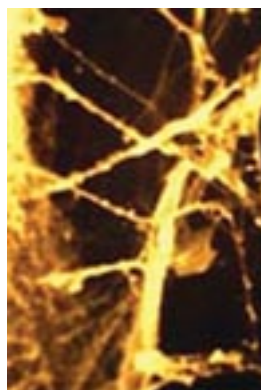


> Le syndrome d'Ehlers-Danlos constitue un groupe hétérogène de maladies génétiques du tissu conjonctif. Il est caractérisé par une peau hyper-extensible, des articulations anormalement mobiles et des vaisseaux fragiles. Les anomalies moléculaires responsables de cette maladie portent souvent sur les collagènes et les enzymes assurant leur maturation. La forme classique du syndrome, qui sera principalement discutée dans cet article, est majoritairement due à des mutations du collagène V, un collagène fibrillaire présent en petite quantité dans les tissus affectés. Cependant, des anomalies moléculaires du collagène I ou de la ténascine peuvent aussi être responsables de ce syndrome. De plus, chez la souris, l'inactivation de gènes codant pour d'autres molécules matricielles (SPARC, thrombospondine, petits protéoglycanes riches en leucine) conduit à des phénotypes mimant ce syndrome et suggère que ces molécules pourraient donc être impliquées. Comme les anomalies du collagène V restent à ce jour principalement responsables de cette affection, nous discuterons son rôle physiologique à la lumière des observations cliniques et fondamentales. Nous tenterons de comprendre comment le collagène V interagit avec les autres molécules pour déterminer les caractéristiques tissulaires. <

Le syndrome d'Ehlers-Danlos : l'architecture matricielle en question

Agnès Fichard, Hélène Chanut-Delalande,
 Florence Ruggiero



Institut de Biologie et
 Chimie des Protéines,
 UMR Cnrs 5086,
 7, passage du Vercors,
 69367 Lyon Cedex 07, France.
f.ruggiero@ibcp.fr

que l'os, la peau, la cornée ou encore les tendons, sont structurés à partir des mêmes matériaux de base et notamment à partir des collagènes (Figure 1). Les propriétés tissulaires doivent donc résulter de différences quantitatives entre les composés matriciels d'un tissu à l'autre, d'interactions spécifiques ou encore d'agencements topologiques particuliers à un type de tissu (Figure 1). L'imbrication des divers constituants matriciels au service du maintien des propriétés tissulaires est particulièrement bien illustrée par une maladie, le syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS). Il s'agit d'un groupe assez hétérogène de maladies génétiques, classées en six types différents selon la nouvelle nosologie [1], et qui affectent les tissus conjonctifs non cartilagineux (Tableau 1). Les atteintes cardinales sont cutanées, articulaires et vasculaires. La peau, fréquemment contusionnée, présente un aspect doux et velouté. Elle est hyperextensible tout comme le sont les articulations [2]. Les facultés de contorsions des sujets atteints sont telles que jadis, certains purent faire l'objet d'attraction dans les foires. Les vaisseaux sont fragiles et cette fragilité se révèle extrême dans l'un des types d'EDS, l'EDS vasculaire, qui est le plus

La matrice extracellulaire est constituée de quatre grandes familles de composés, les collagènes, les protéoglycanes, les glycoprotéines et les protéines élastiques. Ces composés peuvent, pour la plupart, s'auto-assembler mais également interagir entre eux ou par l'intermédiaire de récepteurs, avec les cellules. C'est grâce à cette trame de connexions que se réalise la vie cellulaire (adhérence, morphogenèse, apoptose...) et que se forment les caractéristiques tissulaires (solidité, souplesse, transparence). Il est frappant de constater à quel point des tissus aux propriétés aussi différentes

sévère, les sujets atteints étant prédisposés notamment à des ruptures vasculaires.

Cette maladie a longtemps semblé résulter d'anomalies génétiques portant sur les collagènes fibrillaires I et III, ou encore sur des enzymes assurant la maturation des collagènes, telles que la N-protéinase, qui est responsable du clivage amino-terminal de ces collagènes, ou la lysyl-hydroxylase garante de la réticulation des collagènes. En ce qui concerne la forme la plus fréquente de la maladie, l'EDS classique, objet de cet article, il a été établi que des mutations affectant le collagène V, un collagène fibrillaire peu abondant, fréquemment associé au collagène I, sont responsables de 30 à 50 % des cas rapportés. Cette forme classique peut également, mais plus rarement, être en rapport avec des mutations siégeant sur le collagène I. Cependant, il est désormais acquis que l'EDS n'est pas strictement lié à des mutations affectant la synthèse ou la maturation des collagènes. Des anomalies d'une protéine matricielle non collagénique, la ténascine X, sont à l'origine de quelques cas d'EDS classique [3]. De plus, des expériences d'inactivation de gènes chez la souris laissent présumer que d'autres constituants matriciels (thrombospondine-2, SPARC [*secreted protein acidic and rich in cystein*], décorine, lumican...) pourraient être en cause, élargissant ainsi le spectre des protéines impliquées dans cette maladie. Ces données de la recherche fondamentale, alliées à l'analyse de l'impact des défauts moléculaires sur la présentation clinique de l'EDS classique, permettent d'appréhender la contribution des protéines matricielles et notamment du collagène V à la spécificité fonctionnelle de certains tissus.

Caractéristiques moléculaires des collagènes I et V et de la ténascine X

Ces protéines sont les cibles principales des mutations conduisant à un EDS classique. Le rôle que jouent les collagènes I et V dans cette maladie ne peut être appréhendé sans une brève description de leurs principales caractéristiques (voir [4] pour une présentation plus exhaustive). Les collagènes sont des protéines extracellulaires constituées de trois chaînes polypeptidiques comportant au moins un domaine replié en triple hélice. Cette conformation caractéristique est adoptée, du fait de la présence dans la séquence primaire de chacune des chaînes, d'une succession de triplets Gly-X-Y, pour lesquels X est le plus souvent représenté par une proline et Y par une hydroxyproline. Les collagènes I, III, V, de même que les collagènes II et XI, forment le groupe des collagènes fibrillaires, ainsi désignés par leur aptitude à s'assembler en agrégats spécifiques formant des fibres à striation périodique. Ces agrégats résultent souvent de l'associa-

tion de collagènes de type différents, qui peuvent être synthétisés dans une même cellule et qui s'assemblent à l'extérieur de la cellule pour former des fibres mixtes, dites alors hétérotypiques (Figure 2). De telles fibres, composées de collagènes I, III et V sont présentes dans les tissus atteints des sujets porteurs d'EDS (peau, tendon et os) alors que les assemblages II et XI sont presque exclusivement restreints aux tissus cartilagineux. La quantité relative de chacun de ces composants au sein d'une même fibre a une incidence directe sur son diamètre, qui, en retour, semble déterminer certaines propriétés tissulaires. Par exemple, un tissu comme l'os, où la solidité est requise, présente de larges fibres hétérotypiques I/V (100-150 nm de diamètre moyen) pour lesquelles la quantité de collagène V est largement minoritaire (moins de 1 % par rapport au collagène I). La cornée contient des fibres comportant les mêmes types de collagène, mais où

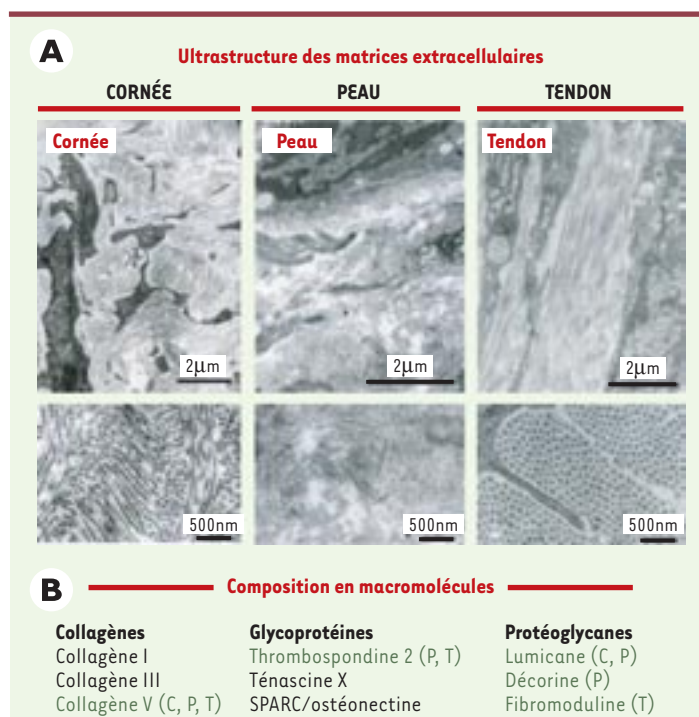


Figure 1. Ultrastructure des matrices extracellulaires et composition en macromolécules. **A.** Organisation du réseau collagénique adaptée à la fonction des tissus: la cornée, où les fibres s'agencent en un contre-plaqué extrêmement régulier dont dépend la transparence de ce tissu; la peau, où les fibres de collagènes, de section hétérogène, ne présentent aucune direction privilégiée et sont garantes de la cohésion de ce tissu particulièrement élastique et déformable; le tendon, où les faisceaux de fibres, parallèles les uns aux autres, forment de solides câbles capables de résister aux forces de tensions considérables que subit ce tissu. **B.** Composants matriciels présents dans quelques-uns des tissus cibles de l'EDS de type classique: la cornée (C), la peau (P) et le tendon (T). En vert, molécules dont l'absence totale ou une mutation provoquée affectent en priorité l'un des tissus présentés (d'après les connaissances actuelles [3,26-30,33]).

le collagène V représente 25 % par rapport au collagène I. Les fibres sont plus fines, d'un diamètre de 25 à 30 nm et agencées de manière très régulière, caractéristiques dont on sait l'importance pour la transparence de ce tissu. Chez l'adulte, une blessure profonde de la cornée cicatrise en une zone opaque résultant de la formation de fibres de diamètre irrégulier. Plusieurs études convergentes montrent que le collagène V serait un des facteurs responsables de la régulation du diamètre des fibres hétérotypiques I/V, notamment grâce à une particularité dans la maturation de son extrémité amino-terminale. En effet, les collagènes fibrillaires sont synthétisés sous forme de pro-collagène, présentant une triple hélice ininterrompue d'environ 1000 acides aminés, flanquée de

deux extrémités amino- et carboxy-propeptidiques. Une fois sécrétée dans la matrice, la molécule de collagène subit une excision de ces extrémités amino- et carboxy-terminales effectuée par des enzymes spécifiques, les amino- et carboxy-protéinases. Cet élagage va pratiquement réduire la molécule à sa simple triple hélice. Cependant, contrairement aux collagènes I et III, le collagène V retient un large globule amino-terminal qui, par encombrement stérique, limite le dépôt de molécules de collagène I au sein des fibres hétérotypiques I/V [5] (Figure 2).

Les ténascines sont des molécules mystérieuses quant à leur fonction. Elles sont au nombre de cinq, notées C, R, X, Y et W [6] (→). Les isoformes les mieux connues sont la

NOUVELLE NOSOLOGIE ANCIENNE CLASSIFICATION	SYMPTÔMES CLINIQUES PRINCIPAUX	SYMPTÔMES CLINIQUES MINEURS	CAUSE GÉNÉTIQUE OU MOLÉCULAIRE	MODE DE TRANSMISSION	FRÉQUENCE	NUMÉRO OMIM
Classique EDS I ou II	Hyperextensibilité de la peau Cicatrices atrophiques Hypermobilité des articulations	Peau douce et veloutée Pseudo-tumeurs molluscoïdes Hypotonie musculaire Développement moteur retardé Complications dues à l'hypermobilité des articulations (subluxations, déboîtements...) Contusions fréquentes Fragilité des tissus (hernie...)	Mutations des gènes COL5A1 ou COL5A2 Mutations du gène COL1A1 Mutation du gène TénascineX	AD	Commun	130000 130010
Hyper-mobile EDS III	Hyperextensibilité variable de la peau (pas de cicatrice atrophique) Hypermobilité généralisée des articulations	Déboîtement fréquent des articulations, Douleurs chroniques des membres et des articulations	?	AD	Commun	130020
Vasculaire EDS IV	Peau mince et translucide Fragilité ou rupture des artères, de l'intestin ou de l'utérus Contusions étendues Aspect caractéristique de la face	Acrogérie (atrophie cutanée) Hypermobilité des petites articulations Rupture des tendons et des muscles Pied-bot Veines variqueuses Fistule artério-veineuse Pneumothorax Atrophie des gencives	Mutations du gène COL3A1	AD	Commun	130050
Cypho-scoliotique EDS VI	Articulations lâches Hypotonie musculaire sévère à la naissance Scoliose à la naissance Fragilité de la sclérotique Rupture du globe oculaire	Fragilité des tissus Cicatrices atrophiques Contusions fréquentes Ruptures artérielles Type marfanoïde Microcornée Ostéoporose	Déficit en lysyl-hydroxylase Autre cause inconnue	AR	Rare	225400
Arthrochalisique EDS VIIA EDS VIIB	Hypermobilité sévère des articulations avec subluxations récurrentes Luxation congénitale bilatérale des hanches	Hyper-élasticité de la peau Fragilité des tissus Cicatrices atrophiques Contusions fréquentes Hypotonie musculaire Cypho-scoliose Ostéopénie moyenne	Maturation défectueuse de l' amino-pro-peptide de la chaîne $\alpha 1(I)$ (type A) ou $\alpha 2(I)$ (type B) causée par une délétion de l'exon 6 dans COL1A1 ou COL1A2	AD	Rare	130060

Tableau I. Classification des syndromes d'Ehlers-Danlos selon la nouvelle nosologie [1]. AD: autosomique dominant; AR: autosomique récessif; OMIM: on line mendelian inheritance in man.

ténascine C, forme la plus répandue, fortement exprimée durant le développement, particulièrement dans les sites de condensation du mésenchyme, la téna-scine R, dont l'expression est restreinte au système nerveux central et qui aurait un rôle dans la croissance neuronale et le guidage axonal, et la téna-scine X, présente dans les mêmes tissus que la téna-scine C, mais dans des zones distinctes. Du point de vue structural, les téna-scines partagent une organisation commune à base de répétitions de motifs EGF (*epidermal growth factor*) et de modules fibronectine de type III. Les monomères, larges polypeptides d'une masse moléculaire variant de 190 à 300 kDa selon l'isoforme, peuvent s'assembler pour former des structures oligomériques à plusieurs bras, comme l'hexabrachion caractéris-

tique de la téna-scine de type C. Les capacités d'interaction des téna-scines, notamment de la téna-scine C, avec les composés extracellulaires ont été largement étudiées, de même que leurs interactions avec les cellules. Les fonctions de la téna-scine C sont duelles puisque la molécule peut se révéler *in vitro* adhérente ou, au contraire, anti-adhérente selon le type cellulaire. Ces propriétés sont fondamentales car, en fragilisant les interactions cellules/matrices, ces protéines pourraient permettre aux cellules de migrer ou de se diviser [6].

Le syndrome d'Ehlers-Danlos : présentation clinique, nosologie, anomalies génétiques

Le syndrome prit son nom dans les années 1930, après les travaux de deux dermatologues, l'un danois Edward Ehlers (1863-1937), l'autre français Alexandre Danlos (1844-1912), ayant chacun rapporté, au début du XX^e siècle, des cas de patients présentant une hyper-élasticité de la peau. La fréquence de cette maladie pourrait être voisine de 1/5000 naissances, mais reste imprécise, car il existe probablement de nombreux cas infra-cliniques. Cette affection, sans prédisposition ethnique ou raciale, se place, en terme de nombre de patients, comme la troi-

sième affection génétique du tissu conjonctif. La forme classique de cette maladie héréditaire est à transmission autosomique dominante en ce qui concerne les gènes de collagènes I et V mais pourrait être récessive dans le cas du gène de la téna-scine X.

Les symptômes principaux de l'EDS classique sont l'hyper-extensibilité de la peau, la présence de cicatrices atrophiques et l'hypermobilité des articulations. Les mutations sur les gènes de collagène V constituent l'une des causes les plus fréquemment répertoriées de l'EDS classique, forme la plus commune de cette maladie. Dès 1994, des études de liaison génétique chez des patients atteints d'EDS ont permis de mettre en évidence l'importance fonctionnelle de ce collagène pourtant peu abondant dans les tissus [7]. Depuis lors, de nombreuses mutations des gènes de collagène V conduisant à des EDS ont été décrites (Tableau II).

La chaîne $\alpha 1$ du collagène (V), le plus fréquemment, et la chaîne $\alpha 2$ (V) plus rarement, peuvent être affectées [8, 9]. Les mutations sont de nature variée (délétion d'exon, mutation ponctuelle, translocation), et tou-

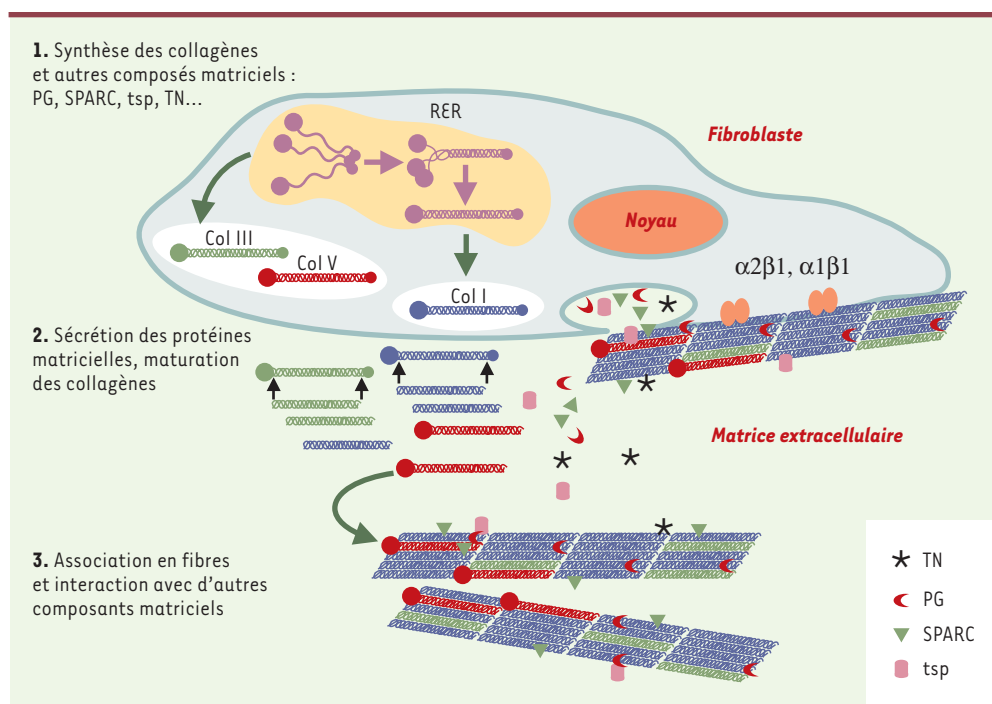


Figure 2. Synthèse des collagènes par les fibroblastes et organisation supramoléculaire des protéines matricielles dans le compartiment extracellulaire. La biosynthèse d'une molécule de procollagène fibrillaire nécessite l'association de trois chaînes par le domaine carboxy-pro-peptidique puis leur enroulement en triple hélice (étape 1). Le pro-collagène formé est alors sécrété dans le compartiment extracellulaire où il est converti en une molécule mature: le collagène (étape 2). Cette étape de maturation est indispensable pour permettre l'association en fibres: la fibrillogenèse (étape 3). Les fibroblastes synthétisent aussi d'autres molécules matricielles, comme les petits protéoglycans (PG), SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*), la thrombospondine (Tsp), qui, en se liant aux fibres de collagène, participent à la fibrillogenèse. RER: réticulum endoplasmique rugueux; Col: collagène; TN: téna-scine.



GÈNE	MUTATION Nature et localisation	DONNÉES CLINIQUES Atteintes autres que cutanées et articulaires	COMMENTAIRES	RÉFÉRENCES
COL5A1	Translocation chromosome 9/chromosome X Interruption dans l'intron 24 Interruption de la triple hélice	Développement retardé Scoliose Hypomélanose d'Ito		[10]
COL5A1	Délétion de 4 pb dans l'intron 65 conduisant à la délétion de l'exon 65 Carboxy-pro-peptide	Accouchement prématuré		[11]
COL5A1	Mutation ponctuelle G/T en 5' d'un site d'épissage. Délétion de l'exon 49 (54 pb) Triple hélice	Cyphoscoliose thoracique moyenne Prolapsus de la valvule mitrale Hypermétropie (cornée aplatie) 1 fausse couche, 1 grossesse à terme	Aspect clinique entre type arthrochlasique et type classique	[12]
COL5A1	Mutation ponctuelle G/C aboutissant à une substitution Cys/Ser en position 1181 Carboxy-pro-peptide Délétion de l'exon 42 Triple hélice Mutation ponctuelle T/A en position -11 sur site d'épissage de l'exon 65 aboutissant au niveau de l'ARNm soit à une insertion de 9 pb soit à une délétion de 45 nucléotides de l'exon 65. Carboxy-pro-peptide	Pour le patient référent: pectus excavatum, scoliose moyenne, pied-bot, varicosité, hernie inguinale Hernie ombilicale Dislocation des hanches Luxation des chevilles		[13]
COL5A1	Mutation ponctuelle T/G au niveau d'un site de branchement d'épissage de l'intron 32 Délétion de l'exon 33 (15 aa) dans 60 % des transcrits Triple hélice		1 ^{re} description d'une mutation dans un site de branchement d'épissage (ariat)	[14]
COL5A2	Mutation ponctuelle G/T dans le site 5' donneur de l'intron 28 Délétion de l'exon 28 Triple hélice Délétion de 7 pb à la jonction intron/exon de l'exon 27 Délétion de l'exon 27 Triple hélice	Pied-bot Pas de signes cliniques d'anomalies oculaire, squelettique ou viscérale Dislocation récurrente des épaules	Effet dominant négatif	[8]
COL5A2	Mutation ponctuelle G/C G934R Triple hélice			[9]
COL5A1	Mutation ponctuelle G/A dans l'exon 58 et mutation ponctuelle G/A dans l'exon 13 Double substitution: G530S et G1489D Petite triple hélice de l' amino-pro-peptide et triple hélice Mutation ponctuelle G/A dans l'exon 58 Substitution G1489D Triple hélice Mutation ponctuelle G/A dans l'exon 13 Substitution G530S Petite triple hélice de l' amino-pro-peptide	Varicosité des jambes Microcornée Microcornée	La mutation sur la partie amino-pro-peptidique entraîne un phénotype discret, mais renforce la gravité du syndrome EDS dû à la mutation sur la triple hélice	[15]
COL5A1	Mutations non-sens dues à l'insertion ou à la délétion d'un nucléotide chez cinq individus différents dans les exons 48, 49, 53, 54 Perte d'hétérozygotie au niveau de l'ARNm qui n'est pas exprimé ou qui est instable. Triple hélice Mutation ponctuelle T/A Omission d'exon 15 Triple hélice		Haplo-insuffisance Pour un cas: les bases moléculaires de l'expression d'un seul allèle restent à déterminer	[16]
COL5A1	Mutation sur le site accepteur d'épissage de l'exon 14 Arrêt de la transcription au niveau de l'exon 17 Triple hélice	4 cas étudiés dans la même famille: • un pectus excavatum • une grossesse normale, une avec rupture prématurée des membranes		[17]

Tableau II. Mutations sur les gènes codant pour le collagène V provoquant un syndrome d'Ehlers-Danlos.

chent principalement la triple hélice et le carboxy-pro-peptide [10-14]. Au sein d'une famille affectée par cette maladie, des mutations dans la partie amino-pro-peptidique ont été également rapportées, mais elles conduisent à un phénotype discret (peau fine, cicatrisation retardée) qui ne peut être apparenté à un EDS classique [15]. Toutefois, cette mutation constitue un facteur aggravant lorsqu'elle est couplée à une autre mutation située dans la partie codant pour la triple hélice, qui, par ailleurs, induit à elle seule un EDS [15]. Dans le cas de l'ostéogénèse imparfaite, une autre maladie héréditaire affectant les tissus osseux et dont les anomalies moléculaires portent sur les chaînes de collagène I, les substitutions au niveau de la glycine, ce petit acide aminé crucial dans la structure en triple hélice de la molécule, sont largement majoritaires et entraînent des phénotypes sévères. Dans l'EDS classique lié au collagène V, il est remarquable que les mutations responsables d'anomalies d'épissage d'introns, sont plus fréquentes et que, dans les quelques cas où un résidu glycine est substitué, le phénotype n'est pas aggravé [9, 15]. Les répercussions de ces mutations au niveau protéique peuvent être quantitatives (haplo-insuffisance ou nombre de molécules diminué) ou qualitatives (protéines anormales produisant un effet dominant négatif), sans que puisse y être associé un degré de gravité [16, 17].

Une quinzaine de cas d'EDS classique, clairement liés au collagène V, ont été rapportés jusqu'ici. Il faudra sans doute que l'échantillonnage soit plus important pour mieux appréhender les relations génotype/phénotype et apprécier au plus juste la participation de ce collagène à l'architecture tissulaire. Il faut aussi garder à l'esprit que l'EDS classique est à transmission dominante et qu'une proportion de molécules intactes reste donc toujours sécrétée. Les biopsies, dont le nombre est bien évidemment limité, apportent peu de renseignements sur la structure des tissus conjonctifs atteints, mais ont permis de montrer que, d'un point de vue ultrastructural, les fibres apparaissent fusionnées, clairsemées, que leurs contours et leurs diamètres sont irréguliers (fibres en « chou-fleur »). Ce diamètre n'est pas systématiquement accru alors que dans les tissus, plus le collagène V est faiblement représenté, plus les fibres sont grosses. Il existe quatre chaînes α de collagène V pouvant s'associer en au moins quatre formes moléculaires différentes: une majoritaire, l'hétérotrimère $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$, et trois minoritaires les isoformes $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$, $[\alpha 1(V)]_2\alpha 4(V)$ et l'homotrimère $[\alpha 1(V)]_3$. Dans plusieurs cas d'EDS classique, il a été montré que les gènes des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène V ne sont pas impliqués dans la maladie. Les gènes des

chaînes $\alpha 3$ ou $\alpha 4$ ont été plus récemment caractérisés [18, 19], et leurs mutations pourraient peut-être rendre compte de quelques cas.

Cependant, les mutations sur le collagène V ne sont certainement pas responsables à elles seules de toute la pathologie classique. Des anomalies moléculaires responsables de ce syndrome ont également été identifiées au niveau de la chaîne $\alpha 1$ du collagène I ou de la ténascine X [20, 21]. Le rôle de la ténascine X dans la genèse de l'EDS reste cependant encore à clarifier car les patients souffrent également d'hyperplasie médullorénaire congénitale. De plus, le phénotype diffère légèrement par rapport aux cas où les collagènes V et I sont impliqués, puisqu'il n'y a pas de cicatrices atrophiques et que les fibres de collagène n'ont pas l'aspect singulier en « chou-fleur » [2]. Une autre étude a confirmé le rôle de la ténascine X dans l'EDS (5 cas sur 151 patients souffrant de cette maladie) et la caractéristique récessive de la transmission de la maladie [22]. L'implication de la ténascine X empêche donc cependant de considérer l'EDS classique comme une maladie strictement liée aux collagènes. Certaines maladies génétiques matricielles comme l'ostéogénèse imparfaite ou le syndrome de Marfan résultent de défauts qui touchent principalement une seule molécule matricielle, en l'occurrence respectivement le collagène I et la fibrilline I (protéine impliquée dans l'élasticité des tissus). Au contraire, l'EDS classique résulte de mutations siégeant sur des gènes de protéines différentes, qui cependant donnent lieu à des manifestations cliniques proches. Ces caractéristiques seraient à rapprocher de celles de l'épidermolyse bulleuse.

Les causes moléculaires de l'EDS classique ne sont pas toutes élucidées, mais les techniques d'inactivation de gène chez la souris orientent les recherches vers des protéines matricielles non collagéniques.

Inactivation de gènes codant pour les protéines matricielles chez la souris et syndrome d'Ehlers-Danlos

Les mutations nulles sur les collagènes I et III sont très rapidement létales chez la souris et n'ont donc pu apporter d'éléments fondamentaux à la connaissance de l'EDS [23-25] (Tableau III). Il n'existe pas encore de modèle de souris dont le gène codant pour le collagène V a été invalidé, mais la lignée porteuse d'une mutation de délétion sur l' amino-télopeptide de la chaîne $\alpha 2(V)$ présente des manifestations cutanées voisines de celles observées dans le syndrome d'Ehlers-Danlos, sans pour autant que le phénotype observé en soit la réplique exacte (pas d'hypermobilité démontrée des articula-

tions) [26]. Quelques équipes, dont la nôtre, s'attachent à étudier en profondeur les répercussions précises de cette mutation sur la fibrillogenèse.

Les souris dont le gène de la ténascine a été invalidé présentent une hyper-extensibilité cutanée progressive s'apparentant à un syndrome d'Ehlers-Danlos. Cette hyper-extensibilité résulterait d'un dépôt plus faible de collagène I dans la matrice, ce qui est en faveur d'un rôle régulateur de la ténascine X dans la synthèse de collagène [27].

Curieusement, chez la souris, les mutations dont les conséquences s'apparentent le plus au phénotype EDS, concernent plutôt des petits protéoglycanes comme la décorine, le lumicane, la fibromoduline et des protéines matricielles, comme SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteines*) et la thrombospondine. La décorine et la fibromoduline, conjointement impliquées dans la régulation du diamètre des fibres *in vitro*, et le lumicane font partie de la famille des petits protéoglycanes riches en leucine, appelés ainsi du fait de la répétition en tandem de tels motifs au sein de leur protéine-cœur. Chez la souris, l'absence de lumicane entraîne une opacité

cornéenne montrant le rôle essentiel de ce protéoglycane dans la transparence de la cornée [28]. La peau de ces souris est anormalement élastique. Dans le cas des souris dont le gène codant pour la fibromoduline a été invalidé, les tendons montrent une laxité particulièrement importante [29]. Ces observations suggèrent une participation de ces deux protéoglycanes à la physiopathogénie du syndrome d'Ehlers-Danlos chez l'homme. Les souris transgéniques, dont le gène codant pour la décorine a été invalidé, ont une peau fragile avec une capacité d'extension réduite [30], ce que confirment des données recueillies dans deux cas isolés d'EDS, pour lesquels des altérations de la synthèse de protéoglycane à dermatane sulfate, et notamment de décorine, ont été décrites [31, 32]. Un phénotype avec des manifestations cutanées, mais surtout articulaires, proche de l'EDS classique, est observé chez les souris dont le gène codant pour la thrombospondine-2 (TSP-2) a été invalidé [33].

Les thrombospondines sont au nombre de 5. Ces macromolécules multimériques résultent de l'association de trois (TSP-1 et TSP-2) ou cinq (TSP-3, 4 et 5) chaînes

GÈNE	SOURIS HOMOZYGOTES ^{-/-}		MALADIES HUMAINES ÉVOQUÉES PAR LE PHÉNOTYPE MURIN	RÉFÉRENCES
	Souche/Génotype	Phénotype		
COL1A1	Mov13	Mutation létale à 14 jours de gestation par rupture des vaisseaux principaux		[23]
	Intégration du virus Monkey Moloney dans l'intron 1	Régulation du diamètre et de l'organisation orthogonale des fibres de la cornée perturbée		
COL1A2	Oim	Mutation entraînant des fractures, des difformités des membres, une ostéopénie généralisée et une petite stature	Ostéogenèse imparfaite modérée à sévère	[24]
COL3A1	Inactivation par recombinaison homologue	Mutation le plus souvent létale par rupture des vaisseaux 2 jours après la naissance. Taux de survie de 5 % au moment du sevrage. Fibres dermiques anormales	Ehlers-Danlos vasculaire	[25]
Décorine	Inactivation par recombinaison homologue	Fibrillogenèse anormale de la peau (fragile et distendue) et des tendons (fibres irrégulières) Pas de défaut dans la cornée	Ehlers-Danlos	[30]
Thrombospondine 2	Inactivation par recombinaison homologue	Peau fragile et distendue, queue flexible (fibres irrégulières) Atteinte des tendons. Augmentation de la densité osseuse Temps de saignement allongé et augmentation du nombre de vaisseaux sanguins	Ehlers-Danlos	[33]
Ténascine C, R, X	Inactivation par recombinaison homologue	Absence de phénotype marquant Ténascine R et C: anomalies subtiles du système nerveux Ténascine X: hyper-élasticité de la peau	Ehlers-Danlos	[27]
Lumicane	Inactivation par recombinaison homologue	Peau fragile et distendue (fibres plus grosses, section irrégulière) Opacification de la cornée (grosses fibres, avec des fusions latérales anormales, accroissement de l'espace inter-fibrillaire)	Ehlers-Danlos Dystrophie cornéenne	[28]

Tableau III. Phénotypes de mutations nulles chez la souris reflétant un syndrome d'Ehlers-Danlos.

polypeptidiques identiques d'une taille d'environ 145 kDa, liées par des ponts disulfures. TSP-1 et TSP-2 sont souvent co-localisées dans la matrice, même si la TSP-2 présente une expression plus restreinte et se retrouve de manière prépondérante dans le cartilage et l'os en développement. TSP-1 et 2 partagent d'ailleurs certaines propriétés, comme l'inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale et sont toutes deux des facteurs chimiotactiques pour de nombreuses cellules. La peau et les tendons des souris dont le gène codant pour la TSP-2 a été invalidé sont hyper-élastiques. La densité des tissus en vaisseaux sanguins est accrue. Il convient donc de rappeler, même si le phénotype n'est pas rigoureusement identique, que les vaisseaux sont également affectés dans l'EDS. Le rôle de la TSP-2 pourrait se situer au niveau cellulaire. Les fibroblastes des animaux dont le gène codant pour la TSP-2 a été invalidé présentent des propriétés de surface altérées, ce qui pourrait modifier leur adhérence aux collagènes et perturber le réseau du tissu conjonctif sous-jacent. Ce pourrait être également le cas pour SPARC, petite glycoprotéine anti-adhérente de 32 kDa, également connue pour sa capacité d'inhiber la prolifération cellulaire. De fait, si son absence provoque originellement des altérations oculaires (cataractes), des symptômes proches de ceux de l'EDS, comme la présence de fibres aberrantes dans la peau, sont également évoqués [34]. Le rôle joué par les interactions cellules/composants matriciels dans la genèse de l'EDS, notamment par l'intermédiaire de récepteurs de surface, est donc une piste à ne pas mésestimer.

L'architecture matricielle à la lueur du syndrome d'Ehlers-Danlos

Il est désormais acquis que le collagène V n'est pas seul responsable de toute la pathologie classique de l'EDS. Des anomalies moléculaires touchant des gènes de familles différentes conduisent donc à un même phénotype, ce qui confirme que la matrice extracellulaire doit bien être considérée comme un ensemble architectural, où plusieurs éléments participent à la genèse d'une fonction.

Il nous paraît intéressant d'évoquer quelques interrogations soulevées par les connaissances actuelles sur le collagène V, les composés matriciels que nous avons évoqués et la présentation clinique de l'EDS.

De nombreuses molécules semblent vouées à la régulation de la croissance des fibres des tissus affectés par l'EDS, fibres qui sont essentiellement composées de collagène I. C'est le cas du collagène V, du collagène III, du lumécane ou encore de la thrombospondine. De plus, toutes ces protéines sont capables d'interagir entre

elles (pour seuls exemples [4, 35]). Pour ajouter à cette complexité, lorsqu'un constituant est défectueux, la présence des autres est modifiée, ce qui laisse supposer que des mécanismes régulateurs d'origine probablement cellulaire sont alors mis en jeu.

Il est également frappant de constater que les mêmes pièces matricielles forment des puzzles aussi différents (Figure 1). Comme nous l'avons déjà fait remarquer, l'os, la cornée, la peau, les tendons, les vaisseaux ont des compositions moléculaires très voisines et des propriétés très différentes. Il existe certes des variations quantitatives des constituants matriciels d'un tissu à un autre, mais elles ne peuvent rendre compte totalement de ces différences. Par exemple, le collagène V est un collagène peu abondant dans la peau et les tendons où il ne représente guère que 2 à 5 % des collagènes fibrillaires alors qu'il en représente environ 15 à 20 % dans la cornée [4]. Or, les manifestations d'EDS classique impliquant ce collagène sont principalement cutanées et articulaires, alors qu'elles sont secondaires ou absentes dans la cornée.

Pourquoi un tissu comme le tendon est affecté lors de l'EDS classique alors que la cornée est indemne? Tout d'abord, rien ne permet d'exclure que les formes moléculaires du collagène V trouvées dans la cornée soient rigoureusement identiques à celles présentes dans le tendon. Il existe différentes isoformes du collagène V qui pourraient assumer des rôles différents, comme le suggèrent nos travaux [36-38]. Compte tenu du profil d'expression de chacune des isoformes, l'hypothèse d'une fonction dépendante du tissu paraît également plausible. Le collagène V pourrait participer à la régulation du diamètre des fibres dans la cornée ou les vaisseaux, mais pourrait avoir un rôle distinct, qui reste encore à déterminer, dans les autres tissus. De plus, il est probable que la contribution du collagène V à la transparence cornéenne ait été mal évaluée lors des approches expérimentales réalisées jusqu'à présent. La transparence résulte de phénomènes complexes. Les protéoglycannes y participent, comme notamment le lumécane [28]. De plus, des données biophysiques sur l'orientation et sur les angles de disposition des molécules au sein des fibres et des études sur les modalités de la fibrillogenèse montrent que ces paramètres varient d'un tissu à un autre [39]. Notamment, les fibres croissent linéairement dans la cornée et latéralement dans le tendon.

Ainsi, même si l'aspect des fibres d'un tissu à un autre semble grossièrement similaire, leur architecture fine et la manière dont elles s'élaborent au cours du développement divergent subtilement et pourraient expliquer que les tissus soient diversement affectés lors des maladies.

Lorsqu'une protéine est défectueuse, le déclenchement de mécanismes compensatoires est mis en évidence dans des maladies liées au collagène comme l'hypochondrogenèse ou l'achondrogenèse, le collagène de type II défectueux étant remplacé plutôt efficacement dans le cartilage par les collagènes I et III [40]. Cette compensation pourrait se produire dans la cornée mais comment expliquer alors qu'elle soit absente dans la peau ou les tendons? Faut-il, comme nous l'avons déjà évoqué, mieux considérer le rôle des cellules souvent spécifiques des tissus? Il est intéressant de noter que des souris porteuses d'une mutation sur la partie amino-pro-peptidique de la chaîne $\alpha 2(V)$ présentent un grand nombre de follicules pileux ayant une disposition ectopique dans l'hypoderme qui, de plus, est six fois plus épais que la normale [26]. Or, la genèse des follicules pileux est un exemple d'école, illustrant le rôle des interactions cellules/matrices. Dans le même ordre d'idée, l'absence de ténascine X chez les souris modifie en retour le dépôt de collagène I par les cellules. Les maladies matricielles doivent donc aussi se concevoir en intégrant l'aspect cellulaire. Plusieurs récepteurs cellulaires ont été identifiés pour le collagène V, mais leur rôle *in vivo* reste à élucider [37, 41-43].

La connaissance des causes moléculaires responsables de l'EDS a beaucoup progressé, mais est loin d'être exhaustive. Il est permis de penser que d'autres protéines aux rôles mal définis, comme les collagènes XII et XIV qui se lient aux fibres collagéniques, pourraient être impliquées. Cette maladie constitue un paradigme illustrant l'intrication complexe des composés matriciels. La connaissance des modalités de leur biosynthèse, de leur agencement, de leurs interactions et de leur coopération étroite et réglée permet d'appréhender comment, à partir d'un même matériau de base, les architectures et les fonctions tissulaires varient. Malheureusement, l'avancée des recherches n'a pas actuellement permis d'apporter d'amélioration significative dans le traitement de la maladie. La prise en charge médicale reste donc symptomatique [44]. Si elles sont évoquées pour des maladies du tissu conjonctif comme l'ostéogenèse imparfaite, les possibilités de thérapie génique, notamment pour les cas sévères d'EDS, comme l'EDS vasculaire, ne semblent pas encore à l'ordre du jour. ♦

SUMMARY

The Ehlers-Danlos syndrome: the extracellular matrix scaffold in question

Ehlers-Danlos syndrome (EDS) is a heterogeneous heritable connective tissue disorder characterized by hyperextensible skin, hypermobile joints and fragile vessels. The molecular causes of this disorder are often, although not strictly, related to collagens and to the enzymes that process these proteins. The classical form of the syndrome, which will be principally discussed in this review, can be due to mutations on collagen V, a fibrillar collagen present in small amounts in affected tissues. However, collagen I and tenascin have also been demonstrated to be involved in the same type of EDS. Moreover gene disruption of several other matrix molecules (thrombospondin, SPARC, small leucine rich proteoglycans...) in mice, lead to phenotypes that mimic EDS and these molecules have thus emerged as new players. As collagen V remains the prime candidate, we discuss, based on fundamental and clinical observations, its physiological role. We also explore its potential interactions with other matrix molecules to determine tissue properties. ♦

RÉFÉRENCES

1. Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup RJ. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. *Am J Med Genet* 1998; 77: 31-7.
2. Steinmann B, Royce PM, Supeti-Furga A. The Ehlers-Danlos syndrome. In: Royce PM, Steinman B, eds. *Connective tissue and its heritable disorders*. New York: Wiley-Liss, 1993: 351-408.
3. Mao JR, Bristow J. The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *J Clin Invest* 2001; 107: 1063-9.
4. Fichard A, Kleman JP, Ruggiero F. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biol* 1995; 14: 515-31.
5. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 2001; 32: 223-37.
6. Erickson HP. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 869-76.
7. Nicholls AC, McCarron SM, Narcisi P, Pope FM. Molecular abnormalities of type V collagen in the Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Hum Genet* 1994; 62: 523-8.
8. Michalickova K, Susic M, Willing MC, Wenstrup RJ, Cole WG. Mutations of the $\alpha 2(V)$ chain of type V collagen impair matrix assembly and produce Ehlers-Danlos syndrome type I. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 249-55.
9. Richards AJ, Martin S, Nicholls AC, Harrison JB, Pope FM, Burrows NP. A single base mutation in COL5A2 causes Ehlers-Danlos syndrome type II. *J Med Genet* 1998; 35: 846-8.
10. Toriello HV, Glover TV, Takahara K, et al. A translocation interrupts the COL5A1 gene in a patient with Ehlers-Danlos syndrome and hypomelanosis of Ito. *Nat Genet* 1996; 13: 361-5.
11. Wenstrup RJ, Langland GT, Willing MC, D'Souza VN, Cole WG. A splice junction mutation in the region of COL5A1 that codes for the carboxyl propeptide of pro- $\alpha 1(V)$ chains results in gravis form of Ehlers-Danlos syndrome (type I). *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1733-6.
12. Nicholls AC, Oliver JE, McCarron S, Harrison JB, Greenspan DS, Pope FM. An exon skipping mutation of a type V collagen gene (COL5A1) in Ehlers-Danlos syndrome. *J Med Genet* 1996; 33: 940-6.
13. De Paepe A, Nuytinck L, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Naeyaert JM. Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 547-54.
14. Burrows NP, Nicholls AC, Richards AJ, et al. A point mutation in an intronic branch site results in aberrant splicing of COL5A1 and in Ehlers-Danlos syndrome type II in two British families. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 390-8.

15. Giunta C, Steinmann B. Characterization of 11 new mutations in COL5A1 of individuals with Ehlers-Danlos syndrome type IV: preliminary comparison of RNase cleavage, EMC and DHPLC assays. *Hum Mutat* 2000; 16: 176-7.
16. Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH. Null alleles of the COL5A1 gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1757-65.
17. Bouma P, Cabral WA, Cole WG, Marini JC. COL5A1 exon 14 splice acceptor mutation causes a functional null allele, haploinsufficiency of $\alpha 1(V)$ and abnormal heterotypic interstitial fibrils in Ehlers-Danlos syndrome II. *J Biol Chem* 2001; 276: 13356-64.
18. Imamura Y, Scott IC, Greenspan DS. The pro- $\alpha 3(V)$ collagen chain. Complete primary structure, expression domains in adult and developing tissues, and comparison to the structures and expression domains of the other types V and XI procollagen chains. *J Biol Chem* 2000; 275: 8749-59.
19. Chernousov MA, Rothblum K, Tyler WA, Stahl RC, Carey DJ. Schwann cells synthesize type V collagen that contains a novel $\alpha 4$ chain. Molecular cloning, biochemical characterization, and high affinity heparin binding of $\alpha 4(V)$ collagen. *J Biol Chem* 2000; 275: 28208-15.
20. Nuytinck L, Freund M, Lagae L, Pierard GE, Hermanns-Le T, De Paepe A. Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1398-402.
21. Burch GH, Gong Y, Liu W, et al. Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. *Nat Genet* 1997; 17: 104-8.
22. Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, et al. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N Engl J Med* 2001; 345: 1167-75.
23. Lohler J, Timpl R, Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell* 1984; 38: 597-607.
24. Chipman SD, Sweet HO, Davison MT, et al. Defective pro $\alpha 2(I)$ collagen synthesis in a recessive mutation in mice: a model of human osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1705-5.
25. Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1852-6.
26. Andrikopoulos K, Liu X, Keene DR, Jaenisch R, Ramirez F. Targeted mutation in the *col5a2* gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. *Nat Genet* 1995; 9: 31-6.
27. Mao JR, Taylor G, Dean WB, et al. Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat Genet* 2002; 30: 421-5.
28. Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 1998; 141: 1277-86.
29. Svensson L, Aszodi A., Reinholt FP, Fassler R, Heinegard D, Oldberg A. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem* 1999; 274: 9636-47.
30. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997; 136: 729-43.
31. Fushimi H, Kameyama M, Shinkai H. Deficiency of the core proteins of dermatan sulphate proteoglycans in a variant form of Ehlers-Danlos syndrome. *J Intern Med* 1989; 226: 409-16.
32. Quentin E, Gladen A, Roden L, Kresse H. A genetic defect in the biosynthesis of dermatan sulfate proteoglycan: galactosyltransferase I deficiency in fibroblasts from a patient with a progeroid syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1342-6.
33. Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, et al. Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol* 1998; 140: 419-30.
34. Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 2001; 107: 1049-54.
35. Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chervoneva I, Birk DE. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol* 2000; 151: 779-88.
36. Fichard A, Tillet E, Delacoux F, Garrone R, Ruggiero F. Human recombinant $\alpha 1(V)$ collagen chain. Homotrimeric assembly and subsequent processing. *J Biol Chem* 1997; 272: 30083-7.
37. Delacoux F, Fichard A, Geourjon C, Garrone R, Ruggiero F. Molecular features of the collagen V heparin binding site. *J Biol Chem* 1998; 273: 15069-76.
38. Chanut-Delalande H, Fichard A, Bernocco S, Garrone R, Hulmes DJ, Ruggiero F. Control of heterotypic fibril formation by collagen V is determined by chain stoichiometry. *J Biol Chem* 2001; 276: 24352-9.
39. Scott JE, Thomlinson AM. The structure of interfibrillar proteoglycan bridges (shape modules) in extracellular matrix of fibrous connective tissues and their stability in various chemical environments. *J Anat* 1998; 192: 391-405.
40. Mundlos S, Chan D, McGill J, Bateman JF. An $\alpha 1(II)$ Gly913 to Cys substitution prevents the matrix incorporation of type II collagen which is replaced with type I and III collagens in cartilage from a patient with hypochondrogenesis. *Am J Med Genet* 1996; 63: 129-36.
41. Ruggiero F, Comte J, Cabanas C, Garrone R. Structural requirements for $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrin mediated cell adhesion to collagen V. *J Cell Sci* 1996; 109: 1865-74.
42. Tillet E, Ruggiero F, Nishiyama A, Stallcup WB. The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *J Biol Chem* 1997; 272: 10769-76.
43. Vogel W, Brakebusch C, Fassler R, Alves F, Ruggiero F, Pawson T. Discoidin domain receptor 1 is activated independently of $\beta (1)$ integrin. *J Biol Chem* 2000; 275: 5779-84.
44. De Paepe A. The Ehlers-Danlos syndrome: a heritable collagen disorder as cause of bleeding. *Thromb Haemost* 1996; 75: 379-86.

TIRÉS À PART
F. Ruggiero