

Proposition de Doctorat

A l'Institut de Chimie Physique (CNRS 8000)

Equipe CAPRI (Chimie Analytique, Physico-Chimie et Réactivité des Ions)

Recherche de peptides biomarqueurs de l'arthrose dans le liquide synovial

L'arthrose est une maladie articulaire dégénérative répandue, affectant 10-20 % de la population de plus de 50 ans. Elle est caractérisée par une altération de la structure entière de l'articulation, comprenant entre autres une dégradation progressive du cartilage ainsi qu'une inflammation de la membrane synoviale (Eveque-Mourroux et al. 2020). A ce jour, il n'existe pas de traitement de l'arthrose si ce n'est le recours aux analgésiques. Afin de pouvoir mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et de proposer une thérapie, il est primordial de rechercher des biomarqueurs adéquats permettant son diagnostic précoce ainsi qu'un suivi de sa progression avec le temps. L'intérêt est porté sur le liquide synovial, comme étant le compartiment où de tels biomarqueurs sont potentiellement présents (Kamphorst et al. 2007), puisque site des changements pathologiques dans les articulations.

Dans le processus de l'arthrose, le collagène de type II, quasi-spécifique au cartilage, est dégradé, en particulier, en peptide « coll2-1 » de séquence HRGYPGLDG (Billinghurst, et al. 1997), identifiée empiriquement et reconnue par un anticorps spécifique. Ce peptide joue un rôle important dans le suivi de la dégradation du cartilage (Henrotin et al. 2007). En effet, des teneurs élevées en coll2-1 ont été retrouvées dans le sérum de patients humains atteints d'arthrose ainsi que dans les phases précoces de l'arthrose des cochons d'Inde développant spontanément cette maladie (Lambert et al. 2019). Une étude in-vivo originale a mis en évidence le rôle du coll2-1 à induire une inflammation synoviale chez les rats, renforçant son implication dans la physiopathologie de l'arthrose et ainsi son rôle potentiel comme biomarqueur de cette maladie dégénérative (Lambert et al. 2019). De plus, la recherche du coll2-1 mais aussi des formes de coll2-1 ayant subi des modifications post-traductionnelles (PTM) revêt une importance majeure. En exemple, le ratio du coll2-1 et de sa forme nitrée (coll2-1 NO₂) se révèle être plus élevé chez les patients atteints d'arthrose des mains que chez les témoins (Punzi et al. 2012), et montre ainsi l'impact des dommages oxydatifs dans la physiopathologie du cartilage. Ceci corrobore les études démontrant que la nature et l'abondance des peptides modifiés du collagène sont reliés aux changements pathologiques de maladies (van Huizen et al. 2020), et à ce jour les PTM du coll2-1 sont en grande partie encore méconnues.

A notre connaissance, les seules méthodes analytiques développées à ce jour, pour le coll2-1 ainsi que de sa forme nitrée coll2-1 NO₂, sont des méthodes immuno-enzymatiques (Billinghurst et al. 1997). L'action des enzymes de la matrice extracellulaire fait apparaître au sein du liquide articulaire de nombreux peptides comprenant la séquence HRGYPGLDG. Les méthodes immunologiques utilisées jusqu'à maintenant ne sont pas capables de les identifier ainsi que leurs PTM. Ce projet de doctorat a pour objectif l'identification et de quantification absolue des peptides de la famille du « coll2-1 » ainsi que les peptides résultants de leur PTM, dans les échantillons biologiques, par le couplage de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Plusieurs approches pourront

être envisagées pour l'identification, de la digestion *in-silico* afin de prédire les séquences peptidiques de la « famille du coll 2-1 », à la digestion *in vitro* du collagène II et à l'extraction par immunoaffinité des peptides de la « famille coll2-1 » d'échantillons de liquides articulaires de patients atteints d'arthrose (collaboration U INSERM 1124, hôpital Cochin, Paris).

L'analyse qualitative et quantitative des peptides de la « famille du coll2-1 » nous permettra de confirmer ou d'infirmer quels peptides de cette famille constituent non seulement un(des) biomarqueur(s) de la dégradation du cartilage mais également de l'arthrose, permettant le contrôle de sa progression et son suivi thérapeutique (Henrothin et al. 2017).

Research for osteoarthritis biomarker peptides in synovial fluid

Osteoarthritis is a widespread degenerative joint disease, affecting 10-20% of the population over 50 years old. It is characterized by an alteration of the entire structure of the joint, including, among other things, progressive degradation of the cartilage as well as inflammation of the synovial membrane (Eveque-Mourroux et al. 2020). To date, there is no treatment for osteoarthritis other than the use of analgesics. In order to better understand the pathophysiology of this disease and to propose therapy, it is essential to search for adequate biomarkers allowing its early diagnosis as well as monitoring its progression over time. Interest is focused on the synovial fluid, as being the compartment where such biomarkers are potentially present (Kamphorst et al. 2007), since it is the site of pathological changes in the joints.

In the process of osteoarthritis, type II collagen, almost specific to cartilage, is degraded, in particular, into the "coll2-1" peptide with the sequence HRGYPGLDG (Billinghurst, et al. 1997), identified empirically and recognized by a specific antibody. This peptide plays an important role in monitoring cartilage degradation (Henrothin et al. 2007). Indeed, high levels of coll2-1 have been found in the serum of human patients with osteoarthritis as well as in the early phases of osteoarthritis in guinea pigs spontaneously developing this disease (Lambert et al. 2019). An original *in-vivo* study highlighted the role of coll2-1 in inducing synovial inflammation in rats, reinforcing its involvement in the pathophysiology of osteoarthritis and thus its potential role as a biomarker of this degenerative disease (Lambert et al. 2019). In addition, the search for coll2-1 but also forms of coll2-1 having undergone post-translational modifications (PTM) is of major importance. For example, the ratio of coll2-1 and its nitrated form (coll2-1 NO₂) turns out to be higher in patients with hand osteoarthritis than in controls (Punzi et al. 2012), and thus shows the impact of oxidative damage in the pathophysiology of cartilage. This corroborates studies demonstrating that the nature and abundance of modified collagen peptides are linked to pathological changes in diseases (van Huizen et al. 2020), and to date the PTMs of coll2-1 are largely still unknown.

To our knowledge, the only analytical methods developed to date, for coll2-1 as well as its nitrated form coll2-1 NO₂, are immuno-enzymatic methods (Billinghurst et al. 1997). The action of extracellular matrix enzymes causes numerous peptides comprising the HRGYPGLDG sequence to appear within the joint fluid. The immunological methods used until now are not capable of identifying them and their PTMs. This doctoral project aims to identify and absolutely quantify peptides of the "coll2-1" family as well as the peptides resulting from their PTM, in biological samples, by coupling liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Several approaches could be considered for identification, from *in-silico* digestion to predict the peptide sequences of the "coll 2-1 family", to *in vitro* digestion of collagen II and immunoaffinity extraction of peptides from the "coll2-1 family" from joint fluid samples from patients with osteoarthritis (collaboration with U INSERM1124, Cochin hospital, Paris).

The qualitative and quantitative analysis of the peptides of the “coll2-1 family” will allow us to confirm or refute which peptides of this family constitute not only biomarker(s) of cartilage degradation but also of cartilage degradation. osteoarthritis, allowing control of its progression and therapeutic monitoring (Henrothin et al. 2017).

Direction de la thèse : Pr Marie-Claude Menet

Co-encadrement de la thèse : Dr Ninette Aboud-Mrad

Contacts : ninette.abou-mrad@universite-paris-saclay.fr & marie-claude.menet@universite-paris-saclay.fr

Références

- Billingham, R.C., ..., Van Wart H., and Robin Poole A. 1997. “Enhanced Cleavage of Type II Collagen by Collagenases in Osteoarthritic Articular Cartilage” . *The Journal of Clinical investigation* 99 (7): 1534–1545.
- Eveque-Mourroux, M.R., Rocha B., Barré F.P.Y., Heeren R.M.A., and Cillero-Pastor B. 2020. “Spatially Resolved Proteomics in Osteoarthritis: State of the Art and New Perspectives.” *Journal of Proteomics* 215: 103637.
- Henrothin, Y., Lambert C., Borderie D., and Rannou F. 2017. *United States Patent Application Publication US 2017/0320939 A1*.
- Henrotin, Y., Addison S., Kraus V., and Deberg M. 2007. “Type II Collagen Markers in Osteoarthritis: What Do They Indicate?” *Current Opinion in Rheumatology* 19 (5): 444–50.
- van Huizen, N. A., Ijzermans J. N. M., Burgers P. C., and Luider T. M. 2020. “Collagen Analysis with Mass Spectrometry.” *Mass Spectrometry Reviews* 39 (4): 309–35.
- Kamphorst, J. J., van der Heijden R., DeGroot J., Lafeber F. P. J. G., Reijmers T. H., van El B., Tjaden U. R., van der Greef J., and Hankemeier T. 2007. “Profiling of Endogenous Peptides in Human Synovial Fluid by NanoLC-MS: Method Validation and Peptide Identification.” *Journal of Proteome Research* 6 (11): 4388–96.
- Lambert, C., Borderie D., Dubuc J. E., Rannou F., and Henrotin Y. 2019. “Type II Collagen Peptide Coll2-1 Is an Actor of Synovitis.” *Osteoarthritis and Cartilage* 27 (11): 1680–91.
- Punzi, L., Ramonda R., Deberg M., Frallonardo P., Campana C., Musacchio E., and Henrotin Y. 2012. “Coll2-1 , Coll2-1NO2 and Myeloperoxidase Serum Levels in Erosive and Non-Erosive Osteoarthritis of the Hands.” *Osteoarthritis and Cartilage* 20 (6): 557–61.