces expériences sont caractérisées par un plateau, suivi d'une chute brutale de la turbidité, qui marque la dissociation du gel.

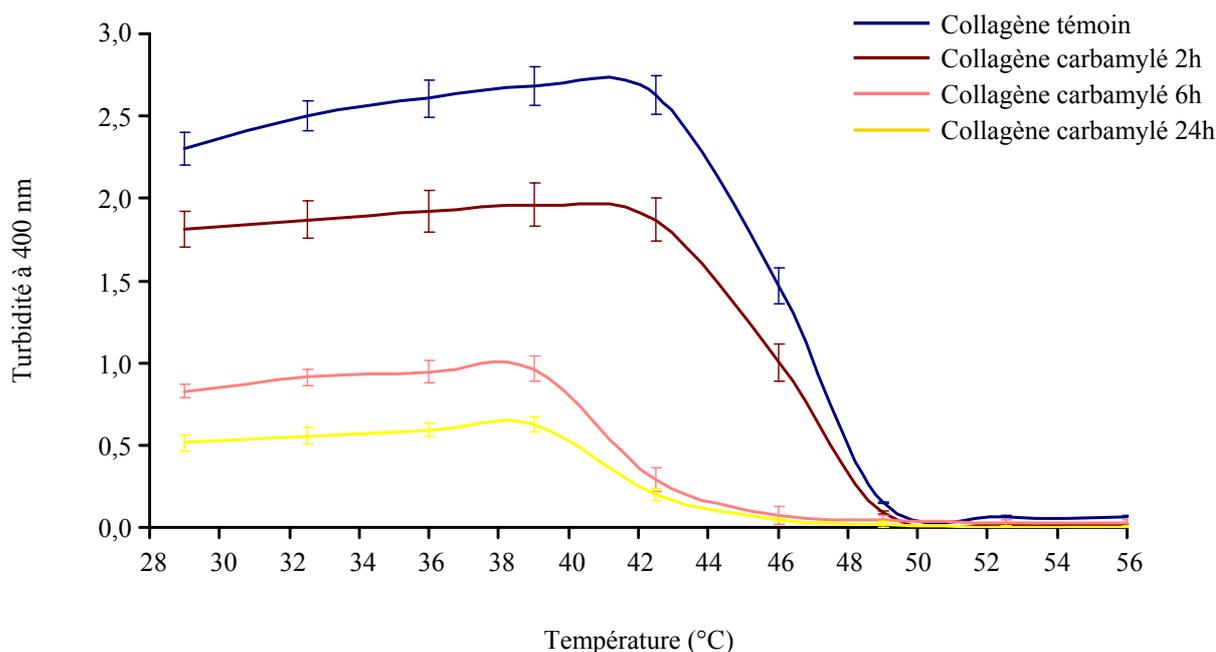


Figure 36. Influence de la carbamylation sur la résistance des gels de collagène à la température.

Les gels de collagène sont soumis à une augmentation progressive de température (+ 2°C/min). Le processus de dénaturation par la température est suivi par la mesure de la turbidité à 400 nm.

La température de fusion, qui correspond à la température pour laquelle la turbidité à 400 nm est égale à la moitié de sa valeur maximale, est pratiquement similaire pour les gels de collagène témoin et carbamylé 2h (*i.e.* respectivement 46,5°C et 46,0°C). Comme dans le cas du test de fibrillogenèse, le changement le plus important se produit entre 2h et 6h de carbamylation, car les températures de fusion des gels constitués des collagènes carbamylé 6h et carbamylé 24h chutent significativement, atteignant respectivement 41,5°C et 41,0°C. Ces résultats montrent que la carbamylation induit une plus grande sensibilité des gels de collagène à la température.

III.1.10. Aspect morphologique du collagène carbamylé

III.1.10.1. Etude de la structure des gels de collagène carbamylé

Les expériences de fibrillogenèse ont montré une baisse de densité des gels de collagène carbamylé. Pour savoir si cette baisse était due à une diminution du diamètre des fibres ou à un réel défaut d'assemblage et de formation des fibres, l'homogénéité des gels a été évaluée par coloration et par microscopie électronique à balayage.

Des gels de collagènes ont été séchés après polymérisation puis colorés au bleu de Coomassie R-250. La coloration permet de rendre compte de l'homogénéité du gel. La figure 37A montre un gel relativement uniforme pour le collagène témoin, alors que les gels de collagène carbamylé apparaissent plus hétérogènes, avec la présence d'amas plus denses. Ce phénomène s'intensifie avec le temps de carbamylation, et c'est pour le collagène carbamylé 24h que l'hétérogénéité est la plus évidente.

Ce phénomène a été confirmé par l'observation des gels en microscopie électronique à balayage (figure 37B). En effet, pour le collagène carbamylé 24h, la formation du gel est relativement incomplète et anarchique par rapport au collagène témoin, comme en témoigne l'existence de zones de dissociation apparentées à de véritables trous.

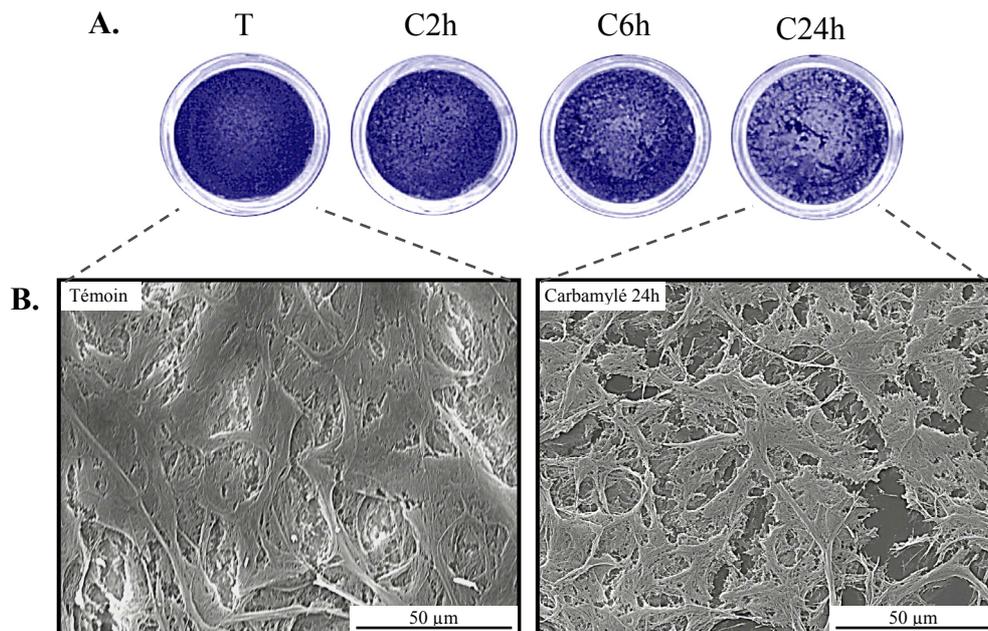


Figure 37. Influence de la carbamylation sur la structure des gels de collagène.

(A) : les gels de collagène ont été polymérisés pendant 2 h à 37°C en plaque 24 puits, puis séchés et colorés au bleu de Coomassie R-250. (B) : Les gels, formés dans les mêmes conditions, sont déshydratés et observés au microscope électronique à balayage. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h.

III.1.10.2. Aspect morphologique des fibres de collagène carbamylé en microscopie électronique à balayage

Comme les résultats précédents montrent un défaut d'assemblage des molécules de collagènes, nous avons déterminé si ce phénomène était également lié à une modification de l'organisation et de la taille des fibres, par l'observation du collagène carbamylé en microscopie électronique à balayage (MEB).

Les observations en MEB montrent que 2 h de carbamylation n'altèrent pas la structure fibrillaire du collagène ni son organisation en réseau en comparaison avec le collagène témoin (figure 38). En revanche, l'augmentation du temps de carbamylation induit une modification progressive de l'organisation des fibres, plus visible après 24 h de carbamylation. Ces changements associent une diminution du diamètre des fibres à une altération du réseau, qui apparaît plus serré que dans le cas du collagène témoin.

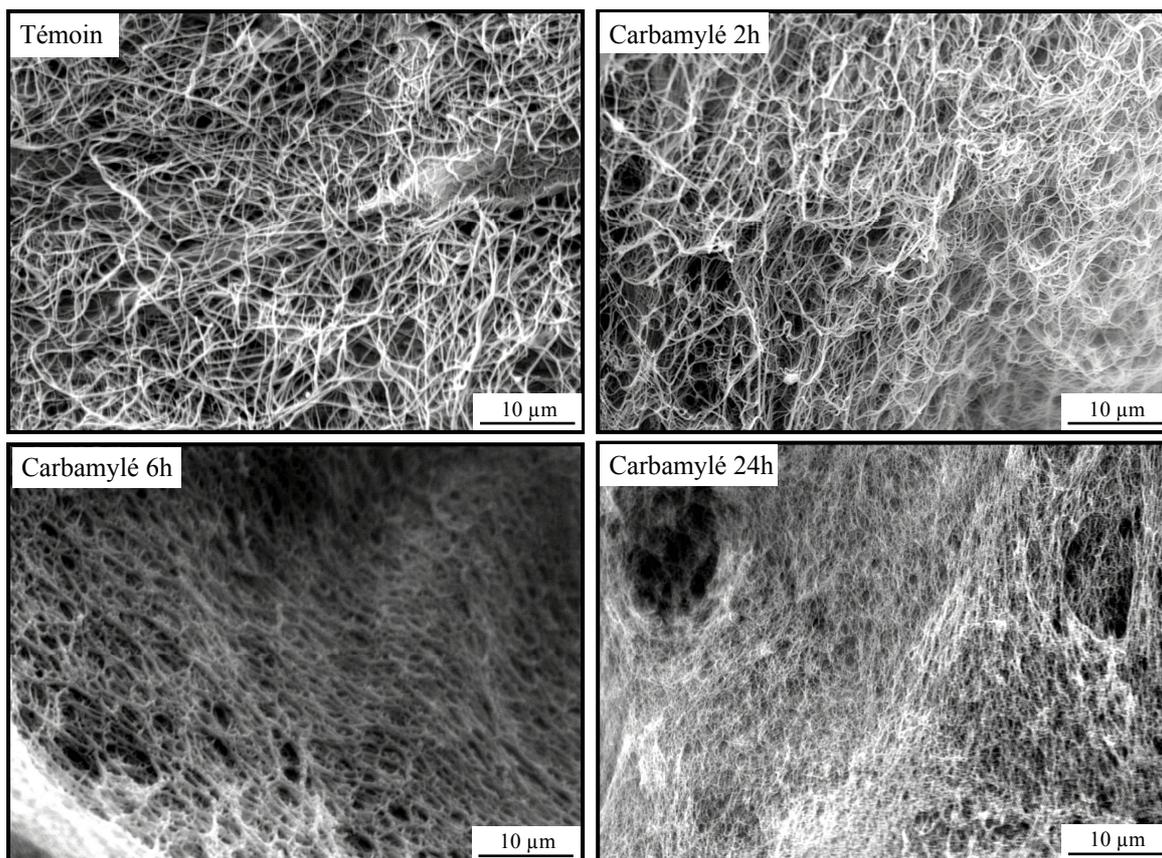


Figure 38. Observation du collagène carbamylé en microscopie électronique à balayage.

Le collagène sous forme lyophilisée est déshydraté puis métallisé pour permettre son observation au microscope électronique à balayage.

En conclusion, l'analyse structurale a permis de montrer que la carbamylation n'induit pas de dénaturation complète du collagène, mais plutôt des modifications locales de la structure de la triple hélice, entraînant une perte de son hélicité. Ces anomalies structurales sont modérées mais néanmoins responsables d'un problème d'assemblage des molécules de collagène les unes par rapport aux autres, à l'origine d'un défaut de fibrillogenèse et d'une plus grande fragilité des gels de collagène.

III.2. SENSIBILITE DU COLLAGENE CARBAMYLE A LA PROTEOLYSE ENZYMATIQUE

Dans la partie précédente, nous avons montré que la carbamylation entraînait une altération de la structure en triple hélice du collagène. Sachant que l'état de la triple hélice est un facteur essentiel dans le mécanisme de dégradation du collagène [Lauer-Fields, 2002], nous avons déterminé, dans ce deuxième chapitre, les conséquences de la carbamylation sur la sensibilité du collagène à la protéolyse enzymatique.

III.2.1. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase bactérienne

La collagénase bactérienne est une enzyme peu spécifique capable de cliver les collagènes en petits fragments. Nous l'avons utilisée en première approche pour mettre en évidence une éventuelle différence de sensibilité du collagène carbamylé à la protéolyse enzymatique.

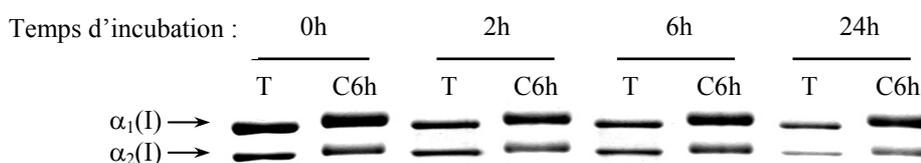
III.2.1.1. Mise en évidence par électrophorèse

Le collagène, après incubation pendant 2, 6 et 24 heures à 37°C avec la collagénase bactérienne extraite de *Clostridium histolyticum* (qualité CLSPA), est soumis à une électrophorèse de type SDS-PAGE. La quantification des bandes correspondant aux chaînes α permet d'établir le pourcentage de dégradation. Pour ces expériences, nous avons choisi de tester le collagène carbamylé 6h, et les quantités d'enzyme ajoutées ont été déterminées de manière à n'obtenir qu'une digestion partielle du collagène, permettant la quantification.

Le collagène témoin présente une disparition progressive des bandes correspondant à $\alpha_1(I)$ et $\alpha_2(I)$ jusqu'à 24 h d'incubation (figure 39A). En revanche, l'intensité des bandes du collagène carbamylé 6h ne varie pratiquement pas, même au temps d'incubation 24 h. La quantification densitométrique confirme la digestion progressive du collagène témoin avec le temps d'incubation (figure 39B). Son taux de dégradation est de 38 % après 2 h d'incubation, et

atteint 57 % après 24 h. Le pourcentage de dégradation du collagène carbamylé est significativement plus faible dès 2 h d'incubation (23 % ; $p < 0,01$), et évolue peu avec le temps comparativement au collagène témoin. Après 24 h d'incubation, la dégradation du collagène témoin est 2,5 fois plus importante que celle du collagène carbamylé 6h. Ces résultats indiquent une plus grande résistance du collagène carbamylé 6h, par rapport au collagène témoin, à l'action de la collagénase bactérienne.

A.



B.

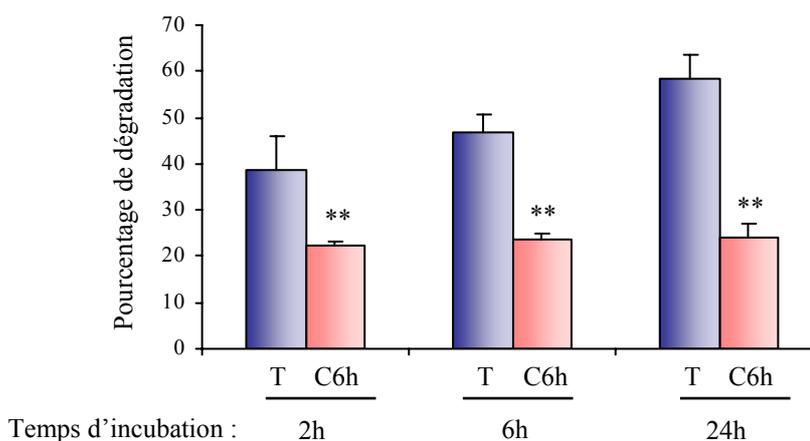


Figure 39. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase bactérienne : SDS-PAGE.

Le collagène est soumis à l'action de la collagénase bactérienne (*Clostridium histolyticum*, qualité CLSPA) à 37°C pendant 2, 6 et 24 h selon le protocole décrit dans le chapitre « matériel et méthodes ». (A) : SDS-PAGE à 5 % (m/v) de polyacrylamide des chaînes α du collagène. (B) : Quantification par densitométrie des bandes correspondant aux chaînes $\alpha_1(I)$ et $\alpha_2(I)$. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types (n=3). Significativité : ** : $p < 0,01$. Abréviations : T : collagène témoin ; C6h : collagène carbamylé 6h.

III.2.1.2. Dosage de la 4-Hydroxyproline

Après incubation du collagène avec la collagénase bactérienne, le dosage de la 4Hyp, AA caractéristique du collagène, est réalisé dans les culots (collagène non dégradé) et les surnageants (petits fragments libérés lors de la protéolyse), permettant le calcul d'un pourcentage de dégradation.

Ces résultats confirment que le collagène carbamylé 6h est plus résistant à la dégradation par la collagénase bactérienne que le collagène témoin (figure 40). Ainsi, 10 % du collagène témoin est dégradé après 2 h d'incubation, contre seulement 3 % du collagène carbamylé 6h ($p < 0,05$). Le taux de dégradation augmente progressivement avec le temps d'incubation pour les deux types de collagène. Le collagène témoin reste plus sensible que le collagène carbamylé 6h à tous les temps de l'expérimentation. Après 24 h d'incubation, le collagène témoin est dégradé à 65 % contre seulement 44 % pour le collagène carbamylé 6h ($p < 0,01$).

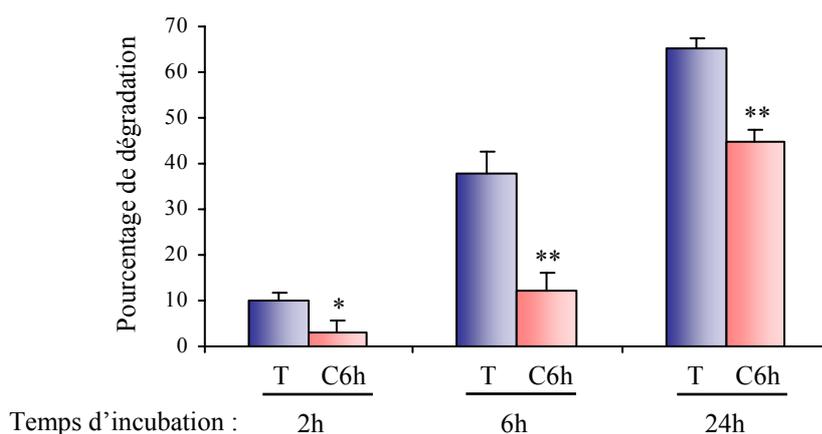


Figure 40. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase bactérienne : quantification.

Le collagène est soumis à l'action de la collagénase bactérienne à 37°C pendant 2, 6 et 24 h, puis le collagène non dégradé est précipité à l'éthanol 80 % (v/v). Après centrifugation et hydrolyse, la 4Hyp est dosée dans le culot et dans le surnageant. Les résultats de pourcentage de dégradation sont exprimés en moyennes \pm écart-types ($n=3$). Différences significatives : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$. Abréviations : T : collagène témoin ; C6h : collagène carbamylé 6h.

Ces deux expériences différentes nous ont permis de montrer que la carbamylation du collagène le rendait plus résistant à la digestion par la collagénase bactérienne.

III.2.2. Dégradation du collagène carbamylé par les collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8 et MMP-13)

Afin de mieux comprendre les conséquences de la carbamylation sur le catabolisme du collagène *in vivo*, nous avons mesuré la résistance du collagène carbamylé à l'action d'enzymes plus physiologiques, les MMP. Dans un premier temps, les tests ont été réalisés avec les collagénases interstitielles MMP-1, MMP-8 et MMP-13.

III.2.2.1. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase-1 (MMP-1)

Différents tests ont été utilisés pour caractériser la sensibilité du collagène carbamylé à la MMP-1.

a) Mise en évidence par zymographie

Cette technique consiste à incorporer, dans un gel de polyacrylamide, le substrat de l'enzyme testée, ici le collagène de type I, et à utiliser ce support pour l'électrophorèse de quantités définies de proMMP-1 recombinante. Son activité a été évaluée vis à vis de deux substrats distincts : le collagène témoin et le collagène carbamylé 6h. La sensibilité du collagène à l'action de la proMMP-1 est déterminée indirectement par le seuil de détection de l'action de l'enzyme et par l'intensité des plages de lyse.

Les zymogrammes mettent en évidence plusieurs bandes : une bande majoritaire de proMMP-1 et trois bandes minoritaires de taille inférieure, correspondant aux formes actives de la MMP-1 (figure 41). Les deux gels présentent un profil pratiquement identique, avec un seuil de détection situé à 2 ng d'enzyme pour le collagène témoin comme pour le carbamylé 6h. Cependant, l'intensité des bandes apparaît plus importante dans le cas du gel constitué de collagène témoin, tant pour la forme pro-MMP-1 que pour les formes actives.

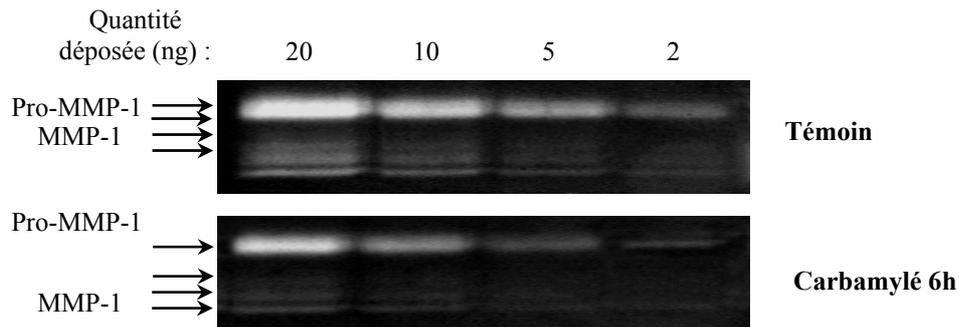


Figure 41. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-1 : zymographie.

Des quantités décroissantes (20 à 2 ng) de proMMP-1 recombinante sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 % (m/v) contenant 0,5 mg/mL de collagène témoin ou carbamylé 6h. Après incubation pendant 18 h à 37°C, l'activité enzymatique est mise en évidence par l'apparition de plages de lyse après la coloration du gel au bleu de Coomassie G-250.

b) Mise en évidence par SDS-PAGE

Nous avons également évalué la dégradation du collagène par la MMP-1, par électrophorèse, qui permet de suivre l'apparition des fragments de dégradation qui résultent, dans un premier temps, d'un clivage du collagène aux trois quarts de sa longueur, générant deux fragments dégradés par la suite en peptides de plus petite taille.

L'effet du temps d'incubation en présence de MMP-1 a été testé sur les collagène témoin et carbamylé 6h (figure 42).

Dans le cas du collagène témoin, les fragments de clivage des chaînes α par la MMP-1 sont visibles dès 2 h d'incubation puis s'accumulent avec le temps. Après 24 h en présence de l'enzyme, plusieurs fragments deviennent majoritaires par rapport aux chaînes α , et en particulier à la chaîne $\alpha_2(I)$, qui a totalement disparu. L'apparition des fragments de dégradation du collagène carbamylé 6h, qui augmente également avec le temps d'incubation, est plus tardive que celle du collagène témoin. Ainsi, après 24 h d'incubation, deux fragments seulement sont générés par le clivage du collagène carbamylé 6h, au lieu de cinq pour le collagène témoin. De

plus, une bande correspondant à la chaîne $\alpha_2(I)$ persiste. Ces données indiquent une plus grande résistance du collagène carbamylé à l'action de la MMP-1.

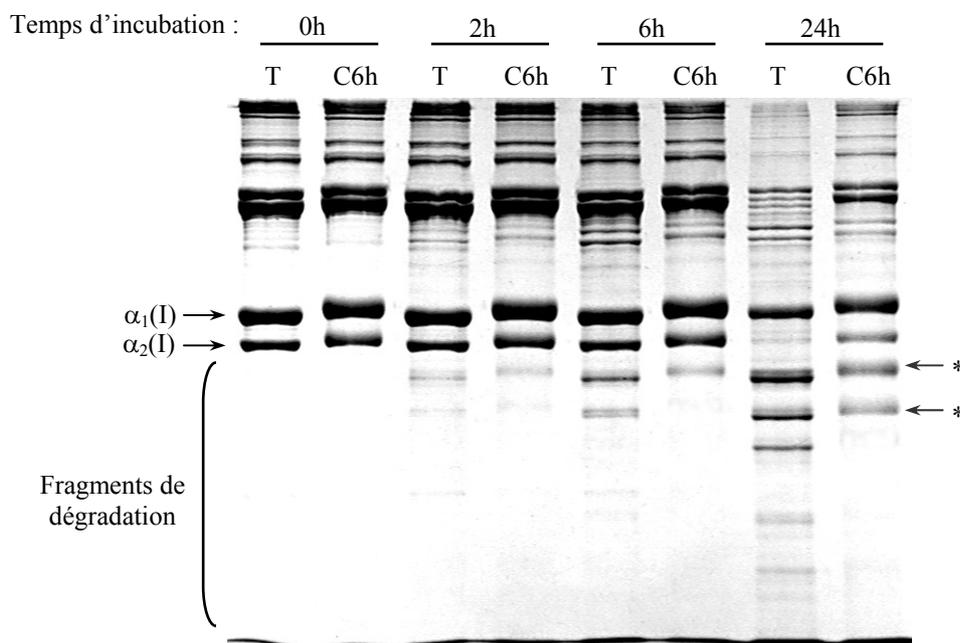


Figure 42. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-1 : SDS-PAGE.

Après incubation du collagène en présence de 12,8 nM de MMP-1 active pendant 2, 6 ou 24 h à 37°C, l'apparition des produits de dégradation est mise en évidence par SDS-PAGE à 6 % (m/v) de polyacrylamide. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C6h : collagène carbamylé 6h; * : fragments $\frac{3}{4}$ obtenus après clivage du collagène.

Pour déterminer si la résistance dépend du taux de carbamylation, nous avons testé comparativement les collagènes préalablement carbamylés pendant 2, 6 et 24 h (figure 43). Cette expérience montre un profil de dégradation identique après 24 h d'incubation pour le collagène carbamylé 2h et le collagène témoin, alors qu'une plus grande résistance à la dégradation est visible à l'électrophorèse pour le collagène carbamylé 6h. Le collagène carbamylé 24h apparaît plus résistant que le collagène carbamylé 6h, puisque pratiquement aucun fragment de dégradation n'est produit par l'action de la MMP-1, même en 24 h. Ces résultats montrent que la carbamylation induit une résistance du collagène à la protéolyse par la MMP-1, proportionnelle à son intensité.

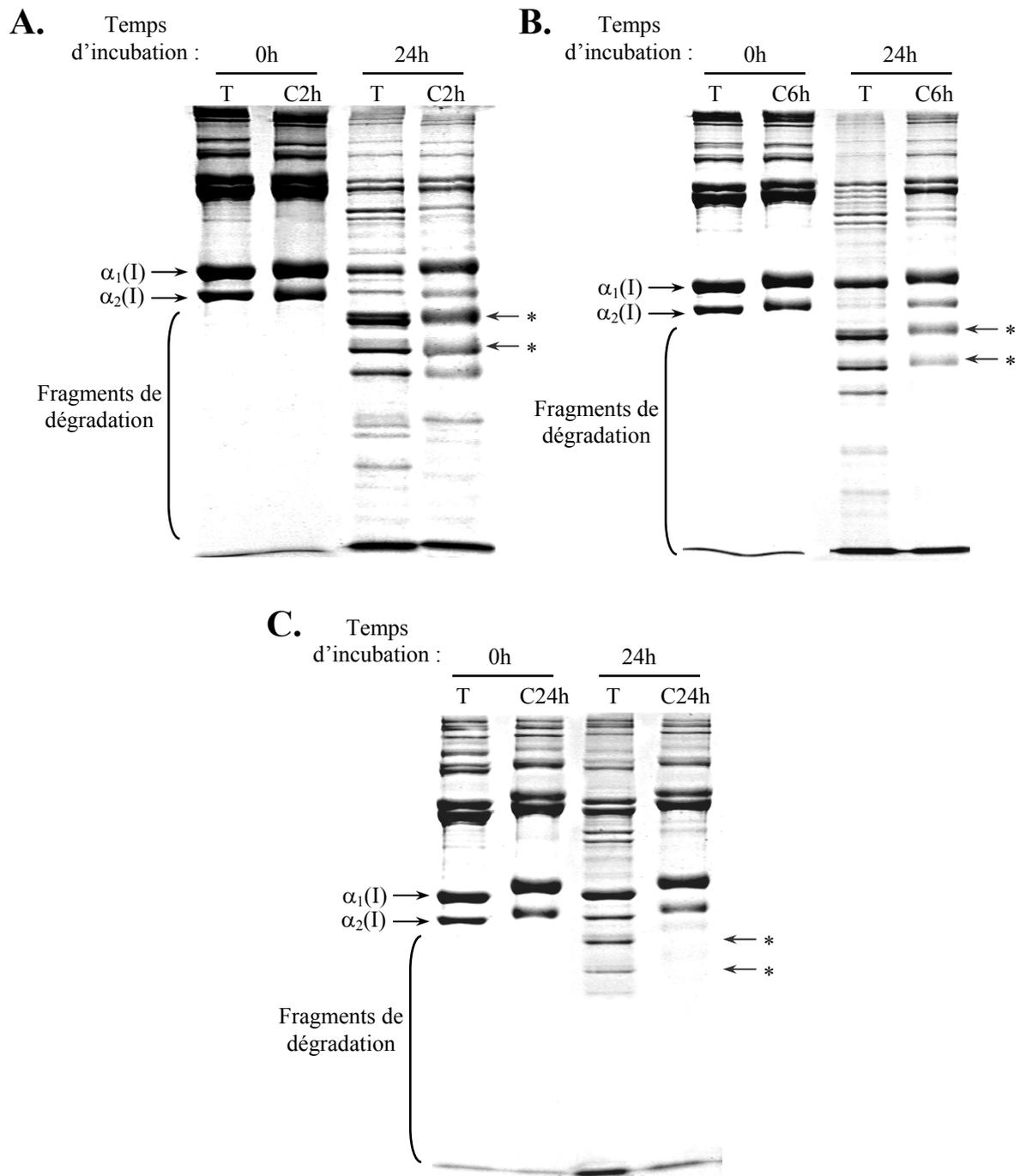


Figure 43. Influence du taux de carbamylation sur la résistance du collagène carbamylé à la MMP-1.

Les collagènes témoin et carbamylés 2h (A), 6h (B) et 24h (C) sont incubés en présence de MMP-1 active pendant 24 h à 37°C. Les produits de dégradation sont mis en évidence par SDS-PAGE à 6 % (m/v) de polyacrylamide. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h ; * : fragments $\frac{3}{4}$ obtenus après clivage du collagène.

c) Dégradation du collagène marqué

La résistance du collagène carbamylé à la MMP-1 a été confirmée par un test quantitatif basé sur l'incubation de collagène marqué au tritium en présence de MMP-1. Le comptage de la radioactivité permet de calculer un pourcentage de dégradation. Nous avons choisi des concentrations d'enzyme entraînant au maximum 50 % de dégradation du collagène, conditions permettant une analyse quantitative optimale.

Dans les conditions utilisées, le taux de dégradation du collagène témoin est de 42 % (figure 44). Aucune variation significative n'est constatée avec le collagène carbamylé 2h, alors que le collagène carbamylé 6h présente un taux de dégradation significativement plus faible que celui du collagène témoin (29 % ; $p < 0,05$). La résistance augmente avec l'intensité de carbamylation, étant deux fois plus importante pour le collagène carbamylé 24h, qui n'est dégradé qu'à 19 % ($p < 0,01$), que pour le collagène témoin.

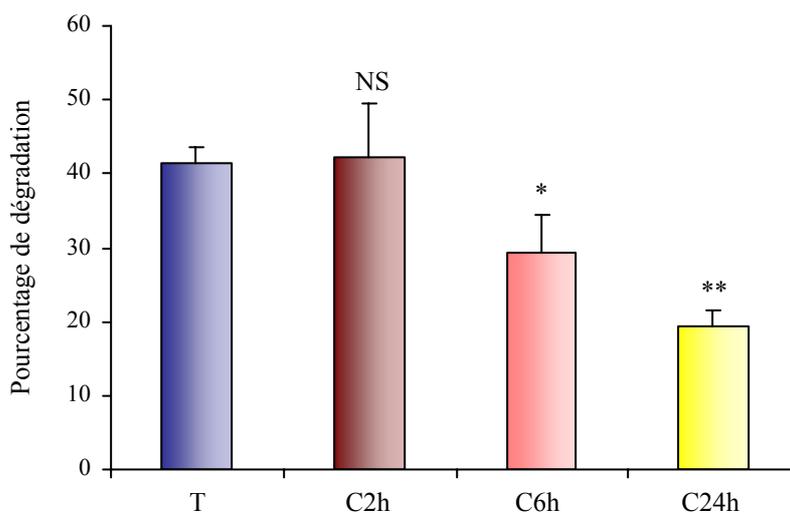


Figure 44. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-1 : quantification.

Le collagène tritié est soumis à l'action de la MMP-1 durant 18 h à 37°C puis la réaction est stoppée par précipitation à l'éthanol 80 % (v/v) du collagène non dégradé. Après centrifugation, le comptage de la radioactivité est effectué dans le culot (collagène non dégradé) et le surnageant (fragments de collagène dégradé), ce qui permet de calculer un pourcentage de dégradation. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types ($n=3$). Test de significativité : NS : différence non significative ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$. Abréviations : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h.

Ces diverses expériences montrent que le collagène carbamylé est plus résistant à l'action de la MMP-1, de façon proportionnelle au degré de carbamylation.

III.2.2.2. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase-2 (MMP-8)

La résistance du collagène carbamylé a également été étudiée vis à vis d'une autre collagénase interstitielle, la collagénase des neutrophiles (ou MMP-8). Nous avons utilisé les mêmes techniques que celles décrites dans le paragraphe III.2.2.1., sauf la zymographie, dont la sensibilité s'est révélée insuffisante.

a) Mise en évidence par SDS-PAGE

La dégradation du collagène par la MMP-8 fournit des fragments de taille comparable à ceux obtenus après clivage par la MMP-1, et s'accumulent avec le temps d'incubation (figure 45). On remarque une apparition plus tardive des fragments de clivage pour le collagène carbamylé 6h, ainsi qu'une moins grande abondance de peptides de faible masse moléculaire, notamment après 24 h d'incubation.

Le degré de carbamylation du collagène influe directement sur la résistance à la MMP-8 (figure 46). La dégradation du collagène carbamylé 2h est pratiquement identique à celle du collagène témoin, alors qu'une différence de dégradation visible à l'électrophorèse apparaît pour les préparations de collagène carbamylé pendant 6 h et 24 h. Cependant, les profils électrophorétiques obtenus à partir des collagènes carbamylés 6h et 24h sont quasiment identiques, et l'effet apparaît moins prononcé que vis à vis de la MMP-1 (§ III.2.2.1.b).

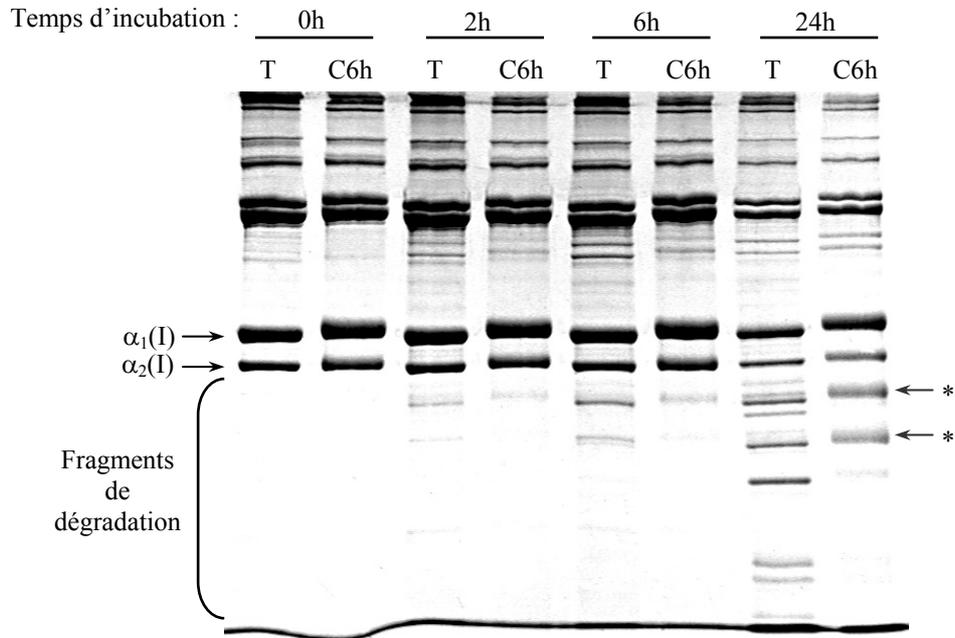


Figure 45. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-8 : SDS-PAGE.

Après incubation du collagène en présence de MMP-8 active pendant 2, 6 ou 24 h à 37°C, l'apparition des produits de dégradation est mise en évidence par SDS-PAGE à 6 % (m/v) de polyacrylamide. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C6h : collagène carbamylé 6h ; * : fragments $\frac{3}{4}$ obtenus après clivage du collagène.

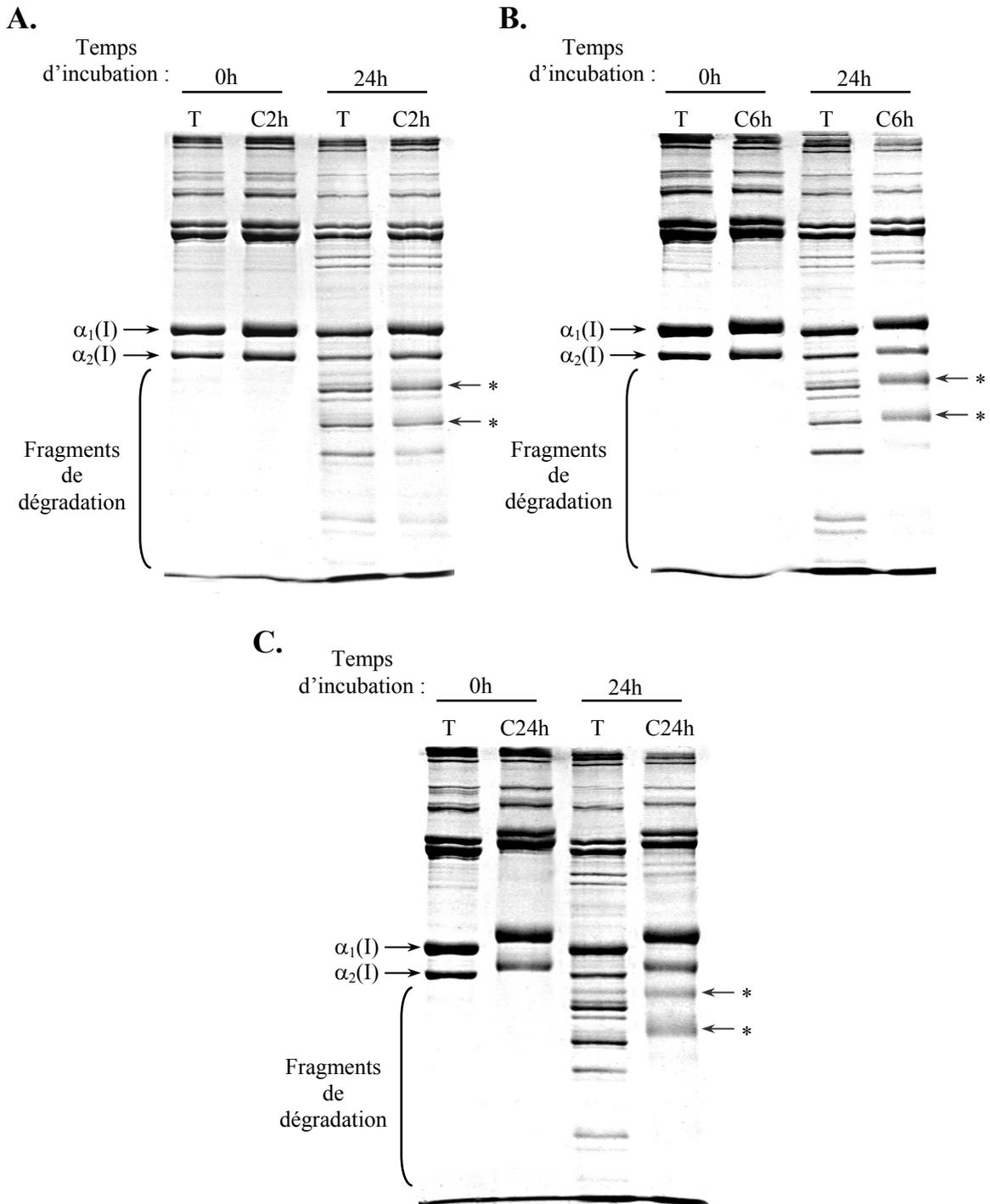


Figure 46. Influence du taux de carbamylation sur la résistance du collagène carbamylé à la MMP-8.

Les collagènes témoin et carbamylés 2h (A), 6h (B) et 24h (C) sont incubés en présence de MMP-8 active pendant 24 h à 37°C. Les produits de dégradation sont mis en évidence par SDS-PAGE à 6 % (m/v) de polyacrylamide. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h ; * : fragments $\frac{3}{4}$ obtenus après clivage du collagène.

b) Dégradation du collagène marqué

Le test de dégradation du collagène marqué ne montre pas de différence significative du taux de dégradation entre le collagène carbamylé 2h (50 %) et le collagène témoin (47 %) (figure 47). Pour les taux de carbamylation plus élevés, les collagènes sont moins sensibles à la dégradation.

L'effet n'est pas significatif pour le collagène carbamylé 6h (42 %), mais la diminution est significative pour le collagène carbamylé 24h, dont le pourcentage de dégradation est de 34 % ($p < 0,05$).

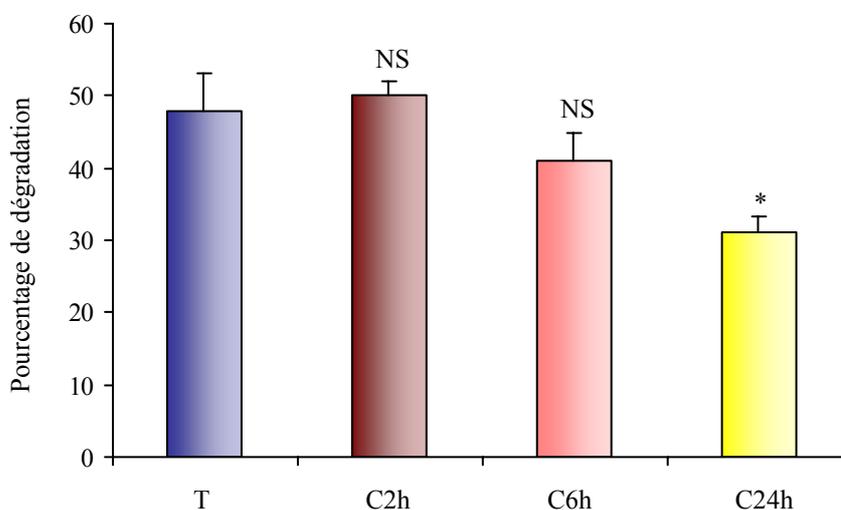


Figure 47. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-8 : quantification.

Le collagène tritié est soumis à l'action de la MMP-8 durant 18 h à 37°C puis la réaction est stoppée par précipitation à l'éthanol 80 % (v/v) du collagène non dégradé. Après centrifugation, le comptage de la radioactivité est effectué dans le culot (collagène non dégradé) et le surnageant (fragments de collagène dégradé), ce qui permet de calculer un pourcentage de dégradation. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types ($n=3$). Test de significativité : NS : différence non significative ; * : $p < 0,05$. Abréviations : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h.

Ces résultats montrent que le collagène carbamylé est plus résistant que le collagène témoin à l'action de la MMP-8, mais de façon moins prononcée que dans le cas de la MMP-1.

III.2.2.3. Dégradation du collagène carbamylé par la collagénase-3 (MMP-13)

L'action de la MMP-13 sur le collagène carbamylé a été testée dans les mêmes conditions que pour la MMP-8.

a) Mise en évidence par SDS-PAGE

La MMP-13 clive le collagène en petits fragments non détectables en SDS-PAGE, ce qui explique que la dégradation se traduise par la disparition des bandes caractéristiques du collagène (figure 48). Les profils électrophorétiques obtenus après 2 h et 6 h d'incubation sont comparables, hormis l'apparition de deux bandes de faible intensité correspondant à des produits de dégradation du collagène témoin après 6 h d'incubation. Des différences importantes sont notées après 24 h d'incubation, avec la disparition pratiquement complète des chaînes α du collagène témoin, et seulement une baisse d'intensité des bandes de chaînes α .

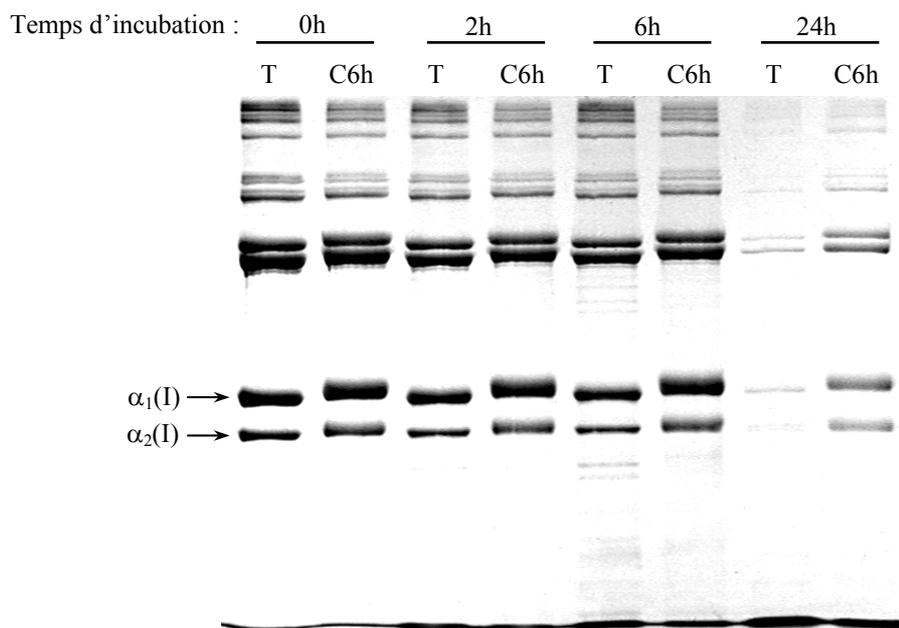


Figure 48. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-13 : SDS-PAGE .

Après incubation du collagène en présence de MMP-13 active pendant 2, 6 ou 24 h à 37°C, l'apparition des produits de dégradation est mise en évidence par SDS-PAGE à 6 % (m/v) de polyacrylamide. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C6h : collagène carbamylé 6h.

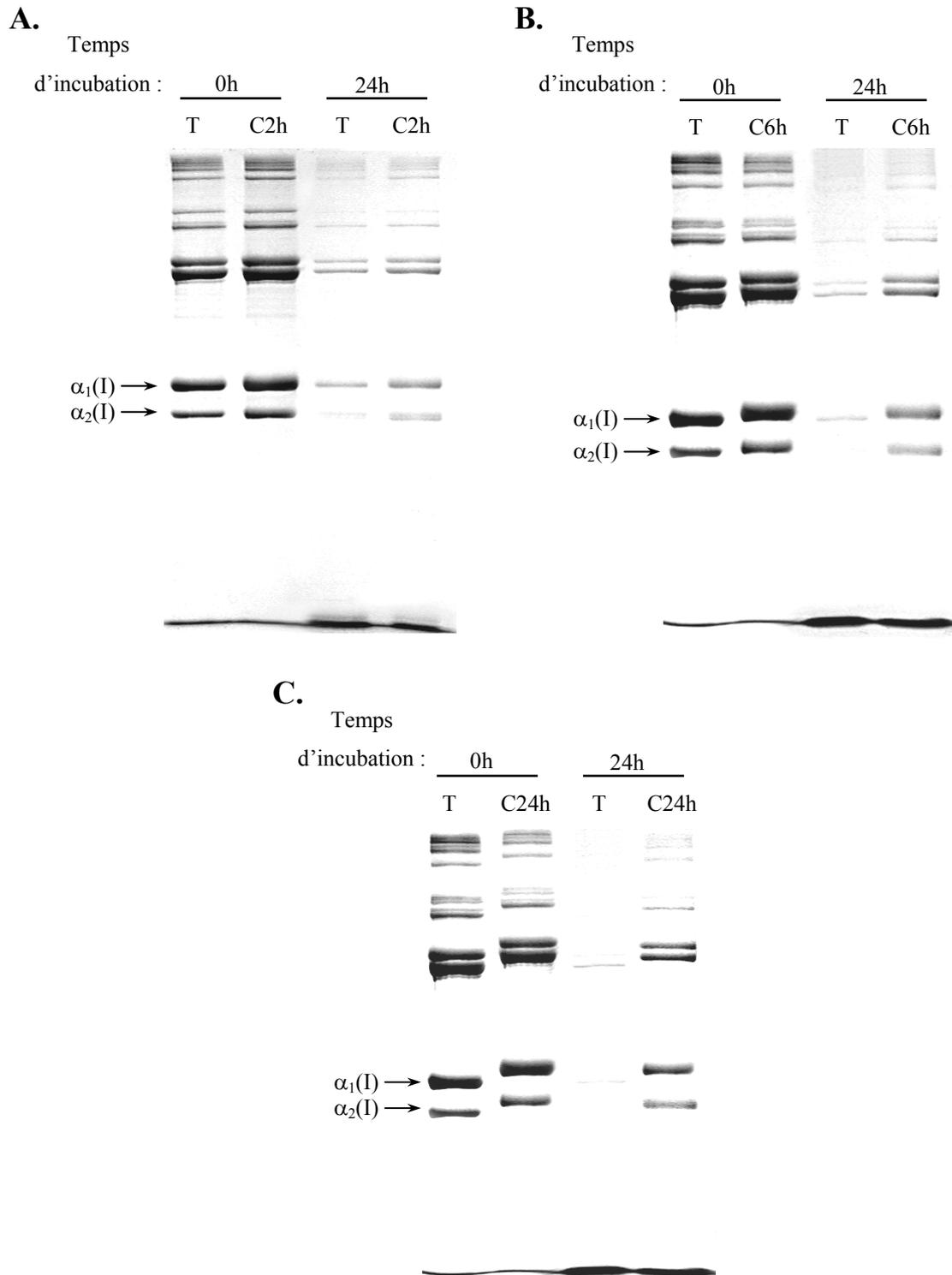


Figure 49. Influence du taux de carbamylation sur la résistance du collagène carbamylé à la MMP -13.

Les collagènes témoin et carbamylés 2h (A), 6h (B) et 24h (C) sont incubés en présence de MMP-13 active pendant 24 h à 37°C. Les produits de dégradation sont mis en évidence par SDS-PAGE à 6 % (m/v) de polyacrylamide. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h.

La figure 49 montre que toutes les préparations de collagène carbamylé sont plus résistantes à l'action de la MMP-13 que les préparations de collagène témoin. On note dans tous les cas une forte diminution, voire une disparition quasi totale, des bandes de chaînes α du collagène témoin, contrastant avec leur persistance pour les collagènes carbamylés, qui augmente avec le taux de carbamylation.

b) Dégradation du collagène marqué

Le test a montré une diminution significative du pourcentage de dégradation pour les collagènes carbamylés 6h et 24h, qui sont respectivement de 39 % et 37 % ($p < 0,01$), pour une valeur de 56 % avec le collagène témoin (figure 50). La différence entre le collagène témoin et le collagène carbamylé 2h n'est pas significative.

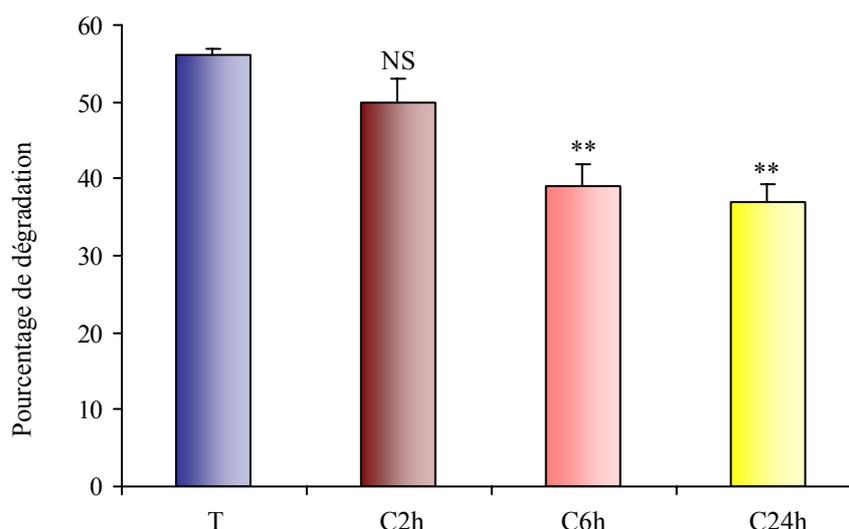


Figure 50. Dégradation du collagène carbamylé par la MMP-13 : quantification.

Le collagène tritié est soumis à l'action de la MMP-13 durant 18 h à 37°C puis la réaction est stoppée par précipitation à l'éthanol 80 % (v/v) du collagène non dégradé. Après centrifugation, le comptage de la radioactivité est effectué dans le culot (collagène non dégradé) et le surnageant (fragments de collagène dégradé), ce qui permet de calculer un pourcentage de dégradation. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types (n=3). Test de significativité : NS : différence non significative ; ** : $p < 0,01$. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h.

Ces résultats montrent une augmentation de la résistance du collagène carbamylé à la dégradation par la MMP-13, même si on note une variation d'amplitude des différences selon le test utilisé.

III.2.3. Dégradation du collagène carbamylé par les gélatinases (MMP-2 et MMP-9)

Nos analyses structurales ayant montré que la carbamylation du collagène interférait sur la stabilité de la triple hélice, entraînant progressivement un état de dénaturation, nous avons testé le comportement du collagène carbamylé vis à vis de deux gélatinases, la MMP-2 et la MMP-9, dont le substrat préférentiel est le collagène dénaturé ou gélatine.

III.2.3.1. Mise en évidence par zymographie

Les diverses préparations de collagène ont été incorporées dans des gels de polyacrylamide, puis différentes quantités de gélatinases (proMMP-2 ou proMMP-9) ont été soumises à l'électrophorèse. Après incubation pendant 18 h à 37°C, les gels sont colorés puis analysés. En fonction de la quantité d'enzyme déposée, l'apparition ainsi que l'intensité des plages de lyse permettent de définir la sensibilité relative des collagènes à la digestion enzymatique.

Pour le collagène témoin, la quantité minimale d'enzyme permettant d'observer une plage de lyse est de 100 pg pour la proMMP-2 et de 10 pg pour la proMMP-9 (figure 51). Lorsque le collagène est carbamylé pendant 2 h, cette valeur ne varie pas pour la proMMP-9, mais passe à 50 pg pour la proMMP-2. Quand le taux de carbamylation est plus élevé, la sensibilité du collagène aux gélatinases est plus grande, car seulement 20 pg de proMMP-2 et 4 pg de proMMP-9 sont suffisants pour obtenir un signal. Aucune différence n'est observée entre les collagènes carbamylés 6h et 24h.

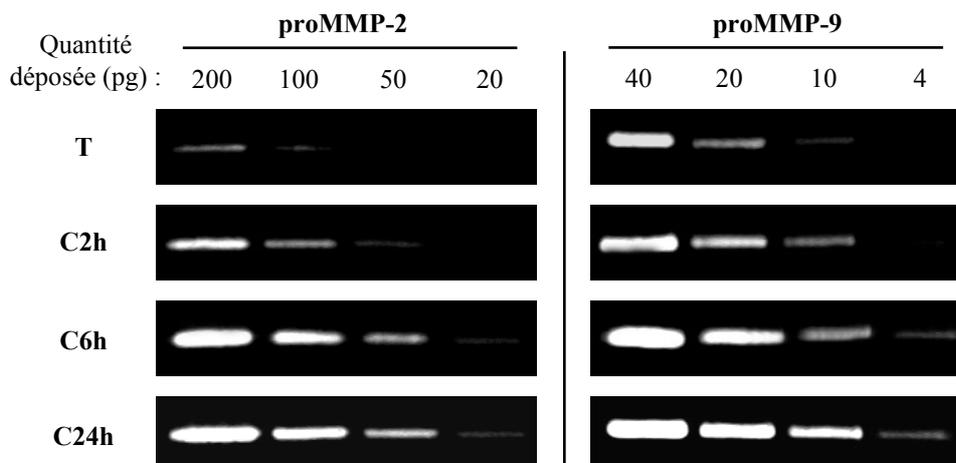


Figure 51. Dégradation du collagène carbamylé par les gélatinases : zymographie.

Des quantités décroissantes de proMMP-2 ou proMMP-9 sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 % (m/v) contenant 0,5 mg/mL des différents types de collagène. A la suite de l'incubation pendant 18 h à 37°C, l'activité enzymatique est mise en évidence par l'apparition de plages de lyse après la coloration du gel au bleu de Coomassie G-250. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h.

III.2.3.2. Dégradation du collagène marqué

La dégradation du collagène carbamylé par les gélatinases a été étudiée à l'aide du test utilisant le collagène tritié. La dégradation par la MMP-2 est significativement augmentée ($p < 0,05$) pour l'ensemble des collagènes carbamylés par rapport au collagène témoin, dont le taux basal de dégradation est de 23 % (figure 52). Cependant, il n'existe aucune différence de sensibilité entre les différentes préparations de collagènes carbamylés, puisque les pourcentages de dégradation des collagènes carbamylés 2h, 6h et 24h sont respectivement de 33 %, 36 % et 34 %.

Dans le cas de la MMP-9, des résultats similaires sont obtenues pour le collagène témoin (26 % de dégradation) et le collagène carbamylé 2h (31 % de dégradation). En revanche, la dégradation est significativement plus importante pour les collagènes carbamylé 6h et carbamylé 24h, avec des pourcentages de dégradation respectivement de 44 % et 45 % ($p < 0,05$).

Cependant, aucune différence n'est observée entre ces deux préparations malgré leur différence de carbamylation.

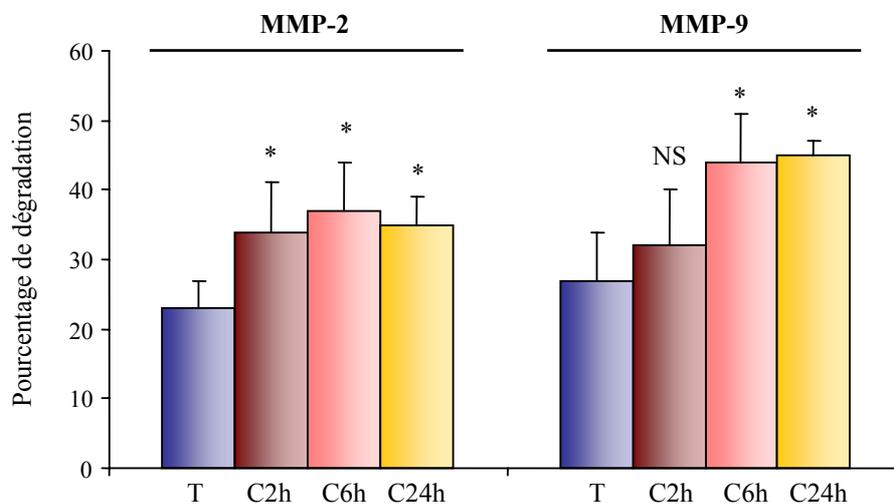


Figure 52. Dégradation du collagène carbamylé par les gélatinases : quantification.

Le collagène tritié est soumis à l'action de la MMP-2 ou MMP-9 durant 18 h à 37°C puis la réaction est stoppée par précipitation à l'éthanol 80 % (v/v) du collagène non dégradé. Après centrifugation, le comptage de la radioactivité est effectué dans le culot (collagène non dégradé) et le surnageant (fragments de collagène dégradé), ce qui permet de calculer un pourcentage de dégradation. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types (n=3). Test de significativité : NS : différence non significative ; * : $p < 0,05$. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h.

Ces expériences montrent que la carbamylation augmente la sensibilité du collagène à l'action des gélatinases (MMP-2 et MMP-9).

D'une manière générale, la carbamylation induite par une incubation de 6 h avec le KCNO (soit 0,4 % de résidus modifiés) semble réunir les conditions minimales pour que le collagène présente des différences de sensibilité à la protéolyse enzymatique par les gélatinases, mais également par les collagénases.

III.2.4. Dégradation du collagène carbamylé par la pepsine

Nous avons également testé la susceptibilité du collagène carbamylé à la digestion par une protéinase non spécifique, la pepsine. La triple hélice confère au collagène une résistance à la pepsine, propriété susceptible d'être modifiée après carbamylation.

Le pourcentage de dégradation du collagène témoin par la pepsine est relativement faible (*i.e.* 7 %), et correspond au clivage des télépeptides (figure 53). Les collagènes carbamylé 2h et carbamylé 6h présentent un pourcentage pratiquement équivalent, restant inférieur à 10 % et statistiquement non différent. En revanche, la dégradation du collagène carbamylé 24h est beaucoup plus importante, atteignant 27 %. Cette augmentation est significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

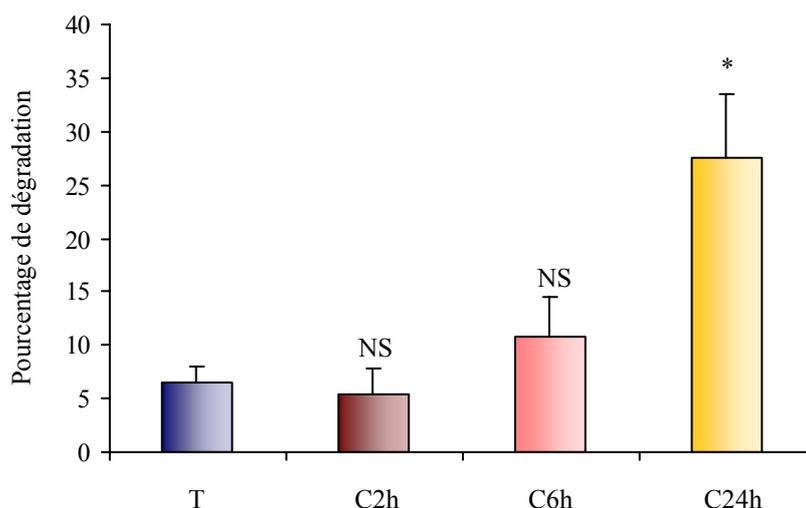


Figure 53. Dégradation du collagène carbamylé par la pepsine : quantification.

Le collagène tritié est soumis à l'action de la pepsine durant 18 h à 4°C puis la réaction est stoppée par précipitation à l'éthanol 80 % (v/v) du collagène non dégradé. Après centrifugation, le comptage de la radioactivité est effectué dans le culot (collagène non dégradé) et le surnageant (fragments de collagène dégradé) ce qui permet de calculer un pourcentage de dégradation. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types ($n=3$). Test de significativité : NS : différence non significative ; * : $p < 0,05$. Abréviations : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h.

Ce chapitre a permis de mettre en évidence des différences de sensibilité du collagène carbamylé à la protéolyse enzymatique. Ces différences se manifestent par une augmentation de la résistance à la collagénase bactérienne et aux collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8 et MMP-13), parallèlement à une plus grande sensibilité aux gélatinases (MMP-2 et MMP-9) et à la pepsine (dans le cas d'un taux important de carbamylation).

III.3. INFLUENCE DE LA CARBAMYLLATION SUR LES INTERACTIONS ENTRE COLLAGÈNE ET PNN

Les résultats présentés dans les chapitres précédents ont démontré l'altération des propriétés structurales et physico-chimiques du collagène carbamylé. Sachant que la fonction d'une protéine est intimement liée à sa structure et que le collagène de type I est capable de réguler les fonctions d'adhésion et d'activation des polynucléaires neutrophiles humains (PNN) [Monboisse *et al.*, 1990], nous avons étudié l'influence de la carbamylation sur les interactions entre collagène et PNN.

III.3.1. Adhésion des polynucléaires neutrophiles au collagène carbamylé

L'adhésion est la première étape du contact entre les PNN et le collagène de type I. Nous avons utilisé le test de coloration au violet cristal pour déterminer l'influence de la carbamylation sur l'adhésion des PNN au collagène. Pour cela, les cellules sont incubées au contact du collagène pendant 2 h à 37°C. Après plusieurs lavages pour éliminer les cellules non adhérentes, les PNN sont fixés à la glutaraldéhyde puis les noyaux colorés au violet cristal. Le colorant est solubilisé dans l'acide acétique et l'absorbance à 560 nm, proportionnelle au nombre de cellules adhérentes, est mesurée.

La mesure de l'absorbance à 560 nm montre que l'adhésion des PNN ne varie pas de manière significative lorsqu'ils adhèrent aux collagènes carbamylés 2h, 6h ou 24h par rapport au collagène témoin (figure 54). La carbamylation n'a donc pas d'influence sur l'adhésion des PNN au collagène, quel que soit le degré de carbamylation.

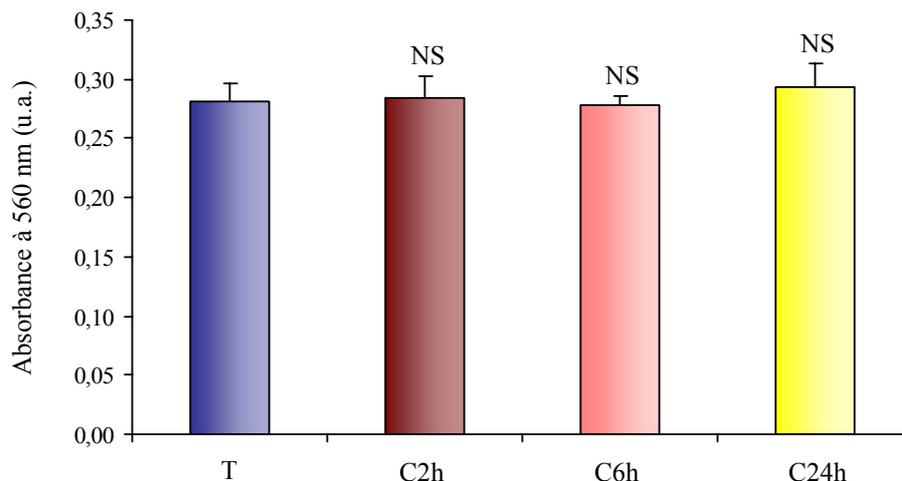


Figure 54. Influence de la carbamylation sur l'adhésion des polynucléaires neutrophiles au collagène.

200 000 PNN sont incubés pendant 2 h à 37°C en plaque 96 puits sur 25 µg de collagène. Les cellules adhérentes sont fixées à la glutaraldéhyde puis colorées au violet cristal. Les résultats sont exprimés en moyennes d'absorbance à 560 nm ± écart-types (n=3). Test de significativité : NS : différence non significative par rapport au collagène témoin. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h ; u.a. : unités arbitraires.

III.3.2. Activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène carbamylé

Les PNN adhèrent au collagène de type I et l'utilisent comme support pour leur déplacement, mais ils peuvent également être activés par ce contact. Après avoir montré que l'adhésion n'était pas influencée par la carbamylation du collagène, nous avons déterminé la capacité du collagène carbamylé à activer les PNN.

La production d'espèces réactives de l'oxygène (RLO) par les PNN en fonction du temps d'incubation au contact du collagène a été étudiée par chimioluminescence et par réduction du NBT (figure 55).

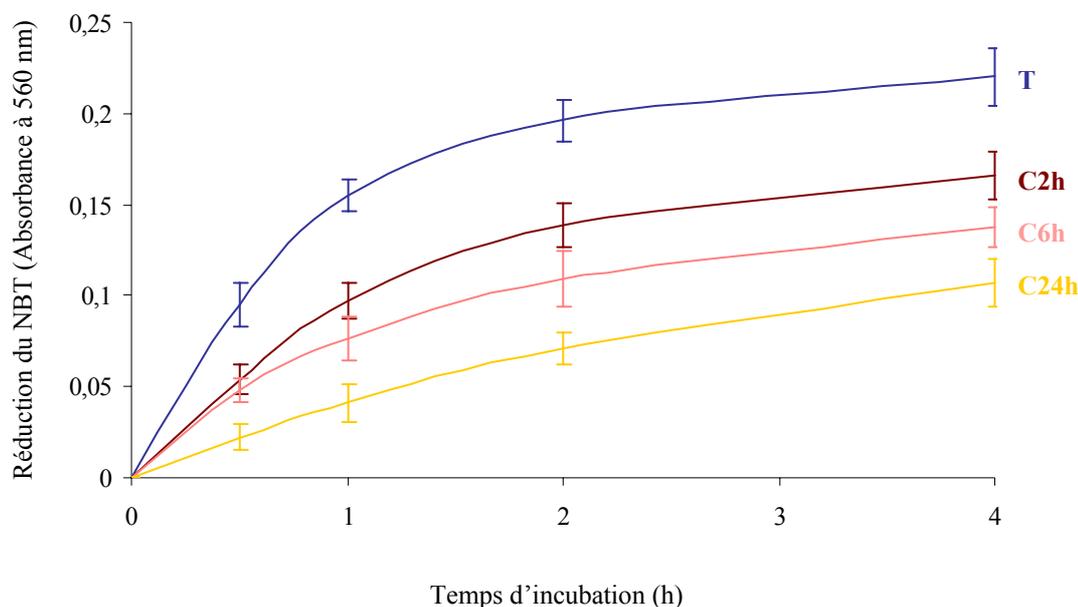
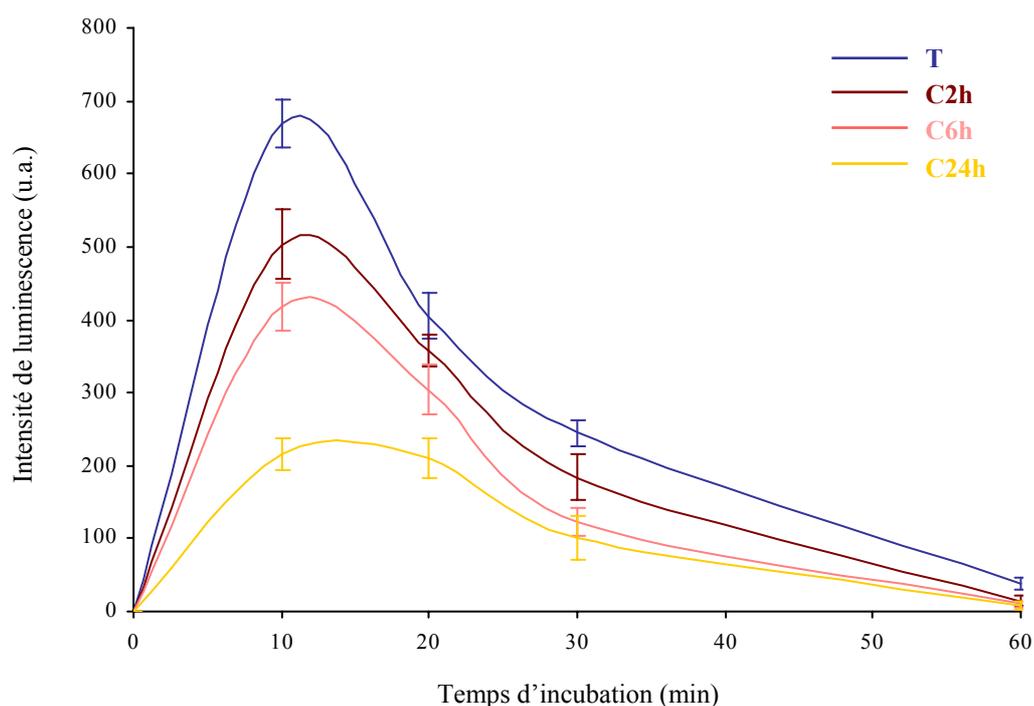
A.

B.


Figure 55. Cinétique d'activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène carbamylé.

Les PNN sont incubés à 37°C avec le collagène et leur activation est évaluée soit par réduction du NBT suivie par la mesure de l'absorbance à 560 nm (A), soit par mesure de la chimioluminescence en présence de luminol (B). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types (n=3). *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h ; u.a. : unités arbitraires.

L'accumulation de diformazan provenant de la réduction du NBT en fonction du temps, est caractérisée par une phase exponentielle qui atteint un plateau après 2 h d'incubation. L'aspect général des courbes obtenues avec les collagènes témoin et carbamylés est comparable. Leur comparaison révèle une inhibition de la production de RLO par le collagène carbamylé dès 30 min d'incubation. Celle-ci reste relativement constante tout au long de la période d'étude, quel que soit le taux de carbamylation du collagène (figure 55A).

Lorsque la production de RLO est suivie par chimiluminescence, (figure 55B), les courbes obtenues sont biphasiques, et mettent en évidence un pic de production après 10 min de stimulation, pour revenir ensuite à un niveau basal après une heure d'incubation. L'allure de la courbe est identique pour les collagènes carbamylés, avec une amplitude du pic moins importante.

La différence d'allure de courbe est due au caractère temporaire de l'excitation du luminol alors que dans le cas du NBT, le diformazan est un précipité stable qui s'accumule dans les cellules avec le temps.

Ces expériences ont permis de montrer que les cinétiques de libération de RLO sont identiques quel que soit le type de collagène. Pour étudier en détail l'effet de la carbamylation du collagène sur la production de RLO par les PNN, nous avons choisi de décrire ce phénomène au temps d'incubation 2 h pour le NBT et au bout de 10 min de stimulation pour le test au luminol.

III.3.2.1. Etude de l'activation des PNN par réduction du NBT

Les espèces réactives de l'oxygène produites par les PNN peuvent réduire le bleu de nitrotétrazolium (NBT), en diformazan, quantifiable par mesure de l'absorbance à 560 nm.

Pour cette expérience, les PNN ont été incubés pendant 2 h à 37°C au contact du collagène et en présence de NBT (figure 56). Le collagène témoin active les PNN, l'absorbance à 560 nm étant de 0,19 après 2 h, alors que cette valeur ne dépasse pas 0,05 lorsqu'ils adhèrent sur plastique, ce qui reflète le niveau basal d'activation des PNN. L'activation par le collagène est proche de celle observée après stimulation par le tripeptide fMet-Leu-Phe à 10^{-7} M (*i.e.* 0,26), utilisé comme témoin positif d'activation.

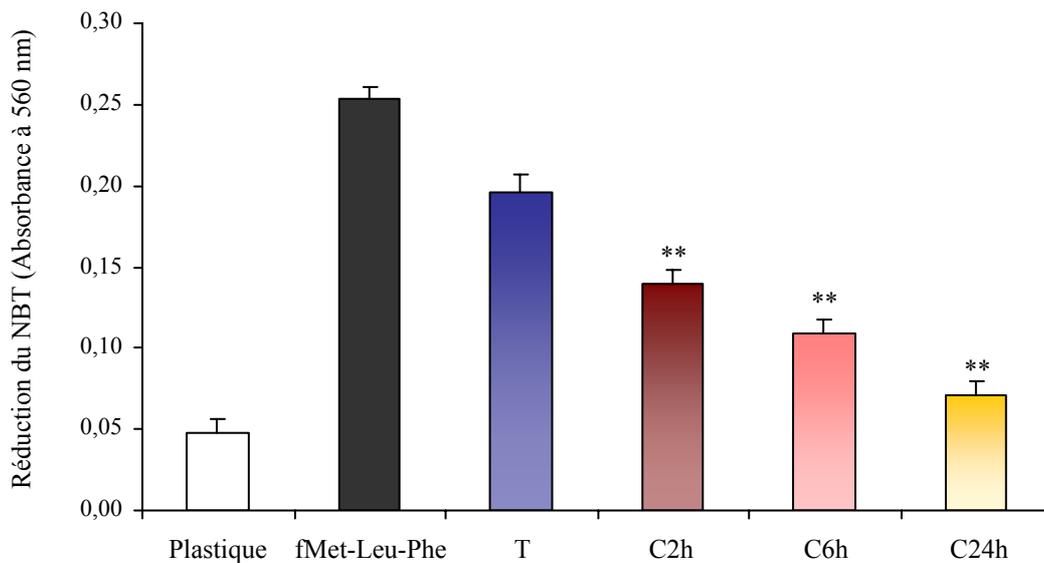


Figure 56. Effet de la carbamylation du collagène sur l'activation des polynucléaires neutrophiles (Test de réduction du NBT).

200 000 PNN sont incubés pendant 2 h à 37°C en plaque 96 puits sur 25 µg de collagène en présence de NBT. L'activation des PNN est mise en évidence par la réduction du NBT, déterminée par l'absorbance à 560 nm. L'activation sur plastique témoigne du taux d'activation basal des PNN et l'utilisation de fMet-Leu-Phe (10^{-7} M final) comme agent stimulant sert de contrôle positif d'activation. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types (n=3). Test de significativité par rapport au collagène témoin : ** : $p < 0,01$. Abréviations : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2h ; C6h : collagène carbamylé 6h ; C24h : collagène carbamylé 24h.

Dès 2 h de carbamylation, on observe une inhibition significative de 30 % de l'activation des PNN par le collagène carbamylé ($p < 0,01$). Ce phénomène s'amplifie lorsque le taux de carbamylation du collagène augmente, les pourcentages d'inhibition atteignant respectivement 45 % et 64 % pour les collagènes carbamylé 6h et carbamylé 24h. L'inhibition est presque totale pour le collagène carbamylé 24h, si l'on prend en considération le taux d'activation basal et non spécifique des cellules. Ces résultats ont été confirmés par une autre technique de dosage des RLO.

III.3.2.2. Etude de l'activation des PNN par chimiluminescence

La mise en évidence de la production de RLO par chimiluminescence a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, le NBT étant remplacé par le luminol

qui, lorsqu'il est excité par les RLO, émet des photons. La quantification du nombre de photons émis est effectuée à l'aide d'un luminomètre.

L'activation des PNN par le collagène témoin est mise en évidence par une intensité de luminescence environ sept fois supérieure à celle des PNN non stimulés (tableau 9). Le potentiel d'activation des PNN est vérifié par la réponse au fMet-Leu-Phe (10^{-7} M), utilisé comme contrôle positif, qui est ici de l'ordre de trente-cinq fois supérieure à la valeur basale.

	Intensité de luminescence (unités arbitraires)	Pourcentage d'inhibition (par rapport au collagène témoin)
Sans effecteur	97 ± 12	-
fMet-Leu-Phe	3510 ± 219	-
Collagène témoin	670 ± 33	-
Collagène carbamylé 2h	509 ± 48 **	24 %
Collagène carbamylé 6h	428 ± 32 **	36 %
Collagène carbamylé 24h	200 ± 22 **	70 %

Tableau 9. Détermination par chimiluminescence de l'effet de la carbamylation du collagène sur l'activation des polynucléaires neutrophiles.

10^6 PNN sont incubés pendant 10 min à 37°C avec le collagène en présence de luminol. L'activation des PNN est mise en évidence par la mesure de la luminescence produite par le luminol excité par les RLO. L'incubation en présence de fMet-Leu-Phe (10^{-7} M final) comme agent stimulant sert de contrôle positif d'activation. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-types (n=3). Test de significativité par rapport au collagène témoin : ** : $p < 0,01$.

La comparaison des différents collagènes carbamylés avec le collagène témoin montre une inhibition de l'intensité de luminescence proportionnelle au degré de carbamylation. En effet, le collagène carbamylé 2h perd 24 % ($p < 0,01$) de sa capacité d'activation des PNN. Ce pourcentage d'inhibition passe à 36 % ($p < 0,01$) pour le collagène carbamylé 6h et atteint 70 % ($p < 0,01$) pour le collagène carbamylé pendant 24 h.

Ces résultats confirment l'inhibition de l'activation des PNN par le collagène carbamylé, de façon dépendante du taux de carbamylation.

III.3.2.3. Activation des PNN au contact du collagène carbamylé par l'urée

Pour se rapprocher des conditions rencontrées *in vivo*, nous avons testé la réponse des PNN à un contact avec du collagène carbamylé par l'urée au lieu de KCNO. Pour cela, le collagène a été soumis à une incubation de 3 et 6 mois en présence d'urée 50 mM, entraînant la modification de respectivement 1,5 et 3 résidus de lysine en homocitrulline (tableau 4).

Une préparation de collagène témoin a été incubée pendant 3 mois à 37°C dans un tampon phosphate. Ce collagène conserve son potentiel activateur des PNN, mais celui-ci diminue néanmoins significativement après 6 mois d'incubation, ce qui indique que le collagène perd une partie de son effet biologique après une trop longue incubation à 37°C en tampon phosphate (figure 57).

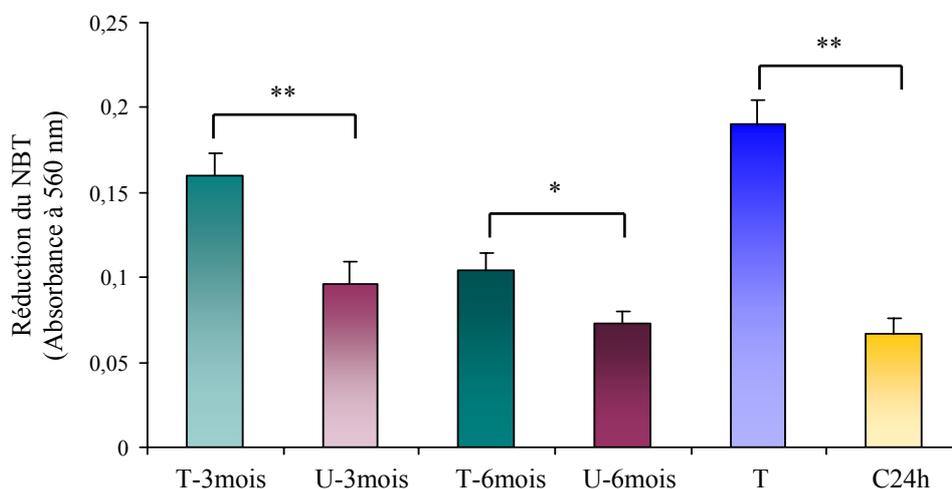


Figure 57. Influence de la carbamylation du collagène par l'urée sur l'activation des polynucléaires neutrophiles.

200 000 PNN sont incubés pendant 2 h à 37°C en plaque 96 puits sur 25 µg de collagène en présence de NBT. L'activation des PNN est mise en évidence par la réduction du NBT déterminée par l'absorbance à 560 nm. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-types (n=3). Test de significativité par rapport au collagène témoin correspondant : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$. Abréviations : T-3mois et T-6mois : collagène témoin incubé pendant 3 mois ou 6 mois en tampon phosphate à 37°C ; U-3mois et U-6mois : collagène carbamylé, incubé à 37°C pendant 3 mois ou 6 mois dans un tampon phosphate contenant 50 mM d'urée ; T : collagène témoin non incubé dans le tampon phosphate ; C24h : collagène carbamylé 24h par le KCNO.

Le collagène incubé pendant 3 mois avec de l'urée 50 mM provoque une inhibition de 40 % de l'activation des PNN par rapport au témoin ($p < 0,01$). Après 6 mois d'incubation, la préparation garde un effet inhibiteur de 30 % ($p < 0,05$).

Ces résultats montrent que le collagène carbamylé par l'urée possède les mêmes propriétés inhibitrices sur la production de RLO que le collagène carbamylé par le KCNO.

III.3.2.4. Morphologie des PNN après contact avec le collagène carbamylé

Nous avons complété l'étude biochimique de l'activation des PNN par une analyse morphologique par microscopie électronique à balayage. Les PNN ont été incubés sur un tapis de collagène pendant 2 h à 37°C puis soumis à l'observation microscopique (figure 58).

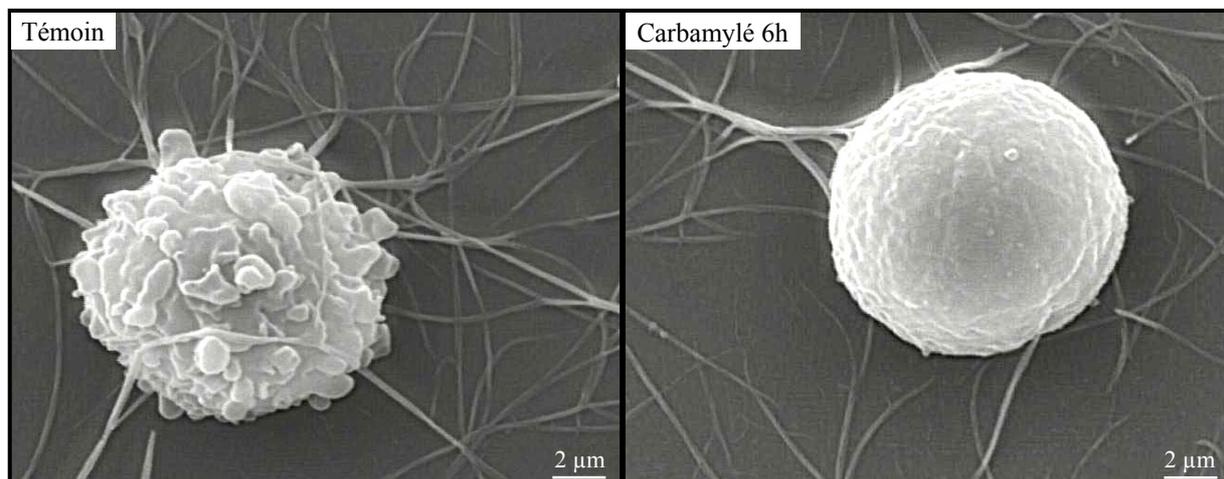


Figure 58. Modification de la morphologie des polynucléaires neutrophiles après interaction avec le collagène carbamylé.

Les PNN sont incubés pendant 2 h à 37°C avec le collagène puis les échantillons sont préparés pour permettre l'observation au microscope électronique à balayage.

Les clichés montrent une adhésion des PNN au collagène témoin, mise en évidence par l'enroulement des PNN autour des fibres. Cette interaction s'accompagne de l'activation des PNN, qui présentent une surface membranaire hétérogène laissant apparaître de nombreuses invaginations, reflet des activités d'exocytose et de dégranulation des PNN.

En revanche, l'interaction des PNN avec le collagène carbamylé conduit à une activation beaucoup plus faible. La surface membranaire des PNN reste quasiment homogène, ce qui

montre l'absence ou la diminution de leur activité sécrétoire, sans que la viabilité de la cellule n'apparaisse affectée.

Ces résultats montrent donc l'existence d'une corrélation entre la morphologie des PNN et l'inhibition de la production de RLO induite par le collagène carbamylé.

III.3.2.5. Contrôle des préparations de collagène

Nous avons vérifié qu'après stérilisation, les préparations de collagène ne contenaient pas d'endotoxines bactériennes, capables d'activer les PNN. Le dosage d'endotoxines a été réalisé au laboratoire d'Hématologie du Pr. Nguyen (CHU de Reims).

Le dosage a également été effectué en parallèle sur une solution de concentration connue (5 µg/mL) de lipopolysaccharide (LPS), utilisée comme étalon pour déterminer la quantité d'endotoxines présentes dans les solutions de collagène (tableau 10).

	Endotoxines (u.e./mL)
LPS	215 600
Collagène témoin	0,87
Collagène carbamylé 2h	1,36
Collagène carbamylé 6h	1,49
Collagène carbamylé 24h	1,33

Tableau 10. Dosage des endotoxines dans les différentes préparations de collagène.

Le collagène est solubilisé à 2 mg/mL dans l'acide acétique 18 mM stérile, puis le dosage d'endotoxines est effectué au laboratoire d'Hématologie du Pr. Nguyen (CHU de Reims). La solution de lipopolysaccharide (LPS) à 5 µg/mL est utilisée comme étalon. *Abréviation* : u.e. : unités d'endotoxines.

La concentration d'endotoxines dans la solution étalon de LPS est de 215 600 u.e./mL. Pour qu'une solution soit considérée comme dépourvue d'endotoxines, il faut que cette concentration soit inférieure à 2,1 u.e./mL, ce qui correspond à une concentration de 0,05 ng/mL de LPS [Gretzer *et al.*, 2002]. Etant donné que toutes les solutions de collagène testées possèdent

une concentration d'endotoxines inférieure à 1,5 u.e./mL, les solutions de collagène ont été considérées comme dépourvues d'endotoxines, ce qui permet de vérifier que l'activation des PNN par le collagène est indépendante d'un effet éventuel des endotoxines bactériennes.

III.3.3. Mécanisme d'inhibition par le collagène carbamylé de la production de radicaux libres oxygénés par les polynucléaires neutrophiles

Nous avons voulu expliquer par quel mécanisme le collagène carbamylé entraînait une inhibition de la production de RLO par les PNN. Dans un premier temps, nous avons procédé à certaines vérifications, comme l'étude de la viabilité cellulaire, puis nous avons déterminé les séquences du collagène responsables de cet effet.

III.3.3.1. Evaluation de la viabilité des PNN au contact du collagène carbamylé

Nous avons vérifié que le collagène carbamylé n'exerçait pas d'effet toxique sur les PNN, de deux manières différentes : soit par le test d'expulsion du bleu Trypan, qui permet de colorer les cellules mortes, soit par dosage de l'activité lactate déshydrogénase (LDH), enzyme intracellulaire libérée au cours de la lyse cellulaire (tableau 11).

D'après le comptage des cellules mortes après coloration au bleu Trypan, on trouve une viabilité cellulaire supérieure à 95 %, quelle que soit la préparation de collagène. Aucune différence significative n'a été constatée entre le collagène témoin et les différentes préparations de collagène carbamylé. Ces résultats sont confirmés par la mesure de l'activité LDH dans les surnageants de culture, car les valeurs ne dépassent pas 14 UI/L quel que soit le collagène avec lequel les cellules ont été incubées, alors que cette activité atteint 228 UI/L pour le témoin positif.

	Test au bleu Trypan (pourcentage de cellules viables)	Activité LDH (exprimée en UI/L)
Témoin positif (cellules lysées)	-	228 ± 11
Collagène témoin	98 ± 2 %	10 ± 3
Collagène carbamylé 2h	98 ± 1 % NS	12 ± 5 NS
Collagène carbamylé 6h	95 ± 5 % NS	8 ± 6 NS
Collagène carbamylé 24h	96 ± 4 % NS	14 ± 4 NS

Tableau 11. Effet du collagène carbamylé sur la viabilité des polynucléaires neutrophiles.

Les PNN sont incubés pendant 2 h à 37°C sur un tapis de collagène, puis la viabilité cellulaire est évaluée soit par comptage des cellules mortes après coloration au bleu Trypan, soit par dosage de l'activité LDH. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-types (n=3). Test de significativité : NS : différence non significative par rapport au collagène témoin. *Abréviation* : LDH : lactate déshydrogénase.

Ces deux tests de viabilité cellulaire montrent que le collagène carbamylé n'exerce pas d'effet toxique direct sur les PNN.

III.3.3.2. Effet « scavenger » du collagène carbamylé

Après avoir vérifié que le collagène carbamylé n'entraînait pas de baisse de viabilité des PNN, nous avons mesuré sa capacité à capter les RLO, autrement dénommée effet « scavenger » du collagène. Pour cela, nous avons utilisé un système acellulaire de production d'ions superoxide, le système hypoxanthine-xanthine oxydase. La production d'ions superoxide a été suivie par la technique de réduction du NBT.

Ni le collagène témoin, ni le collagène carbamylé 24h ne modifient de manière significative la production d'ions superoxide dans ce système (figure 59). L'inhibition de la libération de RLO par les PNN en présence de collagène carbamylé ne s'explique donc pas par un effet scavenger direct de ce collagène sur les RLO produits par les cellules.

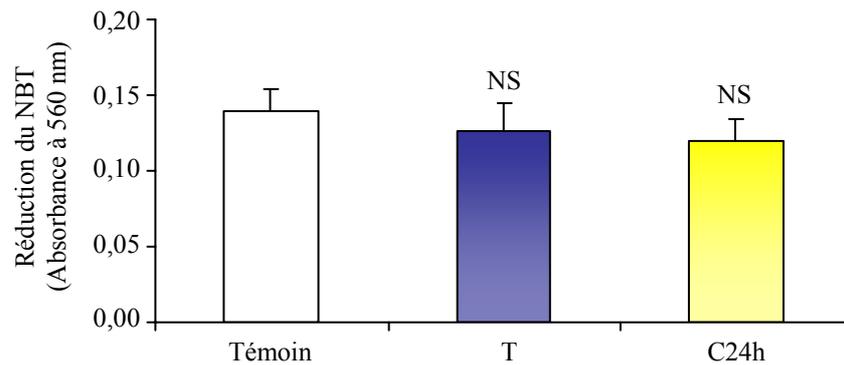


Figure 59. Influence du collagène carbamylé sur la production d'ions superoxide en système acellulaire.

Les ions superoxide sont produits *in vitro* par le système acellulaire hypoxanthine-xanthine oxydase et quantifiés par la technique de réduction du NBT en tampon phosphate (témoin), en présence ou non de collagène. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types ($n=3$). Test de significativité : NS : différence non significative par rapport au témoin. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C24h : collagène carbamylé 24 h.

III.3.3.3. Rôle de la carbamylation du peptide α_1 CB6 dans l'interaction entre collagène et polynucléaires neutrophiles

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que le collagène de type I stimulait la libération de RLO par les PNN par l'intermédiaire d'une séquence spécifique (DGGRYY), située au niveau du télopeptide C-terminal de la chaîne α_1 du collagène [Monboisse *et al.*, 1990]. Cette séquence activatrice est contenue dans le peptide α_1 CB6, qui constitue une cible préférentielle de carbamylation (§ III.1.3.2).

Pour déterminer le rôle de la carbamylation de ce peptide dans l'inhibition de l'activation des PNN, nous avons reproduit une technique d'étude de l'interaction entre les CB-peptides et les PNN, mise au point au laboratoire [Garnotel *et al.*, 1993]. Les CB-peptides sont séparés par électrophorèse puis transférés sur membrane. Après incubation des PNN avec la membrane, les fonctions d'adhésion et d'activation des PNN au contact des différents CB-peptides sont analysées (cf protocole schématisé par la figure 21).

Dans une première expérience, nous avons testé les CB-peptides provenant des collagènes témoin, carbamylé 6h et pepsiné. Les CB-peptides du collagène pepsiné, dépourvu de ses télépeptides, servent de contrôle négatif d'activation. En effet, le peptide α_1 CB6, qui contient la séquence activatrice des PNN, se trouve à l'extrémité C-terminale du collagène, éliminée par l'action de la pepsine.

Un gel d'électrophorèse, réalisé en parallèle, est utilisé comme référence pour l'identification des CB-peptides (figure 60). Ce gel permet de vérifier le retard de migration dû à la carbamylation du peptide α_1 CB6 et l'efficacité de la digestion pepsique, illustrée par la diminution de taille du peptide.

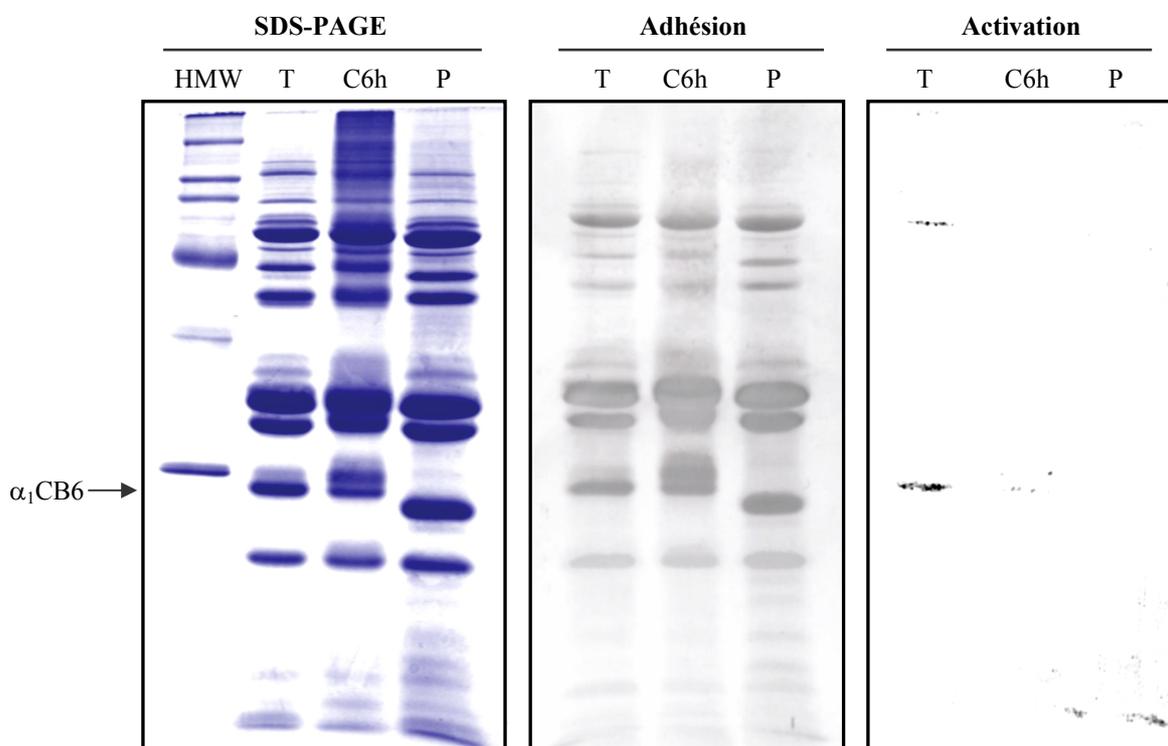


Figure 60. Rôle de la carbamylation du peptide α_1 CB6 sur l'adhésion et l'activation des polynucléaires neutrophiles.

50 μ g de CB-peptides ont été séparés par SDS-PAGE à 12,5 % (m/v) de polyacrylamide puis transférés sur membrane de PVDF. L'adhésion et l'activation des PNN ont été étudiées selon le protocole décrit au § II.2.4.7. *Abréviations* : HMW : marqueurs de haute masse moléculaire ; T : collagène témoin ; C6h : collagène carbamylé 6 h ; P : collagène pepsiné.

Ni la carbamylation, ni la digestion par la pepsine ne modifient les propriétés d'adhésion des PNN à l'ensemble des CB-peptides, notamment α_1 CB6.

L'activation des PNN par les préparations de collagène témoin est sélectivement observée sur le CB-peptide α_1 CB6. On note cependant une seconde bande, de plus haute masse moléculaire, également capable d'activer les PNN, qui doit correspondre à une forme de digestion incomplète du collagène. En revanche, on observe une très nette inhibition de l'activation des PNN par le peptide α_1 CB6 du collagène carbamylé 6h, puisque seul un très faible signal d'activation est détecté. Par ailleurs, le peptide α_1 CB6 du collagène pepsiné est incapable d'activer les PNN.

La carbamylation du peptide α_1 CB6 joue donc un rôle dans l'inhibition de la libération de RLO par les PNN. Pour déterminer si cette propriété était liée au degré de carbamylation, nous avons reproduit le test d'activation avec des CB-peptides issus des collagènes témoin, carbamylé 2h, carbamylé 6h et carbamylé 24h (figure 61).

La figure 61A montre que l'inhibition de l'activation des PNN est concomitante d'une augmentation du taux de carbamylation du peptide α_1 CB6. Les signaux obtenus ont été quantifiés par densitométrie à partir de trois expériences indépendantes. Si aucune différence significative n'est observée entre les collagènes témoin et carbamylé 2h, on note une inhibition de 60 % de l'activation des PNN pour le collagène carbamylé 6h. L'inhibition est pratiquement totale en présence du peptide α_1 CB6 du collagène carbamylé 24h (figure 61B).

Ces expériences montrent que l'effet inhibiteur du collagène carbamylé est la conséquence de la carbamylation spécifique du peptide α_1 CB6, et que le degré de l'inhibition est dépendant du taux de carbamylation.

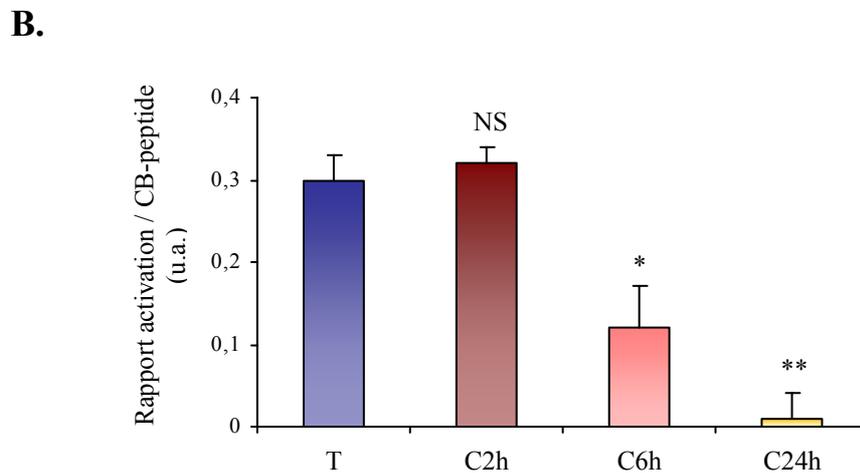
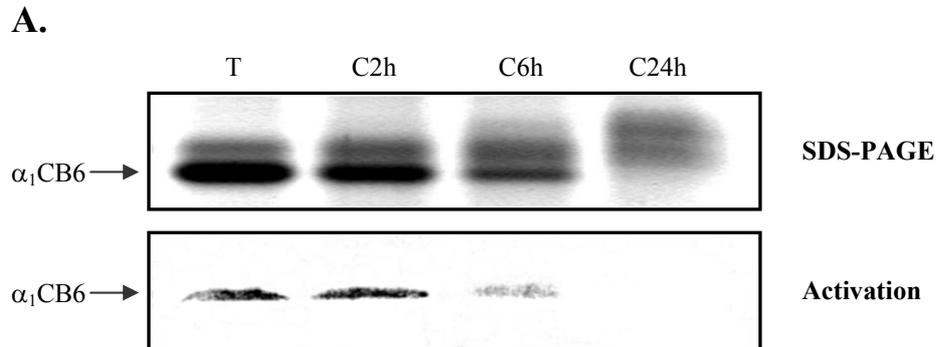


Figure 61. Influence du degré de carbamylation du peptide α_1 CB6 sur l'activation des polynucléaires neutrophiles.

(A) 50 μ g de CB-peptides ont été séparés par SDS-PAGE à 12,5 % (m/v) de polyacrylamide puis transférés sur membrane de PVDF. L'activation des PNN a été étudiée selon le protocole décrit au § II.2.4.7. (B) Quantification densitométrique de l'activation des PNN rapportée à la quantité de CB-peptide. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types. Test de significativité : NS : différence non significative ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C2h : collagène carbamylé 2 h ; C6h : collagène carbamylé 6 h ; C24h : collagène carbamylé 24 h.

III.3.3.4. Relation entre degré de carbamylation et activité du peptide α_1 CB6

Après avoir mis en évidence l'implication de la carbamylation du peptide α_1 CB6, nous avons voulu déterminer le degré minimal de carbamylation permettant d'obtenir l'inhibition de l'activation des PNN.

Or, dans chaque préparation de collagène carbamylé étudiée, le taux de carbamylation du peptide α_1 CB6 est hétérogène, ce qui traduit l'apparition de plusieurs spots en électrophorèse bidimensionnelle. Nous devons donc disposer d'un ensemble de peptides α_1 CB6 ayant un taux de carbamylation identique, ce qui nous a conduit à séparer, par isoélectrofocalisation préparative, les différents peptides α_1 CB6, dans le but de tester leur capacité à activer les PNN selon leur degré de carbamylation.

L'IEF a permis la séparation de trois peptides α_1 CB6 à partir du collagène témoin et cinq à partir du collagène carbamylé 6h (figure 62). Parmi les trois peptides α_1 CB6 obtenus du collagène témoin, seul les deux peptides de pHi plus élevé (*i.e.* 6,8 et 7,7) sont capables d'activer les PNN. Les cinq peptides issus du collagène carbamylé 6h possèdent un pHi plus faible (*i.e.* de 6,8 à 5,2), corrélé à l'apparition progressive du retard caractéristique de mobilité électrophorétique. Parmi eux, seul celui de pHi est égal à 6,8 est capable d'activer les PNN. Cependant, l'activation est plus faible que pour le peptide de pHi équivalent isolé à partir du collagène témoin.

La même expérience a été réalisée avec des CB-peptides préparés à partir de collagène carbamylé 24h (figure 63). Les résultats obtenus pour le collagène témoin confirment que seuls les deux peptides de pHi plus élevé (*i.e.* 6,8 et 7,7) induisent la libération de RLO par les PNN. En revanche, aucune des différentes formes du peptide α_1 CB6 du collagène carbamylé 24h n'est capable d'activer les PNN. Ce résultat concorde avec celui de l'expérience précédente car le peptide ayant un pHi égal à 5,2 qui possède plus d'un résidu modifié, est incapable de stimuler la libération de RLO par les PNN.

Ces expériences montrent que la carbamylation d'un seul résidu de lysine du peptide α_1 CB6 suffit à conférer l'effet inhibiteur sur l'activation des PNN.

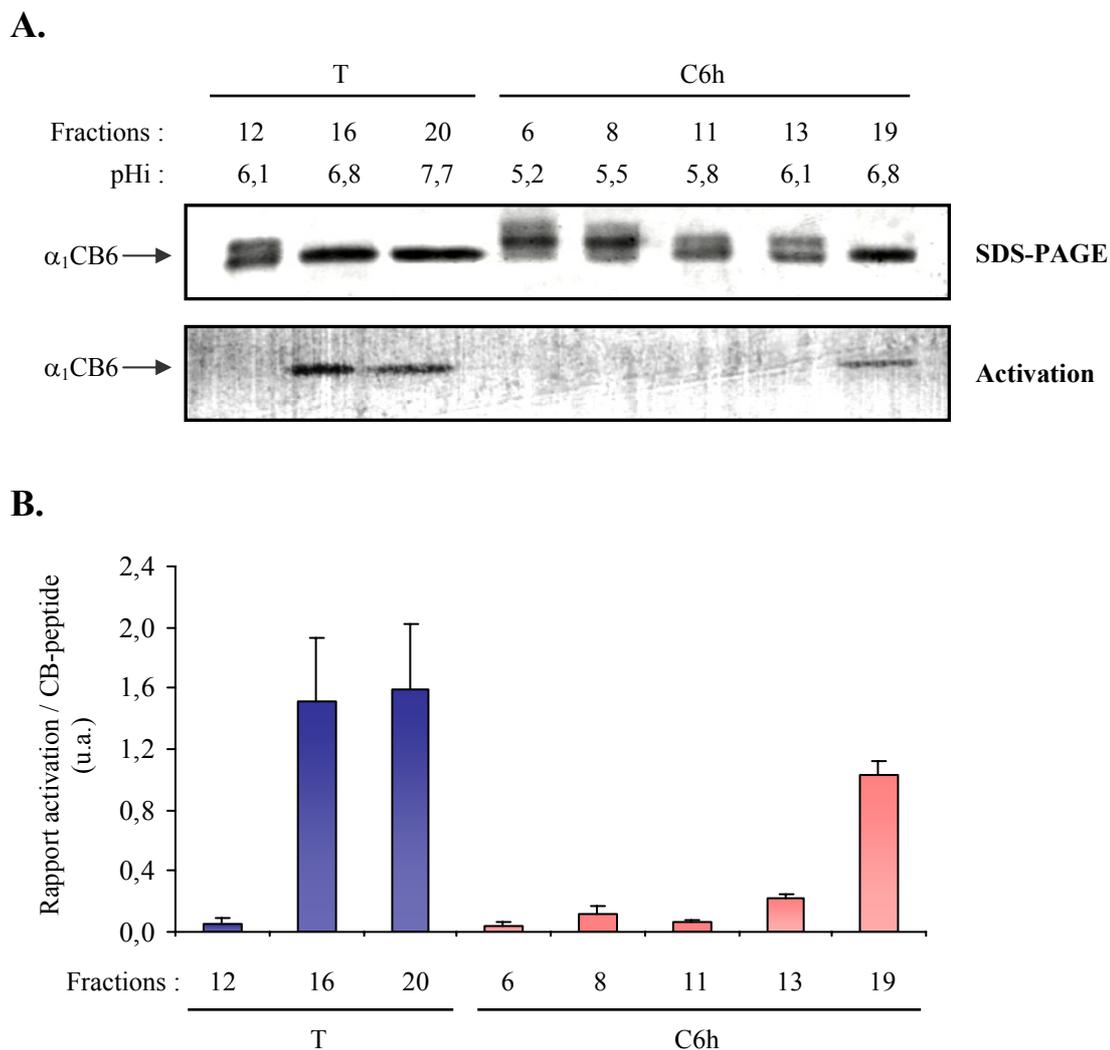


Figure 62. Effet inhibiteur des différents peptides α_1 CB6 issu du collagène carbamylé 6h.

(A) Les CB-peptides, séparés par IEF préparative, sont soumis à une SDS-PAGE à 12,5 % (m/v) d'acrylamide puis transférés sur membrane de PVDF. L'activation des PNN au contact des différents CB-peptides a été étudiée selon le protocole décrit au § II.2.4.7. (B) Quantification densitométrique du signal d'activation des PNN rapporté à la quantité de CB-peptide déposée. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types effectuées à partir de trois expériences indépendantes. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C6h : collagène carbamylé 6 h ; u.a. : unités arbitraires.

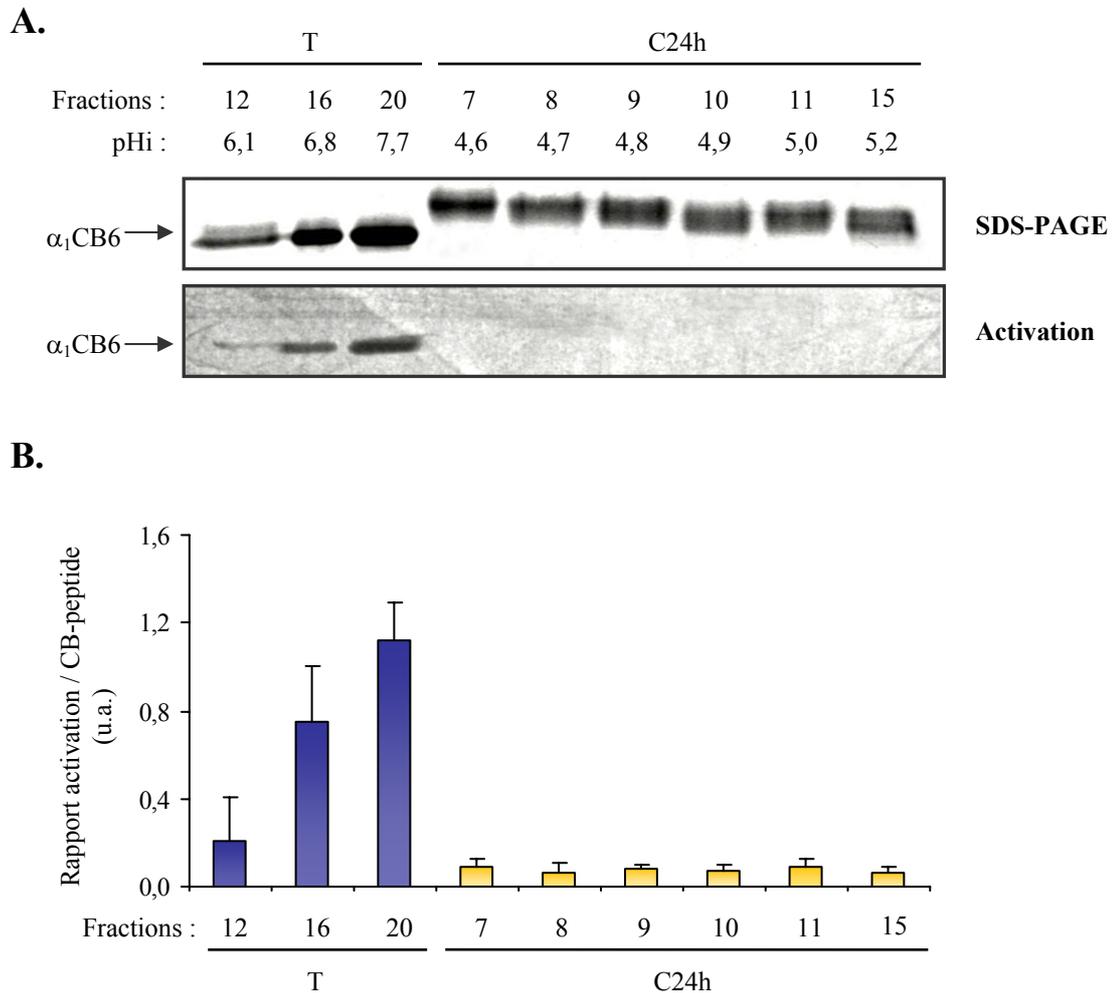


Figure 63. Effet inhibiteur des différents peptides α_1 CB6 issu du collagène carbamylé 24h.

(A) Les CB-peptides, séparés par IEF préparative, sont soumis à une SDS-PAGE à 12,5 % (m/v) d'acrylamide puis transférés sur membrane de PVDF. L'activation des PNN au contact des différents CB-peptides a été étudiée selon le protocole décrit au § II.2.4.7. (B) Quantification densitométrique du signal d'activation des PNN rapporté à la quantité de CB-peptide déposée. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types effectuées à partir de trois expériences indépendantes. *Abréviations* : T : collagène témoin ; C6h : collagène carbamylé 6 h ; u.a. : unités arbitraires.

III.3.3.5. Mise en évidence de l'implication d'un résidu de lysine dans l'activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène de type I

Les résultats précédents indiquent que la carbamylation des résidus de lysine est responsable de l'altération des interactions entre PNN et collagène de type I, suggérant l'implication d'un résidu de lysine dans l'activation des PNN par le collagène. Pour le confirmer, nous avons utilisé une approche différente consistant, dans un premier temps, à réaliser des expériences de compétition avec un composé de structure très proche de la lysine et non métabolisable par la cellule, l'acide 6-amino-hexanoïque (AHA).

L'AHA inhibe l'activation des PNN induite par le collagène de type I de manière dose dépendante. L'effet est significatif à partir de 12,5 mM d'AHA (- 30 %, $p < 0,01$), et l'inhibition devient totale pour une concentration de 100 mM (figure 64).

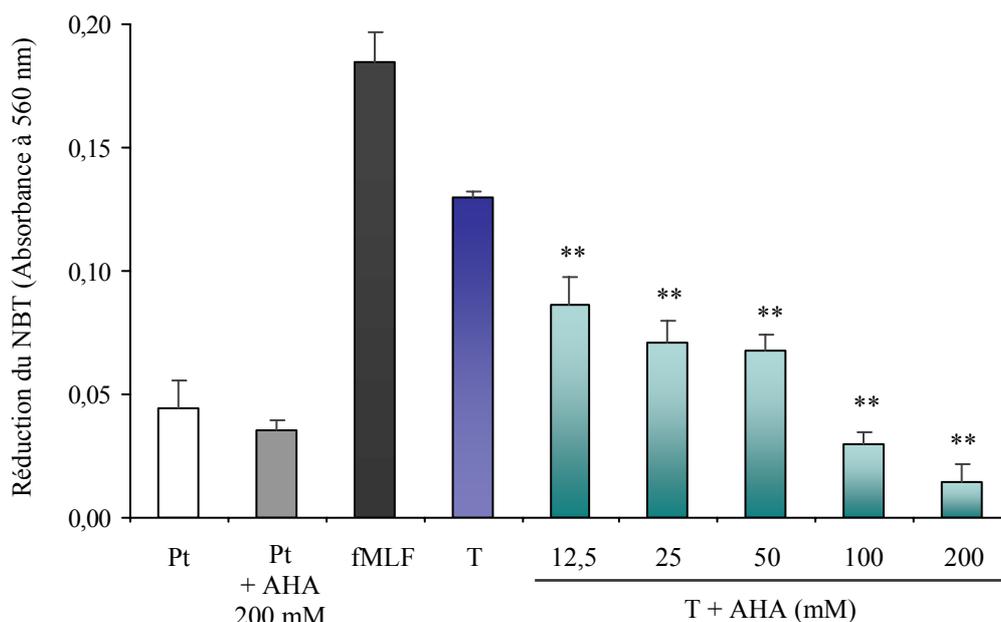


Figure 64. Effet de l'acide 6-amino-hexanoïque sur l'activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène de type I.

Les PNN sont incubés pendant 2 h à 37°C avec le collagène en présence d'acide 6-amino-hexanoïque. L'activation des PNN est mise en évidence par la réduction du NBT, déterminée par l'absorbance à 560 nm. L'activation sur plastique reflète le taux d'activation basal des PNN tandis que l'utilisation de fMet-Leu-Phe (10^{-7} M final) comme agent stimulant sert de contrôle positif d'activation. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types (n=3). Test de significativité par rapport au collagène témoin : ** : $p < 0,01$. *Abréviations* : Pt : plastique ; AHA : acide 6-amino-hexanoïque ; fMLF : fMet-Leu-Phe ; T : collagène témoin.

En revanche, l'AHA ne modifie pas l'adhésion des PNN au collagène, quelle que soit la concentration utilisée (figure 65).

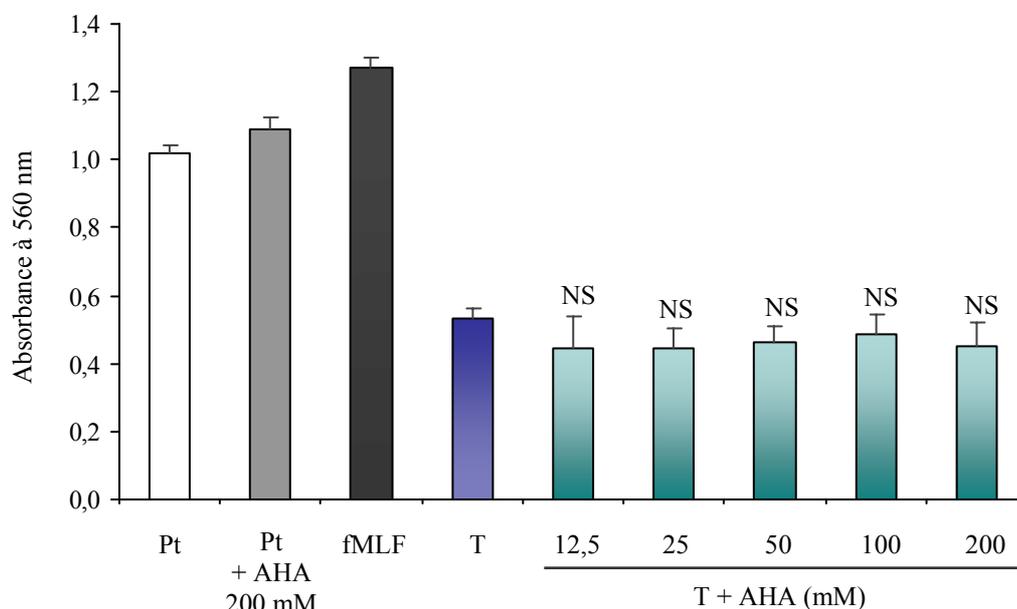


Figure 65. Effet de l'acide 6-amino-hexanoïque sur l'adhésion des polynucléaires neutrophiles au collagène.

Les PNN sont incubés pendant 2 h à 37°C avec le collagène en présence d'acide 6-amino-hexanoïque. L'adhésion des PNN au collagène est mise en évidence par coloration des cellules au violet cristal, puis mesure de l'absorbance à 560 nm. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart-types (n=3). Test de significativité par rapport au collagène témoin : NS : différence non significative. *Abréviations* : Pt : plastique ; AHA : acide 6-amino-hexanoïque ; fMLF : fMet-Leu-Phe ; T : collagène témoin.

Nous avons évalué l'éventuel effet toxique de l'AHA sur les PNN par dosage de l'activité LDH dans les surnageants de culture. Ce dosage montre que l'AHA n'est pas toxique pour les PNN, même à une concentration de 200 mM (tableau 12).

	Activité LDH (exprimée en UI/L)
Témoin positif (cellules lysées)	230 ± 21
Plastique	16 ± 3
Plastique + AHA 200 mM	15 ± 5
fMet-Leu-Phe (10^{-7} M)	17 ± 8
Collagène témoin	19 ± 6
Collagène témoin + AHA 12,5 mM	20 ± 5 NS
Collagène témoin + AHA 25 mM	20 ± 3 NS
Collagène témoin + AHA 50 mM	21 ± 4 NS
Collagène témoin + AHA 100 mM	24 ± 2 NS
Collagène témoin + AHA 200 mM	23 ± 5 NS

Tableau 12. Effet de l'acide 6-amino-hexanoïque sur la viabilité des polynucléaires neutrophiles.

Les PNN sont incubés pendant 2 h à 37°C sur collagène en présence de différentes concentrations d'acide 6-amino-hexanoïque, puis la viabilité cellulaire est évaluée par dosage de l'activité LDH. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-types (n=3). Test de significativité par rapport au collagène témoin : NS : différence non significative. *Abréviations* : AHA : acide 6-amino-hexanoïque ; LDH : lactate déshydrogénase.

Ces expériences de compétition avec l'AHA montrent l'implication d'un résidu de lysine dans le processus d'activation des PNN par le collagène de type I. Pour localiser plus précisément le site de carbamylation responsable de l'effet biologique, nous avons recherché les résidus de lysine du peptide α_1 CB6 situés à proximité de la séquence activatrice des PNN, et susceptibles d'être carbamylés. L'alignement des séquences d'AA du peptide α_1 CB6 de différentes espèces met en évidence la conservation d'un résidu de lysine situé 3 AA en amont de la séquence DGGRYY (figure 66).

Homme	S A G F D F S F L	P Q P P Q E	Δ	K	A H	D G G R Y Y	R A
Rat	S G G Y D F S F L	P E P P E E	Q	K	S Q	D G G R Y Y	
Lapin	S G G F D I Δ F M	P E P P E E	G	K	A Δ	D G G R Y Y	R A
Poulet	S G G F D F S F L	P Q P P Q E	Δ	K	A H	D G G R Y Y	R A
Veau	S G G Y D L S F I	P Q P P Q E	Δ	K	A H	D G G R Y Y	

Figure 66. Alignement des séquences d'AA de l'extrémité C-terminale des peptides α_1 CB6 de différentes espèces (D'après Monboisse *et al.*, 1990).

L'alignement des séquences en AA des peptides α_1 CB6 met en évidence la conservation d'une séquence PGPPQE (entourée en rose), dont la fonction est encore inconnue, de la séquence activatrice des PNN (entourée en jaune), et d'un résidu de lysine (en position 1208) situé entre ces deux séquences (entourée en bleu). *Abréviation* : Δ : délétion.

Ces données nous ont amené à émettre l'hypothèse que cette lysine, située en position 1208, pouvait jouer un rôle important dans l'activation des PNN par le collagène de type I. Pour la tester, nous avons produit un peptide α_1 CB6 recombinant, dans lequel la lysine¹²⁰⁸ a été mutée en **glycine**.

Des peptides recombinants ont donc été produits en système procaryote (E-coli - souche JM109DE3) sous la forme de protéines de fusion GST, selon le protocole décrit au paragraphe II.2.4.8b. L'activation des PNN par les peptides α_1 CB6 purifiés possédant ou non la mutation a été mesurée par chimiluminescence (tableau 13).

Le peptide α_1 CB6 recombinant témoin présente un potentiel d'activation des PNN inférieur de 39 % à celui de la molécule de collagène entière. La mutation de la lysine¹²⁰⁸ en glycine entraîne une inhibition significative de 53 % ($p < 0,01$) de la capacité du peptide à stimuler la libération de RLO par les PNN.

	Intensité de luminescence (unités arbitraires)	Pourcentage d'inhibition (par rapport à α_1 CB6 témoin)
Sans effecteur	72 ± 13	-
fMet-Leu-Phe	7391 ± 313	-
Collagène de type I	495 ± 58	-
α_1 CB6 recombinant témoin	303 ± 10	-
α_1 CB6 recombinant muté	141 ± 28 **	53 %

Tableau 13. Mesure par chimiluminescence de l'activation des polynucléaires neutrophiles par les peptides α_1 CB6 recombinants.

10^6 PNN sont incubés pendant 10 min à 37°C, en suspension avec 50 µg de peptides α_1 CB6 recombinants. L'activation des PNN est mise en évidence par la mesure de la luminescence produite par le luminol. L'incubation en présence de fMet-Leu-Phe (10^{-7} M final) et de collagène de type I, comme agents stimulants, sert de contrôle positif d'activation. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-types (n=3). Différence significative par rapport au peptide α_1 CB6 témoin : ** : $p < 0,01$.

Ces expériences permettent de démontrer qu'en complément de la séquence DGGRYY, d'autres résidus, comme le résidu de lysine en position 1208, peuvent moduler l'activation des PNN par le collagène de type I.

Chapitre IV

DISCUSSION

Dans certains contextes physiopathologiques, les protéines des organismes vivants sont la cible de modifications post-traductionnelles tardives, qui se caractérisent par la fixation de métabolites simples sur les groupements NH_2 des protéines [Harding *et al.*, 1989]. La glycoxydation des protéines, qui est amplifiée au cours du diabète sucré et impliquée dans le développement de complications à long terme caractéristiques de cette pathologie, demeure parmi les modifications post-traductionnelles les mieux connues à ce jour [Paul et Bailey, 1996 ; Vlassara, 1997]. Plus récemment, une autre réaction du même type a été identifiée : la carbamylation, qui correspond à la fixation non enzymatique de cyanate, métabolite dérivé de la décomposition de l'urée, sur les groupements NH_2 libres des AA ou des protéines, et plus particulièrement les groupements $\epsilon\text{-NH}_2$ des résidus de lysine. *In vivo*, cette modification post-traductionnelle est une des conséquences de l'IRC, puisque son intensité augmente avec la concentration sérique d'urée [Kraus LM et Kraus AP, 2001]. Le processus de carbamylation a été mis en évidence chez les patients urémiques pour des protéines circulantes (hémoglobine et protéines plasmatiques) [Balion *et al.*, 1998 ; Wynckel *et al.*, 2000], mais également pour des protéines de la matrice extracellulaire, au niveau des reins de patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) [Kraus *et al.*, 2001]. Bien que peu de données bibliographiques soient disponibles à ce sujet, les protéines de la matrice extracellulaire sont susceptibles de présenter un taux de carbamylation plus élevé que les protéines circulantes, étant donné que la durée de vie de la protéine est un paramètre déterminant pour la modification post-traductionnelle d'une protéine.

La fixation de métabolites simples sur les groupements aminés des protéines peut induire des altérations de leurs propriétés structurales et fonctionnelles, conduisant à des perturbations de leurs interactions avec les cellules environnantes, à l'origine directe de processus physiopathologiques *in vivo*. Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier la carbamylation du collagène de type I qui, non seulement joue un rôle crucial dans l'architecture du tissu conjonctif, mais est également impliqué dans la régulation des fonctions de nombreux types cellulaires, en particulier les cellules inflammatoires telles que les polynucléaires neutrophiles. L'IRC est une pathologie qui se caractérise par une atteinte progressive et irréversible des fonctions rénales, dont la première conséquence est la non élimination des déchets métaboliques. Au cours de l'IRC, contexte pathologique qui favorise la carbamylation, en raison de l'augmentation de l'urémie, les patients présentent des troubles infectieux et inflammatoires importants, d'origine multifactorielle. Le but de notre travail a été de déterminer l'impact de la carbamylation sur les

propriétés structurales du collagène de type I, puis d'étudier son rôle sur l'interaction entre collagène carbamylé et PNN, dans le contexte des complications de l'IRC.

Analyse structurale du collagène de type I carbamylé

Caractérisation de la réaction de carbamylation :

Le collagène de type I a été carbamylé *in vitro* par incubation à 37°C pendant 2, 6 ou 24 heures en présence de 0,1 M KCNO, selon les conditions décrites dans la littérature [Qin *et al.*, 1992]. L'analyse de la composition en AA révèle que seuls les résidus de lysine sont carbamylés, et transformés en résidus d'homocitrulline, qu'aucune modification du groupement α -NH₂ de l'AA en position N-terminale n'a été mise en évidence. Le pourcentage de résidus modifiés atteint au maximum 1,1 % du nombre total d'AA après 24 heures de traitement, ce qui est en accord avec le taux de carbamylation des protéines sériques (*i.e.* 1 %) obtenu par Shaykh *et al.* en 1999 [Skaykh *et al.*, 1999]. Bien qu'il n'existe pas de données bibliographiques permettant de connaître le taux de carbamylation des protéines tissulaires *in vivo*, le collagène avec lequel ont été réalisées les expériences présente un degré de modification tout à fait envisageable *in vivo*, si l'on considère sa demi-vie, estimée à plus de 15 ans [Verzijl *et al.*, 2000], et si l'on se réfère, par analogie, à la réaction de glycoxydation, pour laquelle l'accumulation de produits de glycation avancés dans les tissus de patients diabétiques a été largement démontrée [Paul et Bailey, 1996].

Cependant, le KCNO n'étant pas un agent de carbamylation physiologique, nous avons carbamylé en parallèle du collagène par 50 mM d'urée. Nos résultats montrent que la réaction est, dans ce cas, beaucoup plus lente mais réelle avec un taux de modification d'un résidu tous les deux mois (l'équivalent de deux heures de carbamylation par le KCNO 0,1 M), ce qui peut représenter une modification conséquente si l'on extrapole à la durée de vie estimée de la protéine. Par conséquent, nous pouvons considérer que le collagène carbamylé utilisé au cours de nos expériences possède un degré de modification compatible avec ce qui peut être rencontré *in vivo*, et renforce la pertinence biologique de l'expérimentation.

Analyse électrophorétique du collagène carbamylé :

Dans un premier temps, pour vérifier l'impact de la carbamylation à la fois sur l'intégrité du collagène et sur sa mobilité électrophorétique, le collagène carbamylé a été soumis à une électrophorèse de type SDS-PAGE. Le gel obtenu montre que le collagène carbamylé présente les bandes caractéristiques correspondant aux chaînes α_1 (I) et α_2 (I). Cependant, les chaînes α du

collagène carbamylé présentent un retard de migration électrophorétique par rapport aux chaînes α du collagène témoin, dépendant du temps de carbamylation. Ce phénomène ne peut pas s'expliquer par une augmentation de la masse moléculaire, puisque le groupement ajouté est constitué de seulement quelques atomes, mais plutôt par un changement conformationnel des chaînes α . En effet, il est acquis que les protéines fibrillaires, comme les collagènes, se comportent de manière différente des protéines globulaires en électrophorèse de type SDS-PAGE [Furthmayr et Timpl, 1971 ; Ricard-Blum *et al.*, 1988]. Par ailleurs, ce type de retard de migration électrophorétique est également rencontré lorsque le collagène présente un taux d'hydroxylation anormalement élevé [Hirota *et al.*, 2003 ; Torre-Blanco *et al.*, 1992]. D'autres études ont mis en évidence une augmentation de l'encombrement stérique, et plus particulièrement du rayon de Stokes, de l'albumine après carbamylation, avec comme conséquence une modification de son comportement en chromatographie d'exclusion-diffusion [Fazili *et al.*, 1993 ; Mir *et al.*, 1992]. Toutes ces données permettent donc d'envisager qu'une modification de la conformation de la chaîne α du collagène est responsable de ce retard de migration électrophorétique.

Sélectivité du processus de carbamylation :

Avant de caractériser l'impact de la carbamylation sur la structure typique en hélice formée par les chaînes α , nous avons entrepris de localiser les sites de carbamylation afin de déterminer la sélectivité de ce processus. Pour cela, nous avons utilisé la technique de clivage par le bromure de cyanogène (CNBr), qui clive après les résidus de méthionine. Les peptides obtenus, appelés CB-peptides, ont été analysés par électrophorèse, qui a mis en évidence l'apparition du retard de migration des différents CB-peptides variable selon le degré de carbamylation, permettant de déterminer, de manière indirecte, la localisation des résidus de lysine préférentiellement carbamylés. Les CB-peptides α_1 CB(7-8), α_1 CB6 et, dans une moindre mesure α_1 CB3, présentent une réduction de leur mobilité électrophorétique dès les temps les plus courts de carbamylation. Pour démontrer de manière plus précise l'existence de sites préférentiels de carbamylation, nous avons séparé les CB-peptides par électrophorèse bidimensionnelle, qui nous apporta des arguments supplémentaires. La première étape de cette technique, la séparation des protéines selon leur pHi, est classiquement utilisée pour mettre en évidence l'ensemble des modifications post-traductionnelles des protéines, car elle permet de détecter la modification d'un seul AA par le déplacement d'un spot. [Gianazza, 1995]. Par

exemple, Qin *et al.* ont utilisé l'isoélectrofocalisation pour déterminer les sites spécifiques de carbamylation de l' α -crystalline bovine [Qin *et al.*, 1992].

L'électrophorèse bidimensionnelle des CB-peptides du collagène témoin a révélé la présence inattendue de quatre spots pour le peptide α_1 CB6, au lieu d'un seul. L'apparition de ces spots supplémentaires ne peut pas être expliquée par la carbamylation du peptide au cours de l'étape de réhydratation de la bandelette en présence d'urée 8 M car une étude a démontré l'absence de carbamylation au cours de l'IEF, même pendant de longues périodes de réhydratation [McCarthy *et al.*, 2003]. De plus, ce profil électrophorétique est très reproductible d'une préparation de collagène à l'autre. Plusieurs hypothèses sont envisageables comme l'implication d'autres modifications post-traductionnelles ou encore la dégradation partielle du peptide, puisque l'élimination d'un seul résidu peut suffire à modifier le pHi du peptide. Cependant, ces hypothèses ne justifient pas réellement le fait que la présence de ces quatre spots soit très reproductible. Au cours de la carbamylation du collagène, de nouveaux spots de pHi plus faible apparaissent au fur et à mesure de l'augmentation du temps d'incubation. L'apparition de nouveaux spots correspondant au CB-peptide α_1 CB6 est détectable dès 2 h de carbamylation, alors que pour d'autres, le changement de profil n'est visible qu'au bout de 24 h de carbamylation. Ces données indiquent que le peptide α_1 CB6 est une cible privilégiée et possède un ou plusieurs sites préférentiels de carbamylation.

Ces résultats suggèrent que les premiers résidus de lysine à être carbamylés sont principalement localisés sur la chaîne α_1 du collagène, ce qui augmente l'impact potentiel de la carbamylation sur la structure de la triple hélice de collagène puisqu'il est composé de deux chaînes α_1 et d'une chaîne α_2 . Cependant, nous ne pouvons pas savoir si les deux chaînes α_1 sont carbamylées simultanément et de la même façon.

Pour déterminer si le degré de carbamylation est en relation avec le nombre de résidus de lysine par CB-peptides, nous avons tenté de localiser théoriquement les résidus de lysine susceptibles d'être carbamylés à partir de l'analyse de la séquence primaire des CB-peptides les plus affectés par la carbamylation. Bien que les CB-peptides α_1 CB(7-8), α_1 CB6 et α_1 CB3 contiennent respectivement vingt-deux, six et cinq résidus de lysine, certains de ces résidus appartiennent à la séquence consensus Gly-X-Lys, ce qui en font des cibles potentielles d'hydroxylation [Kielty et Grant, 2002] (figures 67 et 68).

QLSYGYDEKSTGGISVPGPMGPGSPRGLPGPPGAPGPGQGFQGGPPGEPGEPGASGPMGPR
 GPPGPPGKNGDDGEAGKPGRPGERGP PGPQGARGLPGTAGLPKMKGHRGFSGLDGAKGD
 AGPAGPKGEPGSPGENGAPGQMGPRGLPGERGRPGAPGPAGARGNDGATGAAGPPGPTG
 PAGPPGFPGAVGAKGEAGPQGPRGSEGPQGVRRGEPGPPGPAGAAGPAGNPGADGQPKAK
 GANGAPGIAGAPGFFPGARGPSGPQGPPGPPGKGNSEPGAPGSKGDTGAKGEPGPVGV
 QGPPGPAGEEGKRGARGEPTGLPGPPGERGGPGSRGFPGADGVAGPKGPAGERGSPG
 PAGPKGSPGEAGRPGEAGLPKAKGLTGPSGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGAR
 GQAGVMGFPGPKGAAGEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGEAGAQQPPGPAGPAGERGE
 QGPAGSPGFQGLPGPAGPPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGARGERGFPGERGVQGGPPG
 PAGPRGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPGSQGAPGLQGM PGERGAAGLPKPKGDRGDAGPK
 GADGSPGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAPGDKGESGSPGPAGPTGARGAPGDRGEPGPPGP
 AGFAGPPGADGQPKAKGEPGDAGAKGDAGPPGPAGPAGPPGPIGNVGAPKAKGARGSAG
 PPGATGFPGAAGRVP GPPGPSGNAGPPGPPGPAGKEGKGP RGETGPAGRPGEVGP GPPGPP
 GPAGEKGS PGADGPAGAPGTPGPQGIAGQRGVVGLPGQRGERGFPLPGPSGEPKQGP
 SGASGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPGRDGS PKGDRGETGPAGPPG
 APGAPGAPGPVGPAGKSGDRGETGPAGPAGVPAGARGPAGPQGP RDKGETGEQGDR
 GKKGHRGFSGLQGGPPGPPGSPGEQGPSGASGPAGPRGPPGSAGAPGKDGLNGLPGPIGP
 PGPRGRTGDAGVGP GPPGPPGPPGPPSAGFDFSF LPPQPKAHDGGRYYRA

Figure 67. Séquence primaire en acides aminés de la chaîne α_1 du collagène de type I humain (Source : Base de données Swiss Prot, entrée P02452).

Les séquences d'intérêt sont représentées en gras (RGD et DGGRYY) ou soulignées (séquences consensus d'hydroxylation des résidus de lysine). Tous les résidus de lysine et de méthionine ont été surlignés respectivement en jaune et bleu. Le clivage de la protéine par le bromure de cyanogène est réalisé après chaque résidu de méthionine.

QYDGKGVVGLGPGPMGLMGPRGPPGAAGAPGPQGFQGPAGEPGEFGQTGPAGARGPAGPP
 GKAGEDGHGPKPGRPGERGVVGPQGARGFPGTPLPGFKGIRGHNGLDGLKGQPGAPGV
 KGEFGAPGENGTGQGTGARGLPGERGRVGPAGARGSDGSVGPVGPAGPNGSAGPPG
 FPGAPGPKGEIGAVGNAGPTGPAGPRGEVGLPGLSGPVGPPGNPGANGLTGAKGAAGLP
 GVAGAPGLPGRGIPGPVGAAGATGARGLVGEPPGAGSKGESGNGKGEPGSAGPQGP
 SGEEGKRGPNGEAGSAGPPGPPGLRGSPPSRGLPGADGRAGVMGPPGSRGASGPAGVRG
 PNGDAGRPGEPGLMGRGLPGSPGNIGPAGKEGVPGLPGIDGRPGPIGPAGARGEFGNI
 GFPKPGPTGDPGKNGDKGHAGLAGARGAPGPDGNNGAQGPQGVQGGKGEQGPDPG
 PGFQGLPGPSGPAGEVGPGERGLHGEFGLPGPAGPRGERGPPGESGAAGPTGPIGSRG
 PSGPPGPDGNKGEFVGVAVGTAGPSGSPGLPGERGAAGIPGGKGEKGEFGLRGEIGNP
 GRDGARGAHGAVGAPGPAGATGDRGEAGAAGPAGPAGPRGSPGERGEVGPAGPNGFAGP
 AGAAGQPGA~~KGERGGKGP~~GENGVVGPTGPVGAAGPAGPNGPPGPAGS~~RGD~~GGPPG~~MTG~~
 FPGAAAGRTGPPGPSGISGPPGPPGPAGKEGLRGP~~RGD~~QGPVGRTEVGVAVGPPGFAGEK
 GPSGEAGTAGPPGTPGPQGLLAPGILGLPGSRGERGLPGVAGAVGEPGLGIAGPPGA
 RGPPGAVGSPGVNGAPGEAGRDGNPNDGPPGRDGQPGHKGERGYPGNIGPVGAAGAPG
 PHGPVGPAGKHGNRGETGPSGPVGPAGAVGPRGSPGQGI~~RGD~~KGEPGEK~~GPRGLPGFK~~
 GHNGLQGLPGIAGHHGDQGAPGSVGPAGPRGPAGPSGPAGKDGRTGHPGTVPAGIRGP
 QGHQGPAGPPGPPGPPGPPGV

Figure 68. Séquence primaire en acides aminés de la chaîne α_2 du collagène de type I humain (Source : Base de données Swiss Prot, entrée P08123).

Sur cette séquence, les séquences d'intérêt sont représentées en gras (RGD) ou soulignées (séquences consensus d'hydroxylation des résidus de lysine). Tous les résidus de lysine et de méthionine ont été surlignés respectivement en jaune et bleu. Le clivage de la protéine par le bromure de cyanogène est réalisé après chaque résidu de méthionine.

Comme le cyanate ne peut pas interagir avec des lysines hydroxylées, il ne reste que six résidus de lysine pouvant être carbamylés dans α_1 CB(7-8) et seulement trois dans α_1 CB6 et α_1 CB3. Ces deux derniers peptides contiennent donc le même nombre de résidus de lysine capables de réagir avec le cyanate, mais, d'après les résultats de l'électrophorèse, α_1 CB6 semble être modifié de manière plus importante que α_1 CB3. Le taux de carbamylation d'une séquence donnée n'est donc pas directement corrélé au nombre de résidus de lysine potentiellement carbamylables. D'autres facteurs entrent en jeu pour moduler l'affinité du cyanate vis à vis de tel ou tel groupement ϵ -NH₂. Parmi les facteurs favorisant, les mieux décrits dans la littérature sont l'accessibilité du groupement ainsi que son pKa [Qin *et al.*, 1992]. En effet, bien qu'il ne s'agisse pas d'une réaction enzymatique, la fixation de cyanate sur les résidus de lysine ne se fait pas de manière aléatoire. Il en est de même pour la glycation du collagène, dont les sites préférentiels sont situés sur les CB-peptides α_1 CB3 et α_2 CB(3-5) [Fu *et al.*, 1994 ; Reiser *et al.*, 1992]. Cependant, la sélectivité est dépendante de la protéine étudiée puisque, dans le cas de l' α A-crystalline, la carbamylation peut affecter tous les résidus de lysine à des taux toutefois différents [Qin *et al.*, 1992], alors dans le cas de la γ II-crystalline, le groupement α -NH₂ de la glycine en position N-terminale représente le principal site de carbamylation [Martin et Harding, 1989]. Ces données bibliographiques, ajoutées à nos résultats expérimentaux, nous permettent d'affirmer qu'il existe différentes cibles préférentielles de carbamylation pour le collagène de type I. La suite de notre étude a donc eu pour but de déterminer le degré d'implication de ces résidus de lysines dans l'assemblage structural de la protéine.

Analyse structurale du collagène carbamylé :

La première technique utilisée pour l'analyse des caractéristiques structurales du collagène carbamylé a été le dichroïsme circulaire (DC). Plusieurs études ont rapporté l'utilisation de cette technique pour caractériser l'impact de la carbamylation d'autres protéines telles que l'hémoglobine et l' α -crystalline bovine [Simons *et al.*, 1976 ; Beswick *et al.*, 1984]. Les spectres de DC obtenus pour les collagènes témoin et carbamylés présentent la même allure, avec des caractéristiques communes : un minimum et un maximum à respectivement 198 et 221 nm, et un point de croisement à 213 nm. Ces résultats sont en accord avec les spectres décrits dans la littérature et permettent de valider le fait que les chaînes α du collagène carbamylé conservent une structure en hélice de type polyproline II [Bhatnagar et Gough, 1996 ; Piez et Sherman, 1970]. La présence de la bande positive à 221 nm, qui disparaît au cours de la

dénaturation du collagène, témoigne du maintien de la structure en triple hélice [Brown *et al.*, 1994]. Cependant, l'intensité du signal des bandes positive et négative varie de manière proportionnelle au taux de carbamylation du collagène, ce qui, selon Bhatnagar et Gough, pourrait refléter un changement de la conformation des triples hélices et de leur arrangement en polymères (ou fibres) [Bhatnagar et Gough, 1996].

Le suivi de la disparition de la bande positive à 221 nm sous l'effet d'une augmentation de température a permis de mesurer la température de fusion du collagène carbamylé, reflet de la stabilité de la triple hélice. Jusqu'à six heures de carbamylation (*i.e.* l'apparition de quatre résidus d'homocitrulline pour 1000), aucune variation significative de la température de fusion n'est observée. En revanche, la température de fusion du collagène carbamylé 24h est abaissée. Ce résultat suggère que le collagène, modifié sur 1 % du total de ses AA, conserve globalement une structure en triple hélice, qui est néanmoins déstabilisée à certaines endroits. Ces zones présentent probablement une structure en triple hélice moins « ordonnée », ce qui suffit à fragiliser la protéine et à la rendre plus sensible à la température.

Pour préciser les données obtenues en DC, le collagène carbamylé a été analysé par spectroscopie Raman et IR-TF. Ces techniques de spectroscopie vibrationnelle sont complémentaires et fournissent des informations sur la structure des protéines, à un niveau moléculaire, en comparant les modes et intensités de vibration des liaisons covalentes. Ces deux paramètres varient considérablement lorsque la protéine subit des changements conformationnels importants [Parker, 1983].

Les informations spectrales obtenues pour la région des protéines, c'est-à-dire concernant les bandes amide I et II (Données IR-TF) et amide I et III (données Raman), confirment que la triple hélice de collagène n'est que très peu modifiée par la carbamylation [Ikoma *et al.*, 2003 ; Juszczak, 2004]. Cependant, des différences minimales existent, comme le montre l'analyse statistique des dérivés secondes des spectres IR-TF, et permettent de distinguer les formes carbamylées des contrôles. Ces différences se répercutent également sur le spectre Raman, avec une intensité de vibration de la bande amide I augmentée pour collagène carbamylé. Ainsi, même si cette bande est conservée, ce qui indique l'absence de dénaturation de la protéine, la variation d'intensité de vibration du groupement C=O de la liaison peptidique témoigne d'une « tension » inhabituelle au sein de la structure en hélice du collagène [Parker, 1983].

D'autres modifications, plus prévisibles, sont également observées, comme les changements de modes de vibration des groupements NH₂ et CH₂ et des liaisons C-N, qui reflètent la fixation du cyanate sur la chaîne latérale des résidus de lysine.

En revanche, les variations de l'intensité de vibration des liaisons C-C du squelette protéique et des hétérocycles des résidus de proline et d'hydroxyproline, observées dans la région 857-936 cm⁻¹ du spectre, sont plus inattendues. En effet, elles laissent envisager des répercussions sur le squelette protéique dans son ensemble, de modifications conformationnelles de la triple hélice que l'on peut qualifier de « locales ». Ces résultats, cependant, peuvent s'expliquer de manière logique, si l'on se réfère à la structure de l'hélice formée par la chaîne α du collagène. Nous avons indiqué dans l'introduction que la séquence primaire du collagène, formée de l'enchaînement d'un triplet caractéristique constitué en majorité de résidus de glycine (30 %), de proline et d'hydroxyproline (10 % chacun), conduisait à la formation d'une structure secondaire caractéristique en hélice de type polyproline. Cette hélice fait l'objet d'un équilibre très strict puisque la mutation d'un seul résidu (souvent la substitution d'une glycine) peut suffire à perturber sa structure et l'enroulement correct des trois chaînes, comme cela a été décrit dans de nombreuses pathologies dont les exemples les plus connus sont l'ostéogenèse imparfaite ou les syndromes d'Ehlers-Danlos [Myllyharju et Kivirikko, 2001]. Par conséquent, l'addition d'un groupement cyanate sur la chaîne latérale d'un résidu de lysine peut perturber localement l'équilibre de cette structure hélicoïdale particulière. De plus, lorsque le nombre de résidus modifiés augmente, la possibilité de retrouver deux zones de « déstabilisation » côte à côte augmente également, ce qui pourrait expliquer la plus grande fragilité et la plus grande sensibilité à la température pour les temps de carbamylation les plus élevés.

Si cette hypothèse est correcte, le collagène carbamylé peut se présenter globalement sous forme d'une structure en triple hélice, avec certaines zones ayant perdues cet enroulement caractéristique. Afin de le vérifier, nous avons mesuré les propriétés d'hélicité du collagène par polarimétrie, technique plus adaptée et plus sensible que les précédentes pour mesurer le taux d'hélicité du collagène. La mesure du pouvoir rotatoire à 435 nm a mis en évidence une baisse de 40 % du taux d'hélicité du collagène carbamylé 24h par rapport au collagène témoin, alors que les collagènes carbamylé 2h et carbamylé 6h ne présentent aucune différence significative. Ces résultats confirment notre hypothèse qui fait référence à l'existence de plusieurs zones non arrangées en triple hélice au sein du collagène carbamylé 24h, avec modification de la structure en hélice de type polyproline, en raison de la carbamylation des chaînes latérales de certains résidus de lysine. Il faut noter que le pouvoir rotatoire est beaucoup plus élevé à pH et température physiologiques, conditions que nous n'avons pas pu appliquer en raison de problèmes techniques liés à la carbamylation du collagène. Vu son défaut de fibrillogénèse, il est envisageable que la perte d'hélicité du collagène carbamylé 24h soit plus importante dans ces conditions. Toutefois, dans les conditions utilisées, cette technique nous a apporté des

informations supplémentaires confirmant la perte progressive de la structure en triple hélice avec l'augmentation du degré de carbamylation.

Cependant, les résultats de polarimétrie conduisent à une interprétation différente de celle effectuée à partir des résultats de DC, qui rapportaient l'absence de dénaturation du collagène même après 24 h de carbamylation. Ces divergences peuvent s'expliquer par le fait que la polarimétrie est une technique plus appropriée et plus spécifique que le DC pour l'évaluation du taux d'hélicité du collagène. Toutefois, la baisse de 40 % du taux d'hélicité mesurée est d'une importance telle qu'il est difficilement envisageable que celle-ci ne soit pas visible en DC, ce qui peut remettre en cause la fiabilité du calcul du taux d'hélicité. En effet, cette approche semi-quantitative ne prend pas en considération la présence de zones non hélicoïdales (les télépeptides) lors du calcul, augmentant ainsi le pourcentage d'incertitude. Pour ces raisons, notre interprétation se limitera à affirmer que la structure en triple hélice du collagène est progressivement « fragilisée » avec l'augmentation du degré de carbamylation, sans toutefois présenter de signe majeur de dénaturation.

Influence de la carbamylation sur la structure des fibres de collagène :

Nous nous sommes ensuite intéressé à la capacité propre au collagène de s'assembler spontanément sous forme de fibres. Au vu des résultats précédents, nous pouvions envisager que la perte d'hélicité des molécules de collagène interférait sur leur assemblage supramoléculaire. Les expériences de fibrillogenèse *in vitro* ont montré que la carbamylation du collagène conduisait à une diminution progressive de sa capacité à former des fibres. Ce ralentissement de la fibrillogenèse du collagène a déjà été décrit par Delorenzi *et al.* au cours d'une étude où le collagène avait été incubé en présence de différents ions monovalents dont SCN⁻ [Delorenzi *et al.*, 1996]. Il est difficile de déterminer, dans notre cas, s'il s'agit d'un retard de fibrillogenèse ou un réel défaut d'arrangement des molécules les unes par rapport aux autres. Cependant, l'étude morphologique tend à démontrer que la formation des gels de collagène carbamylé, totalement désorganisés, est caractérisée par un arrangement anarchique des fibres plutôt que par un simple retard de fibrillogenèse. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse avancée plus haut, puisque les modifications de la triple hélice et la perte d'hélicité peuvent être considérées comme l'élément perturbateur de l'arrangement des molécules de collagènes les unes par rapport aux autres. Ce défaut de fibrillogenèse peut avoir d'importantes conséquences *in vivo*, puisque la présence de collagène carbamylé pourrait perturber l'addition et l'intégration de molécules de collagène néosynthétisées aux réseaux préexistants, engendrant une désorganisation générale de

l'architecture du tissu concerné. Ce phénomène pourrait être amplifié par la plus grande sensibilité du collagène carbamylé à la température, et se répercuter *in vivo* sur les propriétés mécaniques des tissus.

Etant donné que des défauts de fibrillogenèse sont généralement associés à une diminution du diamètre des fibres [Delorenzi *et al.*, 1996 ; Torre-Blanco *et al.*, 1992], nous avons analysé l'aspect du réseau de fibres formé par les différents types de collagène en microscopie électronique à balayage. Pour des raisons techniques et à cause de la faible résistance des gels de collagène carbamylé à la manipulation, cette observation a été effectuée directement sur le collagène lyophilisé. Toutefois, cette observation a montré que le diamètre des fibres formées par le collagène diminuait au fur et à mesure de l'augmentation du taux de carbamylation. Le réseau formé est certes plus dense, mais constitué de fibres qui apparaissent beaucoup plus fines et fragiles. Il est envisageable que ce phénomène soit accentué dans des conditions réelles de fibrillogenèse, qui favorisent l'agencement des molécules de collagène et la formation des fibres.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les changements conformationnels de la triple hélice de collagène induits par la carbamylation, perturbent l'agencement des molécules de collagène les unes par rapport aux autres en raison d'une augmentation de l'encombrement stérique, ce qui conduit à une baisse du diamètre des fibres et à une incapacité à former un gel de collagène correctement organisé et suffisamment résistant.

Récapitulatif de l'analyse des propriétés structurales du collagène carbamylé :

Les différentes techniques utilisées pour déterminer l'impact de la carbamylation sur les propriétés structurales du collagène de type I ont fourni un ensemble d'informations complémentaires. Le regroupement de toutes ces informations nous a permis d'imaginer les conséquences de la carbamylation du collagène à plusieurs niveaux : au niveau de la chaîne α , au niveau de la triple hélice puis lors de l'assemblage des molécules de collagène en fibres. (figure 69).

Ainsi, lorsque le collagène est carbamylé, la première structure à être affectée est la chaîne α . En effet, la modification de quelques charges de l'hélice de type polyproline suffit à modifier légèrement son équilibre, même si elle reste globalement sous cette conformation (DC). Cependant, les informations spectrales (Raman et IR-TF) ont montré des tensions au sein du squelette protéique qui peuvent se traduire par un changement conformationnel et engendrer, par

exemple, un encombrement stérique différent, ce qui expliquerait le retard de migration électrophorétique.

Ces changements conformationnels constatés au sein des chaînes α se répercutent directement sur la structure en triple hélice, qui peut perdre par endroits ses propriétés caractéristiques d'hélicité (Polarimétrie). Des données bibliographiques permettent de confirmer la déstabilisation de la triple hélice après carbamylation. Persikov *et al.* ont démontré que les résidus de lysine participaient largement à la stabilité de la triple hélice par le biais d'interactions électrostatiques avec d'autres résidus chargés environnants [Persikov *et al.*, 2005]. La carbamylation du groupement $\varepsilon\text{-NH}_2$, qui engendre une modification de sa charge, perturberait ainsi la mise en place de ces interactions électrostatiques, entraînant la fragilisation de la triple hélice.

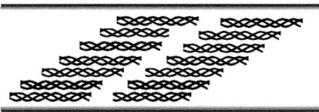
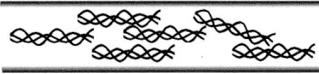
Collagène témoin	Collagène carbamylé	Conséquences de la carbamylation
A. Structure de la chaîne α		
		<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Augmentation de l'encombrement stérique ⇒ Retard de migration électrophorétique ⇒ Modification des modes de vibration des liaisons (C-C et cycles Pro/Hyp) en spectroscopie Raman et IR-TF ⇒ Conservation de la structure en hélice polyproline (DC)
B. Structure de la triple hélice de collagène		
		<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Diminution du taux d'hélicité (polarimétrie) ⇒ Modification des modes de vibration des liaisons (C-C et cycles Pro/Hyp) en spectroscopie Raman et IR-TF
C. Structure des fibres de collagène		
		<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Défaut de fibrillogenèse ⇒ Diminution du diamètre des fibres ⇒ Perte des propriétés mécaniques des gels de collagène

Figure 69. Schéma explicatif de l'impact de la carbamylation sur les propriétés structurales du collagène de type I.

Sur cette figure sont regroupées toutes les informations obtenues dans les différentes expériences, qui ont permis d'expliquer les changements structuraux du collagène induits par la carbamylation, au niveau de la structure des chaînes α , de la triple hélice et des fibres de collagène.

Enfin, lors de l'arrangement tridimensionnel en fibres, les défauts structuraux de la triple hélice se traduisent par une association plus précoce mais anarchique des molécules de collagène entre elles, les empêchant de former des fibres correctes (MEB et expériences de fibrillogenèse).

En conclusion, la carbamylation, qui n'affecte finalement que quelques groupements ϵ -NH₂ (1,1 % du nombre total d'AA), contrairement à la glycation qui aboutit notamment à la formation de liaisons croisées, n'entraîne pas de dénaturation du collagène, qui conserve globalement sa structure en triple hélice, mais génère néanmoins des modifications conformationnelles « locales » de la protéine. Ces changements structuraux modérés sont cependant associés à de lourdes répercussions sur les propriétés physico-chimiques du collagène de type I et sur sa capacité à former des fibrilles. *In vivo*, ces anomalies peuvent induire une désorganisation significative de la matrice extracellulaire et altérer son renouvellement au sein de différents tissus.

Sensibilité du collagène carbamylé à la protéolyse enzymatique

La structure en triple hélice du collagène est un élément déterminant pour sa dégradation spécifique par les collagénases [Fields, 1995]. Les modifications conformationnelles induites par la carbamylation peuvent donc interférer sur les processus de dégradation. Une modification de la dégradation, qu'elle soit favorisée ou inhibée, peut avoir d'importantes conséquences *in vivo* en altérant le remodelage du collagène au sein des tissus, et en conduisant à différentes manifestations pathologiques, comme par exemple la fibrose. Ce type de conséquence a été bien décrit pour une autre modification post-traductionnelle, la glycation, qui entraîne une plus grande résistance du collagène glyqué à la dégradation enzymatique et son accumulation dans les tissus, perturbant ainsi leur organisation architecturale [DeGroot *et al.*, 2001 ; Rittié *et al.*, 1999 ; van der Slot-Verhoeven *et al.*, 2005]. Notre objectif a donc été de déterminer la sensibilité du collagène carbamylé à deux grandes catégories de protéinases : les gélatinases et les collagénases, pour extrapoler au renouvellement de ce collagène modifié au sein de la matrice extracellulaire. Pour cela, nous avons mis au point plusieurs tests de dégradation pour évaluer, qualitativement et quantitativement, la résistance du collagène carbamylé à ces différentes protéinases.

Avant de commenter les résultats, il est important de préciser que d'une manière générale, il est difficile de comparer les activités protéolytiques des différentes enzymes car

celles-ci présentent de grosses différences d'activité spécifique. Nous nous contenterons donc de comparer uniquement les collagènes témoin et carbamylé pour une enzyme et un test donnés.

Nous avons montré, dans un premier temps, que le collagène carbamylé était plus résistant à la dégradation par les collagénases, que ce soit la collagénase bactérienne ou les MMP-1, MMP-8 et MMP-13. Pour tenter d'expliquer cette plus grande résistance, plusieurs hypothèses sont envisageables. Tout d'abord, l'inhibition du clivage du collagène carbamylé par l'enzyme pourrait s'expliquer par la carbamylation d'un résidu de lysine situé à proximité du site habituel de coupure du collagène en fragments $\frac{3}{4}$ - $\frac{1}{4}$ (dans le cas des MMP). En effet, la chaîne latérale des résidus de lysine peut avoir une importance toute particulière dans l'interaction enzyme-substrat. Une étude réalisée en 1979 par Luo *et al.*, a montré la contribution des groupements ϵ -NH₂ des résidus de lysine comme points d'ancrage pour la fixation non covalente d'enzymes au collagène, notamment en procédant à la carbamylation de ce groupement [Luo *et al.*, 1979].

Par ailleurs, le clivage de la chaîne α_1 par la collagénase entre les résidus de glycine et d'isoleucine, respectivement en position 953 et 954, est dépendant des AA environnants occupants les différentes positions dénommées sites « P₁ à P₄ » (en amont) et « P₁' à P₈' » (en aval). Chaque AA a un rôle très précis dans l'interaction avec l'enzyme et toute mutation peut modifier la sensibilité du collagène à la collagénase [Hasty *et al.*, 1993 ; Krane et Jaenisch, 1992]. Même si aucune lysine n'a été répertoriée parmi les AA occupant ces sites, d'autres régions de la protéine, contenant des résidus de lysine, pourraient intervenir dans cette interaction. Toutefois, cette hypothèse, faisant de la chaîne latérale de lysine un site accepteur pour l'enzyme, ne permet pas d'expliquer les résultats obtenus avec la collagénase bactérienne, qui clive le collagène en petits fragments. En effet, l'action de la collagénase bactérienne s'exerce en de nombreux sites de la protéine, contrairement à des collagénases plus physiologiques, comme la MMP-1, qui commencent à dégrader le collagène toujours par le même site (après la glycine⁹⁵³).

Une approche légèrement différente, qui prend en compte la structure en triple hélice du collagène, peut être envisagée pour expliquer les variations de sensibilité aux collagénases. En effet, le mécanisme de dégradation du collagène par les collagénases est de mieux en mieux connu (surtout pour la MMP-1) et fait état d'une première étape de déroulement de la triple hélice avant le clivage proprement dit. La collagénase procède, par le biais d'une activité hélicase, à la déstabilisation et à l'orientation de la molécule de collagène pour favoriser son

clivage [Chung *et al.*, 2004 ; Lauer-Fields *et al.*, 2002]. Par conséquent, l'intégrité structurale de la triple hélice est indispensable à l'interaction avec l'enzyme et au bon déroulement du processus de dégradation. Plusieurs travaux ont mis en évidence le lien entre la structure de la triple et l'efficacité de la dégradation, comme par exemple ceux de Minond *et al.* qui ont montré que la capacité des MMP à dégrader des peptides en triple hélice était dépendante de leur stabilité [Minond *et al.*, 2004]. Autrement dit, les AA constituant la séquence consensus du site de clivage du collagène par les collagénases adoptent une structure en triple hélice qui va déterminer l'affinité de l'enzyme pour son substrat et constituer le point déterminant du processus de dégradation du collagène.

En 2003, Stultz et Edelman ont mis au point un modèle structural pour expliquer les effets de l'hyperglycémie sur la collagénolyse et, parallèlement, montrer l'importance de la conformation de la protéine dans ce processus [Stultz et Edelman, 2003]. Dans cette étude, les auteurs montrent que la glycation du collagène (sans formation de liaisons croisées) entraîne le passage du collagène d'une conformation native à une conformation dite « vulnérable », dans laquelle la triple hélice s'éloigne de sa conformation d'origine. Ce changement conformationnel n'affecte que quelques régions de la protéine mais suffirait à altérer sa résistance à la dégradation par les collagénases. Si l'on effectue le parallèle avec la carbamylation, on se rend compte que, dans les deux cas, on observe une perte de l'hélicité du collagène en certains endroits de la molécule, qui pourrait donc être la cause principale de la résistance du collagène carbamylé aux collagénases. En effet, l'altération de la triple hélice peut perturber l'interaction avec le domaine de la collagénase chargé de dérouler la triple hélice avant son clivage (activité hélicase), si bien que la dégradation du collagène par l'enzyme devient moins efficace en raison d'une baisse d'affinité de l'enzyme pour son substrat (figure 70A).

Nous avons montré dans la première partie des résultats, que le collagène carbamylé n'est pas dénaturé. Cependant, il était légitime de se poser la question est de savoir si ce collagène était ou non plus sensible aux gélatinases en raison de ses modifications structurales, qui l'éloignent, en terme d'affinité, de la condition de substrat préférentiel des collagénases. Nous avons donc déterminé la résistance du collagène carbamylé aux gélatinases, MMP-2 et MMP-9, et montré sa plus grande sensibilité à leur action, par rapport au collagène témoin.

Lors des expériences de dégradation du collagène par les gélatinases, nous observons une activité collagénolytique pour la MMP-2 et la MMP-9, alors que les données de la littérature indiquent que seule la MMP-2 est capable de dégrader le collagène de type I [Nagase et Fields, 1996]. On peut supposer que le collagène subit une légère dénaturation au cours des différents

traitements expérimentaux (incorporation au gel de zymographie et marquage au ^3H), ce qui expliquerait le signal de dégradation obtenu avec la MMP-9. Toutefois, cet inconvénient a pu être minimisé en n'interprétant les résultats que sur la base de la comparaison entre collagènes témoin et carbamylé.

La plus grande sensibilité du collagène carbamylé à la dégradation par les gélatinases s'explique probablement par une meilleure accessibilité à l'enzyme, contrairement au collagène témoin, qui n'est pas le substrat spécifique (figure 70B).

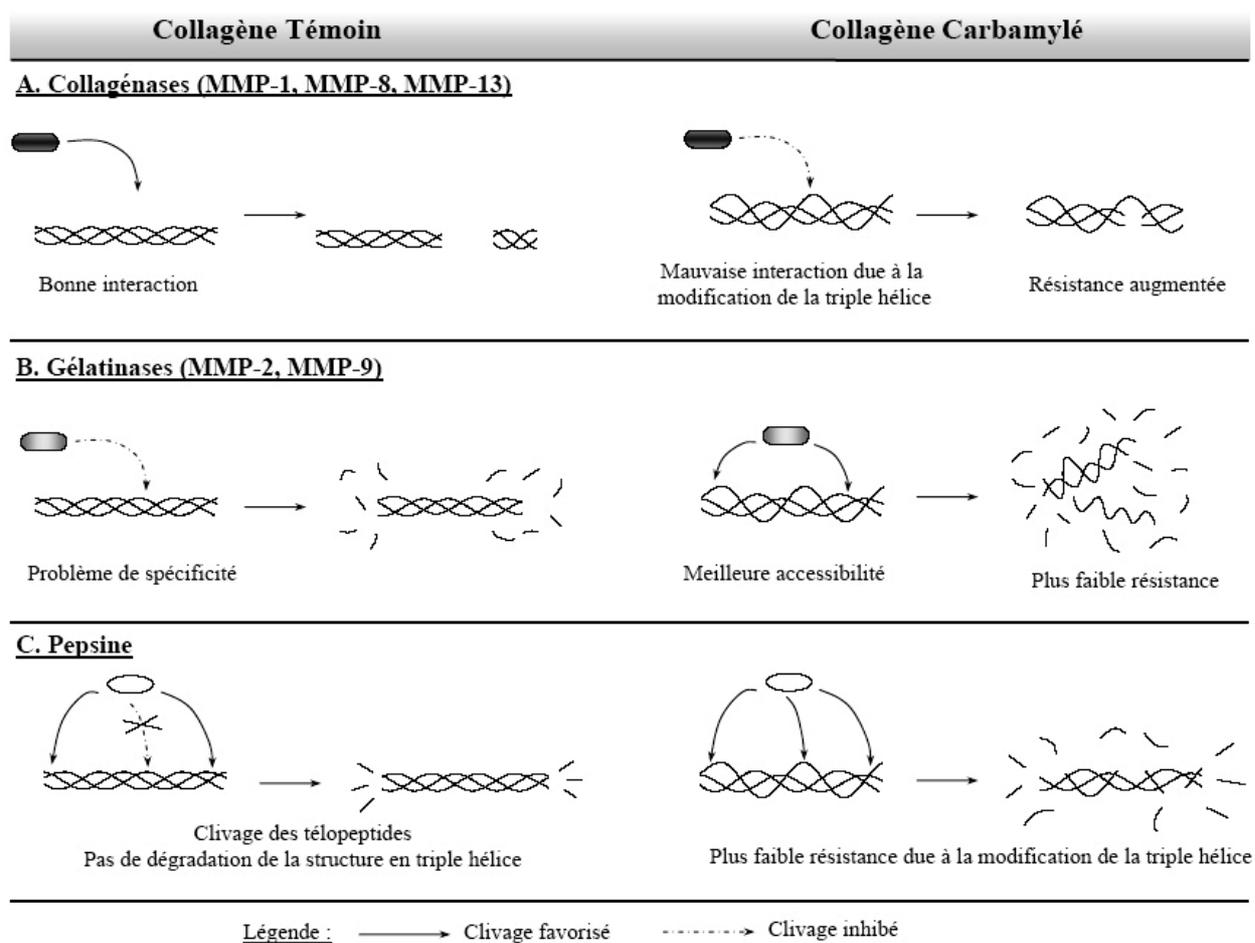


Figure 70. Schéma explicatif de l'impact de la carbamylation sur la sensibilité du collagène à la dégradation enzymatique.

Cette figure représente la dégradation des collagène témoin et carbamylé par trois catégories d'enzymes : les collagénases (A), les gélatinases (B) et la pepsine (C).

La structure en triple hélice du collagène lui permet également d'être résistant, dans certaines conditions, aux protéinases non spécifiques telles que la pepsine. Nos résultats expérimentaux ont montré une augmentation de la sensibilité à la pepsine après 24 heures de carbamylation du collagène, conditions dans lesquelles des modifications des propriétés

d'hélicité du collagène sont mesurables. Ainsi, la modification de la structure de la triple hélice rend le collagène plus sensible à l'activité protéolytique de la pepsine à certains endroits, ce qui explique la diminution de sa résistance à cette enzyme (figure 70C).

Ces résultats nous ont permis de confirmer le rôle majeur de la structure en triple hélice dans le processus de dégradation enzymatique du collagène. Leur interprétation nous a amené à émettre l'hypothèse selon laquelle les modifications liées à la carbamylation, même d'intensité modérée, engendrent d'importantes conséquences sur l'affinité des enzymes (comme les collagénases ou les gélatinases) pour ce collagène, qui sont à l'origine des différences de sensibilité observées. *In vivo*, ce phénomène peut avoir un retentissement néfaste pour les tissus. En effet, la plus grande sensibilité du collagène aux gélatinases, après carbamylation, peut accélérer sa dégradation et bouleverser l'équilibre de son renouvellement au sein de la matrice extracellulaire, conduisant à une désorganisation architecturale du tissu. D'un point de vue clinique, ce phénomène peut par exemple se traduire par l'installation d'un état fibrotique résultant d'une augmentation de l'activité de synthèse des composés matriciels.

Influence de la carbamylation sur les interactions entre collagène et PNN

La matrice extracellulaire ne représente pas un simple support pour l'adhésion des cellules, mais est également capable de réguler de multiples fonctions cellulaires, et par ce biais jouer un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques [Juliano et Haskill, 1993]. Les activités cellulaires sont donc dépendantes des interactions avec les différents constituants matriciels, si bien que toute modification de ces derniers peut entraîner l'altération des fonctions des cellules environnantes. Ce phénomène a déjà été largement décrit dans le cas de la glycation du collagène [Krishnamurti *et al.*, 1997 ; Monboisse *et al.*, 2000].

Notre équipe de recherche est spécialisée de l'étude de ce type d'interaction dans un contexte physiologique dit « normal » et dans certains contextes pathologiques au cours desquels les protéines matricielles sont modifiées [Lefevre *et al.*, 2002 ; Rittié *et al.*, 2002]. Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont permis de montrer que le collagène de type I est capable de réguler les fonctions d'adhésion et d'activation des PNN [Monboisse *et al.*, 1990]. Parmi les complications caractéristiques de l'IRC, les processus infectieux et inflammatoires participent aux causes majeures de morbidité et de mortalité des patients urémiques. Ce phénomène est incontestablement lié à une dysrégulation, d'origine multifactorielle, des fonctions des cellules

phagocytaires, et notamment des PNN. Le but de cette dernière partie a donc été d'étudier l'influence de la carbamylation du collagène sur ses interactions avec les PNN, pour ensuite discuter de sa participation éventuelle *in vivo* à l'apparition des complications infectieuses et inflammatoires de l'IRC.

Les expériences ont été réalisées sur des PNN isolés de sang total provenant des donneurs différents. Si ces conditions entraînent une hétérogénéité importante des propriétés d'adhésion et d'activation des PNN entre les manipulations, elles permettent de généraliser les conclusions. Cependant, il est très difficile de pouvoir comparer les différentes expériences entre elles.

Effet du collagène carbamylé sur l'adhésion et l'activation des PNN :

Nous avons d'abord déterminé l'influence de la carbamylation du collagène sur l'adhésion, étape initiale de l'interaction entre PNN et collagène de type I, sans mettre en évidence de modification significative en présence de collagène carbamylé, et ce quel que soit le degré de carbamylation.

En revanche, la capacité du collagène carbamylé à activer les PNN est diminuée de manière significative, de façon dépendante du taux de carbamylation. Deux tests différents ont été utilisés dans ces expériences. Le test au NBT est utilisé classiquement pour sa simplicité, et parce qu'il permet de suivre, durant toute l'incubation, la production de RLO, par l'accumulation de formazan. Cependant, cette technique est relativement peu sensible mais surtout très peu spécifique des RLO produits. Nous avons donc confirmé les résultats à l'aide d'une technique beaucoup plus sensible et plus spécifique, la détection de la libération de RLO par le luminol, qui rend compte de la production extra- et intracellulaire d' O_2^- par les PNN [Dahlgren et Karlsson, 1999]. Ce test permet de mettre en évidence la libération de RLO après un temps relativement court (d'environ 10 min) suivant le contact des PNN avec le collagène. L'activation des PNN a également été illustrée par l'observation en MEB de leur aspect morphologique. Sur collagène témoin, les PNN présentent une surface membranaire déformée, avec de nombreuses invaginations, témoignant notamment de la dégranulation et de la libération de RLO. Cette activité est fortement inhibée quand les PNN sont en contact avec le collagène carbamylé, présentant alors une morphologie régulière sans déformations membranaires.

Pour établir une corrélation avec la carbamylation *in vivo*, où l'agent de carbamylation est l'urée, nous avons reproduit l'expérience concernant l'activation des PNN avec du collagène

carbamylé par de l'urée. Nous avons confirmé ainsi l'effet inhibiteur du collagène carbamylé car l'inhibition subsiste, quelle que soit la durée d'incubation du collagène avec l'urée. Cependant, dans ces expériences, l'inhibition n'est pas directement proportionnelle au taux de carbamylation, comme dans le cas de la carbamylation par le KCNO. On note aussi que le potentiel activateur du collagène témoin diminue après incubation à 37°C dans un tampon phosphate pendant de longues périodes. On peut supposer que le collagène subit une certaine dégradation durant l'incubation qui diminue sa faculté à activer les PNN. Cette expérience complémentaire nous a cependant permis d'établir que le collagène carbamylé inhibait l'activation des PNN, quel que soit l'agent de carbamylation (KCNO ou urée).

Avant de tenter d'expliquer cet effet biologique, nous avons éliminé différentes causes de modifications de l'activation des PNN, indépendantes de leur interaction avec le collagène. Ainsi, nous avons vérifié que les différentes préparations de collagène ne contenaient pas d'endotoxines bactériennes. Nous avons également vérifié que le collagène carbamylé n'exerçait pas d'effet toxique sur les PNN. Enfin, comme les espèces réactives de l'oxygène sont capables d'interagir avec les protéines [Nguyen *et al.*, 2005], et que l'effet biologique aurait pu être expliqué par une augmentation de l'affinité des RLO pour le collagène carbamylé, nous avons mesuré l'effet « scavenger » direct du collagène sur la production de RLO par un système acellulaire, et montré que le collagène carbamylé en était dépourvu.

Mécanisme responsable des effets biologiques du collagène carbamylé :

Ces diverses vérifications effectuées, plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer la différence d'effet du collagène carbamylé sur l'adhésion et l'activation des PNN. L'adhésion fait intervenir des séquences spécifiques RGD, présentes en nombre important sur les chaînes α du collagène [Di Lullo *et al.*, 2002], qui représentent donc de multiples possibilités de fixation pour les PNN. La carbamylation de quelques uns de ces sites n'est probablement pas suffisante pour entraîner une différence d'adhésion. La technique utilisée peut aussi ne pas être assez sensible pour la mise en évidence de si faibles modifications. Une autre possibilité est que le tripeptide RGD ne nécessite pas une conformation aussi stricte qu'une séquence plus longue comme la séquence activatrice des PNN (DGGRYY) pour exercer son action.

Le problème de l'activation est différent puisqu'il n'existe, au sein de la chaîne $\alpha_1(I)$, qu'une seule séquence DGGRYY, impliquée dans l'activation des PNN [Monboisse *et al.*, 1990]. Cette séquence constitue sans doute une zone plus sensible sur le plan conformationnel

que la séquence RGD, et sa présence en un seul exemplaire explique que toute modification de celle-ci peut avoir une répercussion directe sur l'activation des PNN. Un raisonnement identique peut s'appliquer au fait que l'inhibition d'activation des PNN est dépendante du degré de carbamylation. Plus celui-ci est important, plus la probabilité de modifier le collagène à proximité de la séquence DGGRYY est élevée. Cependant, les conditions utilisées pour réaliser les expériences d'activation ne nous permettaient pas de savoir si l'effet était dû à une modification conformationnelle de cette séquence ou à la carbamylation d'un résidu de lysine précis impliqué dans l'interaction avec les PNN.

Pour répondre à cette question, la première étape était de déterminer si le CB-peptide contenant la séquence DGGRYY, c'est-à-dire α_1 CB6, était non seulement carbamylé, mais surtout prioritairement par rapport aux autres CB-peptides. Les résultats de l'électrophorèse bidimensionnelle ont permis de démontrer que ce peptide était une cible préférentielle de carbamylation. L'étape suivante de notre travail a consisté à établir une corrélation entre la carbamylation de ce peptide et l'effet biologique observé.

Dans ce but, nous avons utilisé une technique mise au point au laboratoire, permettant d'évaluer l'activité des CB-peptides séparés par électrophorèse, sur les fonctions des PNN [Garnotel *et al.*, 1993]. Comme nous l'avons mentionné plus haut, les séquences RGD sont réparties sur toute la longueur de la molécule de collagène, ce qui explique que les PNN puissent adhérer à tous les CB-peptides indifféremment, et qu'aucune différence ne soit visible après carbamylation du collagène. En revanche, nous avons montré que seul α_1 CB6 était capable d'activer les PNN. L'effet est inhibé après carbamylation de α_1 CB6, de manière dépendante du taux de carbamylation. Ces résultats nous permettent d'affirmer que la carbamylation du peptide α_1 CB6 est en partie responsable de l'inhibition de la production de RLO par les PNN. Cette inhibition pourrait s'expliquer par un changement conformationnel de la séquence d'activation, empêchant son interaction avec les récepteurs des PNN. Cette modification conformationnelle pourrait intervenir suite à la carbamylation d'un résidu de lysine à proximité de la séquence DGGRYY, ou comme répercussion de la perte de l'hélicité dans certaines régions de la molécule de collagène proches du télépeptide (qui n'est pas sous forme triple hélicoïdale). Cependant, cette hypothèse est peu envisageable dans notre cas, puisque, dans cette technique, les peptides ont en partie perdu leur conformation d'origine lors de l'électrophorèse. Par conséquent, la conformation structurale de la séquence DGGRYY joue un rôle mineur dans le processus d'activation des PNN. Si l'explication ne fait pas appel à des caractéristiques structurales, la

carbamylation d'un résidu de lysine situé à un site important pour l'interaction avec le récepteur pourrait constituer le facteur essentiel du mécanisme d'inhibition de l'activation des PNN par le collagène carbamylé.

Détermination du taux minimal de carbamylation de α_1 CB6 pour obtenir l'effet biologique :

Pour déterminer le nombre de résidus de lysine carbamylés entraînant des propriétés d'inhibition de l'activation des PNN, nous avons testé individuellement des peptides α_1 CB6 possédant un taux de carbamylation équivalent après séparation par IEF. Dans les expériences précédentes, nous avons utilisé un mélange de peptides α_1 CB6 avec un taux de carbamylation hétérogène. Les résultats du test d'activation ont montré que, seuls les deux spots du peptide α_1 CB6 du collagène témoin étaient capables d'activer les PNN. En revanche, dans le cas du peptide α_1 CB6 du collagène carbamylé 6h, un seul spot parmi les cinq isolés était capable d'activer les PNN. Ce spot possède un pHi équivalent à celui d'un des peptides du collagène témoin. Ces résultats montrent que l'inhibition est quasi totale dès un niveau minime de carbamylation. L'hypothèse a été confirmée par l'incapacité des différents peptides α_1 CB6 issus du collagène carbamylé 24h à activer les PNN. En d'autres termes, ces expériences ont permis de montrer que l'inhibition de l'activation des PNN par le collagène obéit à la loi du tout ou rien. En effet, un seul résidu de lysine semble être important pour l'activation, puisque la perte du potentiel activateur du peptide est totale suite à la carbamylation de ce résidu. De plus, il semble que celui-ci soit parmi les premiers résidus d' α_1 CB6 à être carbamylés, puisque l'inhibition intervient après la carbamylation d'une seule lysine.

Implication d'un résidu de lysine dans l'activation des PNN par le collagène :

Dans une dernière série d'expériences, nous avons utilisé une autre approche, pour confirmer l'implication d'un résidu de lysine dans le processus d'activation des PNN par le collagène de type I, en déterminant l'effet compétiteur de l'acide 6-aminohexanoïque (AHA) sur cette interaction. L'AHA est un analogue de lysine, non métabolisable par la cellule, qui entre en compétition avec les résidus de lysine. Ce composé entraîne une inhibition significative de l'activation des PNN par le collagène de type I, pour une concentration de 12,5 mM, alors que les concentrations habituellement décrites dans la littérature sont de l'ordre de 200 mM, comme dans le cas de l'inhibition des sites de liaison aux lysines de l'apolipoprotéine A [Hoover-Plow *et al.*, 1996]. En revanche, l'AHA n'a aucun effet sur l'adhésion des PNN au collagène et n'altère pas la viabilité cellulaire, même à la concentration de 200 mM. Ces résultats, qui montrent de

façon indirecte, l'importance d'un ou plusieurs résidus de lysine pour l'activation des PNN par le collagène de type I, élimine l'hypothèse faisant de la modification structurale de la triple hélice le point central de l'inhibition de l'activation des PNN par le collagène carbamylé. Ces expériences ont en effet été réalisées en présence de collagène témoin ayant conservé sa structure en triple hélice intacte.

La suite de notre travail était destinée à l'identification du ou des résidus de lysine du collagène intervenant dans l'activation des PNN. Dans cette optique, nous avons recherché, dans des bases de données, la présence de résidus de lysine, au sein de la séquence primaire de la chaîne α_1 du collagène, à proximité de la séquence DGGRYY. Un résidu de lysine (en position 1208), situé trois résidus en amont de la séquence DGGRYY, est très conservé parmi les différentes espèces. Compte tenu de ces données, notre objectif a été de produire un peptide recombinant α_1 CB6, muté pour ce résidu. L'utilisation de peptides synthétiques était inenvisageable, car ces peptides peuvent uniquement exercer un effet compétiteur en présence de collagène et n'ont pas d'effet propre : il est nécessaire que l'ensemble de α_1 CB6 interagisse avec le PNN pour obtenir l'activation [Monboisse *et al.*, 1990]. Nous avons choisi de remplacer le résidu de lysine par un résidu de glycine pour déterminer le rôle de la chaîne latérale de ce résidu, qui peut être essentielle à l'interaction avec le récepteur par son encombrement stérique ou par la charge de son groupement ε -NH₂. La mutation idéale aurait été le remplacement par un résidu d'homocitrulline, mais cet AA, formé par une réaction post-traductionnelle, ne fait bien entendu pas partie des AA incorporés lors de la synthèse protéique.

Après avoir mis au point la production des peptides recombinants par l'intermédiaire de la synthèse d'une protéine de fusion GST, nous avons testé leur capacité à activer les PNN. Le peptide recombinant α_1 CB6 non muté est capable d'activer les PNN, avec cependant une intensité plus faible que pour le collagène de type I entier. Comme la séquence activatrice se situe à l'extrémité C-terminale du peptide, cette différence peut s'expliquer par la dégradation partielle du peptide au cours de sa purification. Toutefois, la mutation entraîne une inhibition significative, de l'ordre de 50 %, de l'activation des PNN. Ces résultats démontrent que ce résidu de lysine, même s'il n'est pas indispensable, est essentiel au processus d'activation des PNN par le collagène. Cependant, cette expérience ne permet pas de savoir si l'inhibition obtenue est due réellement à la perte de la lysine ou plutôt à une modification conformationnelle de la structure de la séquence DGGRYY, provoquée par l'absence de la chaîne latérale du résidu de lysine.

En conclusion, notre travail a permis de montrer que la carbamylation du collagène n'entraîne pas sa dénaturation, mais est responsable de l'apparition de modifications conformationnelles locales caractérisées par la perte de la structure en triple hélice. Ces modifications sont associées à un défaut d'association des molécules de collagène, aboutissant à la formation de fibres plus fines et moins résistantes que dans le cas du collagène témoin. Ces changements structuraux sont également à l'origine de différences de sensibilité du collagène carbamylé à la digestion enzymatique, et plus précisément une plus grande résistance aux collagénases et une plus grande sensibilité aux gélatinases et à la pepsine. La dernière partie de notre travail, destinée à étudier les interactions collagène-PNN, a mis en évidence l'inhibition de la capacité du collagène à activer les PNN. La recherche du mécanisme responsable de cette inhibition nous a permis de démontrer l'implication d'un résidu de lysine dans le processus d'activation des PNN par le collagène.

Chapitre V

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

La majorité des études réalisées *in vitro*, ayant pour but de caractériser la structure ou les fonctions d'une protéine, ne tiennent généralement pas compte de l'état de cette protéine *in vivo* et accordent en particulier peu d'importance à son évolution au cours de sa vie biologique. Pourtant, de nombreux processus peuvent participer au « vieillissement » des protéines *in vivo*, comme les modifications post-traductionnelles tardives, caractérisées par la fixation de métabolites simples sur les groupements réactifs des protéines. L'objectif de notre travail était de déterminer l'influence de la carbamylation, réaction physiologique amplifiée au cours de l'IRC, sur les propriétés structurales et fonctionnelles de la protéine la plus abondante de l'organisme humain, le collagène de type I, connu pour sa capacité à réguler les fonctions cellulaires.

Bien que la carbamylation n'aboutisse pas à la formation de liaisons croisées et ne concerne qu'au maximum 1 % des résidus du collagène (dans nos conditions expérimentales), nous avons montré une altération de la structure typique en triple hélice après carbamylation. Cette altération est associée à des modifications des propriétés physico-chimiques du collagène, qui se manifestent par une baisse de sa température de fusion et la perte progressive de sa capacité à s'assembler sous forme de fibres. Ces troubles s'accompagnent d'une différence de sensibilité du collagène à la protéolyse enzymatique. En effet, le collagène carbamylé est plus résistant que le collagène témoin aux collagénases, mais plus sensible aux gélatinases et à la pepsine. *In vivo*, ces propriétés peuvent entraîner des troubles du renouvellement équilibré du collagène au sein des tissus et générer progressivement des situations pathologiques.

Pour déterminer l'implication de la carbamylation dans l'apparition des troubles infectieux et inflammatoires au cours de l'IRC, nous avons étudié les interactions entre collagène carbamylé et PNN. Ces expériences nous ont permis de montrer que la carbamylation altérait l'activation des PNN par le collagène de type I. La recherche du mécanisme impliqué dans ce processus a révélé l'importance d'un résidu de lysine (en position 1208) du collagène, potentiellement carbamylable, dans le processus d'activation des PNN. Ces résultats suggèrent que la carbamylation du collagène peut contribuer à la dysrégulation des processus infectieux et inflammatoires observés au cours de l'IRC.

Pour compléter ces informations, plusieurs perspectives de travail sont envisageables. En ce qui concerne l'analyse structurale du collagène carbamylé, il serait intéressant de simuler, par modélisation moléculaire, l'effet de la carbamylation de quelques résidus de lysine sur la structure en triple hélice du collagène, ce qui permettrait de valider l'hypothèse émise suite à

l'interprétation des résultats expérimentaux. Ensuite, en ce qui concerne l'étude de la dégradation du collagène par différentes protéinases, l'étude de l'interaction (ou plus particulièrement de l'adhésion) entre les MMP et le collagène carbamylé apporterait de nouveaux éclaircissements sur le mécanisme impliqué et pourrait conforter le rôle de la triple hélice dans le processus de dégradation du collagène.

En ce qui concerne l'étude de l'interaction entre collagène carbamylé et PNN, plusieurs expériences complémentaires sont à envisager, comme la localisation précise des résidus d'homocitrulline sur le collagène carbamylé ou encore la modélisation du peptide α_1 CB6 muté pour évaluer l'effet de la mutation (et également de la carbamylation) sur la conformation de la séquence activatrice des PNN. Par ailleurs, l'essentiel de notre travail a été orienté vers la caractérisation des événements structuraux du collagène carbamylé impliqués dans l'inhibition de l'activation des PNN, mais peu d'expériences ont été réalisées pour mieux définir le comportement des PNN après un contact avec le collagène carbamylé. Dans cette optique, d'autres fonctions des PNN pourraient être explorées, comme la capacité de phagocytose ou le chimiotactisme. Parallèlement, il serait intéressant de procéder à l'analyse des voies de signalisation impliquées dans l'activation des PNN, à commencer par la vérification de l'implication de l'intégrine LFA-1 (CD11a/CD18) dans l'interaction avec le collagène carbamylé, pour suivre, par la suite, différents événements intracellulaires comme la phosphorylation de p¹²⁵FAK et de la PKC ou l'activation des sous-unités cytoplasmiques de la NADPH-oxydase.

Tous ces points permettraient de mieux définir l'impact de la carbamylation du collagène sur la régulation des fonctions des PNN pour établir précisément, d'un point de vue physiopathologique, un lien avec les complications de L'IRC, dans l'optique du développement d'éventuelles stratégies thérapeutiques. D'autre part, la valorisation de notre travail expérimental nécessite une meilleure caractérisation de la carbamylation des protéines matricielles *in vivo*. En effet, même si de nombreux éléments permettent d'envisager sérieusement l'existence de collagène carbamylé, à un moment donné, au sein des tissus, nous ne disposons à l'heure actuelle d'aucune méthode de dosage suffisamment sensible et spécifique pour le démontrer. Notre priorité est donc de développer une technique, en s'appuyant sur des moyens plus modernes tels que la spectroscopie IR-TF, pour mettre en évidence la carbamylation des protéines tissulaires *in vivo* dans des modèles animaux d'insuffisance rénale chronique, dans un premier temps, et ensuite chez l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A, B.

ABDULHUSSEIN R, MCFADDEN C, FUENTES-PRIOR P, VOGEL WF.

Exploring the collagen-binding site of the DDR1 Tyrosine kinase receptor.

J Biol Chem 2004 ; 279 : 31462-31470

AMEYE L, YOUNG MF.

Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases.

Glycobiology 2002 ; 12 : 107-116

BABIOR BM.

Phagocytes and oxidative stress.

Am J Med 2000 ; 109 : 33-44

BABIOR BM, KIPNES RS, CURNUTTE JT.

Biological defense mechanisms: the production by leucocytes of superoxide, a potential bactericidal agent.

J Clin Invest 1973 ; 52 : 741-744

BABIOR BM, LAMBERT JD, NAUSEEF W.

The neutrophil NADPH oxidase.

Arch Biochem Biophys 2002 ; 397 : 342-344

BADII F, HOWELL, NK.

Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry.

J Agric Food Chem 2003 ; 51 : 1440-1446

BALION CM, DRAISEY TF, THIBERT RJ.

Carbamylated hemoglobin and carbamylated plasma protein in hemodialyzed patients.

Kidney Int 1998 ; 53 : 488-495

BATEMAN JF, CHAN D, MASCARA T, ROGERS JG, COLE WG.

Collagen defects in lethal perinatal osteogenesis imperfecta.

Biochem J 1986 ; 240 : 699-708

BATEMAN JF, MASCARA T, CHAN D, COLE WG.

Abnormal type I collagen metabolism by cultured fibroblasts in lethal perinatal osteogenesis imperfecta.

Biochem J 1984 ; 217 : 103-115

BELL E, IVARSSON B, MERRILL C.

Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*.

Proc Natl Acad Sci USA 1979 ; 76 : 1274-1278

BERMAN SJ.

Infections in patients with end-stage renal disease. An overview.

Infect Dis Clin North Am 2001 ; 15 : 709-720

BERLYNE GM, ARI JB, DANOVITCH GM, BLUMENTHAL M.

Cataracts of chronic renal failure.

Lancet 1972 ; 1 : 509-511

BESWICK HT, HARDING JJ.

Conformational changes induced in bovine lens α -crystallin by carbamylation. Relevance to cataract.

Biochem J 1984 ; 223 : 221-227

BHATNAGAR RS, GOUGH CA.

Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules.

New York : Plenum Press ; 1996

BIENKOWSKI RS.

Intracellular degradation of newly synthesized secretory proteins.

Biochem J 1983 ; 214 : 1-10

BODE W, FERNANDEZ-CATALAN C, GRAMS F, GOMIS-RUTH FX, NAGASE H, TSCHESCHE H, MASKOS K.

Insights into MMP-TIMP interactions.

Ann N Y Acad Sci 1999 ; 878 : 73-91

BOND MD, VAN WART HE.

Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*.

Biochemistry 1984 ; 23 : 3085-3091

BOKOCH GM, KNAUS UG.

NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!

Trends Biochem Sci 2003 ; 28 : 502-508

BOREL JP.

Les collagènes.

Sci Tech Technol 1993 ; 25 : 18-26

BOREL JP, BELLON G.

Les collagens vasculaires.

Pathol Biol 1985 ; 33 : 254-260

BOREL JP, MAQUART FX, LE PEUCH C, RANDOUX A, GILLERY P, BELLON G, MONBOISSE JC.

Biochimie dynamique.

Bruxelles : De Boeck & Larcier ; 1997

BOSMAN FT, STAMENKOVIC I.

Functional structure and composition of the extracellular matrix.

J Pathol 2003 ; 200 : 423-428

BROOKS PC, STROMBLAD S, SANDERS LC, VON SCHALSCHA TL, AIMES RT, STETLER-STEVENSON WG, QUIGLEY JP, CHERESH DA.

Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.

Cell 1996 ; 85 : 683-693

BROWN JC, GOLBICK R, MANN K, TIMPL R.

Structure and stability of the triple-helical domains of human collagen XIV.

Matrix Biol 1994 ; 14 : 287-295

BUTKOWSKI RJ, NOELKEN ME, HUDSON BG.

Estimation of the size of collagenous proteins by electrophoresis and gel chromatography.

Meth Enzymol 1982 ; 82 : 410-423

BUTLER GS, BUTLER MJ, ATKINSON SJ, WILL H, TAMURA T, VAN WESTRUM SS, CRABBE T, CLEMENTS J, D'ORTHO MP, MURPHY G.

The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase « receptor » regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study.

J Biol Chem 1998 ; 273 : 871-880

C.

CARMICHAEL DJ, DODD CM, VEIS A.

The solubilization of bone and dentin collagens by pepsin. Effect of cross-linkages and non-collagen components.

Biochim Biophys Acta 1977 ; 491 : 177-192

CERAMI A, MANNING JM.

Potassium cyanate as an inhibitor of the sickling of erythrocytes in vitro.

Proc Natl Acad Sci USA 1971 ; 68 : 1180-1183

CHANTRAIN C, DE CLERCK YA.

Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale.

Med Sci 2002 ; 18 : 565-575

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem 1987 ; 162 : 156-159

CHUNG L, DINAKARPANDIAN D, YOSHIDA N, LAUER-FIELDS JL, FIELDS GB, VISSÉ R, NAGASE H.

Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis.

EMBO J 2004 ; 23 : 3020-3030

COCCO D, ROSSI L, BARRA D, BOSSA F, ROTILIO G.

Carbamoylation of Cu,Zn-superoxide dismutase by cyanate. Role of lysines in the enzyme action.

FEBS Lett 1982 ; 150 : 303-306

COCKCROFT DW, GAULT MH.

Prediction of creatinine clearance from serum creatinine.
Nephron 1976 ; 16 : 31-41

COMBE C, DELMAS Y, VENDRELY B.

La progression de l'insuffisance rénale. Bases physiologiques, essais expérimentaux, progression en fonction des maladies rénales.

In :

Le ralentissement de la progression de l'insuffisance rénale.

Dir. Bobrie G.

Paris : John Libbey Eurotext Ed. ; 2000 : 13-39

D.

DAHLGREN C, KARLSSON A.

Respiratory burst in human neutrophils.
J Immunol Methods 1999 ; 232 : 3-14

DANG PM, CROSS AR, BABIOR BM.

Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67phox and cytochrome b558.

Proc Natl Acad Sci USA 2001 ; 98 : 3001-3005

DAVENPORT A, JONES SR, GOEL S, ASTLEY JP, FEEST TG.

Carbamylated hemoglobin: a potential marker for the adequacy of hemodialysis therapy in end-stage renal failure.

Kidney Int 1996 ; 50 : 1344-1351

DAVENPORT A, JONES SR, GOEL S, ASTLEY JP, HARTOG M.

Differentiation of acute from chronic renal impairment by detection of carbamylated haemoglobin.

Lancet 1993 ; 341 : 1614-1617

DAVIS GE, BAYLESS KJ, DAVIS MJ, MEININGER GA.

Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules.

Am J Pathol 2000 ; 156 : 1489-1498

DECHATELET LR, LONG GD, SHIRLEY PS, BASS DA, THOMAS MJ, HENDERSON FW, COHEN MS.

Mechanism of the luminol-dependant chemiluminescence of human neutrophils.

J Immunol 1982 ; 129 : 1589-1593

DEGROOT J, VERZIJJ N, BUDDE M, BIJLSMA JWJ, LAFEBER FPJG, TEKOPPELE JM.

Accumulation of advanced glycation end products decreases collagen turnover by bovine chondrocytes.

Exp Cell Res 2001 ; 266 : 303-310

DELORENZI NJ, SCULSKY G, GATTI CA.

Effect of monovalent anions on type I collagen fibrillogenesis *in vitro*.
Int J Biol Macromol 1996 ; 19 : 15-20

DESCAMPS-LATSCHA B, WITKO-SARSAT V.

Le stress oxydant dans l'insuffisance rénale chronique et l'hémodialyse.
Néphrologie 2003 ; 24 : 377-379

DELBOSC S, CRISTOL JP, DESCOMPS B, CHENARD J, SIROIS P.

De l'oxygène à l'anion superoxyde. Peut-on moduler la NADPH oxydase ?
J Soc Biol 2001 ; 195 : 401-411

DI LULLO GA, SWEENEY SM, KORKKO J, ALA-KOKKO L, SAN ANTONIO JD.

Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen.
J Biol Chem 2002 ; 277 : 4223-4231

DUCA L, FLOQUET N, ALIX AJP, HAYE B, DEBELLE L.

Elastin as a matrikine.
Crit Rev Oncol Hematol 2004 ; 49 : 235-244

E, F.

ENGEL J, BACHINGER HP.

Structure, stability and folding of the collagen triple helix.

In :

Collagen Primer in Structure, Processing and Assembly.

Topics in Current Chemistry – volume 247.

Dir. Brinckman J, Notbohm H, Muller P.

Berlin-Eidelberg : Springer-Derlag Ed. ; 2005 : 7-33

EPSTEIN EH, SCOTT RD, MILLER EJ, PIEZ KA.

Isolation and characterization of the peptide derived from soluble human and baboon skin collagen after cyanogen bromide cleavage.

J Biol Chem 1971 ; 246 : 1718-1724

EYRE DR, WU JJ.

Collagen cross-links.

In :

Collagen Primer in Structure, Processing and Assembly.

Topics in Current Chemistry – volume 247.

Dir. Brinckman J, Notbohm H, Muller P.

Berlin-Eidelberg : Springer-Derlag Ed. ; 2005 : 207-229

FAZILI KM, MIR MM, QASIM MA.

Changes in protein stability upon chemical modification of lysine residues of bovine serum albumin by different reagents.

Biochem Mol Biol Int 1993 ; 31 : 807-816

FERRANTE A, THONG YH.

Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes from human blood by hypaque-ficoll method.
J Immunol Meth 1980 ; 36 : 109-117

FIELDS GB.

The collagen triple-helix: correlation of conformation with biological activities.
Connect Tissue Res 1995 ; 31 : 235-243

FLEISCHMAJER R, PERLISH JS, OLSEN BR.

The carboxylpropeptide of type I procollagen in skin fibrillogenesis.
J Invest Dermatol 1987 ; 89 : 212-215

FLUCKIGER R, HARMON W, MEIER W, LOO S, GABBAY KH.

Hemoglobin carbamylation in uremia.
N Engl J Med 1981 ; 304 : 823-827

FORSLUND T, SUNDQVIST T.

Priming of oxidative response in human neutrophils by anti-CD18 monoclonal antibodies.
APMIS 1994 ; 102 : 908-914

FU MX, WELLS-KNECHT KJ, BLACKEDGE JA, LYONS TJ, THORPE SR, BAYNES JW.

Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of the late stages of the Maillard reaction.
Diabetes 1994 ; 43 : 676-683

FURTHMAYR H, TIMPL R.

Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis.
Anal Biochem 1971 ; 41 : 510-516

G.

GALLE J.

Oxidative stress in chronic renal failure.
Nephrol Dial Transplant 2001 ; 16 : 2135-2137

GANEVA E, HARDING JJ.

Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase by carbamylation and protection by α -crystallin, a chaperon-like protein.
Biochem Biophys Res Comm 1996 ; 222 : 626-631

GAMALEY IA, KLYUBIN IV.

Roles of reactive oxygen species: signalling and regulation of cellular functions.
Int Rev Cytol 1999 ; 188 : 203-255

GARNOTEL R, MONBOISSE JC, RANDOUX A, HAYE B, BOREL JP.

The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1 integrin triggers the respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils. Role of calcium signaling and tyrosine phosphorylation of LFA-1.

J Biol Chem 1995 ; 270 : 27495-27503

GARNOTEL R, WEGROWSKI J, BELLON G, MONBOISSE JC, PERREAU C, BOREL JP.

Adhesion and activation of human neutrophils onto collagen chains separated by electrophoresis.

Exp Cell Res 1993 ; 205 : 426-429

GASPARI F, PERICO N, MATALONE M, SIGNORINI O, AZZOLINI N, MISTER M, REMUZZI G.

Precision of plasma clearance of iohexol for estimation of GFR in patients with renal disease.

J Am Soc Nephrol 1998 ; 9 : 310-313

GELSE K, POSCHL E, AIGNER T.

Collagens – structure, function, and biosynthesis.

Adv Drug Delivery Rev 2003 ; 55 : 1531-1546

GHOSH AK.

Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis.

Exp Biol Med 2002 ; 227 : 301-314

GIANAZZA E.

Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modifications of proteins.

J Chromatogr A 1995 ; 705 : 67-87

GILLERY P, MAQUART FX, BOREL JP.

Fibronectin dependence of the contraction of collagen lattices by human fibroblasts.

Exp Cell Res 1986 ; 167 : 29-37

GILLERY P, LEPERRE A, COUSTRY F, MAQUART FX, BOREL JP.

Different regulation of collagen I gene transcription in three-dimensional lattice cultures.

FEBS Lett 1992 ; 296 : 297-299

GIRAUDIER S, HELLIO D, DJABOUROV M, LARRETA-GARDE V.

Influence of weak and covalent bonds on formation and hydrolysis of gelatine networks.

Biomacromolecules 2004 ; 5 : 1662-1666

GODIN C, CAPRANI A, DUFAUX J, FLAUD P.

Interactions between neutrophils and endothelial cells.

J Cell Sci 1993 ; 106 : 441-452

GOGLEY B, GROULT N, HORNEBECK W, GODEAU G, PELLAT B.

Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase.

Anal Biochem 1998 ; 255 : 211-216

GONEN B, COLE T, HAHM KS.

The interaction of carbamylated low-density lipoprotein with cultured cells. Studies with human fibroblasts, rat peritoneal macrophages and human monocyte-derived macrophages.

Biochim Biophys Acta 1983 ; 754 : 201-207

GRETZER C, WERTHEN M, THOMSEN P.

Apoptosis and cytokine release in human monocytes cultured on polystyrene and fibrinogen-coated polystyrene surfaces.

Biomaterials 2002 ; 23 : 1639-1648

H.

HAKIM J.

La fonction des polynucléaires neutrophiles et ses anomalies.

In :

Hématologie –Tome I (Précis des maladies du sang).

Dir. Najman A, Verdy E, Potron G, Isnard F.

Paris : Ellipses Ed. ; 1994 : 120-134

HAN JS, KIM YS, CHIN HJ, JEON US, AHN C, KIM S, LEE JS, JANG IJ, SHIN SG.

Temporal changes and reversibility of carbamylated hemoglobin in renal failure.

Am J Kidney Dis 1997 ; 30 : 36-40

HARDING JJ, BESWICK HT, AJIBOYE R, HUBY R, BLAKYTNY R, RIXON KC.

Non-enzymic post-translational modification of proteins in aging. A review.

Mech Ageing Dev 1989 ; 50 : 7-16

HARRIS ED, KRANE SM.

An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture.

Biochim Biophys Acta 1972 ; 258 : 566-576

HARRIS ES, MC INTYRE TM, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA.

The leukocyte integrins.

J Biol Chem 2000 ; 275 : 23409-23412

HASTY KA, WU H, BYRNE M, GOLDRING MB, SEYER JM, JAENISCH R, KRANE SM, MAINARDI CL.

Susceptibility of type I collagen containing mutated $\alpha 1(1)$ chains to cleavage by human neutrophil collagenase.

Matrix 1993 ; 13 : 181-186

HASUIKE Y, NAKANISHI T, MAEDA K, TANAKA T, INOUE T, TAKAMITSU Y.

Carbamylated hemoglobin as a therapeutic marker of hemodialysis.

Nephron 2002 ; 91 : 228-234

HEINO J.

The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions.

Matrix Biol 2000 ; 19 : 319-323

HIGASHI S, MIYAZAKI K.

Reactive site-modified tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits the cell mediated activation of progelatinase A.

J Biol Chem 1999 ; 274 : 10497-10504

HIRABAYASHI Y, KOBAYASHI T, NISHIKAWA A, OKAZAKI H, AOKI T, TAKAYA J, KOBAYASHI Y.

Oxidative metabolism and phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes in patients with chronic renal failure.

Nephron 1988 ; 49 : 305-312

HIROTA A, EBIHARA T, KUSUBATA M, KOBAYASHI M, KOBAYASHI K, KUWABA K, TANAKA K, KIRIYAMA T, IRIE S, KOYAMA Y.

Collagen of chronically inflamed skin is over-modified and upregulates secretion of matrix metalloproteinase-2 and matrix-degrading enzymes by endothelial cells and fibroblasts.

J Invest Dermatol 2003 ; 121 : 1317-1325

HOOVER-PLOW JL, BOONMARK N, SKOCIR P, LAWN R, PLOW EF.

A quantitative immunoassay for the lysine-binding function of lipoprotein(a). Application to recombinant apo(a) and lipoprotein(a) in plasma.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996 ; 16 : 656-664

HORKKO S, HUTTUNEN K, KERVINEN K, KESANIEMI YA.

Decreased clearance of uraemic and mildly carbamylated low-density lipoprotein.

Eur J Clin Invest 1994 ; 24 : 105-113

HORKKO S, SALVOLAINEN MJ, KERVINEN K, KESANIEMI YA.

Carbamylation-induced alterations in low-density lipoprotein metabolism.

Kidney Int 1992 ; 41 : 1175-1181

HYNES RO.

Integrins: bidirectional, allosteric signalling machines.

Cell 2002 ; 110 : 673-687

I, J.

IKOMA T, KOBAYASHI H, TANAKA J, WALSH D, MANN S.

Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*.

Int J Biol Macromol 2003 ; 32 : 199-204

IMHOF BA, DUNON D.

Basic mechanism of leukocyte migration.

Horm Metab Res 1997 ; 29 : 614-621

IOZZO RV.

Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions.

New York : Marcel Dekker Inc ; 2000

JOHANSSON S.

Non-collagenous matrix proteins.

In :

Extracellular matrix, molecular components and interactions.

Dir. Comper W.

Amsterdam : Harwood ; 1996 : 68-94

JONES RD, HANCOCK JT, MORICE AH.

NADPH oxidase: a universal oxygen sensor.

Free Rad Biol Med 2000 ; 29 : 416-424

JULIANO RL, HASKILL S.

Signal transduction from the extracellular matrix.

J Cell Biol 1993 ; 120 : 577-585.

JUNGERS P, CHOUKROUN G, ROBINO C, TAUPIN P, LABRUNIE M, MAN NK, LANDAIS P.

Epidémiologie de l'insuffisance rénale terminale en Ile de France : enquête coopérative prospective en 1998.

Néphrologie 2000 ; 21 : 239-246

JUNGERS P, MAN NK, LEGENDRE C.

L'insuffisance rénale chronique: prévention et traitement. 3^{ème} Ed.

Paris : Flammarion Medecine-Sciences ; 2004

JUSZCZAK LJ.

Comparative vibrational spectroscopy of intracellular tau and extracellular collagen I reveals parallels of gelation and fibrillar structure.

J Biol Chem 2004 ; 279 : 7395-7404

K.

KAGAN HM, LI W.

Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell.

J Cell Biochem 2003 ; 88 : 660-672

KAMOHARA H, YAMASHIRO S, GALLIGAN C, YOSHIMURA T.

Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1a) promotes migration of leucocytes in three dimensional collagen lattices.

FASEB J 2001 ; 15 : 2724-2726

KARLSSON A, DAHLGREN C.

Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes.

Antioxid Redox Signal 2002 ; 4 : 49-60

KEENE DR, SAN ANTONIO JD, MAYNE R, MCQUILLAN DJ, SARRIS G, SANTORO SA, IOZZO RV.

Decorin binds near the C-terminus of type I collagen.

J Biol Chem 2000 ; 275 : 21801-21804

KHAN IH, CATTO GR

Long-term complications of dialysis: infection.
Kidney Int 1993 ; 41 : S143-S148

KIELTY CM, GRANT ME.

The collagen family : structure, assembly, and organization in the extracellular matrix.

In :

Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects. 2nd Ed.

Dir. Royce PM, Steinmann B.

New York : Wiley-Liss Eds ; 2002 : 159-221

KIELTY CM, SHERRATT MJ, SHUTTLEWORTH CA.

Elastic fibres.

J Cell Sci 2002 ; 115 : 2817-2828

KIVIRIKKO KI, MYLLYLÄ R.

Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes.

Meth Enzymol 1982 ; 82 : 245-304

KRANE SM, JAENISCH R.

Site-directed mutagenesis of type I collagen: effect on susceptibility to collagenase.

Matrix Suppl 1992 ; 1 : 64-67

KRAUS LM, GABER L, HANDORF CR, MARTI HP, KRAUS AP

Carbamoylation of glomerular and tubular proteins in patients with kidney failure: a potential mechanism of ongoing renal damage.

Swiss Med Wkly 2001 ; 131 : 139-144

KRAUS LM, ELBERGER AJ, HANDORF CR, PABST MJ, KRAUS AP.

Urea-derived cyanate forms ϵ -amino-carbamoyl-lysine (homocitrulline) in leukocyte proteins in patients with end-stage renal disease on peritoneal dialysis.

J Lab Clin Med 1994 ; 123 : 882-891

KRAUS LM, KRAUS AP.

The search for the uremic toxin : the case of carbamylation of amino acids and proteins.

Wien Klin Wochensh 1998 ; 110 : 521-530

KRAUS LM, KRAUS AP.

Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia.

Kidney Int 2001 ; 59 : S102-S107

KRISHNAMURTI U, RONDEAU E, SRAER JD, MICHAEL AF, TSILIBARY EC.

Alterations in human glomerular epithelial cells interacting with nonenzymatically glycosylated matrix.

J Biol Chem 1997 ; 272 : 27966-27970

KUCKEL CL, LUBIT BW, LAMBOOY PK, FARNSWORTH PN.

Methylisocyanate and actin polymerisation: the *in vitro* effects of carbamylation.

Biochim Biophys Acta 1993 ; 1162 : 143-148

KUENG W, SILBER E, EPPENBERGER U.

Quantification of cells cultured on 96 well plates.
Anal Biochem 1989 ; 182 : 16-19

KUMAR J, SHAH SV.

Kidney disease as an independent risk factor for cardiovascular events.
J Ren Nutr 2005 ; 15 : 99-104

KWAN JT, CARR EC, BENDING MR, BARRON JL.

Determination of carbamylated hemoglobin by high-performance liquid chromatography
Clin Chem 1990 ; 36 : 607-610

KWAN JT, CARR EC, BARRON JL, BENDING MR.

Carbamylated haemoglobin in normal, diabetic and uraemic patients.
Ann Clin Biochem 1992 ; 29 : 206-209

L.

LABAT-ROBERT J.

Cell-matrix interactions in aging: role of receptors and matricryptins.
Ageing Res Rev 2004 ; 3 : 233-247

LAEMMLI UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.
Nature 1970 ; 227 : 680-685

LAUER-FIELDS JL, JUSKA D, FIELDS GB.

Matrix metalloproteinases and collagen catabolism.
Biopolymers 2002 ; 66 : 19-32

LE BLAY G, BLOTTIERE HM, CHERBUT C.

Les collagènes des muscles lisses intestinaux.
Gastroenterol Clin Biol 1996 ; 20 : 185-192

LEE RE, DAVISON PF.

The collagens of the developing bovine cornea.
Exp Eye Res 1984 ; 39 : 639-652

LEFEVRE F, GARNOTEL R, GEORGES N, GILLERY P.

Overexpression of the nuclear protein nucleophosmin/B23 in collagen lattice-cultured fibroblasts: potential role in the control of protein synthesis.
Mol Cell Biochem 2002 ; 229 : 45-50

LE MEUR Y, LAGARDE C, CHARMES JP, BENEVENT D, LEROUX-ROBERT C.

L'insuffisance rénale chronique ; Du diagnostic à la dialyse.
Paris : Doin Eds. ; 1998

LUO KM, GIACIN JR, GILBERT SG, LIEBERMAN ER.

Determination of binding site concentration and average binding constant by the method of equilibrium sorption: evidence for lysine as a principal receptor site for collagen-enzyme binding. J Mol Catalysis 1979 ; 5 : 15-25

M.

MC CARTHY J, HOPWOOD F, OXLEY D, LAVER M, CASTAGNA A, RIGHETTI PG, WILLIAMS K, HERBERT B.

Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis: myth or reality? J Proteome Res 2003 ; 2 : 239-242

MAQUART FX, BELLON G, PASCO S, MONBOISSE JC.

Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. Biochimie 2005 ; 87 : 353-360

MARTIN S, HARDING JJ.

Site of carbamoylation of bovine γ -II-crystallin by potassium [14 C]cyanate. Biochem J 1989 ; 262 : 909-915

MARTIN-MATEO MC, SANCHEZ-PORTUGAL M, IGLESIAS S, DE PAULA A, BUSTAMANTE J.

Oxidative stress in chronic renal failure. Ren Fail 1999 ; 21 : 155-167

MASSON-GADAIS B, HUOT J, LISSITZKY JC.

Topographie de la liaison intégrine ligand. Med Sci 2001 ; 17 : 206-210

MELLADO W, SLEBE JC, MACCIONI RB.

Tubulin carbamoylation. Functional amino groups in microtubule assembly. Biochem J 1982 ; 203 : 675-681

MERCIRIS P, HARDY-DESSOURCES MD, BACHIR D, GIRAUD F.

La drépanocytose: de la physiopathologie à la thérapie. Regard sur la Biochimie 2000 ; 3 : 9-16

MINOND D, LAUER-LIELDS JL, NAGASE H, FIELDS GB.

Matrix metalloproteinase triple-helical peptidase activities are differentially regulated by substrate stability. Biochemistry 2004 ; 43 : 11474-11481

MIR MM, FAZILI KM, QASIM MA.

Chemical modification of buried lysine residues of bovine serum albumin and its influence on protein conformation and bilirubin binding. Biochim Biophys Acta 1992 ; 1119 : 261-267

MOLNAR J, FONG KS, HE QP, HAYASHI K, KIM Y, FONG SF, FOGELGREN B, SZAUTER KM, MINK M, CSISZAR K.

Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins.
Biochim Biophys Acta 2003 ; 1647 : 220-224

MONBOISSE JC, BELLON G, DUFER J, RANDOUX A, BOREL JP.

Collagen activates superoxide anion production by human polymorphonuclear neutrophils.
Biochem J 1987 ; 246 : 599-603

MONBOISSE JC, GARDES-ALBERT M, RANDOUX A, BOREL JP, FERRADINI C.

Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis.
Biochim Biophys Acta 1988 ; 965 : 29-35

MONBOISSE JC, RITTIE L, LAMFARRAJ H, GARNOTEL R, GILLERY P.

In vitro glycooxidation alters the interactions between collagens and human polymorphonuclear leucocytes.
Biochem J 2000 ; 350 : 777-783

MONBOISSE JC, BELLON G, RANDOUX A, DUFER J, BOREL JP.

Activation of human neutrophils by type I collagen. Requirement of two different sequences.
Biochem J 1990 ; 270 : 459-462

MONTGOMERIE JZ, KALMANSON GM, GUZE LB.

Renal failure and infection.
Medicine 1968 ; 47 : 1-32

MOSLEN MT.

Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis.

In :

Free radicals in diagnostic medicine.

Dir. Armstrong D.

New York : Plenum Press ; 1994 : 17-27

MUN KC, GOLPER TA.

Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation.
Blood Purif 2000; 18 : 13-17

MYLLYHARJU J.

Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis.
Matrix Biol 2003 ; 22 : 15-24

MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO KI.

Collagens and collagen-related diseases.
Ann Med 2001 ; 33 : 7-21

MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO KI.

Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms.
Trends Genet 2004 ; 20 : 33-43

N.

NAGASE H.

Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.

Biol Chem 1997 ; 378 : 151-160

NAGASE H, FIELDS GB.

Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides.

Biopolymers 1996 ; 40 : 399-416

NAUSEEF WM.

Assembly of the phagocyte NADPH oxidase.

Histochem Cell Biol 2004 ; 122 : 277-291

NGUYEN TD, MAQUART FX, MONBOISSE JC.

Ionizing radiations and collagen metabolism: from oxygen free radicals to radio-induced late fibrosis.

Rad Phys Chem 2005 ; 72 : 381-386

NICHOLSON DH, HARKNESS DR, BENSON WE, PETERSON CM.

Cyanate-induced cataracts in patients with sickle-cell hemoglobinopathies.

Arch Ophthalmol 1976 ; 94 : 927-930

NIGEN AM, NJIKAM N, LEE CK, MANNING JM.

Studies on the mechanism of action of cyanate in sickle cell disease.

J Biol Chem 1974 ; 249 : 6611-6616

NILSSON L, LUNDQUIST P, KAGEDAL B, LARSSON R.

Plasma cyanate concentrations in chronic renal failure

Clin Chem 1996 ; 42 : 482-483

O.

OIMOMI M, HATANAKA H, YOSHIMURA Y, YOKONO Y, BABA S, TAKETOMI Y.

Carbamylation of insulin and its biological activity.

Nephron 1987 ; 46 : 63-66

OIMOMI M, ISHIKAWA K, KAWASAKI T, KUBOTA S, YOSHIMURA Y, BABA S.

Plasma carbamylated protein in renal failure.

N Engl J Med 1983 ; 308 : 655-656

OIMOMI M, MATSUMOTO S, HATANAKA H, ISHIKAWA K, KUBOTA S, YOSHIMURA Y, BABA S.

Determination of carbamylated plasma protein and its clinical application to renal failure.

Nephron 1985 ; 40 : 405-406

OK E, BASNAKIAN AG, APOSTOLOV EO, BARRI YM, SHAH SV.

Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease.

Kidney Int 2005 ; 68 : 173-178

P, Q.

PARK KD, MUN KC, CHANG EJ, PARK SB, KIM HC.

Inhibition of erythropoietin activity by cyanate.

Scand J Urol Nephrol 2004 ; 38 : 69-72

PARKER FS

Application of infrared, Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry.

New York : Plenum Press ; 1983

PASCO S, RAMONT L, MAQUART FX, MONBOISSE JC.

Effets biologiques de peptides des collagènes I et IV.

J Soc Biol 2003 ; 197 : 31-39

PAUL RG, BAILEY AJ.

Glycation of collagen : the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes.

Int J Biochem Cell Biol 1996 ; 28 : 1297-1310

PEI D, WEISS SJ.

Furin-dependant intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen.

Nature 1995 ; 375 : 244-247

PERSIKOV AV, RAMSHAW JAM, KIRKPATRICK A, BRODSKY B.

Electrostatic interactions involving lysine make major contributions to collagen triple-helix stability.

Biochemistry 2005 ; 44 : 1414-1422

PICK E.

Microassays of superoxide and hydrogen peroxyde production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immuno-assay microplate reader.

Meth Enzymol 1989 ; 378 : 1237-1245

PIENIAZEK A, GWODZDZINSKI K.

Carbamylation of proteins leads to alterations in the membrane structure of erythrocytes.

Cell Mol Biol Lett 2003 ; 8 : 127-131

PIEZ KA, EIGNER EA, LEWIS MS.

The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several collagens.

Biochemistry 1963 ; 2 : 58-66

PIEZ KA, SHERMAN MR.

Characterization of the product formed by renaturation of alpha 1-CB2, a small peptide from collagen.

Biochemistry 1970 ; 9 : 4129-4133

PINNELL SR.

Regulation of collagen synthesis.

J Invest Dermatol 1982 ; 79 : S73-S76

POLLARD TD, EARNSHAW WC.

Biologie cellulaire.

Paris : Elsevier Science Inc ; 2004

PORTER CJ, BURDEN RP, MORGAN AG, DANIELS I, FLETCHER J.

Impaired bacterial killing and hydrogen peroxide production by polymorphonuclear neutrophils in end-stage renal failure.

Nephron 1997 ; 77 : 479-481

PRYDZ K, DALEN KT.

Synthesis and sorting of proteoglycans.

J Cell Sci 2000 ; 113 : 193-205

QIN W, SMITH JB, SMITH DL.

Rates of carbamylation of specific lysyl residues in bovine α -crystallins.

J Biol Chem 1992 ; 267 : 26128-26133

R.

REED CC, IOZZO RV.

The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis.

Glycoconj J 2002 ; 19 : 249-255

REISER KM, AMIGABLE MA, LAST JA.

Nonenzymatic glycation of type I collagen. The effects of ageing on preferential glycation sites.

J Biol Chem 1992 ; 267 : 24207-24216

RENNARD SI, STIER LE, CRYSTAL RG.

Intracellular degradation of newly synthesized collagen.

J Invest Dermatol 1982 ; 79 : S77-S82

RICARD-BLUM S, RUGGIERO F.

The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane.

Pathol Biol 2005 ; 53 : 430-442

RICARD-BLUM S, RUGGIERO F, VAN DER REST M.

The collagen superfamily.

In :

Collagen Primer in Structure, Processing and Assembly.

Topics in Current Chemistry – volume 247.

Dir. Brinckman J, Notbohm H, Muller P.

Berlin-Eidelberg : Springer-Verlag Ed. ; 2005 : 35-84

RICARD-BLUM S, VILLE G.

Collagen cross-linking.

Int J Biochem 1989 ; 21 : 1185-1189

RICARD-BLUM S, VILLE G, HARTMANN DJ.

Use of the Pharmacia Phast System for sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of non-globular proteins: application to collagens.

J Chromatogr A 1988 ; 431 : 474-476

RIEU P.

L'insuffisance rénale terminale est une maladie inflammatoire chronique.

Néphrologie 2003 ; 24 : 329-333

RIMON S, PERLMANN GE.

Carbamylation of pepsinogen and pepsin.

J Biol Chem 1968 ; 243 : 3566-3572

RITTIE L, BERTON A, MONBOISSE JC, HORNEBECK W, GILLERY P.

Decreased contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production.

Biochem Biophys Res Commun 1999 ; 264 : 488-492

RITTIE L, MONBOISSE JC, GORISSE MC, GILLERY P.

Malondialdehyde binding to proteins dramatically alters fibroblast functions.

J Cell Physiol 2002 ; 191 : 227-236

ROBINET A, FAHEM A, CAUCHARD JH, HUET E, VINCENT L, LORIMIER S, ANTONICELLI F, SORIA C, CREPIN M, HORNEBECK W, BELLON G.

Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP.

J Cell Sci 2005 ; 118 : 343-356

ROOS D, VAN BRUGGEN R, MEISCHL C.

Oxidative killing of microbes by neutrophils.

Microbes Infect 2003 ; 5 : 1307-1315

ROSENBLOOM J, ABRAMS WR, MECHAM R.

Extracellular matrix 4: the elastic fiber.

FASEB J 1993 ; 7 : 1208-1218

ROSENZWEIG SD, HOLLAND SM.

Phagocyte immunodeficiencies and their infections.
J Allergy Clin Immunol 2004 ; 113 : 620-626

ROSSO F, GIORDANO A, BARBARISI M, BARBARISI A.

From cell-ECM interactions to tissue engineering.
J Cell Physiol 2004 ; 199 : 174-180

ROXBOROUGH HE, YOUNG IS.

Carbamylation of proteins and atherogenesis in renal failure.
Med Hypotheses 1995 ; 45 : 125-128

S.

SCHLESSINGER J, LAX I, LEMMON M.

Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors?
Cell 1995 ; 83 : 357-360

SCHONHERR E, HAUSSER HJ.

Extracellular matrix and cytokines: a functional unit.
Dev Immunol 2000 ; 7 : 89-101

SHARMA A, TRIPATHI AK, KALRA OP, CHAKRABARTY AK.

Impaired function of neutrophils in uraemic patients.
Natl Med J India 2000 ; 13 : 121-124

SHATWELL KP, SEGAL AW.

NADPH oxidase.
Int J Biochem Cell Biol 1996 ; 28 : 1191-1195

SHAYKH M, PEGORARO AA, MO W, ARRUDA JAL, DUNEA G, SINGH AK.

Carbamylated proteins activate glomerular mesangial cells and stimulate collagen deposition.
J Lab Clin Med 1999 ; 133 : 302-308

SHIMAOKA M, TAKAGI J, SPRINGER TA.

Conformational regulation of integrin structure and function.
Ann Rev Biophys Biomol Struct 2002 ; 31 : 485-516

SIMONS ER, HARTZBAND P, WHITIN J, CHAPMAN C.

Circular dichroism studies of cyanate-induced conformational changes in hemoglobins A and S.
Biochemistry 1976 ; 15 : 4059-4064

SIXT M, HALLMANN R, WENDLER O, SCHARFFETTER-KOCHANEK K, SOROKIN LM.

Cell adhesion and migration properties of β_2 -integrin negative polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix molecules. Relevance for leucocytes extravasation.
J Biol Chem 2001 ; 276 : 18878-18887

SKOUTELIS AT, KALERIDIS VE, GOUMENOS DS, ATHANASSIOU GM, MISSIRLIS YF, VLACHOJANNIS JG, BASSARIS HP.

Polymorphonuclear leukocyte rigidity is defective in patients with chronic renal failure.
Nephrol Dial Transplant 2000 ; 15 : 1788-1793

SMITH CW.

Leucocyte-endothelial cell interactions.
Semin Hematol 1993 ; 30 : 45-53

SMITH LT, HOLBROOK KA, MADRI JA.

Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin.
Am J Anat 1986 ; 175 : 507-521

SMITH RM, CURNUTTE JT.

Molecular basis of chronic granulomatous disease.
Blood 1991 ; 77 : 673-686

SOMERVILLE RPT, OBLANDER SA, APTE SS.

Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks.
Genome Biol 2003 ; 4 : 216-227

STARK GR.

Reactions of cyanate with functional groups of proteins. III. Reactions with amino and carboxyl groups.
Biochemistry 1965 ; 4 : 1030-1036

STARK GR.

Modification of proteins with cyanate.
Methods Enzymol 1967 ; 11 : 590-594

STARK GR, STEIN WH, MOORE S.

Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins.
J Biol Chem 1960 ; 235 : 3177-3181

STENVINKEL P.

Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated ?
Nephrol Dial Transplant 2002 ; 17 : S33-S38

STERNLICHT MD, WERB Z.

How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.
Annu Rev Cell Dev Biol 2001 ; 17 : 463-516

STIM J, SHAYKH M, ANWAR F, ANSARI F, ARRUDA JA, DUNEA G.

Factors determining hemoglobin carbamylation in renal failure.
Kidney Int 1995 ; 48 : 1605-1610

STULTZ CM, EDELMAN ER.

A structural model that explains the effects of hyperglycemia on collagenolysis.
Biophys J 2003 ; 85 : 2198-2204

SZYMANOWICZ A, RANDOUX A, BOREL JP.

Dosage de l'hydroxyproline totale de l'urine.

Ann Biol Clin 1979 ; 37 : 115-116

T.

TAKEYA R, SUMIMOTO H.

Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases.

Mol Cells 2003 ; 16 : 271-277

TASANARONG A, SEUBLINVONG T, EIAM-ONG S.

The role of carbamylated hemoglobin in identifying acute and chronic renal failure.

J Med Assoc Thai 2002 ; 85 : 462-469

TARIF N, SHAYKH M, STIM J, ARRUDA JA, DUNEA G.

Carbamylated hemoglobin in hemodialysis patients.

Am J Kidney Dis 1997 ; 30 : 361-365

TORRE-BLANCO A, ADACHI E, HOJIMA Y, WOOTTON JA, MINOR RR, PROCKOP DJ.

Temperature-induced post-translational over-modification of type I procollagen. Effects of over-modification of the protein on the rate of cleavage by procollagen N-proteinase and on self-assembly of collagen into fibrils.

J Biol Chem 1992 ; 267 : 2650-2655

TREPANIER DJ, THIBERT RJ, DRAISEY TF, CAINES PS.

Carbamylation of erythrocyte membrane proteins: an *in vitro* and *in vivo* study.

Clin Biochem 1996 ; 29 : 347-355

TSUZAKI M, YAMAUCHI M, BANES AJ.

Tendon collagens: extracellular matrix composition in shear stress and tensile components of flexor tendons.

Connect Tissue Res 1993 ; 29 : 141-152

U, V.

UITTO J.

Collagen polymorphism: isolation and partial characterization of alpha 1(I)-trimer molecules in normal human skin.

Arch Biochem Biophys 1979 ; 192 : 371-379

VAN DER SLOT-VERHOEVEN AJ, VAN DURA EA, ATTEMA J, BLAUW B, DEGROOT J, HUIZINGA TWJ, ZUURMOND AM, BANK RA.

The type of collagen cross-link determines the reversibility of experimental skin fibrosis.

Biochim Biophys Acta 2005 ; 1740 : 60-67

VANHOLDER R.

Les toxines urémiques.

Néphrologie 2003 ; 24 : 373-376

VANHOLDER R, RINGOIR S.

Infectious morbidity and defects of phagocytosis function in end-stage renal failure disease: a review.

J Am Soc Nephrol 1993 ; 3 : 1541-1554

VANHOLDER R, RINGOIR S, DHONDT A, HAKIM R.

Phagocytosis in uremic and hemodialysis patients: a prospective and cross sectional study.

Kidney Int 1991 ; 39 : 320-327

VAN WART HE, BIRKEDAL-HANSEN H.

The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.

Proc Natl Acad Sci USA 1990 ; 87 : 5578-5582

VERZIJL N, DE GROOT J, THORPE SR, BANK RA, SHAW JN, LYONS TJ, BIJLSMA JW, LAFEVER FP, BAYNES JW, TEKOPPELE JM.

Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products.

J Biol Chem 2000 ; 275 : 39027-39031

VIGNAIS PV.

The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism.

Cell Mol Life Sci 2002 ; 59 : 1428-1459

VILLENA J, BRANDAN E.

Dermatan sulphate exerts an enhanced growth factor response on skeletal muscle satellite cell proliferation and migration.

J Cell Physiol 2004 ; 198 : 169-178

VISSE R, NAGASE H.

Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry.

Circ Res 2003 ; 92 : 827-839

VLISSARA H.

Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications.

Diabetes 1997 ; 46 : S19-S25

W, X, Y, Z.

WERR J, ERIKSSON EE, HEDQVIST P, LINDBOM L.

Engagement of beta2 integrins induces surface expression of beta1 integrin receptors in human neutrophils.

J Leukoc Biol 2000a ; 68 : 553-560

WERR J, JOHANSSON J, ERIKSSON EE, HEDQVIST P, RUOSLAHTI E, LINDBOM L.

Integrin $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue.

Blood 2000b ; 95 : 1804-1809

WHITE DJ, PURANEN S, JOHNSON MS, HEINO J.

The collagen receptor subfamily of the integrins.
Int J Biochem Cell Biol 2004 ; 36 : 1405-1410

WIEN TJES FB, SEGAL AW.

NADPH oxidase and the respiratory burst.
Semin Cell Biol 1995 ; 6 : 357-365

WITKO-SARSAT V, FRIEDLANDER M, NGUYEN KHOA T, CAPELLERE-BLANDIN C, THU NGUYEN AT, CANTELOUP S, DAYER JM, JUNGERS P, DRUEKE T, DESCAMPS-LATSCHA B.

Advanced Oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure.
J Immunol 1998 ; 161 : 2524-2532

WOESSNER JF.

MMPs and TIMPs – An historical perspective.
Mol Biotech 2002 ; 22 : 33-49

WOOD GC, KEECH MK.

The formation of fibrils from collagen solutions. 1. The effect of experimental conditions: Kinetic and electron microscopy studies.
Biochem J 1960 ; 75 : 588-598

WYNCKEL A, RANDOUX C, MILLART H, DESROCHES C, GILLERY P, CANIVET E, CHANARD J.

Kinetics of carbamylated haemoglobin in acute renal failure.
Nephrol Dial Transplant 2000 ; 15 : 1183-1188

YOON JH, HALPER J.

Tendon proteoglycans: biochemistry and function.
J Musculoskelet Neuronal Interact 2005 ; 5 : 22-34

YOSHIMURA T, MATSUYAMA W, KAMOHARA H.

Discoidin domain receptor 1: a new class of receptor regulating leukocyte-collagen interaction.
Immunol Res 2005 ; 31 : 219-230

ZITTOUN R, SAMAMA M, MARIE JP.

Manuel d'hématologie (4ème édition).
Paris : Ed. Douin ; 1992

Influence de la carbamylation sur les propriétés structurales du collagène de type I et ses interactions avec les polynucléaires neutrophiles humains.

RESUME

La carbamylation est une modification post-traductionnelle caractérisée par la fixation non enzymatique de cyanate, un dérivé réactif de l'urée, sur les groupements NH₂ libres des protéines, affectant plus particulièrement les résidus de lysine, transformés en homocitrulline. Les modifications post-traductionnelles conduisent dans la majorité des cas à une altération des propriétés structurales et fonctionnelles des protéines et de leurs interactions avec les cellules. Au cours de l'insuffisance rénale chronique, contexte pathologique favorisant la réaction de carbamylation, les patients présentent des troubles infectieux et inflammatoires importants, d'origine multifactorielle. Notre travail traite de l'influence de la carbamylation sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles du collagène de type I, protéine de la matrice extracellulaire impliquée dans l'architecture du tissu conjonctif mais également dans la régulation des fonctions cellulaires, notamment celles des polynucléaires neutrophiles.

Après carbamylation *in vitro* (au cours de laquelle seulement 1 % des acides aminés sont transformés), le collagène conserve une structure en hélice de type polyproline II, mais présente, par analyse spectroscopique et polarimétrique, une légère fragilisation de sa conformation dans certaines régions. Ces changements conformationnels, même mineurs, sont responsables d'une incapacité du collagène carbamylé à s'associer sous forme de fibres, ainsi que d'une altération de sa sensibilité à la dégradation enzymatique : le collagène carbamylé est plus résistant aux collagénases et plus sensible aux gélatinases et à la pepsine. Par ailleurs, la carbamylation entraîne une inhibition de l'activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène de type I. La recherche du mécanisme impliqué dans ce processus a permis de montrer que le peptide α_1 CB6, contenant la séquence activatrice des polynucléaires neutrophiles, constituait une cible préférentielle de carbamylation. D'autre part, des expériences de mutagenèse dirigée ont révélé l'importance du résidu de lysine en position 1208, situé à proximité de cette séquence, pour l'activation des polynucléaires neutrophiles par le collagène de type I.

Ces résultats montrent que la carbamylation du collagène peut être considérée comme un événement favorisant la progression de l'insuffisance rénale chronique. En effet, les modifications des propriétés structurales du collagène observées après carbamylation peuvent entraîner un trouble du renouvellement du collagène au sein de la matrice extracellulaire et une désorganisation architecturale de différents tissus comme la paroi vasculaire ou le rein. Par ailleurs, l'incapacité du collagène carbamylé à stimuler les fonctions oxydatives des polynucléaires neutrophiles peut contribuer à l'apparition d'infections, une des causes majeures de morbidité et de mortalité des patients urémiques.

MOTS CLES

Collagène de type I - Insuffisance rénale chronique - Carbamylation - Modifications post-traductionnelles des protéines - Granulocyte neutrophile.

COMPOSITION DU JURY

Rapporteurs : Pr Sylvie RICARD-BLUM (Lyon)
Pr Eric RONDEAU (Paris)
Examineurs : Dr Roselyne GARNOTEL (Reims)
Dr Patricia SANSILVESTRI-MOREL (Paris)
Dr William HORNEBECK (Reims)
Pr Philippe NGUYEN (Reims)
Directeur de thèse : Pr Philippe GILLERY (Reims)

COORDONNEES

Adresse personnelle :

Appt 15
115 Rue Lesage
51100 REIMS

Adresse du laboratoire :

Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire
CNRS UMR 6198 - IFR 53 Biomolécules
UFR Médecine - 51 Rue Cognacq-Jay
51095 REIMS Cedex
✉ : stephane.jaisson@univ-reims.fr