



Rôle de la fibrilline-1 dans la fonction cardiovasculaire au cours du vieillissement : signalisation de la fibrilline-1 dans les cellules endothéliales humaines et exploration structurale et fonctionnelle chez les souris Fbn-1+/mgΔ.

Boubacar Mariko

► To cite this version:

Boubacar Mariko. Rôle de la fibrilline-1 dans la fonction cardiovasculaire au cours du vieillissement : signalisation de la fibrilline-1 dans les cellules endothéliales humaines et exploration structurale et fonctionnelle chez les souris Fbn-1+/mgΔ.. Physiologie [q-bio.TO]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00711832

HAL Id: tel-00711832

<https://theses.hal.science/tel-00711832>

Submitted on 26 Jun 2012

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

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

Thèse de Doctorat d'Université

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1

Discipline : Physiologie-Physiopathologie-Pharmacologie

Par

Boubacar MARIKO

Rôle de la fibrilline-1 dans la fonction cardiovasculaire au cours du vieillissement : signalisation de la fibrilline-1 dans les cellules endothéliales humaines et exploration structurale et fonctionnelle chez les souris Fbn-1+/mgΔ.

Soutenue publiquement le 29 Mai 2009

devant le jury composé de:

Dr Marie-Paule JACOB
Dr Pascal SOMMER
Pr Jean-Pierre SAVINEAU
Pr Pierre-Simon JOUK
Dr Philippe HUBER
Pr Gilles FAURY

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur (Président du Jury)
Examineur
Examineur - Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du laboratoire
Physiopathologies Vasculaires : Interactions cellulaires, signalisation et vieillissement
(INSERM-U882)
Directeur : Dr Philippe Huber
Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant
Commissariat à l'Energie Atomique – GRENOBLE

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse : Marie-Paule Jacob, Pascal Sommer, Jean-Pierre Savineau, Pierre-Simon Jouk, Philippe Huber et Gilles Faury

Je remercie Gilles Faury d'avoir accepté de m'encadrer, pour tous les conseils qu'il m'a prodigués, mais aussi pour m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux dans des congrès internationaux et d'élaborer un réseau collaboratif aussi enrichissant que varié et enfin pour m'avoir donné l'opportunité de m'initier à l'enseignement à l'Université.

Merci à Philippe Huber de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses conseils scientifiques qui ont été très utiles.

Merci à Stéphanie Bouillot, Francine et Adeline pour l'aide technique qu'elles m'ont apportée pendant la thèse et pour leur soutien précieux pendant les derniers mois de la thèse.

Grand merci à Mylène qui m'a transmis son savoir-faire en physiologie malgré l'urgence de la fin de sa thèse. Merci également à Yann et Bastien pour leur soutien et leur amitié.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire qui m'ont soutenu scientifiquement et moralement tout au long de la thèse, en particulier Marie-Hélène, Isabelle, Daniel et Anne-Sophie ainsi que Christine pour sa patience dans les démarches administratives et pour ses conseils. Merci également aux animaliers pour leur disponibilité.

Ce travail étant le fruit de plusieurs collaborations au niveau national et international, je tiens à remercier tous ceux qui y ont contribué de près ou de loin.

Je remercie les gouvernements maliens et français d'avoir financé ces travaux.

Je ne peux oublier de remercier mes amis Amadou, Cheick, et Malal pour leurs conseils et encouragements ainsi que les membres de l'association « Niogon Démé » en particulier son président Marc Buonomo, Béatrice Bossé et sa famille, le personnel de l'UJF de Valence, pour l'accueil qu'ils m'ont réservé dès mon arrivée en France.

Je ne saurais terminer sans remercier mes deux parents qui n'ont ménagé aucun effort pour que je puisse mener à bout mes études et qui ont été pour moi un soutien infailible. Je leur dédie ce travail.

Table des matières

Abréviations	4
I. INTRODUCTION	5
I.1. Le système vasculaire	6
I.1.1. Evolution.....	6
I.1.2 Structure des artères.....	6
I.1.3 Rôle mécanique des artères	8
I.1.4 Relation structure-fonction dans la paroi artérielle.....	10
I.2. Les fibres élastiques	11
I.2.1. Les composants des fibres élastiques	12
I.2.1.1 L'élastine.....	14
I.2.1.1.1 Synthèse et sécrétion de la tropoélastine.....	15
I.2.1.1.2. Assemblage de la tropoélastine	15
I.2.1.2. Les microfibrilles.....	16
I.2.1.2.1. Les fibrillines.....	18
I.2.1.2.1.1 Régulation spatio-temporelle de l'expression des fibrillines	20
I.2.1.2.1.2. Synthèse et sécrétion des fibrillines dans l'espace extracellulaire	21
I.2.1.3. Assemblage des microfibrilles.....	21
I.2.1.3.1. Auto-Assemblage des fibrillines	22
I.2.1.3.2. Formation des liaisons croisées	22
I.2.1.3.3. Maturation des microfibrilles.....	23
I.2.1.3.3.1. Les principes	23
I.2.1.3.3.2. Protéines associées aux microfibrilles.....	23
I.2.2. Assemblage des fibres élastiques.....	26
I.3. Rôle des composants des fibres élastiques dans la signalisation cellulaire	27
I.3.1. Rôle des peptides dérivés de l'élastine	28
I.3.2. Rôle des microfibrilles et de leurs composants associés	29

I.3.2.1. Rôle de la fibrilline-1.....	30
I.4. Altérations des fibres élastiques	33
I.4.1. Altérations génétiques des fibres élastiques	33
I.4.1.1. L'élastine.....	33
I.4.1.1.1. La SVAS	33
I.4.1.1.2. Syndrome de Williams-Beuren (SWB).....	34
I.4.1.1.3. Le cutis laxa	38
I.4.1.1.4. Modèles de souris déficientes en élastine	38
I.4.1.2. Pathologies liées à une anomalie touchant un composant des microfibrilles.....	40
I.4.1.2.1. Les fibulines	40
I.4.1.2.2. Les LTBP's	41
I.4.1.2.3. Fibrilline-1 (fibrillinopathies)	42
I.4.1.2.3.1. Anévrisme et dissection de l'aorte thoracique	43
I.4.1.2.3.2. Le syndrome de Marfan	45
I.4.1.2.3.3. Modèles de souris portant une mutation de la fibrilline-1	49
I.5. Le vieillissement vasculaire	54
I.6. Présentation du sujet de thèse	59
II. RESULTATS.....	62
II.1. Article 1: Microfibrils and fibrillin-1 induce integrin-mediated signalling, migration and proliferation in human endothelial cells	63
II.1.1. Introduction de l'article 1.....	63
II.1.2. Article 1	65
II.1.3. Résultats supplémentaires de l'article 1	101
II.1.4. Discussion de l'article 1	103
II.2. Article 2: Fibrillin-1 genetic deficiency modifies arterial physiology and morphology during aging in mice.....	106
II.2.1. Introduction de l'article 2.....	106
II.2.2. Article souris 2	108
II.2.3. Discussion de l'article 2	146

II.2.4. Résultats complémentaires sur l'artère pulmonaire et l'aorte abdominale.....	149
II.2.4.1. L'artère pulmonaire.....	149
II.2.4.1.1. Histologie de la paroi de l'artère pulmonaire	149
II.2.4.1.2. Paramètres biomécaniques de l'artère pulmonaire gauche.....	151
II.2.4.1.3. Dosage de desmosine et d'hydroxyproline	154
II.2.4.2. L'aorte abdominale	154
II.2.4.2.1. Paramètres biomécaniques de l'aorte abdominale	154
II.2.4.3. Discussion des résultats complémentaires sur l'artère pulmonaire et l'aorte abdominale	156
III. DISCUSSION	158
III.1. La fibrilline-1 est un signal déterminant dans la morphogenèse artérielle.	160
III.2. Effet-dose de la quantité de fibrilline-1 synthétisée sur la morphogenèse artérielle.	164
III.3. La déficience en fibrilline-1 altère le cours normal du vieillissement vasculaire et conduit à un vieillissement artériel pathologique.....	165
III.4. Contribution de la déficience en fibrilline-1 dans la pathogenèse du syndrome de Marfan..	169
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	172
IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	176
V. ANNEXES	214
V.1. Article annexe 1.....	215
V.2. Article annexe 2.....	216

Abréviations

BMP: *Bone Morphogenetic Factor*

cbEGF: *Calcium binding EGF domain.*

EMILIN : *Elastin-Microfibril Interface Located ProteIN.*

IGF : *Insulin-like Growth Factor.*

LOX : *Lysyl OXydase.*

EGF: *Epidermal Growth Factor*

LLC : *Large Latent Complex.*

LTBP : *Latent TGF beta Binding Protein.*

MAGP : *MicroFibril-Associated Glycoprotein.*

MFAP: *Microfibrils Associated Protein.*

MMP : *Matrix MetalloProteinase*

MT-MMP : *Membrane-Type MMP.*

NO : *Nitric Oxyde.*

RGD : *Arginin - Glycin - Aspartate.*

TB: *TGF beta Binding domain.*

TGF beta : *Transforming Growth Factor beta*

I. INTRODUCTION

I.1. Le système vasculaire

I.1.1. Evolution

L'évolution des espèces animales s'est opérée de pair avec une adaptation au milieu dans lequel ces espèces vivent. Chez les organismes unicellulaires et pluricellulaires primitifs, la petite taille permet le contact, donc des échanges directs ou semi-directs, entre le milieu intracellulaire et l'environnement. Mais, au cours de l'évolution, les cellules se sont associées pour augmenter leur efficacité fonctionnelle, donnant naissance à des organismes plus gros comme les animaux et les plantes. La taille de ces organismes a rendu impossible les échanges directs de substances vitales (nutriments, oxygène...) entre les cellules internes profondes et le milieu environnant. En réponse à cela s'est progressivement mis en place le système circulatoire, un réseau vasculaire permettant le transport de substances sur une longue distance entre les cellules internes et les zones spécialisées dans les échanges avec le milieu extérieur. Ce système a évolué pour donner naissance à un réseau de vaisseaux plus large avec de nombreuses ramifications, augmentant ainsi considérablement la résistance hémodynamique. La mobilisation des fluides circulatoires (sang ou hémolymphe) a été rendue possible par la différenciation progressive de portions vasculaires contractiles ou par l'apparition d'un organe qui joue le rôle de pompe : le cœur (Faury G et al. 2001).

I.1.2 Structure des artères

A proximité du cœur, les grosses artères (ou artères élastiques) matures sont organisées en trois couches ou tuniques disposées de manière concentrique. De la lumière vers l'extérieur, sont présentes : l'intima, la média et l'adventice.

- a) **L'intima** : Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (l'endothélium), recouvrant la surface intérieure du vaisseau, qui repose sur une membrane basale, composée principalement de collagène IV, et de la limitante élastique interne. Cette dernière sépare l'intima de la tunique sous-jacente, la média.
- b) **La média** : Elle est composée de cellules musculaires lisses disposées en couches concentriques séparées par des lames élastiques (ou fibres élastiques). Les fibres élastiques sont des ensembles macromoléculaires dont les principaux composants sont l'élastine (90 %) et les microfibrilles. Une description plus exhaustive des fibres élastiques sera faite plus tard. L'ensemble formé par une couche de cellules

musculaires lisses et la lame élastique à laquelle ces cellules sont attachées est appelé unité lamellaire. Des fibres de collagène et des microfibrilles parsemées entre les cellules musculaires lisses sont aussi présentes. La limitante élastique externe sépare la média de l'adventice.

- c) **L'adventice :** C'est la tunique extérieure. Elle est composée de collagènes principalement, de microfibrilles, de fibroblastes, et de petits vaisseaux nourriciers appelés *vasa vasorum* (vaisseau des vaisseaux).

Cette organisation structurale varie le long de l'arbre vasculaire. Des différences sont visibles au niveau de l'épaisseur, de la composition et même de l'absence de certaines tuniques et dépendent de la position du vaisseau sanguin par rapport au cœur. Ainsi les grosses artères proximales sont plus riches en protéines résilientes (artères élastiques) et comportent peu de cellules musculaires lisses alors que la proportion s'inverse pour les artères plus distales (artères musculaires) dont le diamètre est plus petit (figure 1).

Dans les artérioles (structures artérielles les plus distales qui précèdent les capillaires), l'adventice est absente et la média est représentée par une seule couche de cellules musculaires lisses. Les grosses veines ont à peu près la même structure que les artères avec l'exception que les tuniques (média et adventice) sont moins épaisses avec une emphase sur la média. Dans les veines, on trouve de plus des valves qui empêchent le retour du sang veineux.

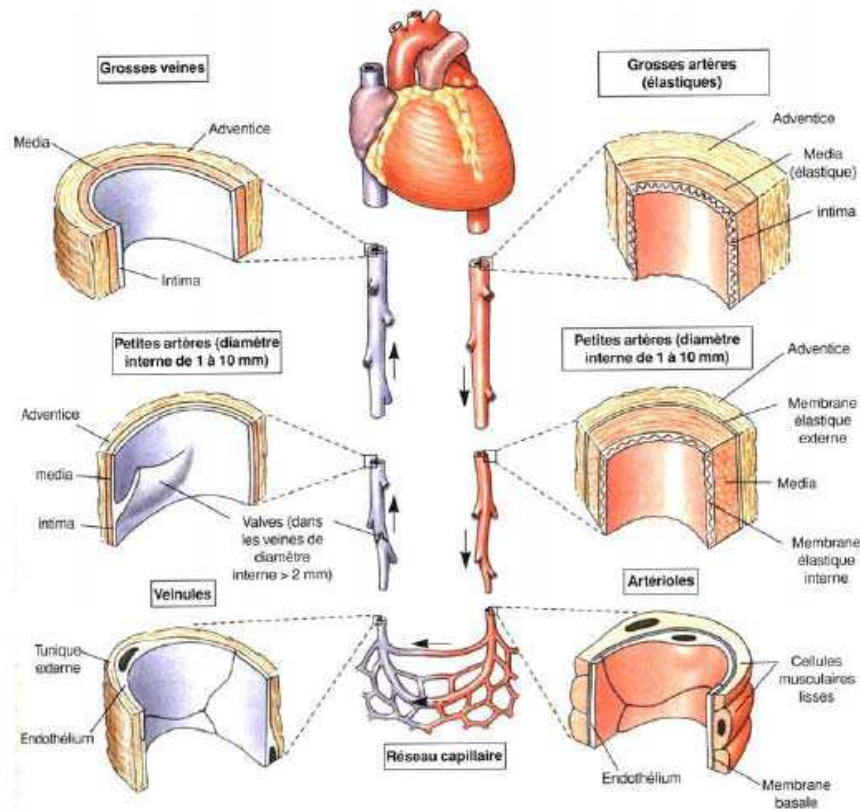


Figure 1: Organisation de la paroi des vaisseaux le long de l'arbre vasculaire. D'après Physiologie Animale, Ed De Boeck.

1.1.3 Rôle mécanique des artères

Le système cardiovasculaire peut être compris, d'un point de vue simpliste, comme étant un ensemble formé d'une pompe (le cœur) relié à un tuyau comportant des ramifications (l'arbre vasculaire). Le cœur a un fonctionnement pulsatile, éjectant le sang de manière discontinue pendant sa phase de contraction appelée systole et se remplissant pendant sa phase de relaxation ou diastole. Les organes ont besoin d'une perfusion continue pour satisfaire leur besoin en substances vitales (nutriments, oxygène...) et pour éliminer les déchets. Ce besoin ne serait pas satisfait si les vaisseaux sanguins qui font le lien entre le cœur et les organes se comportaient comme de simples tuyaux « statiques ». Les grosses artères élastiques, les plus proches du cœur, se distendent pendant la systole pour absorber le surplus de sang (volume d'éjection sanguin) et stockent ainsi de l'énergie. Cette énergie est restituée pendant la diastole et les artères compressent le sang (pression diastolique élevée) en permettant le maintien d'un flux sanguin en diastole. La pression sanguine est très élevée dans le ventricule gauche en systole et subit de très fortes fluctuations au cours du cycle cardiaque (120 mm Hg pendant la systole contre 5 mm Hg pendant la diastole chez l'Homme). Cette

fluctuation s'atténue très fortement dans l'aorte (120 mm Hg pendant la systole contre 80 mm Hg pendant la diastole chez l'Homme) ainsi que dans les artères proximales du fait de leurs propriétés élastiques, et disparaît dans les artérioles et les capillaires qui se trouvent à l'extrémité du réseau vasculaire (figure 2). Ce fonctionnement des grosses artères proximales fait que la pression sanguine dans les artères ne diminue pas trop brusquement lorsque le cœur ne pompe plus de sang (pendant la diastole) et assure ainsi une perfusion continue des organes. Le phénomène mécanico-physiologique responsable de ce lissage du flux sanguin est connu sous le nom d'effet de Windkessel. Il a lieu principalement dans les artères élastiques proches du cœur très riches en protéines résilientes, qui sont à l'origine de cette fonction, et est altéré par des réflexions d'ondes de pression générées par le cœur.

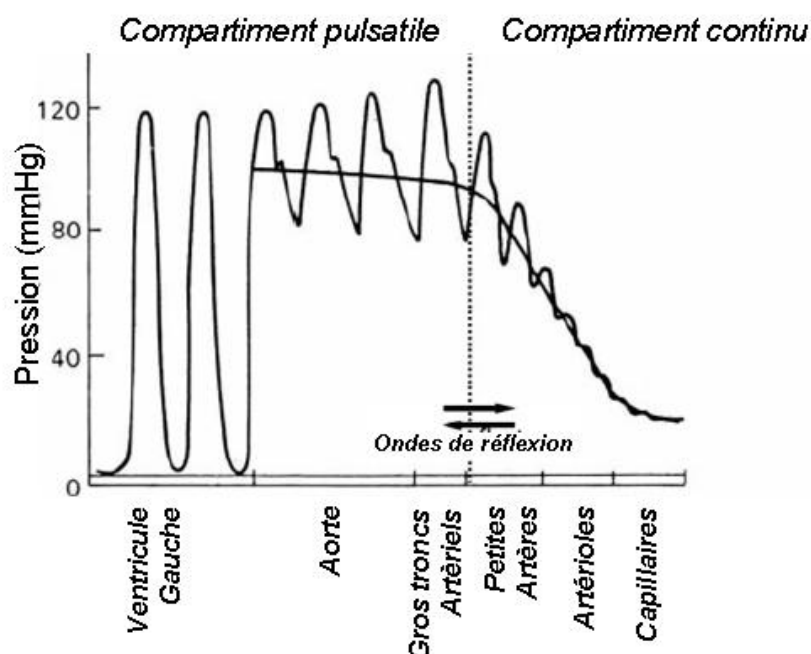


Figure 2: *Représentation de l'oscillation de pression et de la pression artérielle moyenne le long de l'arbre vasculaire.* D'après Safar et Boudier, 2005.

Les artères distales et de faible calibre participent peu à cette fonction de lissage du flux sanguin, mais répartissent le sang dans les différentes parties de l'organisme par une dilatation ou une constriction active.

1.1.4 Relation structure-fonction dans la paroi artérielle

La structure des vaisseaux sanguins joue un rôle essentiel dans la fonction mécanique de ces derniers. L'endothélium agit sur les cellules musculaires lisses en modulant leur contractilité par l'action des substances vasomotrices qu'il sécrète. Son action est plus visible au niveau des artères musculaires où il module la résistance périphérique qui peut avoir une action directe sur l'ensemble du système cardiovasculaire sur le court et le long terme. La media et l'adventice sont les responsables directs des propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins. La média distribue la tension appliquée à la paroi vasculaire par la pression sanguine. Cette répartition de la tension est telle que la charge portée par chaque lame élastique est la même. Plus la tension subie par un vaisseau sanguin est grande, plus le nombre de lames élastiques est élevé. L'adventice, riche en collagènes, limite l'extensibilité des vaisseaux sanguins et contribue ainsi à la protection contre la rupture de la paroi vasculaire.

Les vaisseaux sanguins ont des propriétés élastiques non linéaires, c'est-à-dire qu'ils deviennent plus rigides lorsqu'ils se distendent. Ces propriétés très importantes pour la fonction des grosses artères sont dues à la mise en jeu concomitante des fibres élastiques - l'élastine surtout, mais aussi partiellement des microfibrilles (Lillie MA et al. 1999) et des collagènes qui sont les principaux constituants respectivement de la media et l'adventice. L'élastine est une protéine très extensible avec un module élastique aux alentours de 0,4 MPa. Elle est présente en très grande quantité dans les artères élastiques (plus de 50% du poids sec dans l'aorte) et constitue le principal composant des lames élastiques dans les vaisseaux sanguins. Les collagènes sont, contrairement à l'élastine, très peu extensibles (10% d'extension au maximum) avec un module élastique de 1GPa, plusieurs centaines de fois plus élevé que celui de l'élastine. Le rapport élastine/collagènes est un indicateur de l'élasticité d'un vaisseau sanguin. Plus ce rapport est élevé, plus le vaisseau est distensible.

La contribution de l'élastine et des collagènes dans l'élasticité non linéaire des artères a été mise en évidence par Roach et Burton (Roach MR et Burton AC 1957). En digérant sélectivement l'un ou l'autre de ces deux éléments dans les artères humaines, ils ont montré que la rigidité initiale (à faible extension) de la paroi artérielle représente l'élasticité de l'élastine, alors que la rigidité plus forte pour des extensions plus élevées représente la contribution des fibres de collagènes qui se tendent progressivement et limitent l'extension du vaisseau (figure 3). Les fibres de collagènes sont disposées de manière non organisée dans la média et l'adventice des vaisseaux à faible pression. A proximité de la pression sanguine

physiologique, les fibres de collagène de la média se distendent et s'alignent circonférentiellement. A des pressions sanguines plus élevées, de plus en plus de fibres de collagène de l'adventice sont aussi recrutées ce qui contribue à la protection contre l'altération ou la rupture de la paroi artérielle.

Dans les grosses artères élastiques, les cellules musculaires lisses participent peu aux propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins. Lorsqu'elles sont par exemple non fonctionnelles (après empoisonnement au KCN), la distensibilité est très peu ou pas affectée (Faury G et al. 2001 et 2003). Dans les artères musculaires, les cellules musculaires lisses contrôlent le diamètre artériel et créent une résistance au passage du sang.

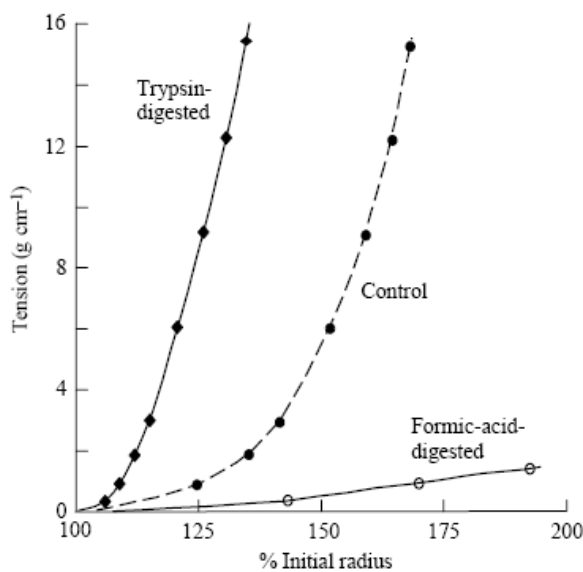


Figure 3: Contributions de l'élastine et du collagène dans la réponse tension-longueur des artères iliaques humaine. Noter une augmentation brusque de la tension lorsque l'élastine est digérée par la trypsine (losange) et l'évolution linéaire de la tension lorsque le collagène est digéré par l'acide formique (cercle vide). La courbe de milieu représente l'artère non traitée. D'après Shadwick, 1999, adapté de Roach MR et Burton AC 1957.

1.2. Les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont les principaux composants de la matrice extracellulaire artérielle. Elles confèrent leurs propriétés élastiques aux tissus extensibles comme la peau, le poumon et les vaisseaux sanguins. L'architecture des fibres élastiques mature est complexe et hautement spécifique du tissu. Dans l'aorte et les grosses artères par exemple, les fibres élastiques forment des lames concentriques séparées par des cellules musculaires lisses. Dans le poumon, elles sont présentes sous forme de fibres fines avec de nombreuses ramifications à travers l'arbre respiratoire. Dans le derme de la peau, les fibres élastiques sont plus épaisses et disposées de manière horizontale (Kielty CM et al. 2002b).

1.2.1. Les composants des fibres élastiques

Les fibres élastiques sont constituées majoritairement de deux composants morphologiquement distincts. Le principal composant est l'élastine (90%) qui constitue le cœur des fibres élastiques dans les tissus adultes. Le deuxième composant majeur des fibres élastiques est représenté par les microfibrilles (10%), qui sont des complexes macromoléculaires (avec plus de 17 composants) et qui sont localisées à la surface des fibres élastiques dans les tissus adultes. Des nombreuses autres protéines s'associent à l'élastine et aux microfibrilles et sont classées en plusieurs catégories selon leur localisation dans les fibres élastiques. Ainsi, on distingue des molécules qui colocalisent avec les microfibrilles ou l'élastine, les molécules qui servent d'interface entre l'élastine et les microfibrilles ou entre les fibres élastiques et la cellule et les molécules impliquées dans le processus de formation des fibres élastiques. La liste de ces molécules se trouve sur le tableau 1. Nous parlerons seulement ici de celles qui ont un rôle majeur dans la formation et/ou le maintien de l'intégrité des fibres élastiques.

Tableau 1 : Principaux composants des microfibrilles et des fibres élastiques. D'après Kielty CM 2006

Molecule	Elastic-fibre location	Refs
Fibrillin-1	Microfibrils	36, 37, 38
Fibrillin-2	Microfibrils	36
Fibrillin-3	Unknown – likely in microfibrils	34
MAGP-1	Microfibrils	37, 58
MAGP-2	Some microfibrils	39, 40
LTBP-1	Some microfibrils; also fibronectin	41, 44, 63
LTBP-2	Microfibrils, elastic fibres	42, 44
LTBP-3	Fibrillar structures	44
LTBP-4	Fibrillar structures, fibrillin	44
Decorin	Microfibrils, microfibril–elastic-fibre interface	30, 67, 68
Biglycan	Elastic-fibre core	30, 68
Versican	Some microfibrils	47
Heparan sulphate	Microfibrils, elastic-fibre core	60, 61
Perlecan	Microfibrils	62
MFAP-1	Some microfibrils	159
MFAP-3	Some microfibrils	160
MFAP-4 (MAGP-36)	Some microfibrils	161
β IGH3	Elastic-fibre–collagen interface	162
Tropoelastin	Elastic-fibre core	1, 2
LOX	Newly secreted tropoelastin, microfibril–elastin interface	163
LOXL	Microfibril–fibulin-5–elastin interface	163
Fibulin-1	Elastic-fibre core	164, 165
Fibulin-2	Elastin–microfibril interface	64
Fibulin-4	Unknown – likely in elastic-fibre core	9
Fibulin-5	Elastic-fibre–cell interface	7, 8
Emilin-1	Elastin–microfibril interface	46
Emilin-2	Elastin–microfibril interface	46
Elastin-binding protein	Newly secreted tropoelastin	89, 91
Vitronectin	Some microfibrils in dermal tissues	166
Amyloid	Some microfibrils in dermal tissues	166
Collagen VIII	Vascular elastic fibres	48
Collagen XVI	Dermal microfibrils	167
Endostatin (C-terminus of collagen XVIII)	Vascular elastic fibres	168
Collagen VI	Some microfibrils	169

Abbreviations: β IGH3, also known as transforming growth factor- β -inducible gene-h3 and as keratopithelin, on chromosome 5q31; lox, lysyl oxidase; loxl, lysyl oxidase-like; ltbp, latent-transforming-growth-factor- β -binding protein; magp, microfibril-associated glycoprotein; MFAP-1, microfibril-associated protein-1.

1.2.1.1 L'élastine

Chez les vertébrés, l'élastine est le principal composant des fibres élastiques conférant aux tissus soumis à des étirements leurs propriétés élastiques. Elle est présente dans des proportions dépassant souvent la moitié du poids du tissu sec. Elle représente plus de 57% du poids sec de l'aorte ascendante, 50% des ligaments élastiques, 7% du poumon et 5% de la peau (Wise SG et Weiss AS 2009). L'élastine est apparue assez tardivement au cours de l'évolution, c'est-à-dire chez les vertébrés, avec la mise en place d'une circulation fermée (haute pression). Elle est présente chez tous les vertébrés excepté les poissons primitifs ou cyclostomes (comme la lamproie et la myxine) mais est absente chez les invertébrés (Faury G 2001). L'élastine est synthétisée sous forme d'un précurseur, la tropoélastine, qui va s'assembler pour donner naissance à un biopolymère extrêmement insoluble et durable qu'est l'élastine. La tropoélastine est codée par un seul gène situé sur le chromosome 7q11.23 chez l'Homme et sur le chromosome 5 chez la souris (Fazio MJ et al. 1991). Le gène de la tropoélastine humaine comporte 36 exons et code pour une multitude d'isoformes (au moins 11). La séquence des acides aminés de la tropoélastine est divisée en deux types de domaines principaux : les domaines hydrophobes riche en glycine, valine et proline, présents en motifs répétitifs, alternant avec les domaines hydrophiles caractérisés par leur l'abondance en lysine et alanine et leur implication dans les liaisons croisées de l'élastine (figure 4). La partie C-terminale de la molécule est hautement conservée et très importante dans le processus d'assemblage des fibres élastiques. Elle contient les deux seuls résidus cystéine de la molécule dans le domaine 36 et se termine par la séquence RKRK.

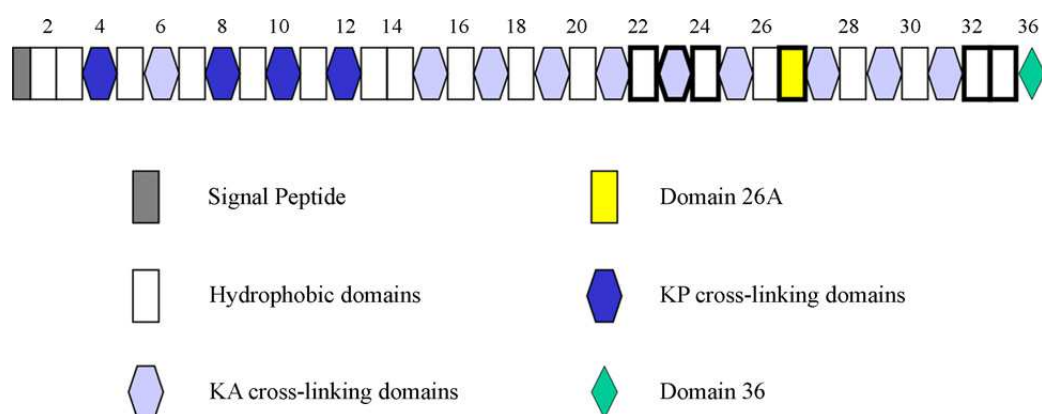


Figure 4 : Schéma des domaines de la tropoélastine humaine contenant tous les exons. Les domaines de liaisons croisées sont divisés en régions riches en KP et régions riches en KA. Les exons potentiellement épissés sont en gras. Le domaine 36 est marqué différemment à cause de ses caractéristiques structurales particulières. D'après Wise SG et Weiss AS 2009.

1.2.1.1.1. Synthèse et sécrétion de la tropoélastine

La tropoélastine est synthétisée sous la forme d'un polypeptide d'environ 72kDa (selon le patron d'épissage) qui va subir un clivage du peptide signal pour donner une protéine mature de 60 – 70 kDa. La synthèse de la tropoélastine a lieu, chez les rongeurs, pendant les phases tardives de la vie fœtale et se poursuit pendant la vie périnatale puis décroît considérablement jusqu'à cesser dans les tissus adultes (figure 5) (Swee MH et al, 1995). Chez l'Homme, elle a lieu aux alentours du dernier tiers de la gestation et se poursuit quelques années après la naissance avant de s'arrêter. La synthèse de la tropoélastine peut être rapidement induite en cas de dommage et est influencée par des facteurs exogènes. L'IGF-1 et le TGF-beta augmentent la synthèse de la tropoélastine alors que l'IL-1 beta et le TNF-alpha induisent sa diminution (Rich CB et al. 1992; Liu J et Davidson JM 1989 ; Kahari VM et al. 1992, Berk J et al.1991, Pierce RA et al. 2006). Dans les vaisseaux sanguins, la tropoélastine est produite majoritairement par les cellules musculaires lisses. Cependant, d'autres types cellulaires incluant les cellules endothéliales et les fibroblastes l'expriment aussi. Chez la souris, la synthèse de la tropoélastine augmente linéairement (mais reste faible) à partir du 14^{ème} jour du développement embryonnaire puis chute brusquement 48h après la naissance, l'expression reprend brusquement pour atteindre un niveau plus élevé auquel il se maintient jusqu'au 14^{ème} jour avant de décroître régulièrement jusqu'à atteindre un niveau plus bas équivalent à celui rencontré chez l'adulte (figure 5) (Kelleher CM et al. 2004). La tropoélastine est sécrétée dans l'espace extracellulaire en association avec une protéine chaperonne de 67kDa, la protéine de liaison de l'élastine (EBP) (Hinek A, 1996). L'EBP, qui est aussi l'un des 3 constituants du récepteur de l'élastine, reste associée à la tropoélastine durant tout le processus de sécrétion de celle-ci dans l'espace extracellulaire (processus qui commence dans le réticulum endoplasmique) (Hinek A et Rabinovitch M 1994).

1.2.1.1.2. Assemblage de la tropoélastine

La tropoélastine, une fois sécrétée va s'engager dans un processus d'assemblage qui a lieu en deux étapes. Les monomères de tropoélastine s'associent grâce aux interactions spécifiques entre les domaines hydrophobes qui sont induites par une augmentation de température (Bellingham CM et al. 2001, Toonkool P et al. 2001). Ce processus d'association appelé coacervation permet l'alignement et la concentration des molécules de tropoélastine en sphères qui restent accrochées à la surface cellulaire avant d'être libérées en direction des fibres élastiques en formation.

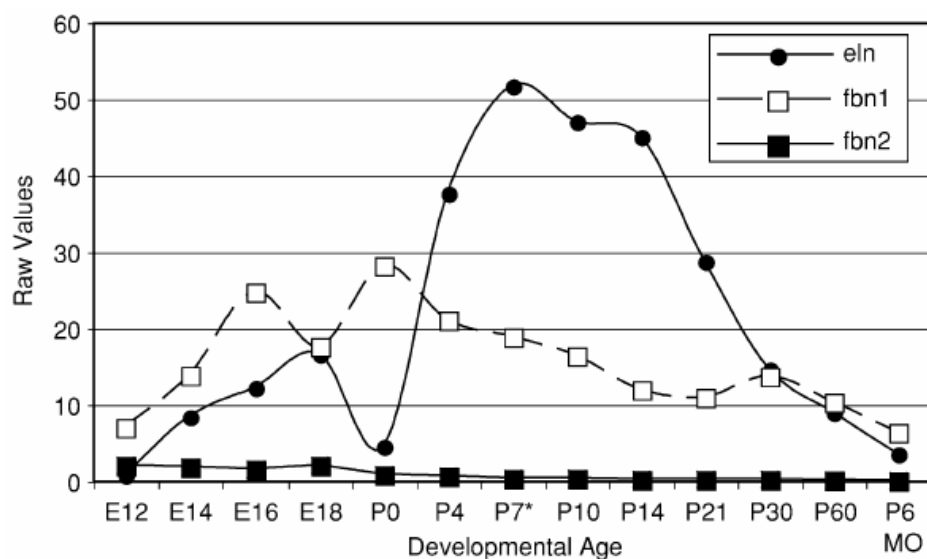


Figure 5 : Profils comparés de l'expression de l'élastine et des fibrillines 1 et 2 chez la souris, déterminés par puce à ADN (confirmés par PCR en temps réel). Valeurs brutes (Raw values) en fonction de l'âge (Developmental Age). E12-E18 = se réfère au nombre de jours de développement embryonnaire, PO-P60 : au nombre de jours post-naissance et P 6 MO (month-old) : correspond à l'âge de 6 mois. D'après Kelleher et coll., 2004.

La coacervation est optimale dans les conditions physiologiques (37°C, pH entre 7 et 8, 150 mM NaCl) (Clarke AW et al 2006). Les récepteurs de la tropoélastine sont impliqués dans leur assemblage mais leur contribution n'est pas entièrement connue (Broekelmann TJ et al. 2005 ; Rodgers UR et Weiss AS 2004 ; Hinek A 1996).

Des études ont montré que la coacervation est une étape importante pré-requise pour la formation des liaisons croisées (cross-links). Les agrégats de tropoélastine sont liés à la surface de la cellule avant d'être déposés sur les microfibrilles. Une Lysyl Oxydase (LOX) catalyse la formation des liaisons croisées de type desmosine ou isodesmosine intra- ou inter-molécules de tropoélastine, en transformant la quasi-totalité des résidus lysine de la tropoélastine. Ceci permet de procurer à l'élastine sa stabilité et son insolubilité.

Une fois que l'assemblage de la tropoélastine est terminé, celle-ci va être déposée sur les microfibrilles préexistantes qui jouent le rôle de squelette ou d'échaffaudage (Wagenseil JE et Mecham RP 2007).

1.2.1.2. Les microfibrilles

Les microfibrilles sont des complexes protéiques de 10-12 nm de diamètre composés d'au moins 17 molécules (Kielty CM et al. 2002b). Des études de microscopie électronique à transmission ont montré que les microfibrilles ont un aspect en collier de perles avec une périodicité de ~56 nm lorsqu'elles ne sont soumises à aucun étirement (Sherratt MJ et al. 2001) (figure 6).

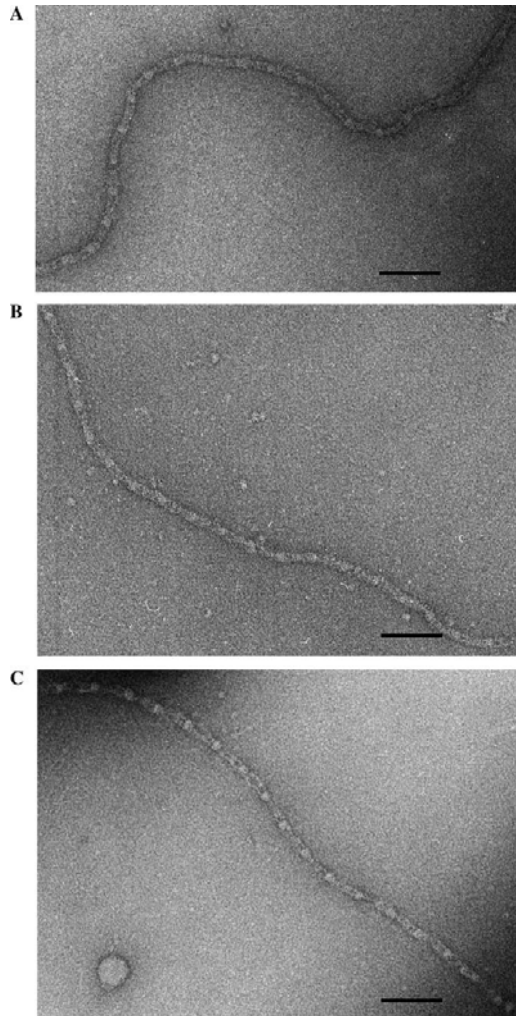


Figure 6 : Images de microscopie électronique à transmission de microfibrilles marquées négativement à faible dose. Les microfibrilles sont isolées de zonules ciliaires (A), de l'humeur vitrée (B) et de l'aorte (C). Noter l'aspect en collier de perles. La périodicité des têtes globulaires est de 57 nm. Barre = 100 nm. D'après Lu Y et al 2006.

Les microfibrilles sont des protéines très conservées au cours de l'évolution, que l'on retrouve à la fois chez les invertébrés (homard, crabe, buccin), les vertébrés primitifs (lamproie) et les autres vertébrés (Faury G 2001). Chez les invertébrés comme le homard (dépourvus d'élastine), les microfibrilles sont responsables de l'élasticité des vaisseaux (McConnell CJ et al. 1997). Chez les vertébrés, les microfibrilles participent aussi, mais pour une plus faible part, aux propriétés élastiques des tissus (Lillie MA et al. 1998; Wang MC et

al. 2009). La propriété élastique des microfibrilles a été vérifiée par des études biomécaniques sur des microfibrilles isolées qui ont montré que celles-ci peuvent s'étirer de manière réversible en faisant passer leur périodicité de 56 à 160 nm (Kielty CM et al. 2002a). Les différents composants des microfibrilles contribuent sans doute de manière inégale à ces propriétés. La fibrilline-1 et la fibrilline-2 sont les principaux composants des microfibrilles. D'autres protéines associées aux microfibrilles ont été décrites (voir tableau 1), dont les mieux caractérisées sont les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGP-1 et 2), les protéines de liaison au TGF beta latent (LTBP 1-4) et les protéines de la famille des fibulines. Les microfibrilles sont associées à l'élastine dans les tissus extensibles, mais peuvent exister aussi dans des tissus dépourvus d'élastine comme les zonules des yeux, qui maintiennent le cristallin en équilibre dynamique (Wallace RN et al. 1991).

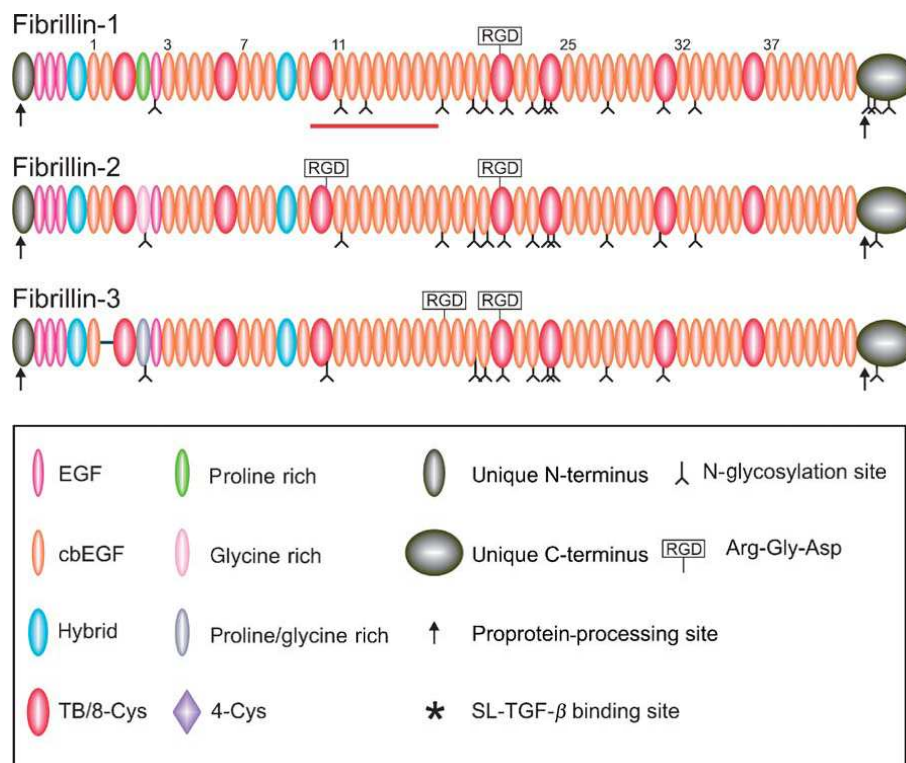


Figure 7: Structure des trois membres de la famille des fibrillines. D'après Hubmacher D et al. 2006

I.2.1.2.1. *Les fibrillines*

Les fibrillines sont les principaux composants structuraux des microfibrilles. La famille des fibrillines est composée de 3 membres : fibrilline-1,-2, et -3 (Sakai LY et al. 1986, Lee B et al. 1991, Corson GM et al. 2004, Wagenseil JE et Mecham RP 2007). Ce sont des

glycoprotéines de grande taille (~ 350 kDa) riches en cystéine et présentant entre elles une forte homologie en acides aminés (61-69%) (figure 7) (Hubmacher D et al. 2006).

Malgré cette forte homologie, les fibrillines sont exprimées par des gènes situés sur différents chromosomes. Les gènes de la fibrilline-1 et de la fibrilline-2 sont situés respectivement sur les chromosomes 15 et 5 chez l'Homme (Pereira L et al. 1993; Lee B et al. 1991, Zhang H et al. 1994; Kielty CM et al. 2002b). Chez la souris, ils sont situés respectivement sur les chromosomes 2 et 18. Le gène de la fibrilline-3, qui est absent chez les rongeurs, est situé sur le chromosome 19 chez l'Homme (Corson GM et al. 2004). Les fibrillines sont composées de 46 ou 47 domaines EGF (epidermal growth factor)-like dont 42 ou 43 lient le calcium (domaines cbEGF). Ces domaines « EGF-like » sont séparés par 7 domaines de liaison du TGF beta (« TB domain ») encore appelés domaines 8-cys en raison de la présence dans ces domaines de 8 résidus cystéine. Si les domaines « EGF-like » sont présents dans la plupart des protéines de la matrice extracellulaire, les domaines TB sont quant à eux présents uniquement dans les fibrillines et les LTBP, d'où le concept de « superfamille » fibrillines - LTBP. Le quatrième domaine TB/8-Cys des trois isoformes de la fibrilline contient le motif Arg-Gly-Asp (RGD) qui est un motif de liaison aux intégrines. Les études structurales ont montré que ce motif est accessible au moins dans le cas de la fibrilline-1 (figure 8) (Lee SS et al. 2004). Ceci est étayé par des études in vitro montrant l'adhésion et l'étalement de plusieurs types cellulaires sur des fragments recombinants de fibrilline-1 par l'intermédiaire d'une liaison aux intégrines $\alpha V\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha V\beta 6$ (Sakamoto H et al. 1996, Pfaff M et al 1996; Bax DV et al. 2003 et 2007; Porst M 2006b; Williamson MR et al. 2008; Jovanovic J et al. 2007).

Les fibrillines-2 et 3 ont un motif RGD supplémentaire situé respectivement sur le troisième domaine TB/8-Cys (TB3) et sur cbEGF 19 (Hubmacher D et al 2006; Corson et al 2004). Sont également présents dans la moitié N-terminale des fibrillines deux domaines hybrides (fusion de domaines EGF et TB) et un domaine riche en proline (dans la fibrilline-1) ou en glycine (dans la fibrilline-2), ou riche à la fois en proline et en glycine (dans la fibrilline-3).

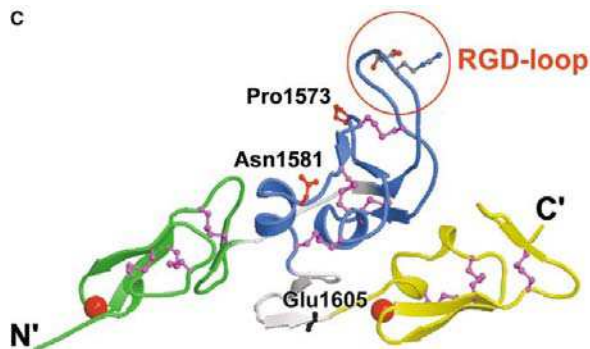


Figure 8 : Structure cristallographique du fragment cbEGF22-TB4-cbEGF23 de la fibrilline-1. Les modules cbEGF22, TB4 et cbEGF23 sont respectivement colorés en vert, bleu et jaune. La région de la boucle RGD est entourée par un cercle rouge. D'après Lee SS et al. 2004.

Les fibrillines ont un rôle majeur dans la liaison et la séquestration des facteurs de croissance comme le TGF beta 1 (Neptune ER et al 2003; Chaudhry SS et al. 2007) et la BMP-7 (Arteaga-Solis E et al 2001; Gregory KE et al 2005) dans la matrice extracellulaire.

1.2.1.2.1.1 Régulation spatio-temporelle de l'expression des fibrillines

L'expression du gène des fibrillines 1 et 2 a été étudiée chez les oiseaux, chez les rongeurs et chez l'homme. Il a été montré que les deux isoformes de fibrilline sont exprimées pendant les étapes précoces du développement embryonnaire des oiseaux, le long des structures axiales comme la notochorde et les somites (Gallagher BC et al. 1993; Sugi et Markwald 1996; Wunsch AM et al 1994; Rongish BJ et al 1998; Visconti RP et al. 2003). Chez la souris, les fibrillines 1 et 2 ont une expression différentielle tant sur le plan du stade de développement que sur le plan de la distribution tissulaire. L'expression du gène de la fibrilline-1 débute aux environs de la moitié du développement embryonnaire (E8,5 - 9 dans le système cardiovasculaire) et est précédée par celle du gène de la fibrilline-2 (Zhang H et al. 1995). Dans l'aorte de souris en développement, l'expression du gène de la fibrilline-2 est plus élevée au début du développement et diminue de manière presque linéaire pendant la maturation. Par ailleurs, le taux d'expression brut de la fibrilline-2 est inférieur, même à son niveau maximal, à celui de la fibrilline-1. Alors que l'expression du gène de la fibrilline-2 se limite au stade embryonnaire, celle de la fibrilline-1 continue jusqu'au stade adulte bien que diminuant progressivement après la naissance (Kelleher CM et al 2004) (figure 5). Ainsi, il

apparaît que l'expression de la fibrilline-2 correspond aux étapes précoces de la morphogénèse alors que celle de la fibrilline-1 correspond aux étapes tardives de la morphogénèse et au développement des structures organiques bien définies (Zhang H et al. 1995). Chez l'Homme, les fibrillines 1 et 2 sont détectées par immuno-histochimie dans les embryons et les organes fœtaux comme l'aorte et le cœur dès le début de l'organogénèse (5ème semaine de la gestation) (Quondamatteo F et al. 2002).

La fibrilline-3, absente chez les rongeurs, mais présente chez la vache, la poule et l'Homme, est exprimée dans les tissus fœtaux. Son expression serait limitée aux étapes précoces du développement (Charbonneau NL et al. 2003, Corson GM et al. 2004).

1.2.1.2.1.2. Synthèse et sécrétion des fibrillines dans l'espace extracellulaire

Les fibrillines sont synthétisées sous la forme d'une proprotéine (profibrilline) de 350kDa. Cette proprotéine va ensuite être engagée dans la voie excrétoire qui passe par l'appareil de Golgi, où ont lieu un certain nombre de modifications (N-glycosylation, repliement, ...), puis par les vésicules sécrétoires. La pro-fibrilline va subir un clivage du propeptide pour parfaire sa maturation. Le lieu de ce clivage est discuté, mais la plupart des travaux suggèrent plus un clivage pendant la phase terminale du transport ou juste après la sécrétion plutôt qu'un clivage dans les phases précoces du transport. Dans toutes les isoformes de fibrilline, le clivage se fait au niveau de sites hautement conservés (Arg Xaa (Lys/Arg)Arg) par des endopeptidases dont celles de la famille de la furine/PACE (Reinhardt DP et al. 2000; Ritty TM et al. 1999). Ce clivage produit, d'une part, un propeptide de 17 à 20 acides aminés (selon le site de clivage) du côté N-terminal et un propeptide de 140 acides aminés du côté C-terminal (figure 7), et d'autre part la fibrilline mature de 320 kDa. Une fois la fibrilline sécrétée dans l'espace extra-cellulaire, celle-ci va s'engager dans le processus d'assemblage des microfibrilles.

1.2.1.3. Assemblage des microfibrilles

L'assemblage des microfibrilles est un processus complexe qui implique le clivage de la pro-fibrilline évoqué plus haut, l'auto-assemblage des fibrillines, la formation de liaisons croisées et la maturation des microfibrilles (figure 9).

1.2.1.3.1. Auto-Assemblage des fibrillines

Les fibrillines matures, une fois sécrétées dans l'espace extracellulaire sur les cellules ou à leur proximité, vont s'associer entre elles pour former des polymères de fibrillines qui constituent l'ossature des microfibrilles. Le processus d'auto-assemblage de la fibrilline-1 a été le plus étudié. Les molécules de fibrilline-1 établissent des interactions linéaires (interactions N-C ter) encore appelées interaction « tête-à-queue (head-to-tail) ». A ces interactions s'ajoutent des interactions latérales mises en évidence, sur une section transversale de microfibrille, par la présence de 6 à 8 molécules de fibrilline-1. Des interactions hétérotypiques latérales entre les fibrilline-1 et -2 ont aussi été observées. Ceci est confirmé par des expériences de double immuno-marquage des fibrilline-1 et 2 montrant la coexistence de ces deux molécules dans les microfibrilles (Hubmacher D et al. 2006; Kielty CM 2006).

Les cellules sécrétrices de fibrilline semblent jouer un rôle important dans ce processus. En effet, un ou plusieurs récepteurs situés à la surface des cellules sont impliqués dans l'assemblage de certaines protéines matricielles comme la fibronectine (Sechler JL et al. 2001) et la laminine-1 (Li S et al. 2002). La fibrilline-1 ne déroge pas à cette règle. Des études in vitro ont montré l'interaction de la fibrilline-1 avec plusieurs intégrines ($\alpha V\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha V\beta 6$) et les héparane-sulphates (Bax DV et al. 2003 et 2007; Sakamoto H et al. 1996; Pfaff M et al. 1996; Cain SA et al. 2005). Ces interactions pourraient influencer l'assemblage des microfibrilles. Des expériences in vitro on montré que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ est indispensable à l'assemblage de la fibrilline-1 dans les microfibrilles (Tsuraga E et al 2009). Tiedemann et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que les protéoglycanes contenant des héparane-sulfates, sous forme de récepteurs cellulaires, joueraient un rôle dans l'assemblage des microfibrilles (Tiedemann K et al 2001).

Les mécanismes d'auto-assemblage des fibrillines sont essentiels pour les étapes initiales de la biogénèse des microfibrilles mais ne sont pas suffisants pour leur maturation. Ils sont complétés par la mise en place des liaisons croisées.

1.2.1.3.2. Formation des liaisons croisées

Deux types de liaisons croisées (cross-links ou pontages) intermoléculaires importantes pour la stabilité des microfibrilles ont été identifiés :

1) des ponts disulfures entre les fibrillines ou entre une fibrilline (-1 ou -2) et d'autres molécules qui impliquent la plupart des cystéines les plus conservées dans les fibrillines. Ces ponts se forment assez rapidement (quelques heures) dans les cultures d'organes d'aorte de poulet (Reinhardt DP et al. 2000),

2) Des liaisons croisées $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysine catalysés par des transglutaminases. Celles-ci pourraient impliquer, en plus des fibrillines, les MAGP-1, ces dernières étant caractérisées comme des substrats de la transglutaminase tissulaire (Brown-Augsburger et al. 1994). Ces liaisons croisées pourraient conférer une stabilité mécanique aux microfibrilles (Thurmond et Trotter 1996). Potentiellement, ces deux types de liaisons croisées, pourraient être essentiels pour des alignements latéraux corrects de fibrillines et d'autres molécules qui facilitent les événements d'assemblage en aval.

1.2.1.3.3. Maturation des microfibrilles

1.2.1.3.3.1. Les principes

Pour compléter la formation des microfibrilles, d'autres molécules vont s'associer au « squelette » ou polymère formé par les fibrillines. Au moins 17 molécules ont été identifiées comme étant soit des composants intégraux des microfibrilles, soit des molécules associées aux microfibrilles (Kielty CM et al. 2002). En particulier, des études ont montré la présence de plusieurs sites de fixation de forte affinité pour l'héparine / héparane-sulfate sur la fibrilline-1. Ainsi, cette dernière étape de l'assemblage des microfibrilles fait intervenir l'interaction entre les fibrillines et les autres composants de microfibrilles par l'intermédiaire des héparane-sulfates (protéoglycanes). Les liaisons croisées entre les fibrillines et les autres composants des microfibrilles interviennent aussi dans la dernière phase de l'assemblage des microfibrilles (Kielty CM 2006).

1.2.1.3.3.2. Protéines associées aux microfibrilles

En plus des mécanismes d'auto-assemblage et de formations de liaisons croisées, d'autres molécules pourraient jouer un rôle important dans l'assemblage des microfibrilles. Plusieurs composants ont été caractérisés comme associés aux microfibrilles et se classent en composants soit intégraux, soit périphériquement associés aux microfibrilles. Pour la plupart d'entre-eux, leur rôle dans la biogénèse, la stabilité ou l'homéostasie des microfibrilles n'est pas démontré.

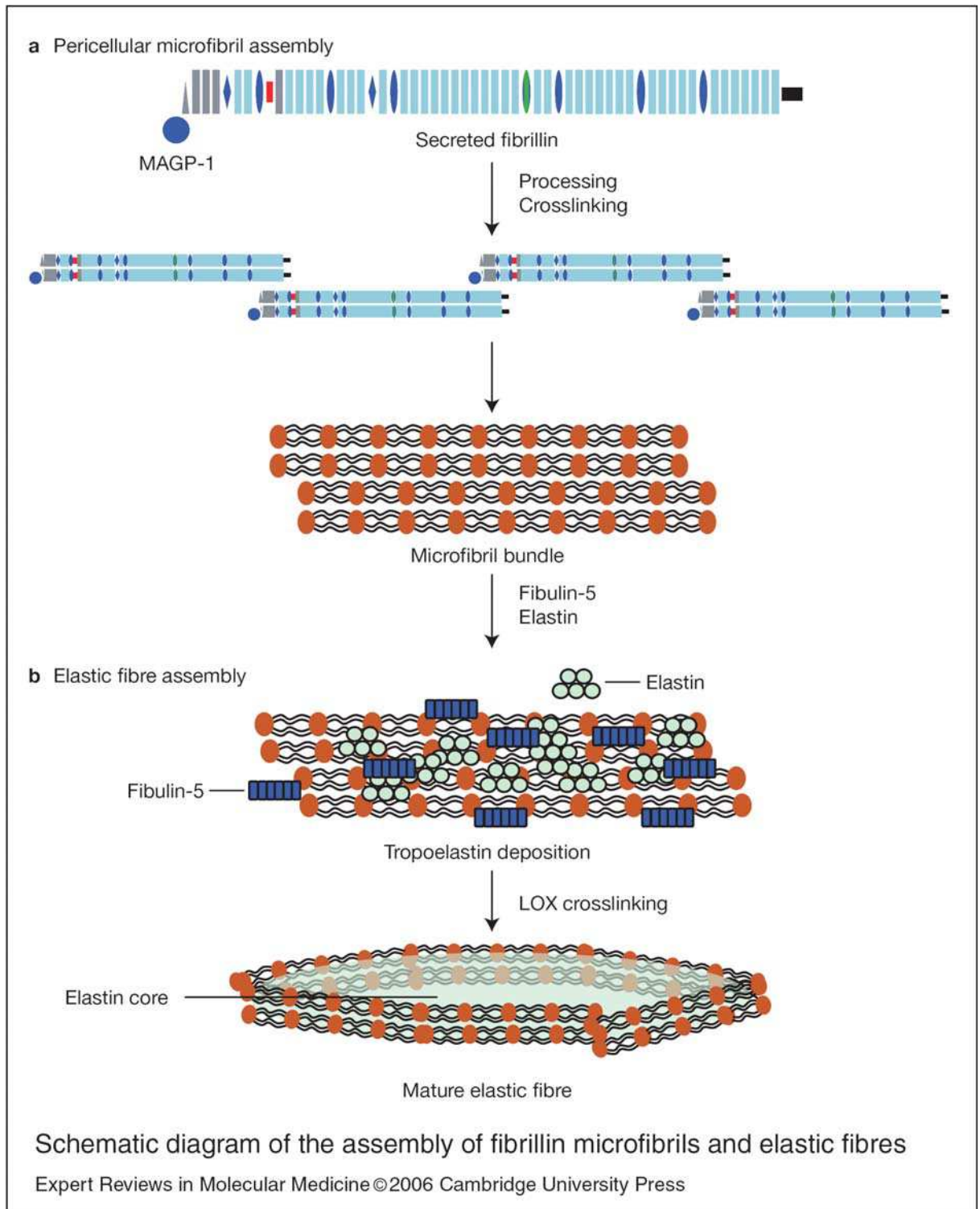


Figure 9 : Schema de l'assemblage des microfibrilles et des fibres élastiques. D'après Kielty CM 2006.

Parmi les composants intégraux associés aux microfibrilles, on note les protéines de la famille des MAGP (-1, 2, 3 et 36) et celles de la famille des MFAP (1, 3 et 4). Les MAGPs sont des petites glycoprotéines (~ 20kDa) qui sont situées dans la partie globulaire des microfibrilles (Henderson M et al.1996). Des expériences ont montré une interaction

spécifique entre les MAGP (-1 et -2) et les fibrillines (-1 et -2) (Penner AS et al. 2002, Jensen SA et al. 2001, Hanssen E et al. 2004). La MAGP-1 a été localisée dans presque toutes les microfibrilles et semble être le seul composant constitutif des microfibrilles après les fibrillines. Elle interagit à la fois avec la tropoélastine et les fibrillines -1 et -2 (Brown-Augsburger P et al. 1994, Jensen SA et al. 2001), ce qui laisse supposer qu'elle joue un rôle important dans l'assemblage des fibres élastiques servant de molécule de jointure entre ses deux partenaires.

Dans la classe des protéines associées aux microfibrilles, rentrent les protéines des familles des fibulines (2, 4 et 5), des LTBP (1, 2 et 4), l'EMILIN-1 et les protéoglycanes (versican, perlecan, biglycan, décorine...) entre autres (Kielty CM et al. 2002, Wagenseil JE et Mecham RP 2007).

Les fibulines sont des protéines de 50 à 200 kDa formant une famille de 5 membres (Timpl R et al. 2003). Les fibulines 2 et 4 interagissent fortement avec la fibrilline-1 (Reinhardt DP et al. 1996, El-Hallous E et al., 2007) alors que la fibuline-5 présente une faible affinité pour elle (Yanagisawa H et al., 2002). Les fibulines -1 et -3 n'ont pas d'interaction avec les microfibrilles (Reinhardt DP et al. 1996 ; El-Hallous E et al., 2007). La fibuline-4 est localisée dans les microfibrilles environnant les cœurs d'élastine (Kobayashi N et al., 2007) alors que les fibulines -2 et -5 sont, quant à elles, situées à l'interface entre les microfibrilles et l'élastine (Reinhardt DP et al., 1996 ; Yanagisawa H et al., 2002)

Les LTBP sont des protéines appartenant à la superfamille des fibrillines (présence du module TB). Les modules TB spécifiques des LTBP -1, -3 et -4 lient le TGF beta latent à l'intérieur de la cellule formant le gros complexe latent (LLC) qui sera sécrété dans l'espace extracellulaire. Les LTBP-1 et 4 lient à la fois le TGF-beta et les fibrillines et microfibrilles permettant ainsi à ces dernières de réguler la biodisponibilité du TGF-beta (Isogai Z et al. 2003). Elles régulent aussi la maturation du TGF beta latent (Zhou Y et al. 2008).

L'EMILIN-1 est localisée à l'interface élastine/microfibrilles. Elle semble être indispensable à la formation des fibres élastiques car, lorsqu'elle est absente, les fibres élastiques présentent des altérations au niveau de la peau et de l'aorte (Zanetti M et al. 2004). Elle inhibe le TGF beta et régule ainsi sa biodisponibilité. Sa déficience conduit à l'hypertension artérielle et à l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique (Zhacchiqna et al. 2006).

Les lysyl oxydases (LOX) sont des enzymes qui forment les liaisons croisées (cross-links) entre les molécules de tropoélastine et entre les molécules de collagène. Elles forment une famille de cinq membres LOX et les protéines LOX-like (LOXL1 -4). LOX et LOXL1

présentent une forte homologie alors que LOXL2-4 appartiennent à une sous-famille séparée (Lucero HA et Kagan HM 2006). LOX et LOXL1 oxydent les groupements aminés des résidus lysines de la tropoélastine. Les aldéhydes formés interagissent avec les anions pour former des liaisons réductibles qui subissent une maturation pour former des liaisons croisées tétra-fonctionnelles (Borel A et al 2001). Ces liaisons croisées que sont la desmosine et l'isodesmosine sont spécifiques à l'élastine chez les vertébrés (Partridge SM et al. 1963, 1964). LOX et LOXL-1 colocalisent dans la plupart des tissus y compris dans la peau (Hayashi K et al. 2004; Noblesse E et al. 2004). LOX est localisée sur les fibres positives pour le marquage de l'élastine alors que LOXL-1 est localisée en association avec les microfibrilles dans la peau (Noblesse et al. 2004). LOXL-1 interagit avec la fibuline-5 (Liu X et al. 2004).

Les protéoglycanes représentent une classe de glycoprotéines constituées d'une protéine à laquelle sont liées une ou plusieurs longues chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Plusieurs protéoglycanes interagissent avec les microfibrilles. La décorine et le versican interagissent directement avec les microfibrilles (Ohno-Jinno A et al 2008, Kielty CM et al 2002b) alors que le biglycane est localisé au cœur des fibres élastiques (Reinboth B et al 2002). Les protéoglycanes contribuent à l'organisation perlée des microfibrilles et à leur intégration dans la matrice extracellulaire environnante.

Globalement, ces protéines associées aux microfibrilles sont très importantes dans la maturation des microfibrilles ainsi que dans l'élastogénèse. Leur importance est illustrée par la défaillance dans la formation des fibres élastiques lorsque l'une d'entre-elles est mutée. Ce point sera abordé dans le chapitre sur l'altération des fibres élastiques.

1.2.2. Assemblage des fibres élastiques

L'assemblage des fibres élastiques est un processus hautement régulé, tant sur le plan temporel que spatial, et a lieu dans la deuxième moitié du développement embryonnaire. Cette rigueur traduit une expression génique coordonnée de tous les composants les plus importants des fibres élastiques. Des études de microscopie de fluorescence en temps réel et de microscopie électronique sur des aortes de souris en développement (E14 à P0) ont permis d'élucider le mécanisme d'assemblage de fibres élastiques. Selon l'un des modèles les plus récents (Wagenseil JE et Mecham RP 2007) la tropoélastine est sécrétée à la surface des cellules sécrétrices, à laquelle elle reste accrochée par l'intermédiaire de récepteurs présents sur la membrane cellulaire (intégrines et glycosaminoglycanes entre autres). Elle est ensuite organisée en agrégats cross-linkés par des enzymes de la famille des LOX. La fibuline-4 et/ou

5 interagit avec ces agrégats pour faciliter l'établissement de liaisons croisées ou limiter leur taille. Les agrégats d'élastine restent accrochés à la surface cellulaire le temps que d'autres molécules de tropoélastine viennent s'associer à eux (Kozel BA et al. 2006). Ils sont ensuite transférés sur les microfibrilles déjà formées et interagiraient avec les intégrines sur la surface des cellules. Les fibulines 4 et 5 et d'autres molécules associées aux microfibrilles aident à ce transfert en interagissant avec la fibrilline-1. Les macro-agrégats d'élastine sur les microfibrilles coalescent pour donner des structures plus grosses qui sont par la suite polymérisées par les enzymes de la famille des LOX pour former des fibres élastiques complètes et fonctionnelles (figure 10) (Wagenseil JE et Mecham RP 2007).

1.3. Rôle des composants des fibres élastiques dans la signalisation cellulaire

Les fibres élastiques, à l'instar d'autres composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, ont des fonctions dans la signalisation cellulaire en plus de leur rôle mécanique. Certains composants des fibres élastiques ont montré clairement des interactions avec des cellules se traduisant par des messages intracellulaires aboutissant à des modulations des fonctions de celles-ci. Ces régulations ont un rôle physiologique important durant toute la vie. En particulier, au niveau vasculaire comme dans les autres organes, ces interactions sont importantes dans la morphogénèse. Aussi au cours du vieillissement ou dans certaines situations pathologiques, les fibres élastiques sont clivées par des protéases. Ces clivages libèrent des fragments de composants de fibres élastiques capables d'interagir avec les cellules et de moduler leurs fonctions.

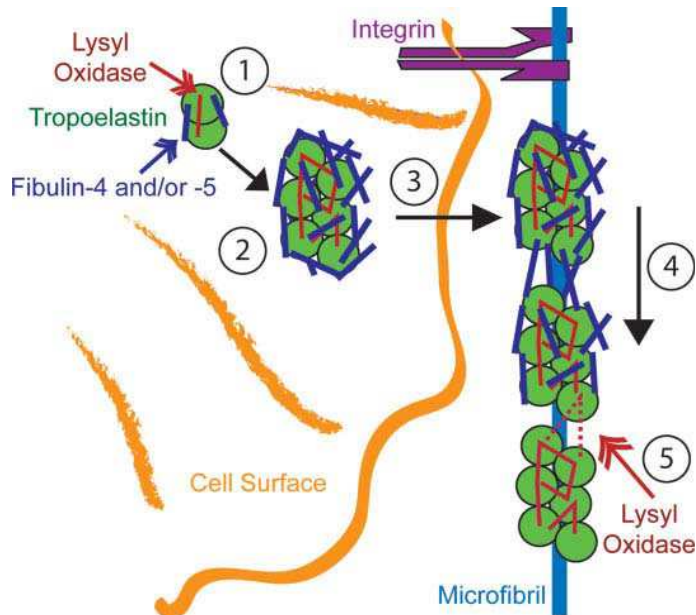


Figure 10: Modèle d'assemblage des fibres élastiques. D'après Wasengeil JE et Mecham RP 2007.

1.3.1. Rôle des peptides dérivés de l'élastine

De nombreuses études ont été réalisées avec des peptides d'élastine pour élucider son rôle au niveau cellulaire. Les peptides d'élastine ont des effets biologiques sur plusieurs types cellulaires. Dans les cellules musculaires lisses, ils induisent la prolifération et la migration. Dans ces cellules, ils activent la voie de signalisation impliquant les récepteurs couplés aux protéines G (Karnik SK et al. 2003). Dans les cellules endothéliales, les peptides d'élastine (kappa-élastine) induisent une augmentation du niveau de calcium cytosolique et nucléaire via l'activation de son récepteur (récepteur de l'élastine-laminine) et les microfilaments d'actine (Faury G et al. 1998). Les peptides d'élastine (kappa-élastine), à des concentrations similaires à celles trouvée dans le sang, induisent une dilatation d'anneaux aortiques de rats dépendante de l'endothélium et du monoxyde d'azote (NO) (Faury G et al. 1995). Les peptides d'élastine induisent la production du NO par les cellules endothéliales via l'activation de la voie PI3-kinase/Akt/NO synthase. Le NO produit induit alors la synthèse et l'activation de MT1-MMP (Membrane- type MMP) par la voie NO/cGMP/Erk1/2 (Fahem A et al. 2008).

Les peptides d'élastine augmentent aussi la survie des cellules endothéliales en absence de facteur de croissance (au bout de 5 jours de culture), augmentent la migration cellulaire, augmentent l'expression et l'activation des proMMP2 et proMT1-MMP via la voie PI3K/Akt et activent l'angiogenèse in vivo (membrane chorio-allantoïque de poulet) et in vitro (formation de tube capillaire dans un gel tridimensionnel de collagène 1) (Robinet A et

al. 2005). Ces peptides activent ERK1/2 via la voie AMPc / protéine kinase A (PKA) et phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Duca L et al. 2005). Ce signal semble être dû à l'activité d'une sialidase (Neuraminidase-1) qui est un composant du complexe membranaire du récepteur de l'élastine (Duca L et al. 2007).

1.3.2. Rôle des microfibrilles et de leurs composants associés

De manière générale, les microfibrilles interagissent in vitro avec plusieurs types cellulaires incluant les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Bax DV et al 2003) et sont les médiateurs de l'adhérence de ces cellules. Plusieurs composants des microfibrilles contenant le motif RGD, comme les fibrillines, la fibuline-5 et la MAGP-2, interagissent aussi avec les cellules par l'intermédiaire des intégrines.

La fibuline-5 interagit avec les cellules endothéliales humaines (HUVECs) de manière dépendante de la séquence RGD (Nakamura T et al. 2002). Elle annule la capacité des cellules endothéliales à effectuer le bourgeonnement angiogénique (sprouting) sous l'effet du VEGF, en inhibant leur prolifération et l'invasion dans une matrice de Matrigel (Albig AR et Schiemann WP 2004). La fibuline-5 humaine recombinante entière interagit avec les cellules musculaires lisses humaines via les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha 4 \beta 1$ sans induire d'effet ni sur la prolifération ni sur la migration de ces cellules (Lomas AC et al 2007).

MAGP-2 qui, contrairement à son homologue MAGP-1, contient un domaine RGD, interagit fortement avec plusieurs types cellulaires (fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) via l'intégrine $\alpha V \beta 3$. Elle intervient dans le processus d'étalement de toutes ces cellules à l'exception des cellules endothéliales (Gibson MA et al. 1999)

LTBP-1 interagit avec les cellules musculaires lisses de rats diabétiques via l'intégrine $\beta 3$ et accélère la migration de ces cellules, ce qui suggère sa contribution à l'épaississement intimal chez ces rats. Par contre, elle a une activité adhésive limitée sur les cellules musculaires lisses témoins (Kanzaki T et Otabe M 2003). Des expériences sur des corps embryoïdes en développement ont montré que LTBP-1 favorise la différenciation des cellules souches embryonnaires en endothélium par un mécanisme probablement dépendant du TGF- β (Gualandris A et al 2000). LTBP-2 est impliquée dans l'adhérence dépendante de RGD et induit la migration des cellules de mélanomes (Vehviläinen P et al. 2003). Cet

effet de LTBP-2 est restreint aux seules cellules de mélanomes puisque les autres types cellulaires n'adhèrent pas sur LTBP-2.

La décorine, un petit protéoglycane riche en leucine, inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales humaines et la formation de structures tubulaires endothéliales in vitro (Davies Cde L et al 2001). Elle induit aussi la calcification des cellules musculaires lisses en culture.

Le versican, protéoglycane abondant de la paroi de vaisseaux sanguins, augmente la prolifération et la migration des cellules endothéliales, et lie l'intégrine $\beta 1$ (Kenagy RD et al. 2006).

I.3.2.1. Rôle de la fibrilline-1

Le rôle de la fibrilline-1 dans la signalisation cellulaire commence à être connu grâce à des études sur des modèles de souris portant des mutations dans le gène de la fibrilline-1, et des expériences in vitro utilisant des fragments spécifiques de la fibrilline-1 recombinante. Des fragments représentant différentes parties de la fibrilline-1 ont été étudiés (figure 10).

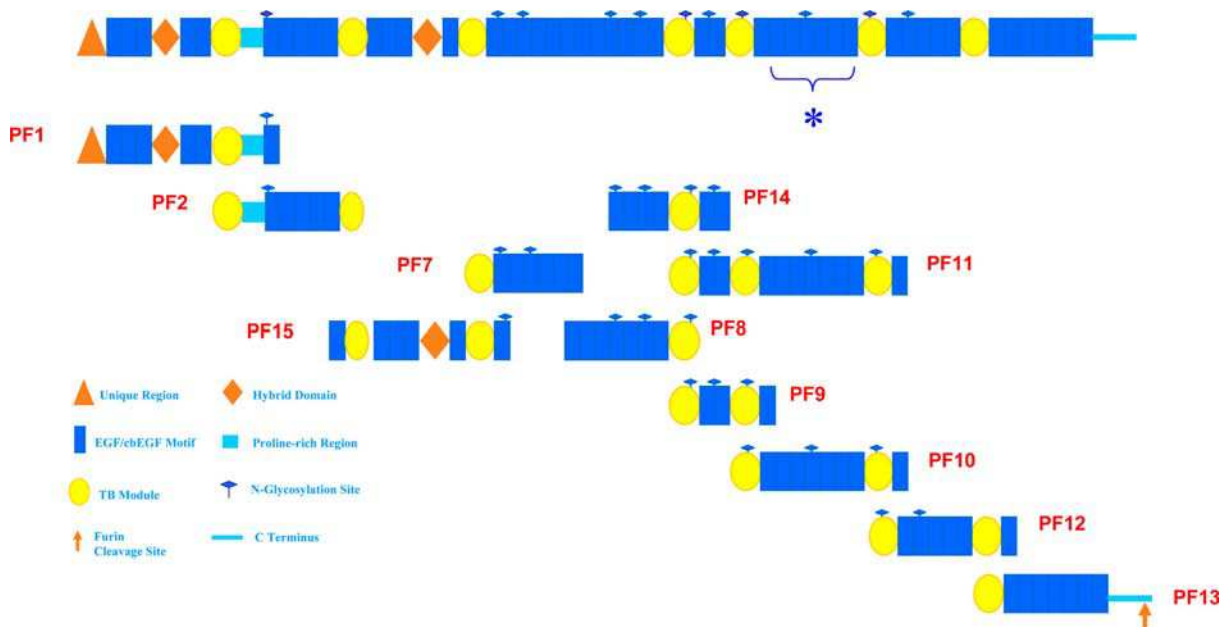


Figure 11: Fragments de la fibrilline-1 humaine recombinante recouvrant toute la longueur de la fibrilline-1. L'astérisque correspond aux six domaines cbEGF dans les fragments PF10 et PF11 qui régulent TGF beta. D'après Chaudry SS et al. 2007.

Parmi ces fragments, ceux contenant le motif RGD ont été les plus étudiés. Des études structurales ont mis en évidence la présence de ce motif et sa disponibilité dans la molécule de fibrilline-1 (Lee SS et al 2004) (figure 8). Les fragments recombinants de fibrilline-1 contenant le motif RGD interagissent avec les récepteurs de type intégrine ($\alpha 5 \beta 1$, $\alpha V \beta 3$, $\alpha V \beta 6$) sur plusieurs types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Sakamoto H et al. 1996, Pfaff M et al 1996, Bax DV et al. 2003 et 2007, Porst M, Williamson R et al. 2008). Les intégrines sont des récepteurs cellulaires qui sont importants dans plusieurs fonctions cellulaires dont l'adhérence, la migration et la prolifération. Les intégrines jouent aussi un rôle important dans la morphogénèse vasculaire (Stupack DG et Chersesh DA 2004). Ces fragments interviennent dans l'interaction, l'adhérence et la migration des fibroblastes et des cellules mésangiales in vitro (Sakamoto H et al. 1996, Pfaff M et al 1996, Bax DV et al. 2003 et 2007, Porst M 2006, Williamson MR et al. 2008), et augmentent aussi l'expression et la production de MMP-1 et MMP-3 (Booms P et al. 2005). D'autres fragments de fibrilline-1, ne contenant pas le motif RGD, se sont aussi avérés importants dans la signalisation cellulaire. Notamment, les fragments contenant le motif GxxPG, qui est une séquence de reconnaissance d'EBP (Elastin Binding Protein), ont montré des propriétés chimiotactiques sur les macrophages, comparables à celles des fragments de dégradation de l'élastine (Guo G et al 2006). Ces fragments augmentent aussi la production de MMP-1 sur des fibroblastes humains (Booms P et al 2006). Les microfibrilles, par l'intermédiaire de la fibrilline-1 entre autres, séquestrent les facteurs de croissance comme le TGF β . Les fragments de fibrilline-1 contenant la séquence codée par les exons 44-49 (PF10 et PF11) régulent la biodisponibilité du TGF β 1. Ces fragments augmentent la signalisation par le TGF- β 1 actif endogène et de Smad-2. Le mécanisme présumé de cette régulation est le suivant : PF10 interagit avec la partie N-terminale de la fibrilline-1 située au niveau de la zone d'interaction des microfibrilles avec le complexe large latent (LLC) composé de TGF β latent, LTBP et de LAP (Latency Associated Peptide). Cette interaction déplace le complexe LLC et libère le TGF- β 1 actif par un mécanisme inconnu (figure 12). La fibrilline-1 interagit et contrôle aussi la signalisation de plusieurs facteurs de croissance de la famille des BMPs. La partie N-terminale de la fibrilline-1 interagit avec le prodomaine des BMP-2, -4 et -7 (Sengle G et al 2008). Certaines mutations de la fibrilline-1 rendent la molécule susceptible à des protéases (Booms P et al. 2000, Reinhardt DP et al 2000b) avec pour conséquence la libération de fragments potentiellement actifs. Certains de ces fragments pourraient activer les MMPs dont la production est accrue dans le syndrome de Marfan (pathologie génétique humaine due à la

mutation du gène de la fibrilline-1 et caractérisée surtout par des anévrismes et dissections aortiques). D'autres activent le TGF-beta qui est aussi un des éléments clés dans la pathogénèse du syndrome de Marfan, surtout au niveau pulmonaire (Neptune ER et al. 2003).

In vivo, des éléments montrent un rôle de signal cellulaire intrinsèque pour la fibrilline-1. Au niveau vasculaire, par exemple, les microfibrilles interagissent avec les cellules musculaires lisses et, en traversant la lame basale, les cellules endothéliales dans l'aorte de souris en développement (Davis EC et al 1994 et 1993). Cette interaction fait au moins intervenir la fibrilline-1. Cette hypothèse est renforcée par plusieurs faits : 1°) le décollement de l'endothélium dans l'aorte de souris déficientes en fibrilline-1 (*fbn1*^{-/-}) (Carta L et al. 2006), 2°) l'altération de la fonction endothéliale lorsque la fibrilline-1 est mutée (Chung AW et al. 2007a, Wilson DG et al. 1999) dans le syndrome de Marfan, 3°) la perte de contact entre les lames élastiques et les cellules musculaires lisses et l'altération phénotypique de ces cellules dans la média de l'aorte de souris portant une mutation dans le gène de la fibrilline-1 (Bunton TE et al 2001).

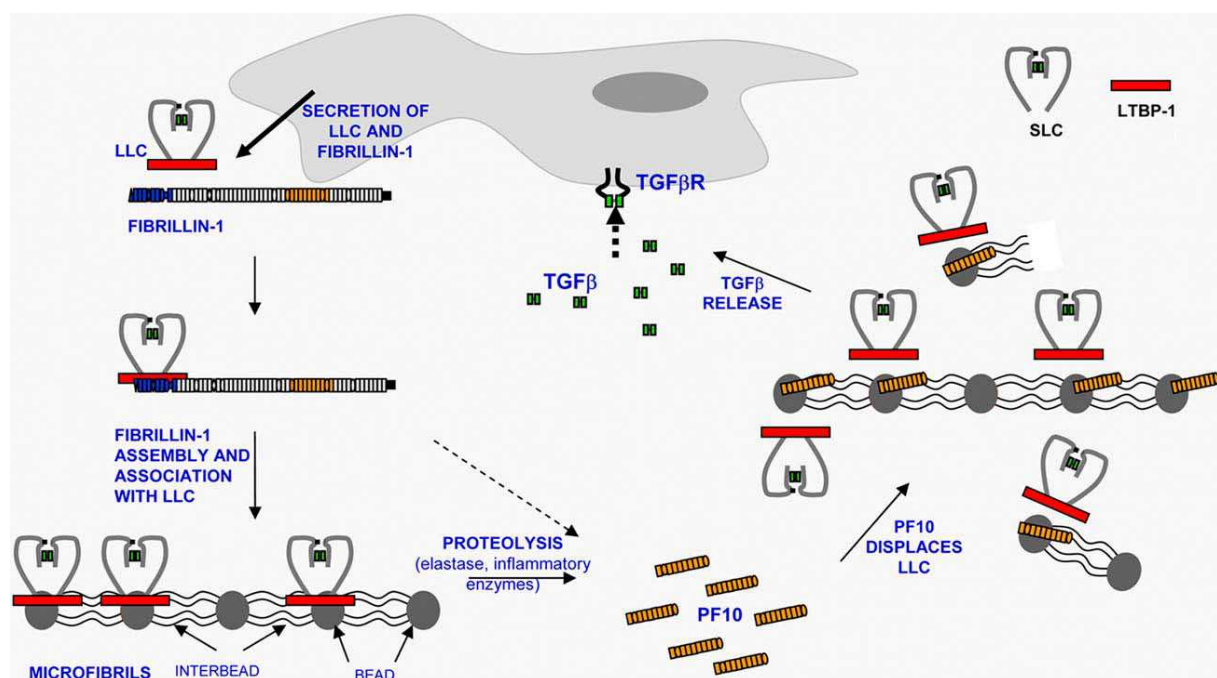


Figure 12 : Modèle de régulation de la biodisponibilité de TGF beta par le fragment de fibrilline-1 PF10. Le complexe LLC sécrétée s'associe avec les microfibrilles. Le fragment PF10 (en orange) libéré par protéolyse, se lie aux microfibrilles en interagissant spécifiquement avec la partie N-terminale de la fibrilline-1 (en bleu) et inhibe par conséquent l'interaction de LLC, qui se fait par LTBP (en rouge) avec les microfibrilles. Ceci conduit à la libération de LLC et une augmentation de TGF beta actif. D'après Chaudhry SS et al 2007 J Cell Biol.

1.4. Altérations des fibres élastiques

La fonction de signalisation des fibres élastiques est mise en lumière par des évènements qui résultent de leurs altérations. Ces évènements se divisent principalement en deux catégories: les processus faisant suite aux mutations génétiques (délétères) d'un de leurs composants essentiels et les processus dégradatifs intervenant au cours du vieillissement.

1.4.1. Altérations génétiques des fibres élastiques

Les altérations génétiques des composants des fibres élastiques sont responsables de plusieurs pathologies humaines affectant les organes qui expriment ces composants.

1.4.1.1. L'élastine

Des mutations dans le gène de l'élastine conduisent à un certain nombre de pathologies humaines incluant la sténose aortique supravalvulaire (SVAS), le syndrome de Williams-Beuren et le cutis-laxa.

1.4.1.1.1. La SVAS

La SVAS est une maladie génétique vasculaire obstructive qui provoque le rétrécissement localisé ou diffus des grosses artères (figure 13). L'aorte ascendante est plus fréquemment touchée mais d'autres artères comme l'artère carotide, l'artère coronaire et l'artère pulmonaire peuvent être aussi affectées (Stamm C et al. 2001). Elle touche environ 1 personne sur 20.000 dans le monde. Elle peut être héritée de manière autosomique dominante (Eisenberg R et al 1964, Schmidt MA et al 1989) ou être une composante du syndrome de Williams (Williams JC et al. 1961, Beuren AJ et al. 1962). Elle survient aussi de manière sporadique dans un certain nombre de cas (Li DY et al. 1997, Metcalfe K et al. 2000).

La SVAS isolée (familiale ou sporadique) est due à des mutations dans un allèle de l'élastine (Li DY et al. 1997, Metcalfe K et al. 2000, Urban Z et al. 1999). Ces mutations peuvent être des translocations (Curran M.E et al. 1993), des délétions (Ewart A.K et al 1993a, Olson T.M et al 1993), ou des mutations ponctuelles (Li DY et al. 1997, Metcalfe K et al. 2000, Urban Z et al. 1999 Hum Genet ; Tassabehji M et al. 1997) (www.hgmd.org). Certaines mutations du gène de l'élastine conduisent à l'arrêt prématuré de la synthèse et à l'élimination des transcrits mutés. Ceci a pour conséquence la synthèse de ~50 % seulement de la quantité d'élastine comme c'est le cas dans un grand nombre de patients SVAS (Tassabehji M et al. 1997, Urban Z et al. 2000), d'où le concept d'haploinsuffisance qui est l'un des deux mécanismes supposés de la pathogénèse de la SVAS. Le deuxième mécanisme

de la SVAS est l'effet dominant négatif dans lequel l'élastine non fonctionnelle interfère avec l'assemblage des fibres élastiques. En effet, des mutations dans le gène de l'élastine, comme les mutations faux-sens ou des mutations dans le site d'épissage produisant des protéines non fonctionnelles ont été observées chez certains patients SVAS. Ces mutations conduisent au saut d'exons ou à l'activation de sites cryptiques (Urban Z et al 1999).

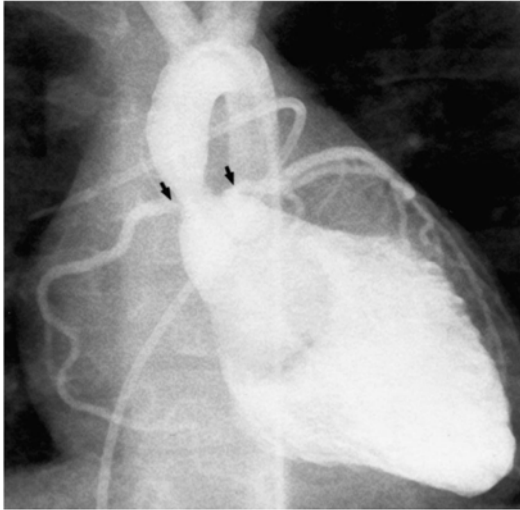


Figure 13 : Angiogramme d'un patient de 4 ans atteint de SVAS. Noter le rétrécissement important de l'aorte ascendante. Les flèches indiquent les sténoses des artères coronaires gauche et droite de part et d'autre de la racine aortique. D'après Stamm C et al. 2001

L'étude de souris génétiquement modifiées (hémizygotes pour le gène de l'élastine) a montré que la SVAS est essentiellement une pathologie d'haploinsuffisance (Li D.Y et al. 1998b). Chez l'humain comme chez la souris, l'hémizygotie de l'élastine durant le développement, provoque une augmentation du nombre d'unités lamellaires dans la paroi de l'aorte, avec un épaissement consécutif de celle-ci au détriment de la lumière, et par voie de conséquence un risque accru de l'obstruction des vaisseaux sanguins (Li D.Y et al. 1998 a et b).

1.4.1.1.2. Syndrome de Williams-Beuren (SWB)

Le syndrome de Williams-Beuren est une pathologie génétique humaine décrite pour la première fois par JCP Williams (Williams JC et al 1961) en 1961 puis AJ Beuren (Beuren AJ et al. 1962) peu de temps après. Elle touche environ 1 personne sur 10000 dans le monde. Elle est caractérisée par des anomalies endocrines (hypercalcémie, métabolisme anormal du

glucose), neurologiques, musculo-squelettiques, un retard mental et des anomalies cardiovasculaires que nous développerons ici. Le syndrome de Williams-Beuren est dû à une délétion de gènes contigus ou microdélétion au niveau du chromosome 7q11.23 (figure 14).

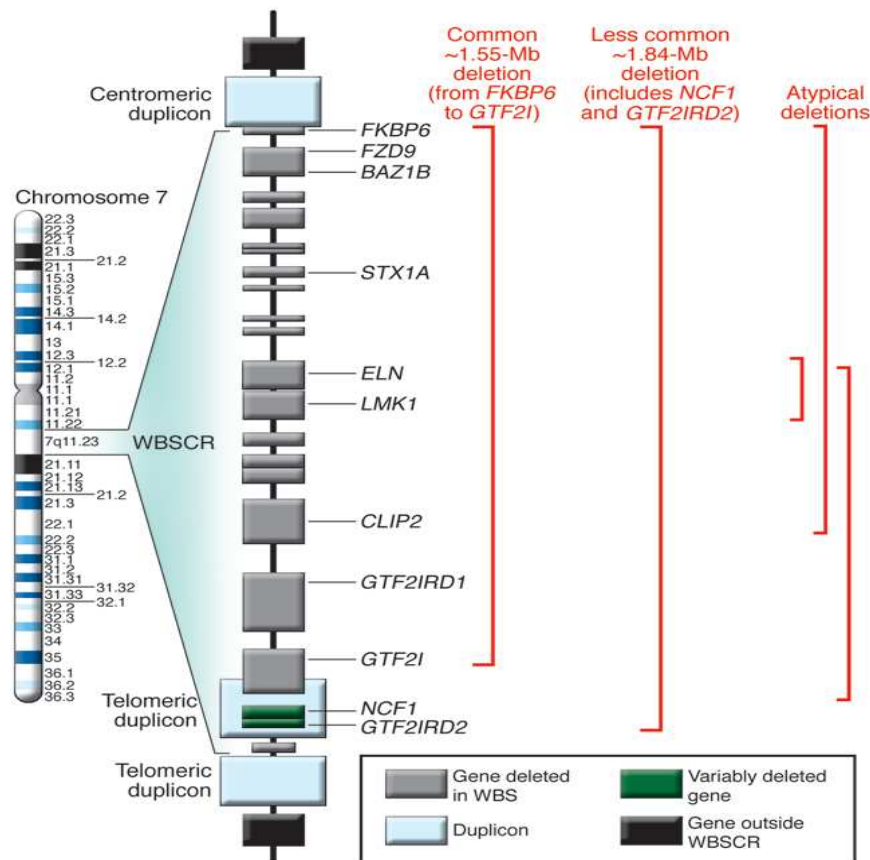


Figure 14: Région critique du syndrome de Williams-Beuren (WBSCR). Microdélétions du chromosome 7q11.23 avec perte de 23 à 26 gènes (incluant celui de l'élastine), responsables du SWB. D'après Pober BR et al 2008.

Le syndrome de Williams-Beuren est caractérisé au niveau vasculaire par une sténose aortique supravulvaire (SVAS) qui est un rétrécissement de l'aorte au dessus des valves aortiques. Cette sténose peut être localisée ou diffuse et impliquer toutes les artères élastiques et des artères moyennes comme l'artère pulmonaire.

Les anomalies vasculaires du SWB sont similaires à celles de la SVAS probablement parce que ces deux pathologies ont en commun une diminution de la sécrétion d'élastine dans la matrice extracellulaire. Dans le cas du SWB, la quantité d'élastine sécrétée par les cellules du patient est seulement de 15 % par rapport aux cellules contrôle alors qu'elle est de 50 % chez les patients SVAS. L'instabilité de l'ARNm ne semble pas en être la cause et cette différence est probablement due à une interaction génique (Urban Z et al. 2002).

Le SWB présente une forte variabilité en termes d'expression de maladie cardiovasculaire, tout comme la SVAS. Cette variabilité peut aller de la mortalité infantile à l'absence de tout signe clinique cardiovasculaire. La variabilité dans la symptomatologie du SWB pourrait être expliquée par une variabilité dans la production de l'élastine, comme démontré par une étude sur deux cohortes de patients SWB (Urban Z et al. 2002, Merla G et al 2006). Un autre facteur contribuant à cette variabilité est relatif aux variations de l'expression des gènes flanquants ou se trouvant la région critique du SWB (figure 14) (Pober BR et al 2008). Le sexe masculin est un risque significatif de SWB et est associé à un début précoce et une expression sévère de la maladie (Sadler SL et al. 2001).

Des études histologiques réalisées sur les artères de patients SWB ont montré un épaississement global de la paroi artérielle même au niveau des endroits non sténotiques. On note, dans la média, une augmentation du nombre de lames élastique de 2,5 fois, ainsi que leur fragmentation avec hyperprolifération et désorganisation des cellules musculaires lisses qui envahissent souvent l'intima dans certains cas de lésion SVAS, particulièrement de type « sablier » (coarctation) (figure 15). On note aussi un pourcentage élevé (40-70%) de cas d'hypertension artérielle et l'hypertrophie ventriculaire gauche surtout chez les patients SWB présentant une artériopathie sévère (Broder K et al 1999, Giordano U et al 2001). L'origine n'est pas bien connue et elle est dans la plus part des cas idiopathique. Les anomalies valvulaires, particulièrement de la valve mitrale, sont détectées chez ces patients (Hallidie-Smith KA et Karas S 1988, Bruno E et al 2003). Chez les patients SVAS et SWB, on note un déséquilibre de la balance MMP9/TIMP1 en faveur de la dégradation matricielle, déséquilibre qui pourrait influencer la migration des cellules musculaires lisses et la néoplasie intimale (Dridi SM et al 2005).

La mutation ou la microdélétion du gène de l'élastine dans le SWB ou la SVAS conduit à une diminution de la sécrétion de l'élastine. Des études réalisées à la fois chez l'humain et la souris ont montré que l'élastine joue un rôle majeur dans la différenciation, la quiescence et la prolifération des cellules musculaires lisses. Les cellules musculaires lisses isolées de patients SWB ou SVAS montrent une prolifération accrue inversement proportionnelle à la quantité d'élastine produite. Ce phénotype hyperprolifératif et migratoire est normalisé par le traitement des cellules avec de la tropoélastine ou de l'élastine (Urban Z et al 2002, Karnik SK et al 2003). Chez les souris déficientes en élastine, on note une prolifération des cellules musculaires lisses à la fois in vivo et sur une culture d'organe (Li DY et al. 1999). L'absence d'une quantité suffisante d'élastine sécrétée provoque une

augmentation du nombre d'unités lamellaires (lame élastique avec une couche de cellules musculaires lisses) et un épaississement de la paroi aortique au cours du développement fœtal conduisant à une diminution de la lumière des vaisseaux sanguins (sténose). Ceci est suivi par un profond remodelage postnatal. Ce remodelage a surtout lieu dans les zones de forte turbulence comme la zone supra-valvulaire ou les zones d'embranchement de vaisseaux, d'où la localisation préférentielle de la sténose à ces endroits (Pober BR et al. 2008).

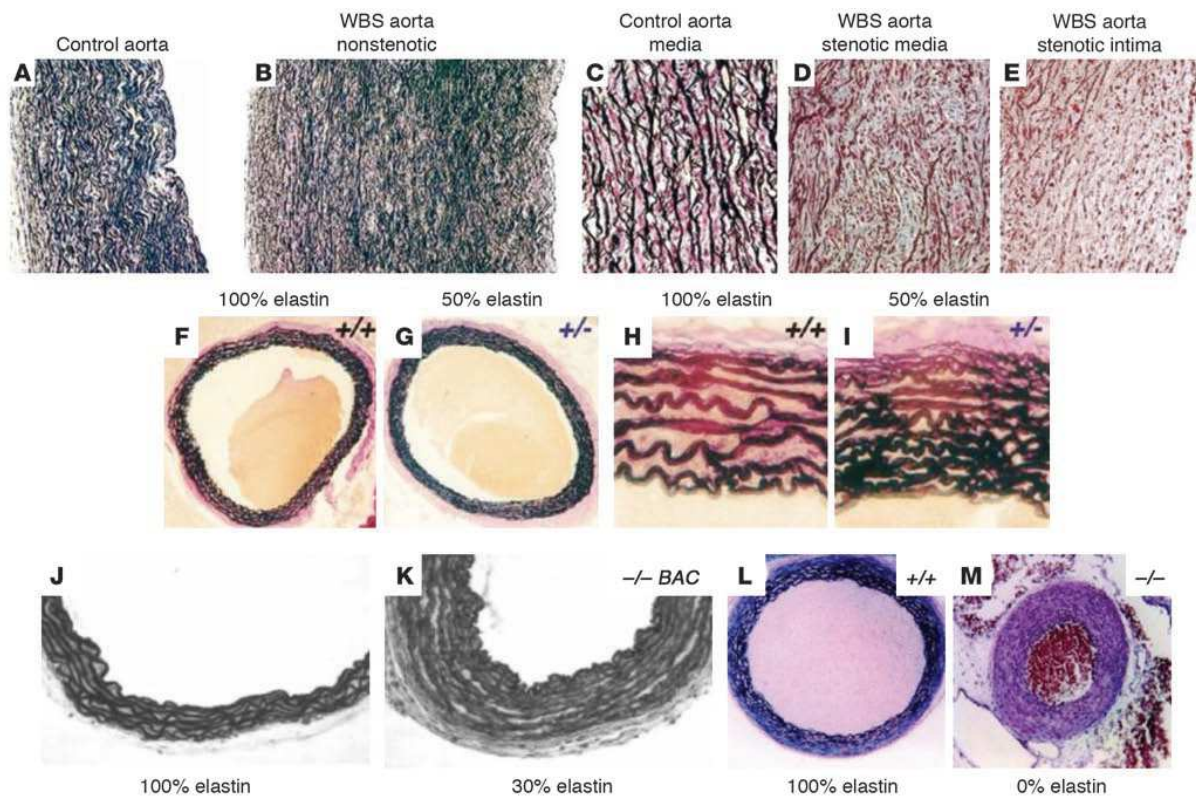


Figure 15 : Anomalies vasculaires du SWB et dans les modèles animaux de déficience en élastine. Sections transversale d'aortes, chez un enfant de 2 ans sains (A,C) et chez un patient du SWB avec une sévère SVAS (B, D et E) marquées avec du pentachrome de Movat pour visualiser les lames élastiques (en noir). Noter un épaississement de la paroi malgré une relative préservation de l'architecture des lames élastiques dans un segment non sténotique de l'aorte (B). Dans la région sténotique, les lames élastiques de la media sont fragmentées et les cellules musculaires lisses sont désorganisées (D) et présentent quelques zones focales de prolifération dans l'intima (E) dans certaines lésions SVAS. Chez les souris hétérozygotes pour le gène de l'élastine (Eln +/-) , noter une augmentation du nombre et une diminution de l'épaisseur des lames élastiques (G et I) comparés aux témoins sauvages (F et H). Noter l'occlusion de l'aorte en cas de perte totale de l'élastine chez les souris homozygotes (-/-) à P0,5 (M) comparées aux souris témoins du même âge (L). D'après Pober BR et al. 2008

Le traitement le plus sûr des lésions vasculaires du SWB reste actuellement la chirurgie. Cependant les bêta-bloqueurs et les bloqueurs de canaux calciques ont aussi été

utilisés dans le passé. Les thérapies alternatives futures pourraient utiliser les molécules qui soit favoriseraient la biosynthèse de l'élastine, ou supprimeraient la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. Parmi ces molécules, on pourra citer le minoxidil, un ouvreur de canaux potassiques (Tsoporis J et al 1998), les glucocorticoïdes (Pierce RA et al 1995) et les rétinoïdes (McGowan SE et al 1997) qui entraînent tous une capacité d'augmentation de la production d'élastine in vivo (Pober BR et al. 2008)

I.4.1.1.3. *Le cutis laxa*

Le cutis-laxa est une maladie génétique rare du tissu conjonctif qui est caractérisée par une laxité (relâchement) et inélasticité de la peau. Elle peut être acquise. Il existe plusieurs formes de la cutis-laxa, chacune présentant une hétérogénéité considérable dans la manifestation clinique (Schreiber MM et al 1961) : deux formes autosomiques récessives, type I et type II, et une forme autosomique dominante.

La forme autosomique dominante de la cutis-laxa est due à la mutation du gène de l'élastine. La plupart des mutations du gène de l'élastine associées à cette pathologie sont des délétions d'un seul nucléotide à proximité de l'extrémité 3' du gène, résultant en l'altération du domaine C-terminal de la tropoélastine, important pour l'assemblage des fibres élastiques (Tassabehji M et al 1998, Zhang MC et al. 1999, Rodriguez-Revenga L et al. 2004). Ceci soulève l'hypothèse d'un mécanisme dominant négatif dans la survenue du cutis-laxa autosomique dominant (Tassabehji M et al 1998). Cette forme s'accompagne souvent de sténoses de l'artère pulmonaire et des dilatations et tortuosités artérielles et aortiques.

La forme autosomique récessive de type I de la cutis-laxa, très sévère, est due à des mutations du gène de la fibuline-5 ou de la fibuline-4 (Hutthagowder et al.2006) alors que celle de type II est due à la mutation de ATP6V0A2 compromettant le trafic vésiculaire et la sécrétion de l'élastine et affectant la survie cellulaire (Hutthagowder et al. 2009).

I.4.1.1.4. Modèles de souris déficientes en élastine

Des modèles de souris hémizygotes pour le gène de l'élastine ont été générées pour étudier la pathogénèse de la SVAS et du SWB. Ces souris ont montré des caractéristiques communes à ces pathologies, à savoir l'hypertension artérielle, l'hypertrophie cardiaque et des remodelages vasculaires se traduisant par l'augmentation du nombre de lame élastiques (figure 15 F-M), la diminution du diamètre luminal et la diminution de l'extensibilité des

artères élastiques (figure 16) (Li DY et al 1998b, Faury et al. 2003, Pezet M et al. 2008). Des études de microscopie électronique ont montré, dans la paroi aortique des souris Eln^{+/-}, la présence de lames élastiques plus fines et plus souvent fragmentées avec des contours irréguliers, et une accumulation subendothéliale de matrice extracellulaire, par rapport aux souris sauvages Eln^{+/+} (Pezet et al 2008). Alors que les souris hétérozygotes sont viables et fertiles, les souris homozygotes (Eln^{-/-}) meurent d'occlusion artérielle (figure 15M) dans les 72 heures après la naissance (Li DY et al. 1998a). Cette mortalité périnatale chez les souris Eln^{-/-} peut être prévenue par l'expression transgénique de l'élastine humaine, qui abolit partiellement la forte pression sanguine, le remodelage vasculaire et la diminution de la compliance chez ces souris (Hirano E et al. 2007).

Les souris hémizygotiques pour gène de l'élastine (Eln^{+/-}) présentent une hypertension artérielle pulmonaire en plus de l'hypertension artérielle systémique (Shifren A et al 2008) et présentent fréquemment au cours du vieillissement, des artères rénales pathologiques caractérisées par une dilatation et une inflammation massive. (Thèse Pezet M, 2006).

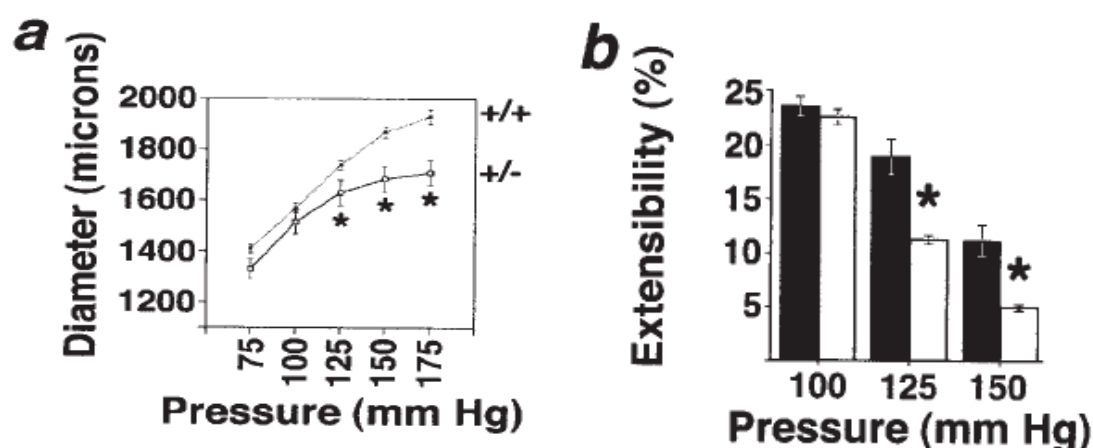


Figure 16 : Extensibilité des aortes de souris Eln^{+/+} et Eln^{+/-}. (a) courbe pression-diamètre. (b) extensibilité à différentes pressions. Le diamètre de l'aorte est plus faible et l'extensibilité diminuée au delà de 100 mm Hg de pression chez les souris Eln^{+/-} comparées aux souris Eln^{+/+}. D'après Li DY et al. 1998.

Toutes ces observations montrent que l'élastine joue un rôle important dans la morphogénèse vasculaire.

La pathogénèse vasculaire chez ces souris est la même que chez les patients SVAS ou SWB, décrite dans les chapitres précédents. L'haploinsuffisance de l'élastine induit une

hyperprolifération des cellules musculaires lisses avec une augmentation du nombre d'unités lamellaires. Ceci aboutit à la diminution de la lumière des grosses artères en particulier l'aorte ascendante qui est la plus touchée certainement à cause de sa constitution en élastine (~50% de son poids sec) mais aussi du stress mécanique qu'elle subit. Chez les souris hémizygotes pour le gène de l'élastine, il a été montré qu'un phénomène d'adaptation se met en place. C'est l'augmentation de la pression artérielle de sorte que le diamètre de travail de l'aorte soit identique à celui chez les souris sauvage, pour l'assurance d'une perfusion normale des organes. Cet état d'hypertension artérielle est en partie lié à une dérégulation du système rénine-angiotensine (Faury G et al. 2003).

1.4.1.2. Pathologies liées à une anomalie touchant un composant des microfibrilles

1.4.1.2.1. Les fibulines

A ce jour, les anomalies touchant les fibulines -1 et -2 n'ont été associées à aucune pathologie humaine. En revanche, la déficience en fibuline-1 chez la souris provoque une létalité périnatale des suites d'un saignement dans vaisseaux capillaires (épargnant les grosses artères) (Kostka G et al. 2001). Les souris déficientes en fibuline-2 présente un phénotype normal et n'ont aucune altération des fibres élastiques (Sicot FX et al 2008). Chez l'humain, la mutation du gène de la fibuline-3 (EFEMP1) est impliquée dans la dégénérescence maculaire génétique (Malattia Laventinese) ressemblant à celle qui survient avec l'âge (Michaelides M et al 2006). Les souris déficientes en fibuline-3 présentent les phénotypes associés à un vieillissement précoce (réduction de la longévité, diminution de la masse corporelle et perte de poils, et atrophie des muscles et des organes...) mais curieusement, ne présentent pas de dégénérescence maculaire (McLaughlin PJ et al 2007). La mutation hétérozygote du gène de la fibuline-4 chez l'humain est associée à la forme autosomique récessive du cutis-laxa, à l'emphysème, la tortuosité aortique, l'anévrisme de l'aorte ascendante (Huchtagowder V et al. 2006, Dasouki M et al. 2007). Les souris présentant une expression hypomorphique de fibuline-4 (Fibulin-4^{R/R}) présentent aussi la tortuosité aortique, l'anévrisme de l'aorte ascendante (figure 16) et une rigidité de l'aorte qui résulte de la désorganisation des fibres élastiques. Ces souris présentent aussi une sténose et insuffisance valvulaire et une perturbation de la signalisation du TGF beta (Hanada K et al 2007). Les mutations du gène de la fibuline-5 sont responsables de la forme autosomique récessive du cutis-laxa chez l'Homme (Hu Q et al. 2006, Loeys B et al 2002, Markova D et al 2003). Les souris déficientes en fibuline-5 (Fibulin-5^{-/-}) présentent les même caractéristiques que celles

des souris *Fibulin-4^{-/-}* (tortuosité aortique, rigidité aortique, anomalie des fibres élastiques, perte d'élasticité de la peau, emphysème) avec une sévérité moindre. Ces souris présentent en plus un élargissement du ventricule droit (Nakamura T et al. 2002) et la formation de multiples néovaisseaux inexistantes chez les souris témoins (angiogenèse aberrante).

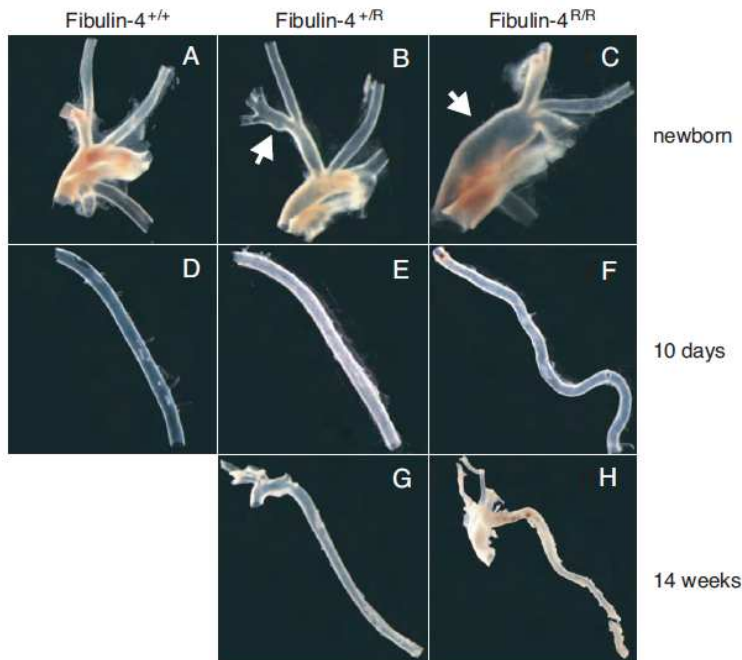


Figure 17 : Anomalies aortiques de souris *Fibuline-4^{+/R}* et *Fibuline-4^{R/R}*. A-C arc et bifurcation de l'aorte de souris nouveau-né *Fibuline-4^{+/+}*, *Fibuline-4^{+/R}* et *Fibuline-4^{R/R}*. Noter l'anévrisme sur l'artère sous-claviculaire chez la souris *Fibuline-4^{+/R}* (flèche blanche en B). L'aorte ascendante est allongée et sévèrement dilatée (flèche blanche en C). D-F Aorte abdominale de souris *Fibuline-4^{+/+}*, *Fibuline-4^{+/R}* et *Fibuline-4^{R/R}* âgées de 10 jours. L'aorte de souris *Fibuline-4^{+/R}* est moins transparente que celle de souris contrôle et les aortes de souris *Fibuline-4^{R/R}* sont allongées et tortueuses. G et H, les hémorragies intra-vasculaires sont visibles dans les aortes de souris *Fibuline-4^{R/R}* âgées de 14 semaines. D'après Hanada H et al 2007.

1.4.1.2.2. *Les LTBP*s

Les mutations du gène du LTBP-2 sont responsables du glaucome primaire congénital caractérisé par une pression intra-oculaire élevée qui apparaît très tôt (dès l'âge d'un an) et qui peut conduire à l'endommagement du nerf optique et à l'élargissement du globe oculaire, conduisant à la perte définitive de la vue (Ali M et al. 2009). Les autres membres de la famille des LTBP ne sont clairement responsables d'aucune pathologie humaine connue. Néanmoins des études ont été réalisées sur des souris pour connaître l'effet de l'altération du gène des LTBP. Globalement, la signalisation du TGF beta est diminuée chez les souris déficientes en LTBP.

La déficience en LTBP-1L (forme longue de LTBP-1) chez la souris aboutit au *truncus arteriosus* (tronc artériel commun) permanent et l'interruption de la crosse aortique associée une diminution de la signalisation du TGF beta. Les souris LTBP-1L^{-/-} meurent à la naissance et on note aussi une létalité embryonnaire chez ces souris (Todorovic V et al. 2007).

La déficience en LTBP-2 est létale entre E3.5 et E6.5 du développement embryonnaire chez la souris (Shipley JM et al 2000).

La déficience en LTBP-3 conduit à des anomalies squelettiques et pulmonaires chez les souris (Dabovic B et al 2002, Colarossi et al 2005)

La déficience en LTBP-4 conduit à l'emphysème, et une cardiomyopathie progressive (commençant par le ventricule droit). Les souris LTBP-4^{-/-} sont en bonne santé jusqu'à l'âge de 6-8 mois, après leur état se dégrade rapidement (Sternier-Kock A et al. 2002)

1.4.1.2.3. Fibrilline-1 (fibrillinopathies)

Les maladies génétiques du tissu conjonctif dues à une mutation hétérozygote des gènes des fibrillines (1, 2 et 3) sont connues sous le nom générique de fibrillinopathies. Alors que la mutation du gène de la fibrilline-2 aboutit à une seule maladie, le syndrome de Beals ou arachnodactylie contracturale congénitale (CCA), la mutation de celui de la fibrilline-1 est quand à elle responsable d'une série de maladies incluant :

- différentes formes du syndrome de Marfan : le syndrome de Marfan sera discuté dans les chapitres suivants.
- la forme dominante du syndrome de Weill-Marchesani : caractérisée par une petite taille, la brachydactylie, une rigidité articulaire et des anomalies oculaires (myopie, glaucome). (Faivre L et al 2003)
- le syndrome de Shprintzen-Goldberg (ou syndrome marfanoïde-craniosynostose) : craniosynostose (dysmorphie du crâne et de la face), caractéristiques Marfanoïdes, anomalies squelettiques, neurologiques et cardiovasculaires (Sood S et al. 1996, Robinson PN et al. 2006)
- le syndrome MASS (anomalies touchant la valve mitrale, l'aorte, le squelette et la peau) : anomalies squelettiques et de la peau, prolapsus de la valve mitrale, dilatation aortique sans dissection (Dietz HC et al. 1993).

- « *l'ectopia lentis* » familiale, la sclérose systémique : mauvais positionnement ou déplacement du cristallin par rapport à sa position normale (Ades LC et al 2004).
- la forme familiale de l'anévrisme/dissection aortique thoracique : elle sera discutée dans un chapitre ultérieur (Milewicz DM et al. 1996).

Les fibrillinopathies impliquent les différents organes dans lesquels les fibrillines sont exprimées. Le système cardiovasculaire est très fortement impliqué dans le syndrome de Marfan et dans l'anévrisme/dissection aortique thoracique familiale, alors qu'il l'est rarement dans les autres types de fibrillinopathies. Dans ces deux pathologies, la principale cause de mortalité est la dissection et rupture de l'aorte ascendante.

I.4.1.2.3.1. Anévrisme et dissection de l'aorte thoracique

L'anévrisme aortique est une dilatation anormale de l'aorte conduisant à une augmentation de plus de 50 % de sa taille normale. Elle peut être d'origine génétique comme dans le cas du syndrome d'Ehlers-Danlos de type IV (mutation du gène de la sous unité alpha-1 du collagène III) (Pepin M et al. 2000), de la valve aortique bicuspidée (BAV) (Clementi M et al. 1996, Glick BN et Roberts WC 1994), ou du syndrome de Marfan (mutation du gène de la fibrilline-1) (Judge DP et Dietz HC 2005), ou acquise comme au cours du vieillissement (Grimshaw GM et Thompson JM 1997) ou même d'origine inconnue (idiopathique) (Marin-Manzano E et al. 2009, Gasparovic H et al. 2005). L'anévrisme peut toucher différentes parties de l'aorte, du sinus de Valsalva à la base de l'aorte ascendante jusqu'à la bifurcation iliaque à l'extrémité de l'aorte abdominale infrarénale. L'anévrisme peut être classé selon la morphologie, l'étiologie ou la localisation anatomique. En se fondant sur la morphologie, on distingue deux types d'anévrismes : l'anévrisme sacculaire (dilatation excentrique de l'aorte) et l'anévrisme fusiforme (dilatation uniforme impliquant toute la circonférence de la paroi aortique). Une classification du type d'anévrisme a été établie par Stanford et DeBakey (figure 18) sur la base de la localisation anatomique.

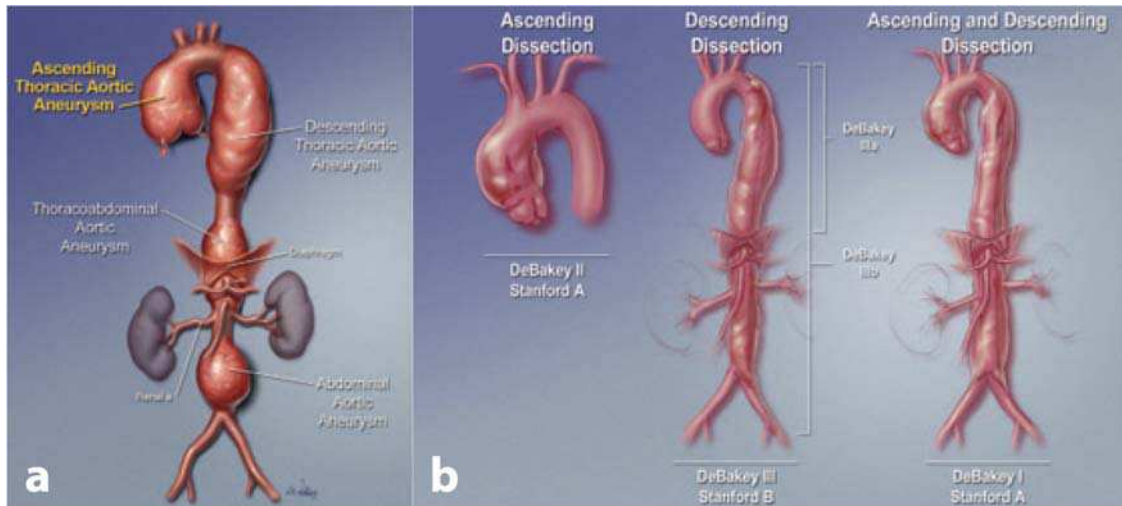


Figure 18 : Localisation et classification anatomiques des anévrismes et dissections. a) Localisation anatomique des anévrismes, b) classification des dissections aortiques initiées dans l'aorte thoracique. D'après Milewicz DM et al 2008.

La pathogénèse de l'anévrisme commence à être connue. Elle est différente selon que l'anévrisme se situe au niveau de l'aorte thoracique (aorte ascendante ou /et descendante) ou de l'aorte abdominale, cette deuxième localisation étant au moins trois fois plus fréquente que la première (Kuivaniemi H et al. 2008).

L'anévrisme de l'aorte abdominale est caractérisé par une inflammation locale chronique de la paroi vasculaire, une diminution du nombre de cellules musculaires lisses dans la média et une fragmentation de la matrice avec une dégradation de l'élastine (Thompson RW 2002). L'expression et l'activation locale de certaines MMP est aussi notée (Thompson RW 2002). Une nécrose de la media avec infiltration de leucocytes est présente dans de nombreux cas.

Au niveau de l'aorte ascendante, l'anévrisme est caractérisé par la dégénérescence de la media aortique avec dégradation des fibres élastiques et du collagène et une accumulation du matériel mucoïde (polysaccharides). On note aussi la perte des cellules musculaires lisses par un processus apoptotique plutôt que nécrotique (Hasham SN et al 2002).

La dissection aortique est une déchirure de la paroi aortique séparant l'intima et la partie interne de la media de sa partie externe et l'adventice et permettant ainsi au sang de rentrer dans la media (Baxter BT 2005). La dissection est plus fréquente au niveau de l'aorte proximale, alors que la plupart des anévrismes sont situés au niveau de l'aorte distale. La

dissection aortique est généralement précédée par une dilatation, mais dans de rares cas elle survient sans dilatation préalable de l'aorte (Baxter BT 2005).

I.4.1.2.3.2. *Le syndrome de Marfan*

Le syndrome de Marfan, lié à la mutation du gène de la fibrilline-1, est une maladie systémique du tissu conjonctif qui tire son nom du pédiatre parisien Antoine-Bernard Marfan. Il touche 2 à 3 personnes sur 10000 dans le monde (Judge DP et Dietz HC 2005). Il se manifeste au niveau des systèmes squelettique (excroissance osseuse), oculaire (dislocation du cristallin), cardiovasculaire (anévrisme et rupture aortique) et pulmonaire ainsi qu'au niveau de la peau. Les atteintes du système cardiovasculaire constituent la principale cause de mortalité due à cette pathologie et se divisent en deux catégories: les atteintes touchant le cœur et celles affectant les vaisseaux sanguins (Judge DP et Dietz HC 2005).

Au niveau cardiaque, on note les événements suivants:

- un épaissement des valves cardiaques (atrio-ventriculaires) souvent associé au prolapsus des valves bicuspidés ou tricuspides,
- une calcification de l'anneau mitral,
- une insuffisance de la valve mitrale conduisant à la défaillance cardiaque congestive
- une cardiomyopathie dilatée (dilatation anormale des ventricules).

Au niveau vasculaire, l'aorte ascendante est le vaisseau le plus touché, voire le seul dans certains cas. La dilatation, puis la rupture, de l'aorte ascendante est l'une des principales caractéristiques du syndrome de Marfan et la principale cause de décès chez les patients. La dilatation est plus importante au niveau de la racine aortique (figure 19). Elle y est souvent restreinte mais peut s'étendre sur toute l'aorte thoracique (ascendante et descendante) et, dans certains cas, on note aussi un anévrisme de l'aorte abdominale. La dilatation de l'aorte évolue progressivement avec l'âge, mais dans la forme infantile particulièrement sévère, la dilatation du sinus du Valsava peut parfois commencer in utero (Ramaswamy P et al. 2006, Lopes KR et al. 2006). Le dysfonctionnement des valves aortiques est un phénomène tardif qui fait suite à l'étirement de l'anneau aortique dû à l'expansion anévrysmale de la racine aortique.

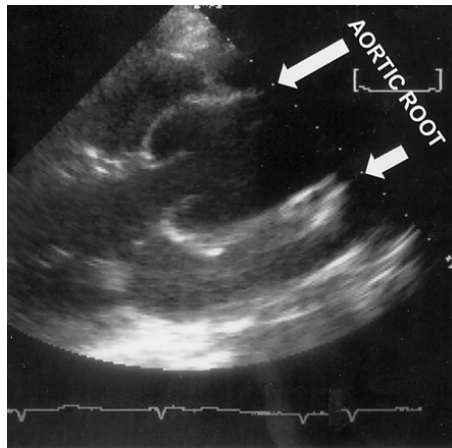


Figure 19: Echocardiogramme bi-dimensionnel (vue longitudinale) illustrant une racine aortique dilatée, impliquant principalement le sinus de Valsalva, chez une patiente de 47 ans atteinte du syndrome de Marfan. D'après Nicola C Ho et al. 2002.

Des études ultrastructurales de l'aorte de patients atteints du syndrome de Marfan avec dissection aortique, ont montré que les lames élastiques perdent leurs connections avec les cellules musculaires lisses et deviennent lisses (figure 20). Ces études montrent aussi une accumulation de collagène fibrillaire dans certaines parties de l'aorte (figure 20 A), la libération de vésicules de matrice libérées par les cellules musculaires lisses et occasionnellement des gros fragments cellulaires suggérant un mécanisme d'apoptose.

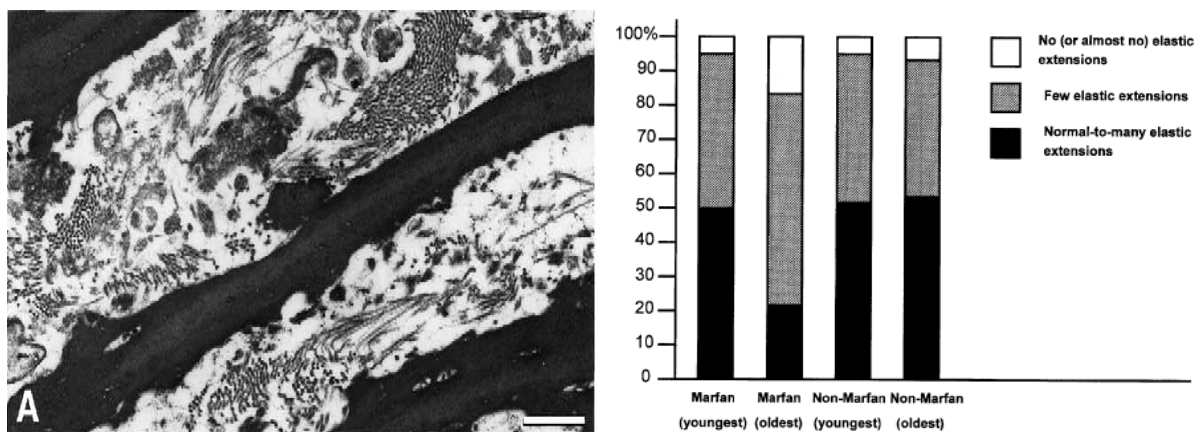


Figure 20 : Gauche : Région fibrotique d'une partie de l'aorte sévèrement endommagée d'un patient Marfan. Les lames élastiques sont lisses suite à la disparition des extensions élastiques. L'espace interlamellaire contient principalement du collagène fibrillaire. Barre = 1µm. Droite : pourcentage de surface de tissu avec différents nombres d'extensions élastiques dans l'aorte de patients avec ou sans syndrome de Marfan. Noter la perte de connections entre les cellules musculaires lisses et les fibres élastiques qui s'accroît chez les patients Marfan âgés. D'après Dingemans K.P et al. 2006.

En utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'échographie, il a été montré que les patients atteints de syndrome du Marfan ont une distensibilité aortique plus faible et un indice de rigidité plus élevé comparés aux sujets normaux (Adams JN et al. 1995, Vitarelli A et al. 2006) (figure 21)

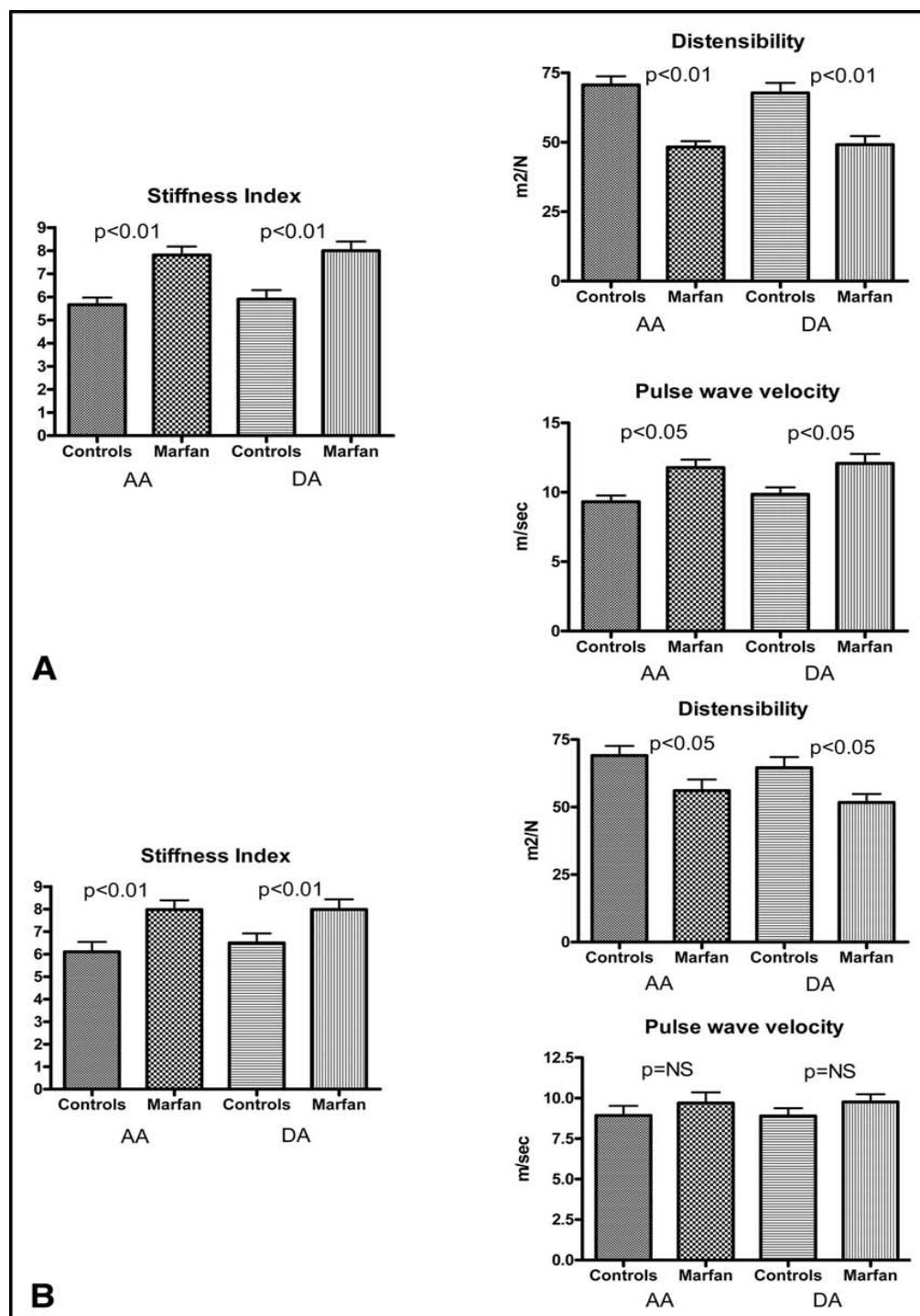


Figure 21: Valeurs standard d'examen échographique de patients atteints du syndrome de Marfan avec dilatation aortique (A) et des patients avec des diamètres aortiques normaux. AA : aorte ascendante. DA : aorte thoracique descendante. D'après Vitarelli A et al 2006.

Le syndrome de Marfan est dû à la mutation du gène de la fibrilline-1, dans 90 % des cas, (Dietz HC et al. 1991) ou des récepteurs de type I et II du TGF beta (TGF beta R1 et R2 respectivement) (Mizuguchi T et al. 2004, Singh KK et al. 2006). Ces récepteurs permettent la transduction de la signalisation par le TGF beta dans la cellule. Cette dernière contrôle un certain nombre de phénomènes cellulaires comme la prolifération, la différenciation, et l'apoptose (Shi Y et Massague J 2003).

Au niveau moléculaire, plus de 600 mutations dans le gène de la fibrilline-1 ont été identifiées comme étant responsables du syndrome de Marfan (<http://www.umd.be>). Ces mutations se divisent en deux groupes (figure 22) :

1) des mutations conduisant à un raccourcissement de la protéine (protéine tronquée) : elles représentent 1/3 des mutations et consistent en des mutations non-sens, des erreurs d'épissage, de petites délétions et insertions conduisant à un codon STOP prématuré, des délétions « multi-exoniques ». Les mutations responsables de l'apparition d'un codon STOP prématuré ont pour conséquence de réduire énormément la production de la protéine à partir de l'allèle mutée (Collod-Beroud G et Bioleau C 2002). En effet, on note une forte diminution de la quantité de fibrilline-1 produite chez certains patients atteints du syndrome de Marfan probablement suite à une dégradation des ARNm provenant de l'allèle mutée ou en lien avec une rétention intracellulaire de la fibrilline-1 (Raghunath M et al. 1995). Alternativement, ces mutations conduisent à la formation d'un monomère de fibrilline-1 anormal qui interfère avec l'assemblage des molécules de fibrilline-1 normales (effet dominant négatif) ce qui a pour conséquence la réduction de la quantité de microfibrilles dans la matrice extracellulaire (Milewicz DM et al. 1992).

2) des mutations faux-sens qui représentent 2/3 des mutations du gène de la fibrilline-1. Ces mutations touchent fréquemment le site de fixation du calcium sur cbEGF et constituent en une délétion ou substitution d'un résidu cystéine, potentiellement impliqué dans une liaison disulfure. Ceci a pour conséquence : a) le repliement incorrect de la protéine augmentant ainsi sa susceptibilité aux protéases (Vollbrandt T et al. 2004, Booms P et al. 2000) ou b) la rétention intracellulaire de la fibrilline-1, dans le réticulum endoplasmique (Whiteman P et Handford PA 2003).

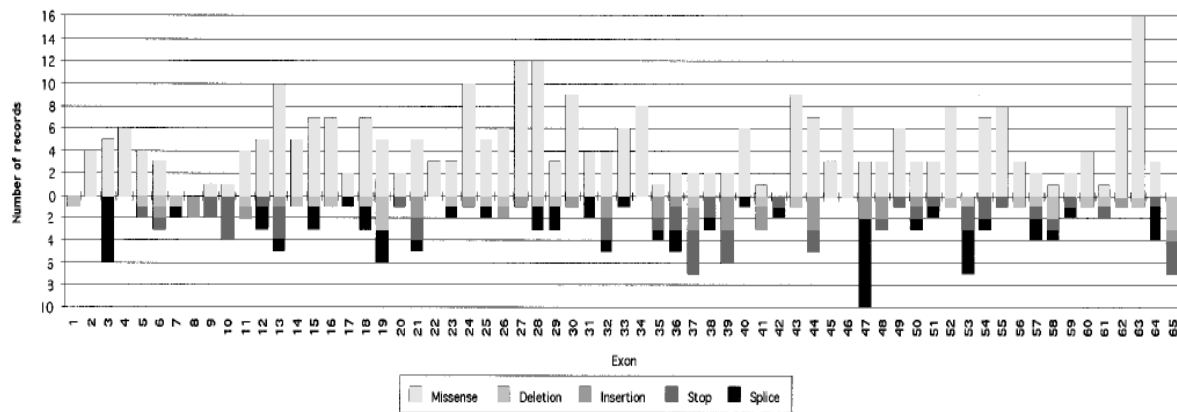


Figure 22: Distribution des mutations identifiées sur le gène de la fibrilline-1. D'après Collod-Bérout G et Boileau C. 2002

Malgré une avancée importante ces dernières années dans le diagnostic moléculaire, il n'est pas toujours possible de faire une corrélation génotype-phénotype dans le syndrome de Marfan. La raison en est l'hétérogénéité clinique. Des personnes d'une même famille portant la même mutation sur le gène de la fibrilline-1 peuvent souvent avoir des manifestations cliniques très différentes du syndrome de Marfan. Cette hétérogénéité clinique serait le résultat de facteurs environnementaux, la susceptibilité des microfibrilles aux dégradations protéolytiques ou même des facteurs stochastiques en plus des facteurs génétiques (Hutchinson S et al. 2003). Néanmoins, quelques associations ont pu être établies (Faivre L et al. 2007). Ainsi, les substitutions de cystéines, quelque soit l'emplacement, sont très fréquemment associées à « *l'ectopia lentis* ». A l'inverse, des mutations conduisant à un codon STOP prématuré sont associées à des phénotypes sévères squelettiques et de la peau. Les mutations dans les exons 24 à 32 sont associées à un pronostic sévère et complet chez les patients jeunes tout comme les patients âgés.

1.4.1.2.3.3. Modèles de souris portant une mutation de la fibrilline-1

Pour comprendre la pathogénèse du syndrome de Marfan, plusieurs modèles de souris portant des mutations dans le gène de la fibrilline-1 ont été créés. Les souris *mgΔ* sont générées par délétion des exons 19-24 (remplacés par une cassette NeoR), codant pour les domaines cbEGF8-TB3, dans le gène de la fibrilline-1. Chez l'humain, les mutations dans

cette région du gène de la fibrilline-1 sont associées à la forme néonatale du syndrome de Marfan. L'allèle mutant est exprimé à hauteur de seulement 10 % par rapport à l'allèle sauvage chez les souris Fbn-1^{mgΔ/mgΔ} (Pereira L et al. 1997). On note chez ces souris la présence de fragmentations focales des fibres élastiques et une accumulation de matrice amorphe. Des microfibrilles sont cependant formées malgré la présence de fibrilline mutante. Si les souris hétérozygotes (Fbn-1^{mgΔ/+}) sont viables et fertiles avec peu de différences perceptibles par rapport au souris sauvages jusqu'à l'âge adulte, les homozygotes (Fbn-1^{mgΔ/mgΔ}) meurent 2 à 3 semaines après la naissance en moyenne, des suites de dissections anévrismales de l'aorte ascendante. L'incapacité des microfibrilles à soutenir le stress hémodynamique dans l'adventice semble être la cause de la dilatation aortique. En revanche, il n'y a pas d'anomalie squelettique chez ces souris homozygotes. Au niveau pulmonaire, ces souris homozygotes présentent une altération de la septation alvéolaire distale associée à une augmentation de l'activation et de la signalisation par le TGF beta qui peut être prévenue par l'administration d'anticorps neutralisants le TGF beta pendant la période périnatale (Neptune ER et al. 2003).

Un autre modèle de souris mutée pour la fibrilline-1 a été accidentellement créé par insertion de la cassette NeoR dans l'intron 18 sans réarrangement de la séquence génique codante (souris mgR). L'allèle mutant est exprimé à hauteur de 15-20% par rapport à l'allèle sauvage (Pereira L et al. 1999). Les souris hétérozygotes (Fbn-1^{mgR/+}) sont viables et ne présentent pas d'anomalies majeures durant leur vie. Les souris homozygotes (Fbn-1^{mgR/mgR}) meurent au bout de 3 à 6 mois après la naissance d'insuffisance pulmonaire et vasculaire. Les souris homozygotes présentent des anomalies squelettiques (cyphose, excroissance des côtes). Au niveau vasculaire, ces souris présentent une calcification médiale des fibres élastiques à partir de 6 semaines, une hyperplasie intimale typiquement présente à partir de 9 semaines, et plus tard une inflammation adventitielle. Les zones où surviennent ces événements sont spatialement proches. Une étude biomécanique sur l'aorte de ces souris montre une augmentation de la rigidité vasculaire (Marque V et al. 2001). Ces souris présentent aussi, au niveau de l'aorte, des ruptures fréquentes de leurs lames élastiques, qui en devenant plus lisses, perdent leur connexion avec les cellules musculaires lisses (Bunton TE et al. 2001). Dans l'aorte, les microfibrilles lient les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses adjacentes aux fibres élastiques à travers des structures appelées « filaments de connexion » (Davis EC et al 1994 et 1993). La perte de ces connexions survient dans l'aorte des souris Fbn-1^{mgR/mgR} (Bunton TE et al. 2001). Lorsque cette perte dépasse un certain seuil, les cellules musculaires lisses initient un programme de synthèse de matrice extracellulaire (MEC) qui va

conduire à l'accumulation de cette protéine dans la paroi et l'augmentation de la rigidité vasculaire. En plus des protéines matricielles, les cellules musculaires lisses sécrètent aussi des enzymes protéolytiques comme la MMP-2 et MMP-9 qui vont permettre l'élastolyse et contribuer ainsi au collapsus mécanique de la paroi de l'aorte (figure 23) (Xiong W et al. 2008).

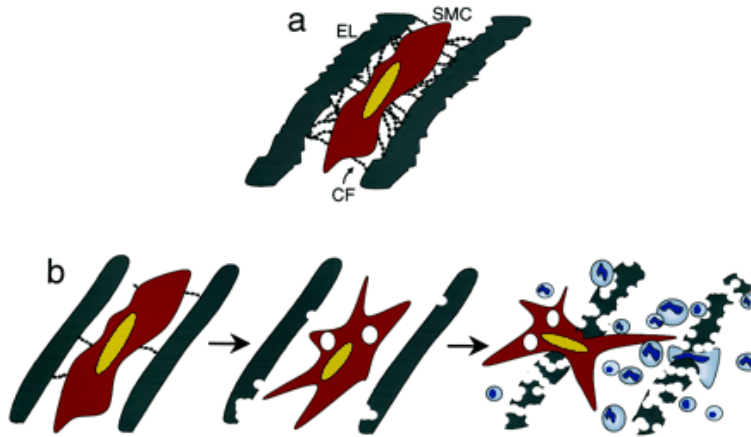


Figure 23: Modèle d'élastolyse acquise dans le syndrome de Marfan. Les cellules musculaires lisses sont attachées à des lames élastiques voisines par des filaments de connexion (CF) composés de fibrilline-1 (a). Les patients atteints du syndrome de Marfan (b) commencent leur vie avec une déficience génétique des CF et peuvent perdre leurs connexions résiduelles avec le temps, initiant une modification de l'état synthétique de la cellule qui contribue à l'élastolyse précoce. L'élastolyse intense peut s'associer avec l'infiltration de cellules inflammatoires dans la media et précipiter le collapsus de la paroi vasculaire. D'après Bunton et al. 2001

L'étude des deux modèles de souris *mgΔ* et *mgR* a montré que des fibres élastiques morphologiquement normales sont présentes (entre les lésions focales et dans les tissus normaux) malgré la mutation de la fibrilline-1. Il avait été conclu que la fibrilline-1 joue un rôle plutôt dans l'homéostasie tissulaire que dans le développement des fibres élastiques et des tissus. Le fait que l'expression du gène de la fibrilline-2 précède celle de la fibrilline-1 et a lieu pendant le développement a soulevé l'hypothèse que la fibrilline-2 joue un rôle prépondérant dans l'assemblage des fibres élastiques. Cette hypothèse a été démentie par le fait que la déficience en fibrilline-2 n'a pas montré d'effet apparent sur l'élastogénèse (Chaudhry SS et al. 2001).

Un troisième modèle de souris a été créé pour permettre de trancher entre les deux hypothèses de pathogénèse du syndrome de Marfan, à savoir le modèle dominant négatif et le modèle de l'haploinsuffisance. Ce modèle de souris porte une mutation ponctuelle qui substitue la cystéine 1039 dans le domaine cbEGF11 par une glycine (mutation C1039G)

(Judge DP et al. 2004). La mutation correspondante (C1039Y) chez l'Homme aboutit à la forme classique du syndrome de Marfan (Schrijver I et al. 1999). Le niveau d'expression de l'allèle portant la mutation C1039G reste inchangé par rapport à celui de l'allèle sauvage. Les souris hétérozygotes ($Fbn-1^{C1039G/+}$) présentent une difformité squelettique, des zones focales d'épaississement de la média avec désorganisation et fragmentation des lames élastiques ainsi que des zones fréquentes de dépôt de protéoglycanes dans l'aorte (figure 24). Il a également été mis en évidence, in vitro, sur des fibroblastes murins, une altération de la formation des microfibrilles. Les souris $Fbn-1^{C1039G/+}$ présentent, comme les souris $Fbn-1^{mg\Delta/mg\Delta}$, une augmentation de la signalisation par le TGF beta qui peut être prévenue par des anticorps neutralisants le TGF beta ou par le losartan, un bloqueur du récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT1) (Habashi JP et al. 2006). Alors que les souris non traitées présentent une dilatation de la racine aortique, un épaississement de la paroi aortique, et une augmentation de la signalisation du TGF beta, les souris traitées présentent une intégrité conservée de la paroi aortique avec des caractéristiques similaires à celle des souris sauvages. Le traitement par le losartan prévient également le défaut de septation alvéolaire (Habashi JP et al. 2006).

Le rôle central de la signalisation par le TGF beta dans la pathogenèse du syndrome de Marfan a remis en question le modèle selon lequel cette pathologie serait uniquement due à la faiblesse structurale des tissus, qui résulte d'une déficience en microfibrilles.

Les souris hétérozygotes $Fbn-1^{C1039G/+}$ présentent une contractilité altérée et une synthèse accrue de MMP-2 et 9 au niveau de l'aorte thoracique (Chung AW et al. 2007b). Elles présentent aussi, au niveau de l'aorte thoracique, une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium (Chung AW et al. 2007a).

Pour comprendre le rôle de la fibrilline-1 indépendamment des mutations observées dans le syndrome de Marfan, un dernier modèle de souris complètement déficient en fibrilline-1 ($Fbn-1^{-/-} = Fbn-1^{mgN/mgN}$) a été généré par interruption de l'exon 1 du gène par une cassette NeoR (Carta L et al. 2006). Contrairement aux précédentes mutations, celle-ci abolit toute expression de l'allèle mutant. Alors que les souris hétérozygotes ($Fbn-1^{mgN/+}$) sont viables et fertiles, les souris homozygotes ($Fbn-1^{mgN/mgN}$) meurent dans les deux premières semaines après la naissance de rupture d'anévrisme, de dysfonctionnement pulmonaire et/ou de collapsus du diaphragme (Carta L et al. 2006).

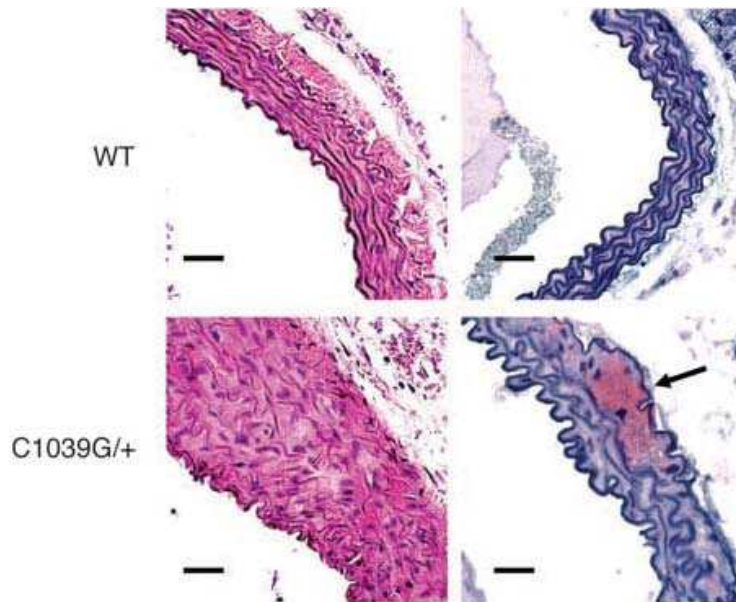


Figure 24: Coupe transversale de l'aorte de souris (6 mois) sauvage (WT) et hétérozygotes pour la mutation C1039G (C1039G/+) marquées à l'HE (à gauche) et la Safranine-O (marquage de protéoglycanes) (droite). Noter l'épaississement de zones focales avec la désorganisation et rupture des lames élastiques et dépôt de protéoglycanes indiquée par la flèche chez les souris mutantes. Barre d'échelle = 25µm. D'après Judge DP et al. 2004

Les souris homozygotes présentent une malformation et une excroissance des côtes. Elles présentent un phénotype inédit par rapport aux autres modèles de souris mutées pour la fibrilline-1 et le syndrome de Marfan en ce sens que l'anévrisme touche toute l'aorte ascendante au lieu de la racine aortique seulement (figure 25) et que la désorganisation des unités lamellaires de la media s'étend sur toute la distance de l'aorte ascendante. Les lames élastiques sont plus fines et désorganisées et la maturation de la paroi de l'aorte ascendante est altérée chez ces souris.

Tous ces résultats suggèrent que la fibrilline-1 joue un rôle important dans le développement et la maturation des fibres élastiques et de la paroi aortique pendant le développement fœtal et surtout pendant la croissance postnatale. On note aussi chez ces souris un décollement de l'endothélium, ce qui montre le rôle d'ancrage de la fibrilline-1 pour ces cellules. La combinaison des déficiences en fibrilline-1 et en fibrilline-2 (par croisement entre souris Fbn-1 ^{+/-} et Fbn-2 ^{+/-}) montre que les deux molécules ont des fonctions qui se recouvrent et que la présence de l'une des deux est impérative pour l'assemblage initial des fibres élastiques (Carta L et al. 2006). Quasiment tous les embryons double homozygotes Fbn-1 ^{-/-}; Fbn-2 ^{-/-} et la moitié des embryons Fbn-1 ^{+/-}; Fbn-2 ^{-/-} meurent in utero et présentent un phénotype vasculaire plus sévère que le souris Fbn-1 ^{-/-}. Ceci suggère que la fibrilline-2 n'est pas indispensable pour la phase tardive du développement des fibres élastiques qui

nécessite un dépôt de fibrilline-1 pour la maturation et la fonction des vaisseaux sanguins durant la vie néonatale.

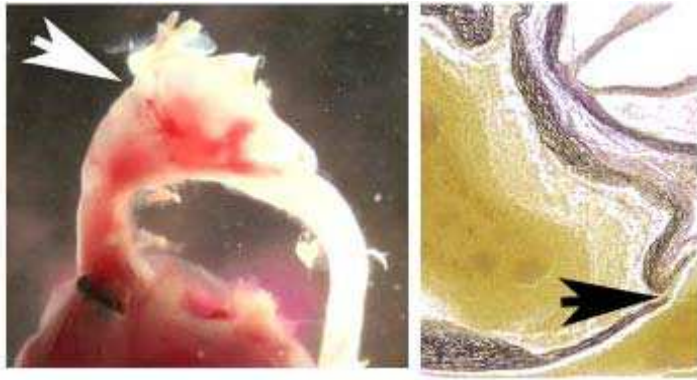


Figure 25 : Photo représentant un anévrisme de l'aorte ascendante (à gauche) d'une souris nouveau-né *fhn1* *mgN/mgN* avec marquage des fibres élastiques montrant une rupture de la paroi aortique (indiquée par la flèche noire à droite). D'après Carta L et al. 2006

La formation des fibres élastiques est un processus très contrôlé. Chaque constituant doit être sécrétée en quantité suffisante, à un période bien déterminée et avec une conformation bien précise, pour pouvoir participer à ce processus. Un défaut dans l'un des composants des fibres élastiques peut déstabiliser ce complexe et aboutir à une défaillance à terme d'un ou de plusieurs organes dans lesquels ils sont produits. Ces défauts, qui paraissent dans certains cas plus discrets pendant les premières phases de la vie, peuvent se révéler plus tard et sont accentués avec l'âge du fait de la dégradation que subit les organes au cours du vieillissement.

1.5. Le vieillissement vasculaire

Les vaisseaux sanguins font partie des organes les plus précocement et durement affectés lors du vieillissement. Le vieillissement vasculaire est un phénomène physiologique naturel qui peut être accompagné de pathologies comme l'athérosclérose, l'hypertension artérielle, l'anévrisme etc. Les grosses artères sont les plus affectées alors que les modifications des vaisseaux de petit calibre sont plus mineures. Les modifications artérielles structurales et fonctionnelles qui interviennent chez l'Homme au cours du vieillissement normal et en cas d'hypertension et d'athérosclérose sont récapitulées dans le tableau 2. On note principalement un dysfonctionnement endothélial, un épaissement de l'intima et souvent de la média, avec une accumulation de protéines matricielles, comme le collagène.

On note également une augmentation de la rigidité artérielle, qui résulte de la dégradation de l'élastine par les MMPs qui sont up-régulées.

Le vieillissement peut être influencé par des facteurs génétiques ou des facteurs environnementaux. La déficience génétique en élastine, chez la souris, par exemple conduit à un processus alternatif du vieillissement au cours duquel la paroi vasculaire est épargnée de l'épaississement et de l'altération de la vasoconstriction médiée par les récepteurs alpha adrénergiques qui sont observés classiquement chez les souris sauvages (Pezet M et al. 2008). La nourriture aussi a un effet sur le vieillissement vasculaire. La déficience en fer ou en acide ascorbique induit une altération de la structure et de la fonction vasculaire au cours du vieillissement (Hill CH et al. 2007, Ely JT 2004). Alors qu'une restriction calorique préserve la structure aortique des altérations associées au vieillissement (Fornieri C et al. 1999).

Tableau 2 : Modifications de la structure, fonction et composition artérielle avec l'âge, l'hypertension et l'athérosclérose.

Arterial Parameter	Aging				Hypertension	Atherosclerosis
	Humans >65 Years	Monkeys 15-20 Years	Rats 24-30 Months	Rabbits 3-6 Years		
Luminal dilation	+	+	+	+	±	?
↑ Stiffness	+	+	+	+	+	?
↑ Collagen	+	+	+	+	±	?
↓ Elastin	+	+	+	+	±	?
Endothelial dysfunction	+	+	+	+	+	+
Diffuse intimal thickening	+	+	+	+	+	+
Lipid involvement	-	-	-	-	±	+
↑ VSMC number	+	+	+	+	+	+
Macrophages	+	-	-	-	+	+
T cells	+	-	-	-	+	+
↑ Matrix	+	+	+	+	+	+
↑ Local Ang II-ACE	+	+	+	+	+	+
MMP dysregulation	+	+	+	?	+	+
↑ MCP-1/CCR2	+	+	+	+	+	+
↑ ICAM	?	?	+	?	+	+
↑ TGFB	?	+	+	?	+	+
↑ NADPH oxidase	?	?	+	?	+	+
↓ VEGF	+	?	?	+	+	+
↓ NO bioavailability	?	?	+	+	+	+
↓ Telomere length	+	+	+	?	?	+
Hypertension	±	±	±	±	+	±
Atherosclerosis	±	-	-	-	±	+

2005

Dans les grosses artères, on note une augmentation du diamètre artériel, et un épaississement de l'intima (figure 26) grâce à une migration des cellules musculaires lisses de la media vers cette tunique. On note aussi un épaississement (moindre que celui de l'intima) de la media alors que le nombre de cellules musculaires lisses diminue. Ceci est dû à une accumulation de matrice extracellulaire, en particulier du collagène et de la fibronectine, ainsi qu'à une hypertrophie des cellules musculaires lisses.

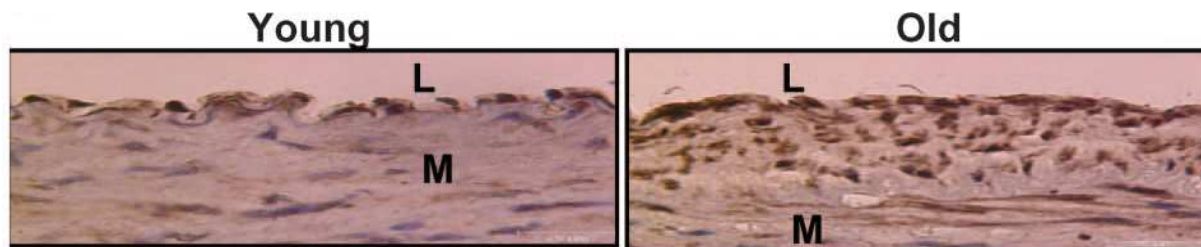


Figure 26: Vieillesse de l'intima artérielle. Modifications morphométriques de la paroi aortique de rats, montrant un épaississement significatif de l'intima (5 fois) chez les rats âgés (droite) comparés aux rats jeunes (gauche). D'après D'après Najjar SS et al. 2005

L'accumulation des produits terminaux de glycation (ou AGE) dans les artères avec l'âge conduit à l'établissement de liaisons croisées entre les molécules de collagène, ce qui le rend peu sensible à l'hydrolyse, permet son accumulation et modifie ses propriétés mécaniques en le rigidifiant. Une augmentation de la quantité de collagène I et III d'un facteur 4 a été observée dans l'aorte de rats au cours du vieillissement (Qiu Hongyu et al. 2007). La quantité d'élastine, quant à elle, semble ne pas être sensiblement modifiée au cours du vieillissement (Spina M et al. 1983, Pezet M et al 2008), mais quelques expériences ont indiqué une certaine diminution liée à l'âge (Cox RH et al 1983). La synthèse de l'élastine s'arrête très tôt après la naissance (quelques semaines chez la souris) (Davis EC 1995). Avec l'âge, l'élastine subit des modifications structurales qui sont la conséquence de la rupture due à la fatigue (failure), de la calcification, de l'action des MMP, de la glycation potentielle, ou de l'action de l'homocystéine. O'Rourke était le premier à suggérer que l'amincissement et la fragmentation de l'élastine artérielle au cours du vieillissement sont dus à la fatigue de l'élastine (O'Rourke MF et al 1976). Des expériences sur l'élastine d'aorte de porc ont montré que celle-ci subit des modifications structurales lors d'étirements cycliques. Plus l'étirement sur l'anneau d'élastine est important, plus la rupture survient tôt au cours des cycles successifs d'étirement (voir figure 27). Si les études sur l'effet du vieillissement sur les microfibrilles sont rares, il a néanmoins été suggéré que les microfibrilles des zonules (dépourvues d'élastine) subissent des modifications d'ordre structural (Hanssen E et al. 2001).

L'aorte ascendante subit la plus forte expansion en diamètre (10% contre 2-3% pour les artères de petit calibre) pendant le cycle cardiaque. C'est une des raisons pour lesquelles la fragmentation de l'élastine est plus importante à cette localisation que partout ailleurs dans l'arbre vasculaire.

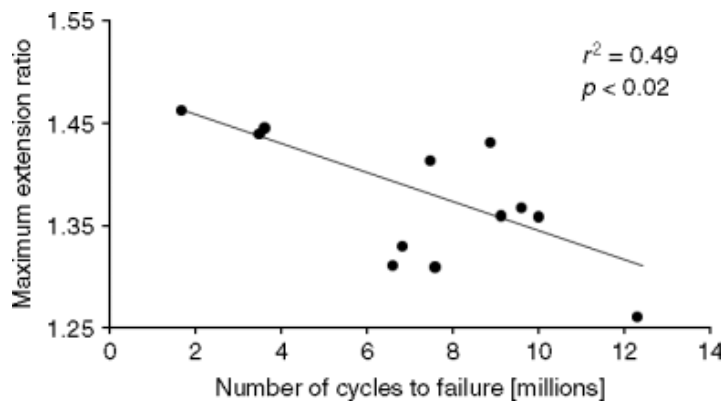


Figure 27 : Rupture de l'élastine due à la fatigue. Le nombre de cycles avant rupture d'anneaux d'élastine aortique de porc augmente lorsque l'extension maximale de l'anneau pendant chaque cycle d'étirement est réduite. D'après Greenwald SE 2007

Ces modifications structurales des composants des artères élastiques liées au vieillissement se traduisent par une altération des fonctions élastiques (de lissage de flux sanguin) de ces artères. Les artères élastiques, en particulier l'aorte, deviennent plus rigides, ce qui augmente l'impédance artérielle. Les ondes de réflexion se propagent plus rapidement (augmentation de la vitesse de l'onde pulsée (PWV)), ce qui a pour conséquence de diminuer la pression diastolique et d'augmenter la pression systolique et donc la pression pulsée qui est la différence entre les deux pressions précédentes. L'augmentation de la pression systolique demande plus de travail au ventricule gauche pour pouvoir pousser le sang dans les artères. Ceci conduit à une hypertrophie du ventricule gauche qui, à son tour, va prolonger le temps de contraction du cœur. La durée de la systole augmente et celle de la diastole diminue. L'augmentation de la durée de la systole va induire une augmentation supplémentaire de la pression à la fin de la systole du fait des ondes de réflexion (O'Rourke MF et Hashimoto J 2007, Greenwald SE 2007).

Dans la microcirculation, aucun changement structural majeur des vaisseaux n'a été détecté au cours du vieillissement. Des modifications fonctionnelles comme l'altération de la vasodilatation dépendante ou non de l'endothélium ont cependant été notées (Christensen KL et Mulvany MJ 2001, James MA et al. 2006). Ces altérations pourraient être dues à l'incapacité des artères proximales de lisser le flux sanguin et d'empêcher les fluctuations de pression de s'étendre jusque dans les artérioles et capillaires, altérant à terme l'endothélium (figure 28).

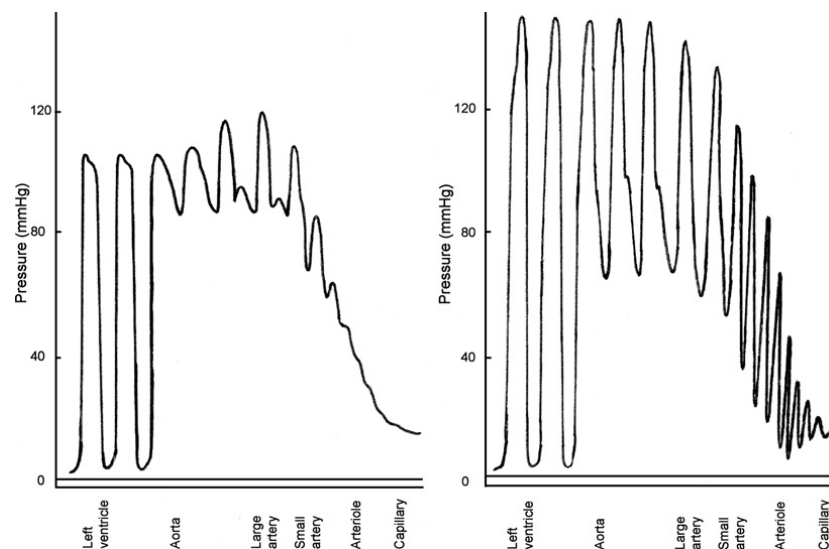


Figure 28 : Effet de l'âge sur les variations de la pression pulsatile entre le ventricule gauche et les capillaires. Noter l'extension des pulsations jusque dans la microcirculation chez les sujets âgés (droite) avec des artères rigides, comparés aux sujets jeunes (gauche). D'après O'Rourke MF et Hashimoto J. 2007

Le vieillissement apparaît ici comme un processus normal qui altère la structure et la fonction des différents organes, en particulier les vaisseaux sanguins qui sont les premiers et les plus touchés. Dans les vaisseaux sanguins, l'altération des fibres élastiques au cours du vieillissement perturbe l'homéostasie des tissus et conduit à des pathologies vasculaires. Les fragments issus de la dégradation des fibres élastiques contribuent à l'initiation ou à l'entretien de ces pathologies, par le biais de la signalisation qu'ils induisent dans les cellules vasculaires en se fixant sur leurs récepteurs à la surface de ces dernières. Les altérations initiales des fibres élastiques au cours du développement sont déterminantes dans les pathologies vasculaires qui apparaissent au cours du vieillissement. Des facteurs environnementaux comme la nourriture ont aussi une influence sur le vieillissement.

1.6. Présentation du sujet de thèse

Les fibres élastiques jouent un rôle majeur dans le développement. Chaque composant a un rôle particulier bien défini. L'élastine qui constitue le composant majeur des fibres élastiques (90 %), est importante dans le maintien de l'intégrité structurale de vaisseaux sanguins. Elle est responsable de l'élasticité des organes soumis à un étirement répétitif. En plus de son rôle structural, elle intervient au niveau de la signalisation cellulaire. Elle régule la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses au cours de la morphogénèse vasculaire. Lorsqu'elle est altérée pendant les phases initiales du développement, on assiste à un remodelage vasculaire qui se traduit par une hyperprolifération des cellules musculaires lisses qui aboutit à des pathologies vasculaires obstructives humaines comme la SVAS ou le SWB. Au cours du vieillissement, les fibres élastiques sont ensuite altérées, et l'élastine subit des modifications structurales (glycation, fixation du calcium et des lipides) qui lui font perdre son élasticité. Ceci contribue à l'augmentation de la rigidité vasculaire qui rend les vaisseaux sanguins susceptibles aux pathologies comme l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle et compromet la fonction cardiaque. L'élastine peut aussi être clivée par des protéases qui libèrent des fragments contenant des sites cryptiques qui vont activer les cellules vasculaires.

Les microfibrilles, bien que minoritaires par rapport à l'élastine chez les vertébrés, participent aussi à la mécanique vasculaire. Elles jouent seules ce rôle lorsque l'élastine est absente comme chez les poissons primitifs et les invertébrés. Les microfibrilles jouent un rôle structural dans la paroi vasculaire en servant de point d'ancrage pour les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses dans la média et participent à la morphogénèse artérielle.

Les microfibrilles sont des complexes protéiques dont le composant majeur est la fibrilline-1. Cette dernière participe largement à la propriété adhésive des microfibrilles comme ce fut montré par des études *in vivo* et *in vitro*. Sa participation aux propriétés mécaniques des microfibrilles est soupçonnée du fait que sa mutation entraîne une diminution des propriétés mécaniques des grosses artères élastiques. La fibrilline-1 participe aussi à la maturation de la paroi vasculaire.

Au cours du vieillissement, les microfibrilles subissent des altérations structurales et deviennent plus fragiles. La fibrilline-1 n'est pas exempte de ces altérations et des études *in*

vitro ont montré qu'elle est susceptible au clivage par les MMPs qui augmentent normalement avec l'âge.

Cependant, il reste quelques zones d'ombre autour de l'état des microfibrilles pendant le vieillissement vasculaire. On peut supposer le clivage des microfibrilles aortiques puis que celles-ci entourent l'élastine dans les fibres élastiques qui, on le sait, sont clivées, mais la présence de fragments de microfibrilles ou de fibrilline-1 issus de leur clivage n'a pas été démontrée jusqu'à présent. Un certain nombre de questions restent donc posées :

- La diminution de la distensibilité et la présence d'anévrismes et de dissections de l'aorte ascendante chez les patients atteints du syndrome de Marfan et chez les souris déficientes en fibrilline-1 pose la question du rôle des microfibrilles et de la fibrilline-1 en particulier dans l'élasticité de l'aorte, et dans la signalisation induite dans les cellules vasculaires.
- De plus, au cours du vieillissement normal, la quantité de microfibrilles (donc de fibrilline-1) diminue avec l'âge (de Carvalho Filho ET et al . 1996) et leur qualité aussi (Hanssen E et al 1998). Ceci pose la question de l'impact de ces modifications sur la structure et la fonction vasculaire.
- Enfin, la voie de signalisation activée par les microfibrilles, et la fibrilline-1 en particulier, dans les cellules vasculaires est peu connue et reste à étudier en détail, de même que les conséquences de cette signalisation sur la morphogénèse et sur la physiologie vasculaire.

L'élastine a été largement étudiée, son rôle a été analysé aussi bien au cours du développement que pendant le vieillissement, dans la fonction cardiovasculaire. Des études sur des souris hémizygotiques pour le gène de l'élastine ont montré que la déficience en élastine conduit à un processus de vieillissement artériel alternatif chez ces souris (Pezet M et al 2007). Il nous a paru important d'évaluer la régulation de ce processus par les microfibrilles et en particulier la fibrilline-1.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier et de comprendre la fonction de la fibrilline-1 dans le système cardiovasculaire au cours du vieillissement. Pour cela, nous avons effectué des explorations structurelles et fonctionnelles sur l'aorte et les grosses artères des souris présentant une déficience dans la synthèse de la fibrilline-1 (souris *Fbn-1*^{+/-mgΔ}) et mimant le syndrome de Marfan. Nous avons réalisé des études de biomécanique, d'histologie, de contenu protéique et d'expression génique des protéines

matricielles sur les grosses artères élastiques (aortes ascendantes et abdominales) et l'artère pulmonaire chez ces souris à différents âges.

De plus, dans le but de comprendre la fonction de la fibrilline-1 au niveau du fonctionnement des cellules vasculaires, nous avons aussi étudié la signalisation induite par des fragments de fibrilline-1 contenant le motif RGD dans les cellules endothéliales humaines.

Comme cela sera présenté dans les chapitres suivants, nous avons montré que la fibrilline-1 induit une signalisation calcique aboutissant à la prolifération et la migration des cellules endothéliales. La déficience en fibrilline-1 provoque, chez la souris, une altération de la fonction mécanique vasculaire qui s'accroît avec l'âge.

La plupart des résultats de cette thèse sont présentés dans le cadre de deux articles soumis pour publication, l'un rapportant les effets de la mutation $mg\Delta$ sur la structure et la fonction artérielle chez la souris, et l'autre rapportant les effets des microfibrilles ou des fragments de fibrilline-1 sur les cellules endothéliales vasculaires humaines. Ces articles sont insérés dans les pages suivantes.

II. RESULTATS

II.1. Article 1: Microfibrils and fibrillin-1 induce integrin-mediated signalling, migration and proliferation in human endothelial cells

Auteurs: MARIKO Boubacar, RAVEAUD Stéphanie, QUENTIN Mickaël, USSON Yves, VERDETTI Jean, HUBER Philippe, KIELTY CM Cay et FAURY Gilles

II.1.1. Introduction de l'article 1

Les microfibrilles constituent avec l'élastine les composants majeurs des fibres élastiques. Elles participent à la fonction mécanique des fibres élastiques, bien que le principal acteur soit l'élastine. Dans des cas où cette dernière est absente, les microfibrilles assurent entièrement cette fonction comme c'est le cas chez les invertébrés et les vertébrés primitifs (poissons primitifs ...). A côté de cette fonction mécanique, les microfibrilles semblent avoir un rôle de signalisation cellulaire. Les microfibrilles sont les premières synthétisées pendant la formation des fibres élastiques durant la deuxième moitié de la gestation chez les mammifères. Elles forment un squelette sur lequel se dépose la tropoélastine (précurseur de l'élastine). Les microfibrilles sont de gros complexes protéiques (plus de 17 molécules) dont les principaux composants sont la fibrilline-1 (essentiellement), les fibrilline-2 et -3 (absente chez les rongeurs), les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGPs), les fibulines et les protéines de liaison au TGF beta latent (LTBPs).

Les microfibrilles contribuent à l'ancrage des cellules vasculaires (endothéliales et musculaires lisses) à la lame élastique proximale (limitante élastique interne) dans les aortes en développement (Davis EC et al 1993 et 1994). Ceci se fait via la fibrilline-1 au moins, ceci étant étayé par le fait que la mutation du gène de celle-ci conduit au décollement endothélial (Carta L et al 2006) et que les molécules de fibrilline-1 ont des domaines qui s'étendent à partir du corps des microfibrilles (Kuo CL et al. 2007). Des études structurales ont montré la présence d'un module RGD flexible et accessible dans la molécule de fibrilline-1 (Lee SS et al. 2004). De plus, in vitro, les fragments recombinants de fibrilline-1 contenant le motif RGD permettent, via une liaison à des intégrines, l'adhérence et l'étalement de plusieurs types cellulaires incluant les cellules endothéliales (Sakamoto H et al. 1996, Pfaff M et al. 1996,

Bax DV et al 2003, Porst M et al. 2006, McGowan SE et al. 2008). In vivo, les souris déficientes ou portant une mutation du gène de la fibrilline-1 présentent un décollement endothélial et une altération de la fonction endothéliale (Carta L et al 2006, Chung AW et al. 2007a). Aussi, note-t-on un dysfonctionnement endothélial chez les patients atteints du syndrome de Marfan (Wilson DG et al. 1999).

Malgré tous ces résultats, la signalisation induite par les microfibrilles, et la fibrilline-1 en particulier, renferment encore quelques zones d'ombre. Dans cet article, nous avons tenté de mettre en lumière la signalisation induite dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs) par des fragments recombinants de fibrilline-1 contenant le motif RGD (PF9 et PF14). Comme l'occupation (interaction) des intégrines par leur ligand mobilise le calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales et que cela régule de nombreuses fonctions cellulaires, nous avons étudié la signalisation calcique à l'aide d'une technique de microscopie de fluorescence que j'ai adaptée au laboratoire et que nous avons publiée (Andrès E et al. 2006, Faury G et al. 2008 : voir chapitre V-annexes).

II.1.2. Article 1

Microfibrils and fibrillin-1 induce integrin-mediated signalling, migration and proliferation in human endothelial cells

Mariko - Fibrillin-1 induces endothelial signalling

MARIKO Boubacar*, RAVEAUD Stéphanie*, QUENTIN Mickaël*, USSON Yves[†], VERDETTI Jean*, HUBER Philippe*, KIELTY CM Cay^{‡,§} and FAURY Gilles*

* Laboratoire «Physiopathologies vasculaires: interactions cellulaires, signalisation et vieillissement» - 1 Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38041, FRANCE ; 2 CEA, iRTSV, Grenoble, F-38054, FRANCE ; 3 INSERM, U882, Grenoble, F-38054, FRANCE. [†]

Laboratory TIMC - Equipe Reconnaissance des Formes et Microscopie Quantitative, Institut d'Ingénierie et de l'Information de Santé (IN3S), Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, 1 CNRS, UMR 5525 ; 2 Université Joseph Fourier, F-38706 La Tronche cedex, France.

[‡]Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, [§]UK Centre for Tissue Regeneration, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Michael Smith Building, Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK.

Corresponding author:

Gilles Faury, LAPV/INSERM U882, iRTSV, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, FRANCE. Tel: (33) 4-38-78-23-48 ; Fax: (33) 4-38-78-49-64 ; E-mail: Gilles.Faury@ujf-grenoble.fr

Word count of body: 4987

Word count of abstract: 200

Number of figures and tables: 5

ABSTRACT

Objective: Microfibrils are macromolecular complexes associated with elastin to form elastic fibers, which endow extensible tissues (arteries, lungs, skin, ...) with elasticity properties. Fibrillin-1, the main component of microfibrils, is a 350kDa glycoprotein whose genetic haploinsufficiency in humans leads to Marfan syndrome, a severe polyfeatured pathology including aortic aneurysms and dissections. Microfibrils and fibrillin-1 fragments mediate adhesion of several cell types, including endothelial cells, while fibrillin-1 additionally triggers lung and mesangial cell migration. However, fibrillin-1-induced intracellular signalling is unknown. Here, we have studied the signalling induced in human endothelial cells by aortic microfibrils as well as the recombinant fibrillin-1 RGD-containing fragments PF9 and PF14.

Methods and Results: Aortic microfibrils and PF14, not PF9, substantially and dose-dependently increased intracellular free calcium level (calcium imaging). PF14 effect was mediated by α V- β 3 and α 5- β 1 integrins, phospholipase-C, IP_3 and mobilization of intracellular calcium stores, while membrane calcium channels were not or only slightly implicated (patch-clamp). furthermore, PF14 enhanced endothelial cell proliferation (as did aortic microfibrils) and migration.

Conclusion: Endothelial cells may physiologically be activated by fibrillin-1 sequences. Genetic fibrillin-1 deficiency could alter normal endothelial signalling and, since endothelium dysfunction is a leading cause of Marfan syndrome, contribute to the arterial anomalies associated to this disease.

Key-words: microfibrils, fibrillin-1, endothelial cells, calcium signalling, proliferation/migration.

CONDENSED ABSTRACT

Fibrillin-1 gene mutations lead to Marfan syndrome (aortic aneurysms and dissections). We have studied the signalling triggered in human endothelial cells by fibrillin-1 fragments (PF9, PF14). PF14 induced integrin-mediated increase in intracellular calcium, proliferation and migration. Fibrillin-1 haploinsufficiency could alter normal signalling in endothelial cells, leading to arterial anomalies.

Large arteries have an essential mechanical role in the smoothing of the pulsatile blood flow and pressure during the cardiac cycle. This function is made possible by extracellular elastic components of the arterial wall. In many invertebrates, with an open and low pressure circulatory system, arterial elasticity is mainly provided by microfibrils, a supramolecular assembly of more than 17 proteins including fibrillin-1 and -2^{1,2}. In vertebrates, arterial elastic properties more adapted to the close and high-pressure circulatory system are provided by elastic fibers, made of elastin (90%, only present in vertebrates) and microfibrils (10%). Elastin is the main contributor to the elastic properties of these fibers, although microfibrils moderately participate to the elastic fiber mechanics³. As a consequence, elastin or fibrillin-1 haploinsufficiency induces arterial mechanics alteration and remodelling⁴⁻⁷. During development of elastic tissues, microfibrils are the first elastic fiber structure that is formed. Tropoelastin, the precursor of elastin, is then deposited on the microfibril scaffold, prior to molecular rearrangement which leads to the mature/functional elastic fiber^{1,8}.

Beside their mechanical role, microfibrils and microfibrillar components can also be involved in cell adhesion. In the developing aorta, microfibrils mediate the anchoring of endothelial and vascular smooth muscle cells to the closest elastic lamina^{9,10}. The anchoring activity of microfibrils seems to be mediated at least in part by their main component, fibrillin-1, since: i) fibrillin-1 domains extend out of microfibrils¹¹ and ii) beside modulating extracellular matrix synthesis and deposition, fibrillin-1 fragments mediate adhesion and spreading of several cell types in vitro, including fibroblasts, smooth muscle cells and endothelial cells¹²⁻¹⁵.

Fibrillin-1 is a 350 kDa cysteine rich glycoprotein which has first been characterized in human, mouse and chicken^{8,16}. Autosomal dominant mutations in the fibrillin-1 gene are responsible for the human genetic disorder Marfan Syndrome (MFS) which features, at the vascular level, aneurysms and aortic disruptions¹⁷. One of the pleiotropic causes of MFS

seems to be endothelial dysfunction, since it has been observed in these patients: i) reduced flow-mediated vasodilation, suggesting an altered endothelial cell signalling, and ii) elevated plasma levels of homocysteine, which attenuate endothelial function and limits NO bioavailability¹⁸⁻²⁰. The participation of fibrillin-1 in endothelial cell anchoring together with the observation of an endothelial detachment in fibrillin-1 null mice (*fbn1*^{-/-}), a mouse model for MFS²¹, suggests that binding of fibrillin-1 to endothelial cell is important in arterial morphogenesis and physiology. Alteration of this interaction may be one of the causes of the vascular dysfunctions and remodelling observed in MFS. To support these hypotheses, it has been found that the RGD motif in the fourth TGF-binding domain of human fibrillin-1 is flexible and accessible, and regulates cell adhesion and spreading through binding to integrins²². The concerned integrins are in particular $\alpha_v\beta_3$ or $\alpha_5\beta_1$ in fibroblasts and β_1 -subunit in smooth muscle cells¹²⁻¹⁴, and the subunits α_v , α_5 and β_1 in endothelial cells¹⁵.

The signalling mechanisms induced by fibrillin-1 in endothelial cells are unknown. Since endothelial integrins and intracellular calcium level play an important role during embryonic development and angiogenesis^{23,24}, we have investigated here the potential integrin-mediated signalling events triggered by microfibrils and fibrillin-1 in human endothelial cells. We have shown that microfibrils and the fibrillin-1 RGD-containing fragment PF14 increase intracellular calcium level. PF14 triggered phospholipase-C / IP3 and intracellular calcium signalling through $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrin engagement and promoted endothelial cell proliferation and migration.

MATERIALS AND METHODS

Detailed protocols could be found in the online supplementary information.

Cell culture

Human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) were isolated using a technique adapted from Jaffe et al.^{25,26}. Cells were harvested from the umbilical vein by a 10 min incubation with collagenase 1A and cultured in fibronectin-coated dishes in medium 199 containing 22% human serum, streptomycin (0.1mg/mL), penicillin (100UI/mL) and L-glutamine (2mmol/L).

Production of aortic microfibrils and fibrillin-1 fragments

Microfibrils were isolated from bovine aorta, in native and non-denaturing conditions, as described^{11,27,28}. The aorta from a newborn calf was incubated for 18 hours at 4°C with 0.5mg/ml purified bacterial collagenase 1A, in the presence of hyaluronidase (5U/mL) and freshly prepared protease inhibitors. Microfibrils were collected after passage of the supernatant through a CL-2B sepharose column. In our experiments, microfibrils were used at 0.15µg/mL ($\approx 10^{-11}$ mol/L), 0.5µg/mL ($\approx 3.3 \times 10^{-11}$ mol/L) and 1.5µg/mL ($\approx 10^{-10}$ mol/L).

The cloning, expression and purification of RGD-containing recombinant human fibrillin-1 fragments PF9 (residues 1528-1807) and PF14 (residues 1362-1688), using the mammalian expression vector pCEP-pu/AC7 and 293-EBNA cells, has been described^{12,29}. The domains of the fibrillin-1 fragments are presented in the online supporting information.

RGD-RGA PF14 mutant (PF14-RGA) was produced using a site-directed mutagenesis of aspartic acid 1541 to alanine, as described²⁹. Validation of the purity and folding of all the fragments used were performed, as described²⁹.

Intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in adherent HUVEC

Measurements and analyses were performed either by confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 410, Carl Zeiss, Jena, Germany) or by classical microscopy (CellR system, Olympus, Rungis, France) using the calcium-sensitive fluorescent dye Fluo-3/AM (excitation: 488nm; emission: >510nm), according to the procedures previously described²⁶. The cells were bathed in a physiological salt solution composed of: NaCl (125mmol/L); KCl (5.6mmol/L); $CaCl_2$ (2.4mmol/L); $MgCl_2$ (1.2mmol/L); D-glucose (11mmol/L); HEPES (10mmol/L); pH 7.4. In the figures, each tracing represents Fluo-3 fluorescence in one cell. Bradykinin a reference agent elevating $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells, was used to verify cell functionality.

Electrophysiological recording

Calcium current recordings (imposed potential: +20mV) were performed using the cell-attached patch-clamp technique (single channel) and materials previously described (Faury et al 1998). Cells were immersed in a Tyrode solution containing: NaCl (125mmol/L); KCl (5.6mmol/L); $CaCl_2$ (2.4mmol/L); $MgCl_2$ (1.2mmol/L); HEPES (10mmol/L); Glucose (11mmol/L), pH 7.4. The patch pipette was filled with a solution containing: $Ba(CH_3COO)_2$ (90mmol/L); HEPES (10mmol/L), pH 7.4. Resting potential (V_m): -57 ± 4 mV (n=35) for non-dividing cells²⁶. The recorded transmembrane currents were integrated and analyzed using the software Biopatch (Biologic, Claix, France).

HUVEC proliferation

Two different methods were used:

1- WST-1 colorimetric method:

WST-1: (4-[3-[4-iodophenyl]-2-4(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio-1,3-benzene disulfonate]) .

The measurement is based on the ability of mitochondrial dehydrogenases of viable cells to

cleave tetrazolium salts ³⁰. Two hours after cell plating, HUVECs were treated with PF14 (1µg/mL; ≈26nmol/L) or solvent alone for 48h. WST-1 reagent (10µL/well) was added. Absorbance of the samples, proportional to the viable cell number, was then measured at 450nm using a microplate reader, and background absorbance was deducted. Proliferation rate: $(\text{Absorbance}_{48\text{h}} - \text{Absorbance}_{0\text{h}}) \times 100 / \text{Absorbance}_{0\text{h}}$

2- Trypsinization/cell count method:

HUVEC were trypsinized and resuspended in deprived culture medium containing 5% human serum, in order to limit spontaneous cell proliferation. Two hours after cell seeding, the dishes were incubated with PF14 (1µg/mL; ≈26nmol/L), or solvent of PF14. After 48 hours, cells were trypsinized and counted using a Kova cell count unit.

The proliferation rate was calculated as: $(\text{Cell number}_{48\text{h}} - \text{Cell number}_{0\text{h}}) \times 100 / \text{Cell number}_{0\text{h}}$

In vitro wound healing assay:

Cell migration was measured using an in vitro wound-healing assay ³¹. HUVECs were grown in fibronectin-coated plates until confluence in complete culture medium, then incubated in deprived culture medium (5% human serum instead of 22%) overnight. Cell cultures were imaged at 0 and 8 hours after wounding and addition of solvent or PF14 (1µg/mL). Wound areas were measured from the images using Image J software (NIH). Wound closure rate was calculated as: $(\text{Wound area}_{0\text{h}} - \text{Wound area}_{8\text{h}}) \times 100 / \text{Wound area}_{0\text{h}}$

RESULTS

Action of microfibrils on intracellular free calcium concentration

Addition of aortic microfibrils produced substantial, dose-dependent and transient elevations of Fluo-3 fluorescence in HUVEC, indicative of $[Ca^{2+}]_i$ increases, up to 5-8 fold aortic (microfibrils at 1.5 μ g/mL). The aortic microfibril-induced elevation of fluorescence was observed in both the cytoplasm and nucleus (Figure 1A-H).

Since microfibrils interact with integrins^{12,32}, which are membrane receptors linked to actin microfilaments, we investigated the possibility of an actin-mediated transduction of the microfibrillar signal. After treatment of HUVEC with the actin-depolymerizer cytochalasin-D, the cells classically changed their morphology to a more spread phenotype. However, cytochalasin-D-treated HUVEC had a response to microfibrils (0.5 μ g/mL) similar to that of untreated cells, i.e. a 2- to 4-fold increase in both nuclear and cytoplasmic fluorescence (Figures 1B,F and 1I,J).

In order to investigate the involvement of membrane calcium channels in this mechanism, control patch-clamp experiments were performed. Addition of microfibril solvent did not lead to activation of membrane calcium channels, showing that: i) the solvent is inactive on calcium channels, and ii) HUVEC present a low basal activity of their membrane calcium channels, with no spontaneous activation over time (Figure 1K). Conversely, addition of aortic microfibrils (0.15 μ g/mL) produced a strong activation of calcium channels (Figure 1L). Microfibril concentrations higher than 0.15 μ g/mL were not used since preliminary experiments have shown that such concentrations induced too high activity of calcium channels, rapidly breaking the seal and ending the experiment. Intensity-Voltage (I/V) experiments were then performed and unitary currents were measured at each imposed potential (data not shown). The calculated conductance of the activated calcium channels was in the range of 6pS.

Action of fibrillin-1 fragments on intracellular free calcium concentration

In order to verify whether the major component of microfibrils, i.e. fibrillin-1, was responsible for the effects triggered in HUVEC by aortic microfibrils, two overlapping fibrillin-1 RGD-containing fragments, PF9 and PF14, were used. Compared to the control (Figure 2A), PF9 did not modify HUVEC $[Ca^{2+}]_i$, whatever its concentration (Figure 2B-E). On the contrary, PF14 application triggered a clear dose-dependent elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in these cells. The fluorescence peaks appearing after application of PF14 reached up to 2-5 fold the initial fluorescence level (Figure 2F-I). Also, within the time-frame of the experiments, some cells exhibited a unique fluorescence peak produced by PF14, while other cells responded several times by cyclic fluorescence peaks. It is to be noted, however, that some cells did not respond to PF14, whereas bradykinin (1 μ mol/L) triggered a strong increase in $[Ca^{2+}]_i$ in most cells, confirming that HUVECs were functional, even when non-responding to PF14 (Figure 2). PF14 (1 μ g/mL; $\approx$ 26nM) was used in all further experiments.

Origin of calcium leading to PF14-triggered $[Ca^{2+}]_i$ elevation in HUVECs

Compared to control, emptying of the intracellular calcium stores by thapsigargin prevented PF14 to induce a $[Ca^{2+}]_i$ increase, suggesting a major role of the intracellular calcium stores in PF14 signalling (Figures 3A,B). This result was supported by another series of experiments aimed at verifying the role of extracellular calcium influx in the PF14-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation. Placing the cells in a calcium-free medium, i.e. preventing calcium influx in the cells, had little effect on the $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by PF14 (figure 3C). Also, blockade of HUVEC calcium channels by nickel chloride did not substantially inhibit PF14-induced elevation of $[Ca^{2+}]_i$ (figure 3D). This feature confirmed that the origin of calcium mobilized by PF14 was mainly intracellular, i.e. the intracellular calcium stores, while extracellular calcium influx took a modest part, if any, in this mechanism. In order to further verify the minor involvement of extracellular calcium influx in the PF14-triggered elevation of $[Ca^{2+}]_i$, the effect of PF14 on the activity of membrane calcium channels was investigated using the

patch-clamp technique in HUVECs. PF14 was not able to induce a calcium channel activity in 9 out of 10 cells studied (Figure 3E-H), confirming the weak involvement of calcium influx.

Receptors and signalling pathways activated by fibrillin-1 fragment PF14

In order to uncover the receptors involved in the PF14-induced calcium signalling pathway, a mutated form of PF14, PF14-RGA, in which the RGD sequence was replaced by RGA (which does not bind to integrins), was applied to the cells. As opposed to the clear response to PF14 (Figure 4A), PF14-RGA did not trigger any response from HUVECs (Figure 4B), suggesting an implication of integrins in the signal transduction. This was supported by the results from other experiments using blocking antibodies to integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$. Both antibodies abolished the response of HUVEC to PF14, confirming the implication of the two above cited integrins in the transduction of the PF14 signal and suggesting that both integrins are needed for PF14 signalling (figure 4C,D).

The signalling pathway leading to PF14-induced elevation of $[Ca^{2+}]_i$ was then studied. Compared to control, depolymerization of actin microfilaments by cytochalasin D did not significantly modify HUVEC response to PF14 (Figures 4E,F), suggesting that PF14 signalling is not a mechanotransduction process mediated by integrin-connected actin microfilaments. However, when phospholipase C (PLC) was blocked by U73122, the PF14-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation was abolished, suggesting an involvement of at least one of the reaction products of PLC as a signalling molecule (Figure 4G). Since inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3), a major reaction product of PLC, is classically known to trigger a release of calcium from the intracellular stores through binding to the IP_3 receptor present at the surface of the endoplasmic reticulum³³, the effects of IP_3 -receptor blockade with 2-APB was evaluated. In this condition, PF14 was unable to trigger any increase in $[Ca^{2+}]_i$ in HUVEC, suggesting that IP_3 was the second messenger responsible for intracellular calcium store release (Figure 4H). Finally, it has to be noted that, using confocal fluorescence microscopy,

PF14 was also found to increase nuclear free calcium level in HUVECs (Figure 4I).

Effect of PF14 on HUVEC proliferation and migration

$[Ca^{2+}]_i$ is known to be involved in the regulation of cell proliferation and migration^{24,33}. We have verified here, in HUVECs, whether the PF14-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase impacts on these two biological activities. The effect of PF14 on HUVEC proliferation was assessed by the WST-1 colorimetric method, we found that HUVEC proliferation rate was significantly higher after addition of PF14 (1 μ g/mL) (+125% after 48h) than after addition of solvent alone (+100%) (1-way ANOVA, $P \leq 0.05$) (Figure 5A). This effect was confirmed by the trypsinization and direct cell counting method: the proliferation rate was +108% at 48h after addition PF14 (1 μ g/mL) while it was only +66% in the presence of solvent alone (1-way ANOVA, $P \leq 0.05$) (Figure 5B). This is consistent with the proliferative effect found for aortic microfibrils (0.5 μ g/mL) (+26% as compared to the control, data not shown).

In wound healing assays, we also found that, after 8 hours, PF14 (1 μ g/mL) induced a significantly higher wound closure (42%) than in control conditions with solvent alone (32%) (1-way ANOVA, $P < 0.05$) (Figure 5C,D).

DISCUSSION

Elastin fragments and tropoelastin have already been shown to increase $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial and vascular smooth muscle cells^{26,34,35} and influence fibroblast, vascular smooth muscle and endothelial cell proliferation³⁶⁻³⁸. This raised the question of knowing whether other constituents of elastic fibers, i.e. microfibril components (appearing earlier during arterial development), are also able to trigger intracellular signalling events. Since it had already been shown that RGD-containing fibrillin-1 fragments enhance cell adhesion^{12-14,29} and migration

^{29,39,40} in several cell types, we have investigated the effects of these fibrillin-1-fragments on endothelial cell signalling, migration and proliferation.

Aortic microfibrils induced a substantial dose-dependent increase in cytoplasmic and nuclear free calcium levels in endothelial cells. In order to unravel which component of microfibrils was responsible for this effect, we studied the action of two RGD-containing overlapping fragments of their main component, fibrillin-1, i.e. fragments PF9 and PF14. These fragments have adhesive properties in vitro and the latter contains a wider sequence than PF9 on the N-terminal side of the RGD ^{12,29}. PF14, not PF9, induced a substantial dose-dependent $[Ca^{2+}]_i$ increase in HUVECs, although lower than that induced by aortic microfibrils. The different responses induced by PF9 and PF14 are consistent with the already shown stronger adhesion and spreading of fibroblast to PF14 in comparison to PF9 ²⁹ and further support the importance of the amino-acids on the N-terminal side of the RGD sequence in cell recognition ^{22,29}.

Here, PF14 exerted its action through integrins substantially expressed in endothelial cells: $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$, the latter being known to also bind to tropoelastin ^{41,42}. This is consistent with the induction by microfibrils and fibrillin-1 fragments of spreading, migration and adhesion of several cell types ^{10,12-15,29,39,40}. In particular, endothelial cells adhere to fibrillin-1 through $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins ¹⁵. Curiously, in our experiments, the blockade of each of these integrins totally inhibited the effect of PF14. This could be explained by the cross-talk between $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrin signalling pathways ⁴³ and subsequent inhibition of angiogenesis by blockade of either of these two integrins ⁴⁴. Alternatively, the simultaneous activation of both integrins might be necessary for PF14 signal transduction in HUVECs, as shown for the action of several angiogenic factors in the induction of endothelial cells migration ⁴⁵.

The transduction of extracellular matrix signals is often mediated by integrins and the actin-based cytoskeleton ⁴⁶. Here, no involvement of actin microfilaments was observed in PF14-induced calcium signalling in HUVECs, similar to what was shown with aortic microfibrils. However, sequential mobilization of phospholipase C (PLC), IP₃ and intracellular calcium stores were demonstrated to be a major pathway activated by PF14 binding to integrins and leading to [Ca²⁺]_i increase. Also, as opposed to what was noticed with aortic microfibrils, no clear calcium channel activation could be observed following HUVEC stimulation by PF14. This, together with the higher response to aortic microfibrils in comparison with PF14, suggests that microfibril signalling in HUVECs also involves microfibrillar components other than fibrillin-1 or fibrillin-1 sequences that are not present in PF14.

Integrin activation by extracellular matrix proteins can lead to [Ca²⁺]_i elevation, which regulates many cellular events, including migration, proliferation and angiogenesis ^{23,24,33}. Here, as suggested by the PF14-induced increase in cytoplasmic and nuclear calcium level, we confirmed that PF14 enhanced HUVEC proliferation. PF14 also increased the migration of HUVECs in a wound healing model, consistent with previous works showing that fibrillin-1 RGD-containing fragments increased the migration of mesangial and lung fibroblast cells ^{39,40}.

Since microfibrils anchor the aortic endothelial cells to the subendothelial elastic lamina in the embryo ¹⁰, microfibrillar components, including fibrillin-1, could be responsible for physiological endothelial signalling at the onset of vessel formation. In Marfan syndrome, fibrillin-1 impairment may alter fibrillin-1 signalling in endothelial cells, contribute to the endothelial dysfunction leading to the disease ¹⁸ and directly account for the arterial anomalies.

ACKNOWLEDGMENTS

1- The authors acknowledge the European Commission (contracts TELASTAR, 5th PCRD, number QLK6-CT-2001-00332; and ELAST-AGE, 6th PCRD, number LSHM-CT-2005-018960) for fundings.

2- We thank Dr. Daniel V. Bax (currently at University of Sydney, Australia) for his contribution to providing the fibrillin-1 PF9 and PF14 fragments.

REFERENCES

1-Kielty CM , Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci.* 2002;115:2817-2828.

2-Faury G. Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathol Biol (Paris)*. 2001;49:310-325.

3-Lillie MA, David GJ, Gosline JM. Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue. *Connect Tissue Res.* 1998;37:121-141.

4-Li DY, Faury G, Taylor DG, Davis EC, Boyle WA, Mecham RP, Stenzel P, Boak B, Keating MT. Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *J Clin Invest.* 1998;102:1783-1787.

5-Marque V, Kieffer P, Gayraud B, Lartaud-Idjouadiene I, Ramirez F, Atkinson J. Aortic wall mechanics and composition in a transgenic mouse model of Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1184-1189.

6-Faury G, Pezet M, Knutsen RH, Boyle WA, Heximer SP, McLean SE, Minkes RK, Blumer KJ, Kovacs A, Kelly DP, Li DY, Starcher B, Mecham RP. Developmental adaptation

- of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J Clin Invest.* 2003;112:1419-1428.
- 7-Pezet M, Jacob MP, Escoubet B, Gheduzzi D, Tillet E, Perret P, Huber P, Quaglino D, Vranckx R, Li DY, Starcher B, Boyle WA, Mecham RP, Faury G. Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta. *Rejuvenation Res.* 2008;11:97-112.
- 8-Zhang H, Hu W, Ramirez F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol.* 1995;129:1165-1176.
- 9-Davis EC. Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. *Lab Invest.* 1993;68:89-99.
- 10-Davis EC. Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta. *J Cell Sci.* 1994;107 (Pt 3):727-736.
- 11-Kuo CL, Isogai Z, Keene DR, Hazeki N, Ono RN, Sengle G, Peter Bachinger H, Sakai LY. Effects of fibrillin-1 degradation on microfibril ultrastructure. *J Biol Chem.* 2007;282:4007-4020.
- 12-Bax DV, Bernard SE, Lomas A, Morgan A, Humphries J, Shuttleworth CA, Humphries MJ, Kielty CM . Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Biol Chem.* 2003;278:34605-34616.
- 13-Pfaff M, Reinhardt DP, Sakai LY, Timpl R. Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1. *FEBS Lett.* 1996;384:247-250.

- 14-Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresch DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem*. 1996;271:4916-4922.
- 15-Williamson MR, Shuttleworth A, Canfield AE, Black RA, Kielty CM . The role of endothelial cell attachment to elastic fibre molecules in the enhancement of monolayer formation and retention, and the inhibition of smooth muscle cell recruitment. *Biomaterials*. 2007;28:5307-5318.
- 16-Sakai LY, Keene DR, Glanville RW, Bachinger HP. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J Biol Chem*. 1991;266:14763-14770.
- 17-Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *Lancet*. 2005;366:1965-1976.
- 18-Wilson DG, Bellamy MF, Ramsey MW, Goodfellow J, Brownlee M, Davies S, Wilson JF, Lewis MJ, Stuart AG. Endothelial function in Marfan syndrome: selective impairment of flow-mediated vasodilation. *Circulation*. 1999;99:909-915.
- 19-Giusti B, Porciani MC, Brunelli T, Evangelisti L, Fedi S, Gensini GF, Abbate R, Sani G, Yacoub M, Pepe G. Phenotypic variability of cardiovascular manifestations in Marfan Syndrome. Possible role of hyperhomocysteinemia and C677T MTHFR gene polymorphism. *Eur Heart J*. 2003;24:2038-2045.
- 20-Jiang X, Yang F, Tan H, Liao D, Bryan RM, Jr., Randhawa JK, Rumbaut RE, Durante W, Schafer AI, Yang X, Wang H. Hyperhomocysteinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2515-2521.

- 21-Carta L, Pereira L, Arteaga-Solis E, Lee-Arteaga SY, Lenart B, Starcher B, Merkel CA, Sukoyan M, Kerkis A, Hazeki N, Keene DR, Sakai LY, Ramirez F. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem.* 2006;281:8016-8023.
- 22-Lee SS, Knott V, Jovanovic J, Harlos K, Grimes JM, Choulier L, Mardon HJ, Stuart DI, Handford PA. Structure of the integrin binding fragment from fibrillin-1 gives new insights into microfibril organization. *Structure.* 2004;12:717-729.
- 23-Stupack DG, Cheresch DA. Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2004;64:207-38.
- 24-Munaron L. Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 2006;1:105-119.
- 25-Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973;52:2745-2756.
- 26-Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L, Verdeti J. Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:2967-2972.
- 27-Baldock C, Koster AJ, Ziese U, Rock MJ, Sherratt MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA, Kielty CM. The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol.* 2001;152:1045-1056.
- 28-El-Hallous E, Sasaki T, Hubmacher D, Getie M, Tiedemann K, Brinckmann J, Batge B, Davis EC, Reinhardt DP. Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first

- hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *J Biol Chem.* 2007;282:8935-8946.
- 29-Bax DV, Mahalingam Y, Cain S, Mellody K, Freeman L, Younger K, Shuttleworth CA, Humphries MJ, Couchman JR, Kielty CM . Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation. *J Cell Sci.* 2007;120:1383-1392.
- 30-Bailey SR, Polan JL, Munoz OC, Agrawal MC, Goswami NJ. Proliferation and beta-tubulin for human aortic endothelial cells within gas-plasma scaffolds. *Cardiovasc Radiat Med.* 2004;5:119-124.
- 31-Babbin BA, Parkos CA, Mandell KJ, Winfree LM, Laur O, Ivanov AI, Nusrat A. Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J Pathol.* 2007;170:951-966.
- 32-Kielty CM , Whittaker SP, Grant ME, Shuttleworth CA. Attachment of human vascular smooth muscles cells to intact microfibrillar assemblies of collagen VI and fibrillin. *J Cell Sci.* 1992;103 (Pt 2):445-451.
- 33-Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:11-21.
- 34-Jacob MP, Fulop T, Jr., Foris G, Robert L. Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:995-999.
- 35-Faury G, Garnier S, Weiss AS, Wallach J, Fulop T, Jr., Jacob MP, Mecham RP, Robert L, Verdeti J. Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. *Circ Res.* 1998;82:328-336.

- 36-Kamoun A, Landeau JM, Godeau G, Wallach J, Duchesnay A, Pellat B, Hornebeck W. Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides. *Cell Adhes Commun.* 1995;3:273-281.
- 37-Ito S, Ishimaru S, Wilson SE. Effect of coacervated alpha-elastin on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *Angiology.* 1998;49:289-297.
- 38-Mochizuki S, Brassart B, Hinek A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2002;277:44854-44863.
- 39-Porst M, Plank C, Bieritz B, Konik E, Fees H, Dotsch J, Hilgers KF, Reinhardt DP, Hartner A. Fibrillin-1 regulates mesangial cell attachment, spreading, migration and proliferation. *Kidney Int.* 2006;69:450-456.
- 40-McGowan SE, Holmes AJ, Mecham RP, Ritty TM. Arg-Gly-Asp-containing domains of fibrillins-1 and -2 distinctly regulate lung fibroblast migration. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38:435-445.
- 41-Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:1135-1157.
- 42-Rodgers UR, Weiss AS. Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie.* 2004;86:173-178.
- 43-Kim S, Harris M, Varner JA. Regulation of integrin alpha v beta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J Biol Chem.* 2000;275:33920-33928.

- 44-Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin $\alpha_5\beta_1$ with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol*. 2000;156:1345-1362.
- 45-Hotchkiss KA, Ashton AW, Schwartz EL. Thymidine phosphorylase and 2-deoxyribose stimulate human endothelial cell migration by specific activation of the integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_V\beta_3$. *J Biol Chem*. 2003;278:19272-19279.
- 46-Wiesner S, Legate KR, Fassler R. Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:1081-1099.

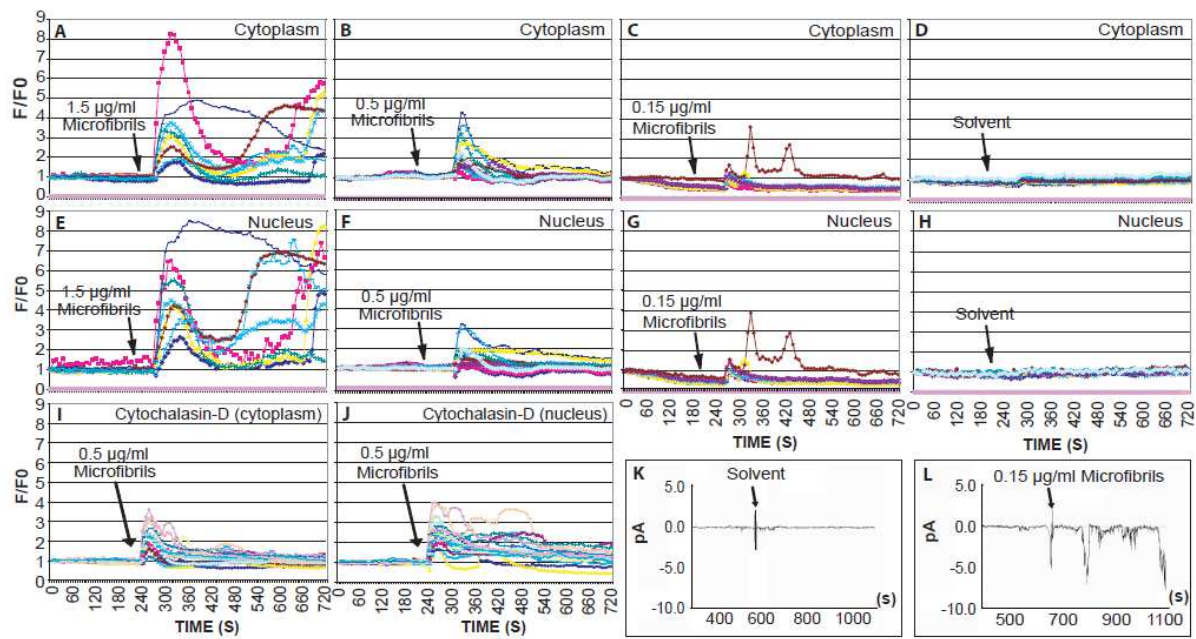


Figure 1

Figure 1: Effect of aortic microfibrils on HUVEC nuclear and cytoplasmic $[Ca^{2+}]$. A-H: dose-effect of microfibrils. n=27-30 cells (control: n=56). I,J: Effect of microfibrils (0.5 μ g/mL) after 45min incubation with cytochalasin-D (1 μ mol/L) (n=28 cells). K,L: microfibril-induced activation of membrane calcium channels. All experiments were at least triplicated. Representative experiments are presented.

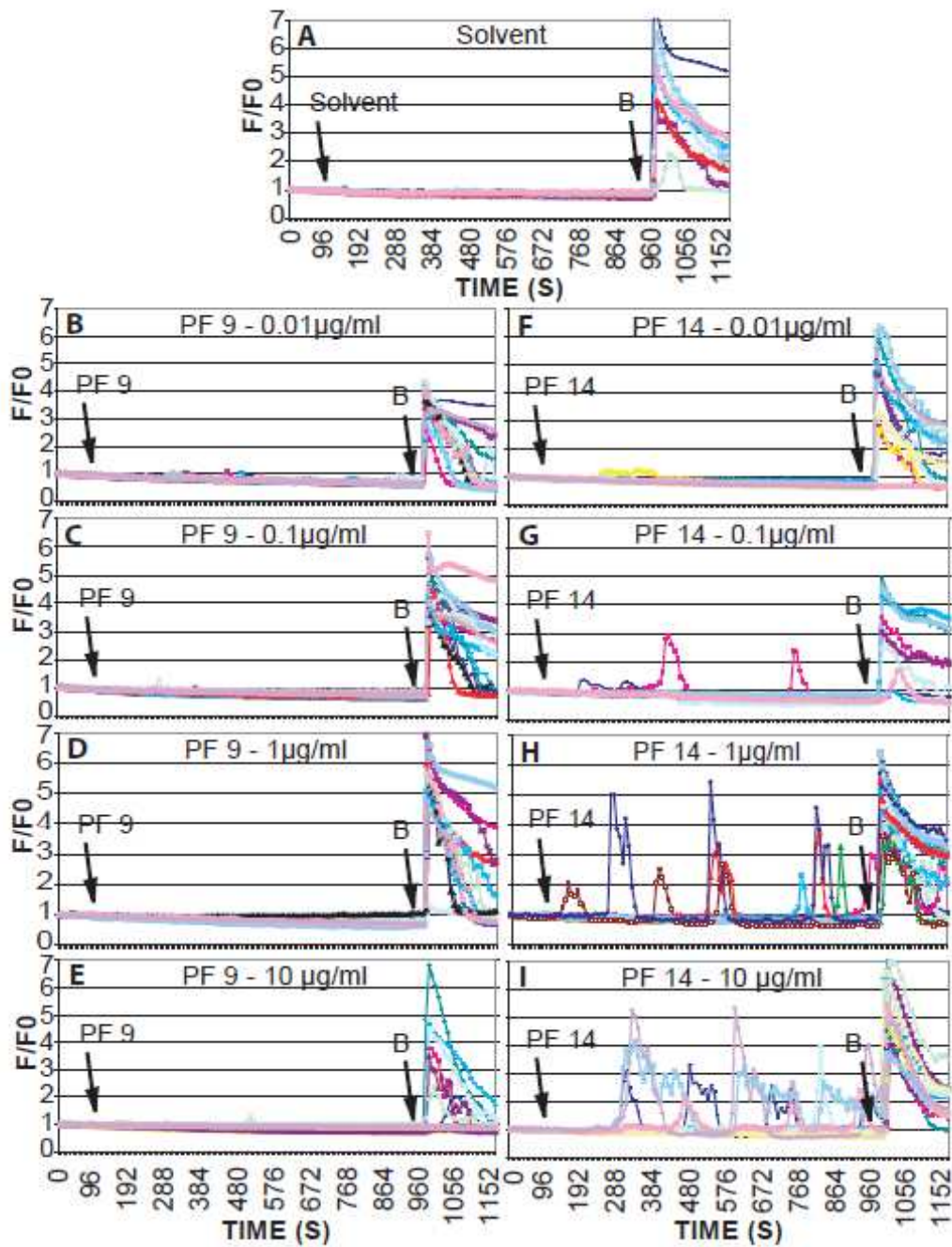


Figure 2

Figure 2: Dose-effect of fibrillin-1 fragments PF9 and PF 14 on HUVEC $[Ca^{2+}]_i$. Addition of solvent (A), or different concentrations of PF9 (B-E) or PF14 (F-I). B: bradykinin ($1\mu\text{mol/L}$). Representative experiments are presented. $n=30-45$ cells from at least 3 different cell cultures.

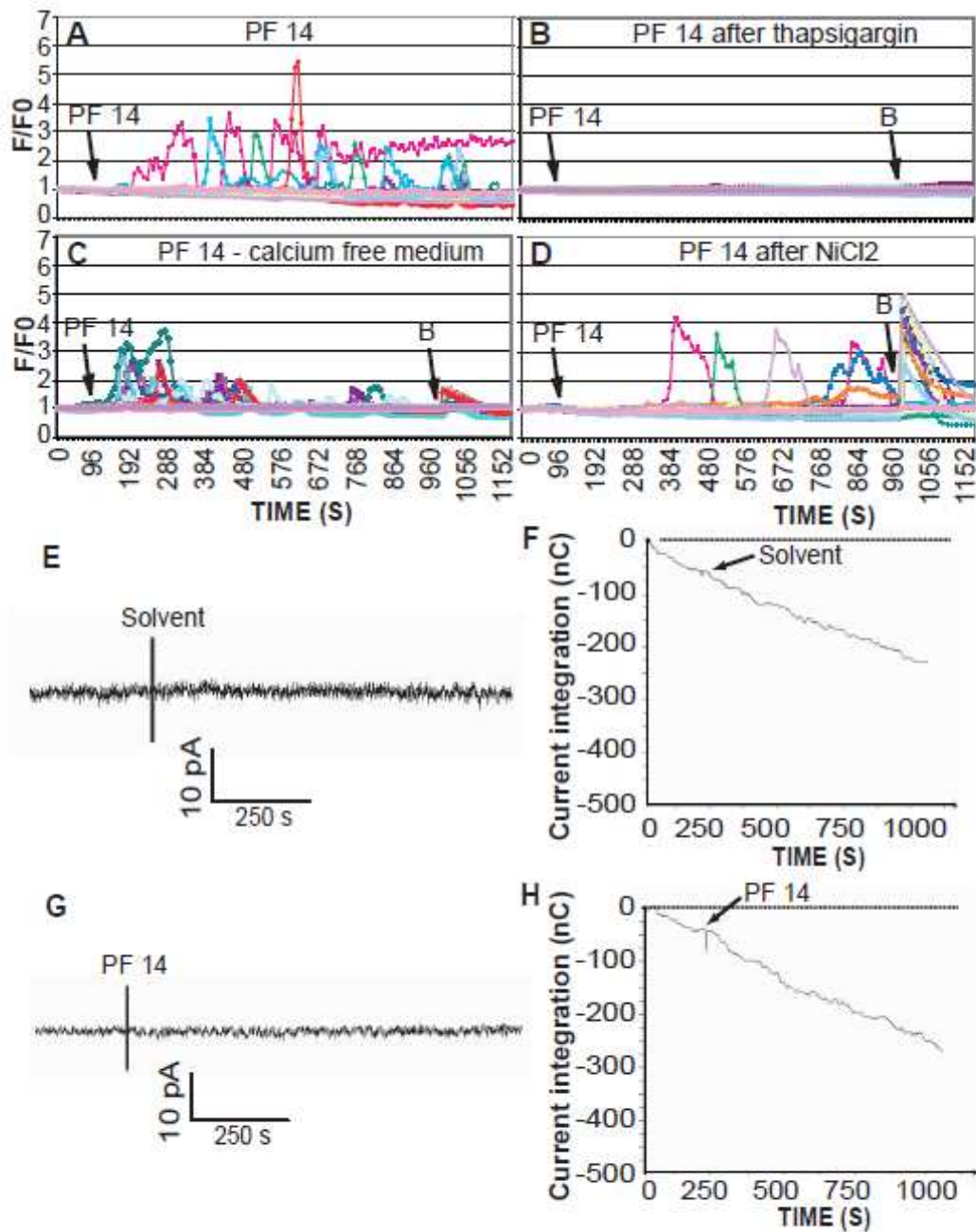


Figure 3

Figure 3: Calcium origin in PF14-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevations. Effect of PF14 (1 μ g/mL) alone (A), after thapsigargin (1 μ mol/L) (B), bathing in calcium-free medium (C) or NiCl₂ (1mmol/L) (D). B: bradykinin (1 μ mol/L). n=30-45 cells. Effect of solvent (E,F;n=5) or PF14 (1 μ g/mL) (G,H;n=10) on membrane calcium channels. Representative experiments are presented.

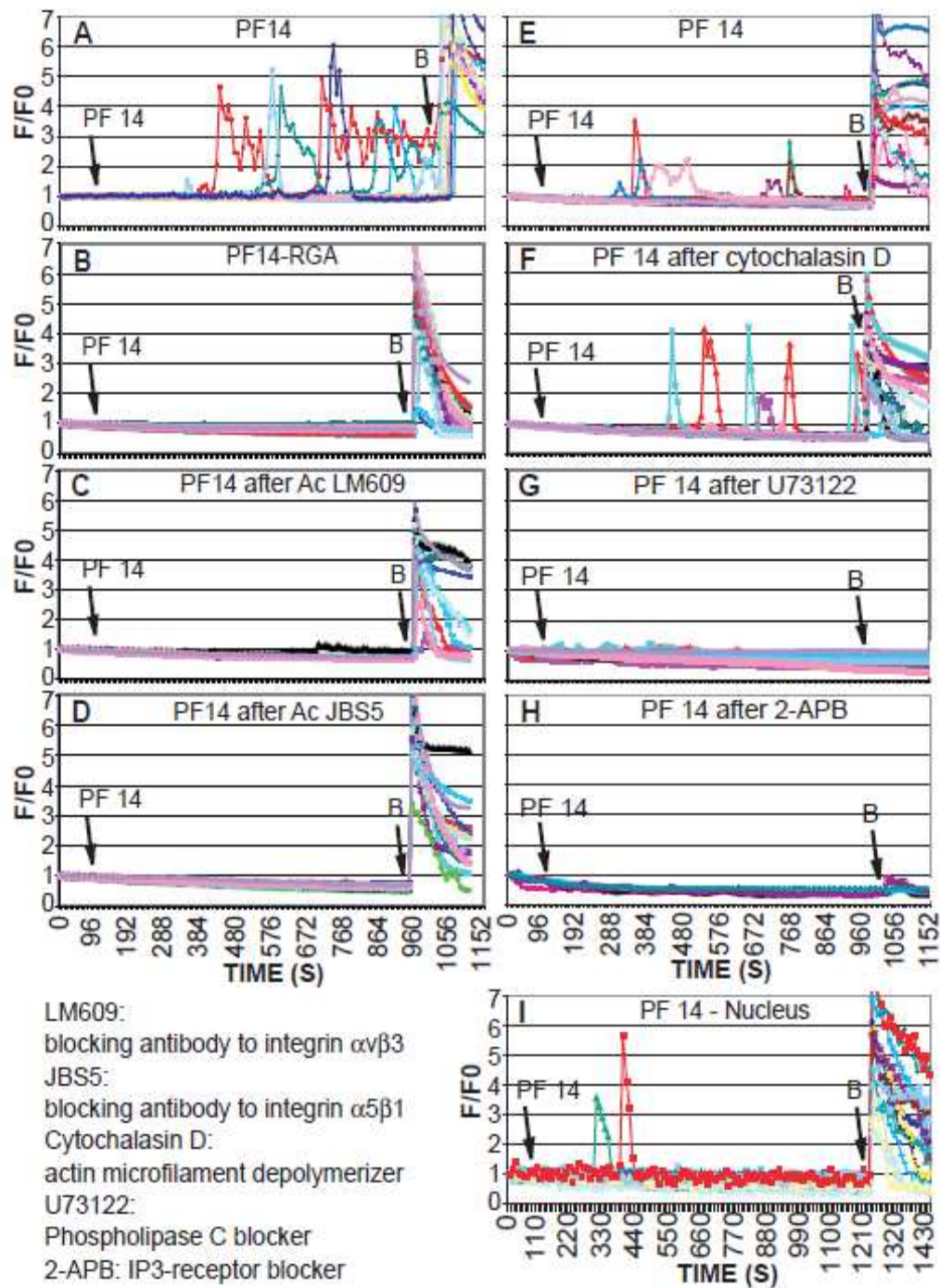


Figure 4

Figure 4: PF14-activated receptors and signalling pathways mediating $[Ca^{2+}]_i$ elevations. PF14 (1 μ g/mL) addition: alone (A,E), PF14-RGA (B), plus LM609 (1 μ g/mL) (C), plus JBS5 (1 μ g/mL) (D), or after cytochalasin-D (1 μ mol/L) (F), U73122 (1 μ mol/L) (G), 2-APB (50 μ mol/L) (H). I: effect on nuclear $[Ca^{2+}]$ (confocal microscopy). B: bradykinin (1 μ mol/L). Representative experiments. n=30-45 cells.

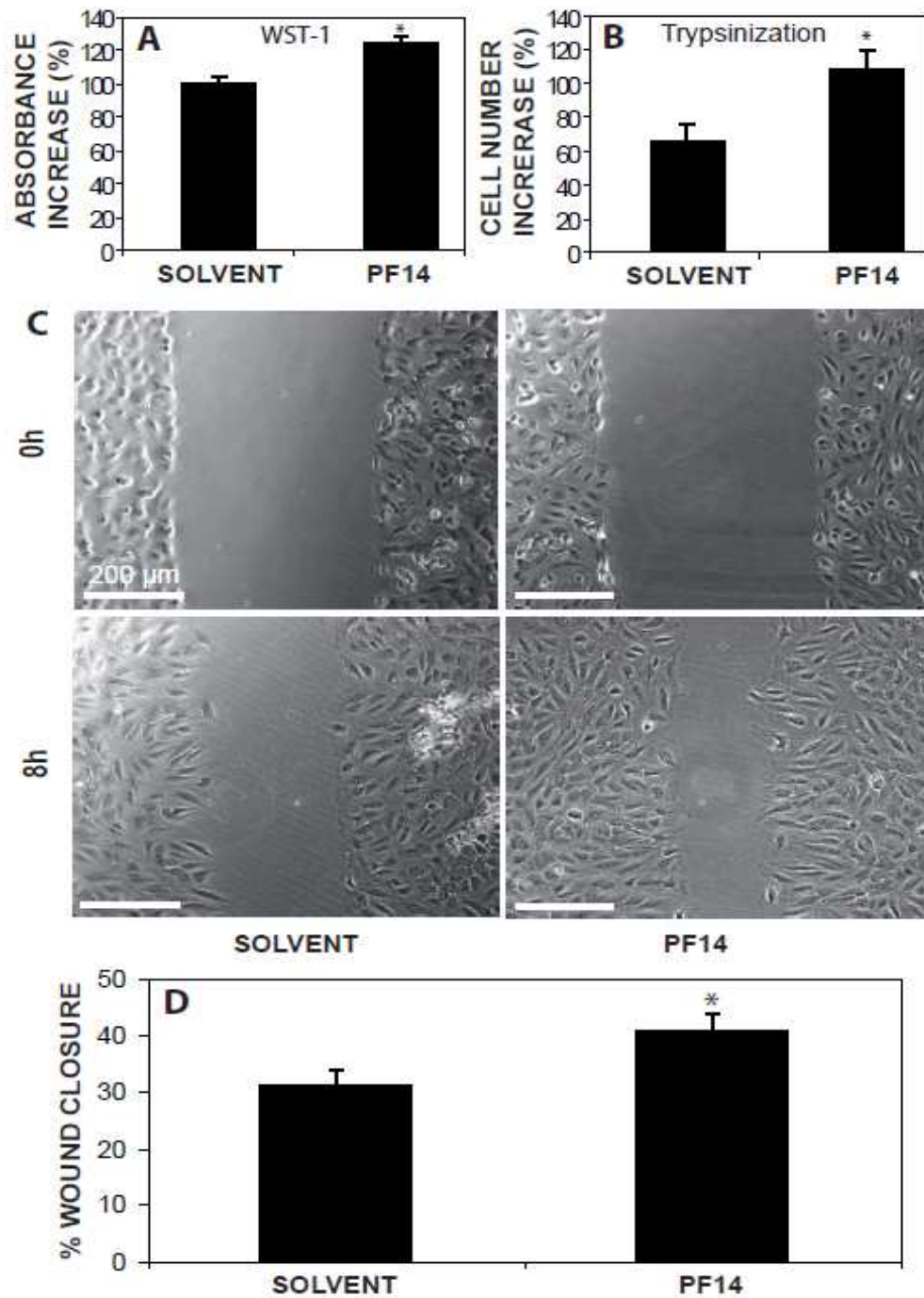


Figure 5

Figure 5: Effect of PF14 on HUVEC proliferation and migration. PF14 (1 μ g/mL) effect on cell proliferation after 48h evaluated by WST-1 (A) or trypsinization (B) method (n=6-8). Effect of PF14 (1 μ g/mL) on cell migration after 8h in wound healing assays (C,D). (n=6). *: significantly different from solvent (1-way ANOVA, $P<0.05$).

DETAILED MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) were isolated using a technique adapted from Jaffe et al. (Jaffe EA et al. 1973; Faury G. et al. 1998). Cells were harvested from the umbilical vein by a 10 minute incubation with collagenase 1A. The endothelial cells were pelleted at 200 G for 10 minutes, and resuspended in medium 199 containing 22% human serum, streptomycin (0.1 mg/mL), penicillin (100 UI/mL) and L-glutamine (2 mmol/L), then placed in dishes with a glass bottom coated with fibronectin. Fluorescence observations were performed in cells adhering to the glass coverslip. Culture medium was changed every two days. Only first and second passage HUVECs were used in the experiments.

Production of microfibrils and fibrillin-1 fragments

Microfibrils were isolated from bovine aorta, in native and non-denaturing conditions, as described (Baldock et al. 2001 ; Kuo et al. 2007 ; El-Hallous E et al. 2007). The protocol was adjusted to prevent proteolytic damages to microfibrils. The aorta from a newborn calf was incubated for 18 hours at 4°C with 0.5 mg/ml purified bacterial collagenase 1A, in the presence of hyaluronidase (5U/mL) and freshly prepared protease inhibitors: phenylmethanesulphonyl fluoride (2 mmol/L) and *N*-ethylmaleimide (10 mmol/L). Samples were centrifugated at 5000 G for 5 minutes, and the supernatant was passed through a CL-2B sepharose column. Excluded volums contained microfibrils.

Recombinant RGD-containing fragments of human fibrillin-1 PF9 (residues 1528-1807) and PF14 (amino acids 1362-1688) were expressed using the mammalian expression vector pCEP-pu/AC7 and 293-EBNA cells, were purified as previously described (Bax et al. 2003).

The cloning, expression and purification of recombinant fibrillin-1 fragments PF9 (316 aminoacids) and PF14 (362 aminoacids), using the mammalian expression vector pCEP-pu/AC7 and 293-EBNA cells, has been described (Bax et al. 2003 ; Bax et al. 2007). cDNA sequencing, SDS-PAGE and mass spectrometry confirmed DNA and protein sequences, respectively (not shown). Gel filtration chromatography was used to ensure only monomeric recombinant fragments were used. Recombinant fragments were concentrated after elution from nickel affinity chromatography, using Vivaspin columns (Sartorius), prior to separation using Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), using an AKTA Purifier system. Monomeric protein was pooled for further experimentation. Fragments were N-glycosylated, as determined by treatment with PNGaseF (New England Biolabs). The domains of the fibrillin-1 fragments PF9 and PF 14 are presented below in Figure 1.

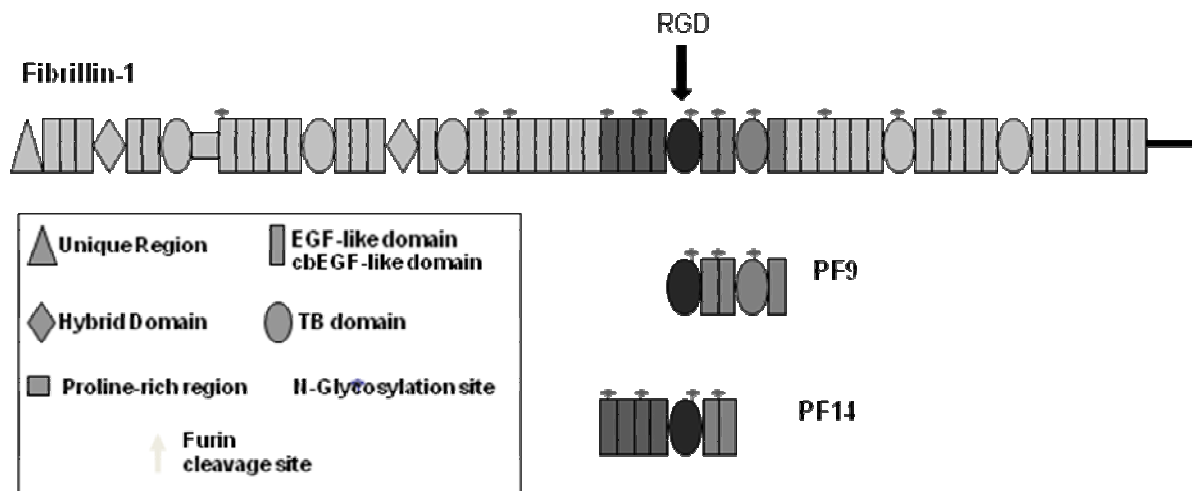


Figure 1: Domains of fibrillin-1 and fibrillin-1 fragments PF9 and PF14.

RGD-RGA PF14 mutant (PF14-RGA) was produced using a site-directed mutagenesis of aspartic acid 1541 to alanine as previously described (Bax et al. 2007).

Intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in adherent HUVEC

Measurements and analyses were performed either by confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 410, Carl Zeiss, Jena, Germany) or by classical microscopy (CellR system, Olympus, Rungis, France) using the calcium-sensitive fluorescent dye Fluo3/AM (excitation: 488 nm; emission: >510 nm), according to the procedures previously described (Faury et al. 1998). The cells were washed twice with a physiological salt solution (PSS) composed of: NaCl (125 mmol/L); KCl (5.6 mmol/L); $CaCl_2$ (2.4 mmol/L); $MgCl_2$ (1.2 mmol/L); D-glucose (11mmol/L); HEPES (10 mmol/L); pH 7.4. PSS (0.75mL) was then added to the cell dish followed by addition of 0.25mL of a bovine serum albumin (2%) and Pluronic F127 (0.08%) solution in PSS containing 5 μ L of a FLUO3/AM solution (0.5 mmol/L) in DMSO (final concentrations: FLUO3/AM: 2.5 μ mol/L, DMSO: <1%). After a 25 minute incubation of HUVECs at room temperature in the dark, the cells were washed three times and bathed in 1 mL PSS 20 minutes before and during the measurements (22°C). In confocal microscopy experiments, the optical slices passed through the nuclei, so that nuclear and cytoplasmic fluorescence could be measured separately. In all cases, ratio of current fluorescence to initial fluorescence (F/F_0) was assumed to be representative of the free calcium level.

In some cases, bradykinin (1 μ mol/L) (Sigma B3259, Saint Quentin-Fallavier, France), classically inducing a strong receptor-mediated elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells (Wang et al. 1995; Leung et al. 2006), was added to HUVECs at the end of the experiment in order to verify cell functionality.

In some experiments, different agents were also applied to HUVECs in order to uncover the PF14 signalling pathways:

- thapsigargin (1 μ mol/L) (Sigma T-9033, Saint Quentin-Fallavier, France), known to empty the intracellular calcium stores by blocking the calcium pump ATP-ase of the endoplasmic reticulum (Thastrup et al. 1989) was applied to HUVECs and depletion of calcium stores was monitored for 16 minutes before addition of PF14 and during the experiment.

- nickel chloride (1 mmol/L), a wide spectrum blocker of membrane calcium channels (Garnier-Raveaud et al. 2001 ; Faury et al. 1998 ; Narahashi et al. 1992), and calcium free medium were used to verify the potential involvement of extracellular calcium influx in the PF14-mediated increase in $[Ca^{2+}]_i$. Composition of the calcium free medium was the following: NaCl (125 mmol/L); KCl (5.6 mmol/L); $MgCl_2$ (1.2 mmol/L); D- glucose (11 mmol/L); HEPES (10 mmol/L); EDTA (0.2 mmol/L); pH 7.4. $NiCl_2$ was applied to the cells 15 minutes prior to addition of PF14 and during the experiment.
- U73122 (1 μ mol/L) (Sigma U-6756, Saint Quentin-Fallavier, France), a blocker of phospholipase C (Jones et al. 2005 ; Yule et al. 1992), was applied to the cells 30 minutes prior to addition of PF14 and during the experiment.
- 2-APB (50 μ mol/L) (Sigma D9754, Saint Quentin-Fallavier, France), a membrane permeable inhibitor of the IP3 receptor (Maruyama et al. 1997), was added to cells for 5 minutes. HUVECs were rinsed prior to recording and addition of PF14.
- Cytochalasin D (1 μ mol/L) (Sigma C8273, Saint Quentin-Fallavier, France), an actin microfilament depolymerizer, making an actin microfilament-mediated mechanotransduction impossible (Cooper 1987) was added to the cells 45 minutes prior to addition of PF14 and during the experiment.
- blocking antibodies (10 μ g/mL) for integrins $\alpha_v\beta_3$ or $\alpha_5\beta_1$, LM609 or JBS5 (Chemicon Europe, Southampton, UK) respectively, were applied to HUVECs 30 minutes prior to addition of PF14 and during the experiment.

Electrophysiological recording

Calcium current recordings were performed using the cell-attached patch-clamp technique (single channel) and materials previously described (Faury et al. 1998). Cells were immersed

in a Tyrode solution containing: NaCl (125 mmol/L); KCl (5.6 mmol/L); CaCl₂ (2.4 mmol/L); MgCl₂ (1.2 mmol/L); HEPES (10 mmol/L); Glucose (11 mmol/L), pH 7.4. The patch pipette was filled with a solution containing: Ba(CH₃COO)₂ (90 mmol/L); HEPES (10 mmol/L), pH 7.4. Barium was used instead of calcium, because calcium channels are generally more permeable to this ion, and barium is known to inhibit potassium currents (Tsien et al. 1987). The imposed potential was +20 mV (except during recording of current-tension curves). HUVEC membrane resting potential (V_m) was measured at -57±4 mV (n=35) for non-dividing cells (Faury et al. 1998). The recorded transmembrane currents were integrated and analyzed using the software Biopatch (Biologic, Claix, France).

HUVEC proliferation

Two different methods were used:

2- WST-1 method

WST-1: (4-[3-[4-iodophenyl]-2-4(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio-1,3-benzene disulfonate]) .

The measurement is based on the ability of mitochondrial dehydrogenases of viable cells to cleave tetrazolium salts (such as WST-1), the reaction product becoming absorbent at 450 nm (Bailey et al. 2004 ; Ishiyama et al. 1996). Briefly HUVEC were plated in fibronectin-coated 96-well microplates at 5 x 10³ cells/well, in medium 199 containing 5% human serum and incubated at 37°C and 5% CO₂. After 2 hours, cells were treated with PF14 (1 µg/mL) or solvent alone for 48h. WST-1 reagent (10 µL/well) was added and incubated for 3 hours at 37°C and 5% CO₂. Absorbance of the samples, proportional to the viable cell number, was then measured at 450 nm using a microplate reader. The background absorbance (= absorbance of medium 199 + WST-1 in the absence of cells) was deducted before proliferation rates were calculated and comparisons were made.

The proliferation rate in each group was calculated as:

$(\text{ABSORBANCE at 48h} - \text{ABSORBANCE at 0h}) \times 100 / \text{ABSORBANCE at 0h}$

6 wells were studied in each group. 1-way ANOVA was used to statistically compare the proliferation rates in the two groups. The differences were considered as statistically significant at $P \leq 0.05$.

2- Trypsinization/cell count method: HUVEC were trypsinized and resuspended in deprived culture medium containing 5% human serum (instead of 22%), in order to limit spontaneous cell proliferation (Vailhé et al. 1996). Cells were then seeded at 4000 cells/cm² in fibronectin-coated dishes. Two hours after cell seeding, which is enough to allow cell attachment, the dishes were incubated with PF14 (1 µg/mL, which is ≈ 26 nM), or solvent of PF14. The time of addition of PF14 was considered to be the initial time (To). After 48 hours, cells were trypsinized and counted using a Kova cell count unit.

The proliferation rate in each group was calculated as:

$(\text{Cell number at 48h} - \text{Cell number at 0h}) \times 100 / \text{Cell number at 0h}$

Experiments were repeated twice in quadruplicate ($n = 8$). The values were then compared using a one-way ANOVA. The differences were considered as statistically significant at $P \leq 0.05$.

In vitro wound healing assay:

Cell migration was measured using an in vitro wound-healing assay (Babbin et al. 2007). Cells were seeded on twelve- well tissue culture plates coated with fibronectin and grown to 100% confluence in complete culture medium. Cells were then incubated in deprived culture medium (5% human serum instead of 22%) overnight. Wounds were produced by scratching the cells with a 200-µL pipette tip then the wounded monolayers were washed twice with PBS to remove cell debris. Monolayers were incubated in deprived cell culture medium and imaged at 0 and 8 hours using an Olympus inverted microscope with an attached CCD camera. Wound areas were measured from the images using Image J software (NIH). In

each case, three measurements along the wound length were averaged to determine the wound area. Wound closure rate was calculated as:

$$(\text{Wound area at 0h} - \text{Wound area at 8h}) \times 100 / \text{Wound area at 0h}$$

The values were then compared using a one-way ANOVA. The differences were considered as statistically significant at $P \leq 0.05$.

REFERENCES

Babbin BA, *et al.* (2007) Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J Pathol* 170(3):951-966.

Bailey SR, Polan JL, Munoz OC, Agrawal MC, & Goswami NJ (2004) Proliferation and beta-tubulin for human aortic endothelial cells within gas-plasma scaffolds. *Cardiovasc Radiat Med* 5(3):119-124.

Baldock C, *et al.* (2001) The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol* 152(5):1045-1056.

Bax DV, *et al.* (2003) Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Biol Chem* 278(36):34605-34616.

Bax DV, *et al.* (2007) Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation. *J Cell Sci* 120(Pt 8):1383-1392.

Cooper JA (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105(4):1473-1478.

- El-Hallous E, *et al.* (2007) Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *J Biol Chem* 282(12):8935-8946.
- Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L, & Verdeti J (1998) Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6):2967-2972.
- Garnier-Raveaud S, *et al.* (2001) Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Growth Factors* 19(1):35-48.
- Ishiyama M, *et al.* (1996) A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19(11):1518-1520.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, & Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52(11):2745-2756.
- Jones NP, Peak J, Brader S, Eccles SA, & Katan M (2005) PLCgamma1 is essential for early events in integrin signalling required for cell motility. *J Cell Sci* 118(Pt 12):2695-2706.
- Kuo CL, *et al.* (2007) Effects of fibrillin-1 degradation on microfibril ultrastructure. *J Biol Chem* 282(6):4007-4020.
- Leung PC, *et al.* (2006) Mechanism of non-capacitative Ca²⁺ influx in response to bradykinin in vascular endothelial cells. *J Vasc Res* 43(4):367-376.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, & Mikoshiba K (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* 122(3):498-505.

Narahashi T & Herman MD (1992) Overview of toxins and drugs as tools to study excitable membrane ion channels: I. Voltage-activated channels. *Methods Enzymol* 207:620-643.

Thastrup O, *et al.* (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 27(1-2):17-23.

Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, & Rosenberg RL (1987) Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 16:265-290.

Vailhe B & Tranqui L (1996) [The role of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) and of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the in vitro angiogenesis process]. *C R Acad Sci III* 319(11):1003-1010.

Wang R, Sauve R, & de Champlain J (1995) Abnormal regulation of cytosolic free calcium in vascular endothelial cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 13(9):993-1001.

Yule DI & Williams JA (1992) U73122 inhibits Ca^{2+} oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 267(20):13830-13835.

II.1.3. Résultats supplémentaires de l'article 1

Les microfibrilles sont associées à l'élastine dans les fibres élastiques mais peuvent aussi exister seules, dépourvues d'élastine dans d'autres tissus comme les zonules des yeux (Ashworth, J. L. et al. 2000). Des études structurales avaient montré qu'il existe une différence structurale mineure entre les microfibrilles aortiques et les microfibrilles des zonules (Lu Y and al. 2006). Nous avons essayé de savoir si cette différence pouvait se traduire par une différence fonctionnelle. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet des microfibrilles de zonules sur le niveau de calcium dans les cellules endothéliales.

Dans les HUVECs, les microfibrilles de zonules induisent une augmentation du niveau de calcium nul ou dans le meilleur des cas beaucoup plus faible que celle induite par les microfibrilles aortiques, même à des concentrations élevées (figure 29).

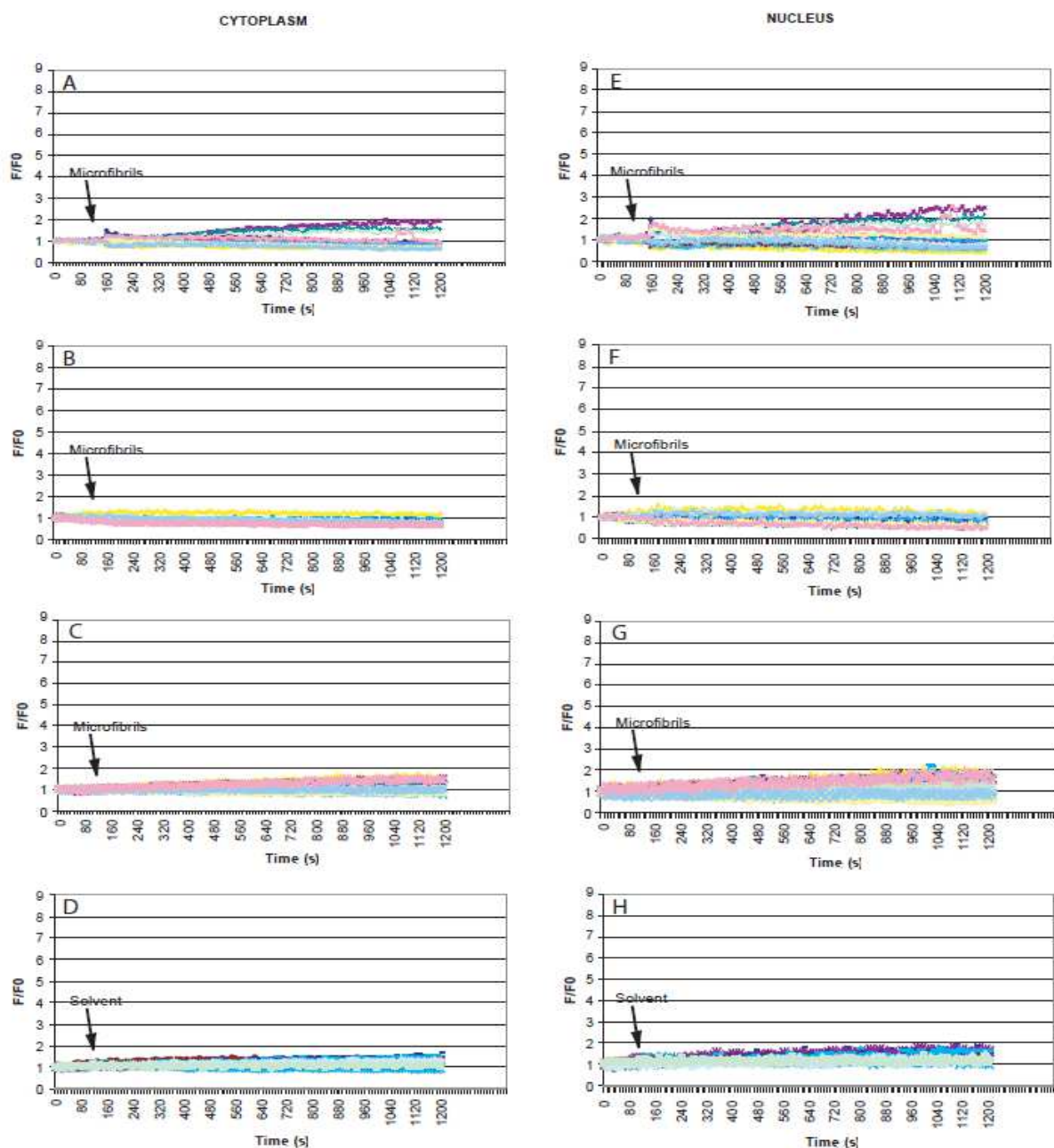


Figure 29: Effet-dose de microfibrilles zonulaires sur la concentration de calcium libre nucléaire et cytoplasmique. A, B, C et D : fluorescence cytoplasmique de Fluo-3. E, F, G et H: fluorescence nucléaire de Fluo-3. Les microfibrilles sont ajoutées à 120 s. Chaque tracé correspond à l'évolution de la fluorescence dans une cellule du champ microscopique. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences avec un total de 33 à 42 cellules. A et E : Addition de microfibrilles 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ($\approx 10^{-10}\text{M}$). B et F : Addition de microfibrilles 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ($\approx 3.3 \times 10^{-11}\text{M}$). C et G : Addition de microfibrilles 0.15 $\mu\text{g/ml}$ ($\approx 10^{-11}\text{M}$). D et H : Addition du solvant des microfibrilles (control).

II.1.4. Discussion de l'article 1

Des études précédentes avaient montré que les peptides d'élastine et la tropoélastine augmentent le niveau de calcium dans les cellules endothéliales (Faury et al. 1998a et b). Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, ces peptides régulent la prolifération et induisent la réorganisation des microfilaments d'actine (Karnik SK et al. 2003). Nous avons cherché à comprendre si les microfibrilles, l'autre composant majeur des fibres élastiques, pouvaient aussi induire une signalisation dans les cellules endothéliales.

Nous avons montré que les microfibrilles aortiques augmentent le niveau de calcium libre dans les cellules endothéliales humaines (HUVECs). Afin de savoir quel composant particulier des microfibrilles aortiques est responsable de cet effet, nous avons en tout premier lieu utilisé les fragments de fibrilline-1, cette dernière étant le composant essentiel des microfibrilles. Les fragments de fibrilline-1, PF9 et PF14, contenant le motif RGD permettent l'adhérence des cellules endothéliales. Ceci est compatible avec ce qui avait précédemment été montré sur les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires (Sakamoto H et al. 1996, Pfaff M et al. 1996, Bax DV et al 2003, Porst M et al. 2006, McGowan SE et al. 2008). Cependant, les fragments PF14 augmentent le niveau de calcium intracellulaire libre de manière dose-dépendante et RGD-dépendante, alors que les fragments PF9 n'induisent pas ces événements. L'absence d'effet de PF9 sur les HUVEC malgré la présence du motif RGD pourrait être due soit à un mauvais repliement du motif RGD, soit à l'absence de séquences situées sur la partie N-terminale et qui jouerait un rôle important dans la signalisation. En particulier, il a été montré que la partie N-terminale de PF14, absente chez PF9 contient un domaine heparane sulphate (Bax DV et al 2008). D'autres molécules de la matrice extracellulaire se comportent comme PF9. C'est le cas de la fibuline-5 qui permet l'adhérence des cellules musculaires lisses sans transduction du signal et avec un effet moindre sur la prolifération et la migration (Lomas AC et al 2007). Nous avons montré la médiation des intégrines $\alpha V \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 1$ dans la signalisation du fragment PF14. Ces intégrines agissent en synergie de sorte que le blocage de l'une d'elles seulement est suffisant pour abolir l'action de PF14. Ce phénomène est similaire à celui observé dans l'induction de la migration par certains facteurs angiogéniques comme la thymidine phosphorylase (Hotchkiss KA et al 2003). Les intégrines et le cytosquelette d'actine sont souvent associés dans les mêmes voies de signalisation venant de la matrice extracellulaire. Ici nous avons montré que les microfilaments d'actine ne sont impliqués ni dans la signalisation des

microfibrilles, ni dans la signalisation de PF14. Certaines différences dans les voies de signalisation des microfibrilles ou de PF14 existent. Les microfibrilles aortiques induisent une activation des canaux calciques membranaires endothéliaux, alors que PF14 ne semble pas activer ces canaux et semblent mobiliser uniquement les réserves de calcium intracellulaires du réticulum endoplasmique. La mobilisation du calcium intracellulaire induite par les microfibrilles aortiques étant beaucoup plus importante que celle induite par PF14, ceci suggère que des composants des microfibrilles autre que la fibrilline-1 ou d'autres séquences de la fibrilline-1 absentes dans PF14 ont un rôle dans la signalisation induite par les microfibrilles aortiques.

Nous avons élucidé la voie de signalisation conduisant à l'augmentation du niveau de calcium libre dans les cellules endothéliales. Nous avons montré l'implication de la kinase src (résultat non montré), de la phospholipase C (PLC) et de l'inositol triphosphate (IP3). L'augmentation du niveau de calcium dans le noyau suite à l'action de PF14 laisse supposer une possible augmentation de la prolifération cellulaire. Ceci a été confirmé par deux techniques différentes montrant que PF14 induit une augmentation de la prolifération des HUVECs de 20%. Les fragments PF14 induisent aussi une augmentation de la migration des HUVECs. Ceci est compatible avec les résultats obtenus avec les cellules mésangiales et les fibroblastes (Porst M et al. 2006, McGowan SE et al. 2007), qui ont montré que les fragments de fibrilline-1 contenant le motif RGD étaient capables d'induire la migration de ces cellules.

Par ailleurs, dans les cellules endothéliales, nous avons montré que les microfibrilles des zonules de l'œil, induisaient des augmentations du niveau de calcium libre très inférieures à celles induites par les microfibrilles aortiques. De plus la cinétique de mobilisation du calcium dans les quelques cellules répondant aux microfibrilles de zonules est différente de celle induite par les microfibrilles aortiques : l'élévation du calcium libre est faible, lente et régulière tout au long de l'expérience après stimulation des cellules par les microfibrilles zonulaires alors que l'élévation du calcium est importante, rapide et sous forme d'une succession de pics transitoires après stimulation par les microfibrilles aortiques. On pourrait penser ici à une spécificité tissulaire de l'action des microfibrilles. La différence structurale entre les deux microfibrilles d'origines différentes pourrait avoir des conséquences sur l'exposition de certains sites cryptiques dans certains tissus et pas dans d'autres. Cette hypothèse pourrait être étayée par le fait que les microfibrilles sont associées à l'élastine dans les artères et pas dans les zonules (Kielty CM et al. 2002a).

Les résultats obtenus dans cet article sont d'une réelle importance dans le sens où ils permettent de lever le voile sur une partie de la signalisation induite par la fibrilline-1 dans les cellules endothéliales. Ils montrent aussi que les microfibrilles pourraient jouer un rôle, autre que mécanique, dans la morphogénèse vasculaire, d'autant plus que la fibrilline-1 signale via les intégrines, induit la prolifération et la migration des cellules endothéliales, phénomènes particulièrement importants dans la morphogénèse vasculaire. Les microfibrilles étant de gros complexes protéiques, la fibrilline-1 pourrait se trouver au premier plan des molécules actives dans ce complexe.

Ces résultats pourraient aussi apporter de nouveaux indices concernant la pathogénèse du syndrome de Marfan. Le calcium mobilisé par les fragments de fibrilline-1 pourrait activer la production de NO (monoxyde d'azote) via l'activation de la NO synthase dans les cellules endothéliales. Le NO produit par les cellules endothéliales module les fonctions des cellules musculaires lisses sous-jacentes comme la prolifération et la synthèse de matrice extracellulaire. L'absence de signalisation de la fibrilline-1 dans les cellules endothéliales pourrait altérer la fonction de ces cellules ainsi que celles des cellules musculaires lisses comme cela est observé chez les patients atteints du syndrome de Marfan (Wilson DG et al. 1999).

II.2. Article 2: Fibrillin-1 genetic deficiency modifies arterial physiology and morphology during aging in mice

Auteurs : Mariko B, Pezet M, Escoubet B, Bouillot S, Andrieu JP, Starcher B, Quaglino D, Jacob MP, Huber P, Ramirez F and Faury G

II.2.1. Introduction de l'article 2

Les fibres élastiques sont des composants de la matrice extracellulaire (MEC) constitués essentiellement d'élastine et de microfibrilles. Elles confèrent aux tissus extensibles comme la peau, le cœur et les vaisseaux sanguins, leurs propriétés élastiques. Les fibres élastiques permettent aux grosses artères élastiques d'assurer correctement leur fonction qui consiste à lisser le flux sanguin (pulsatile) provenant du cœur afin d'assurer la perfusion continue des organes. Bien que l'élastine soit le principal acteur de l'élasticité des grosses artères, les microfibrilles aussi y participent mais à un degré moindre (Lillie MA et al. 1998). Les microfibrilles contrôlent la dilatation maximale de l'aorte et supportent avec le collagène le stress hémodynamique exercé sur l'adventice (Pereira et al. 1997). Les microfibrilles sont des macromolécules composites dont le principal composant est la fibrilline-1. Celle-ci participe à l'étape initiale de l'assemblage des microfibrilles et donc des fibres élastiques.

La mutation du gène de la fibrilline-1 est responsable de la maladie génétique humaine autosomique dominante appelée syndrome de Marfan qui se caractérise au niveau vasculaire par des anévrismes, des dissections aortiques et un dysfonctionnement endothélial. Dès lors, un rôle de signalisation de la fibrilline-1 fût suggéré, cette hypothèse étant étayée par le fait que la fibrilline-1 permet l'adhésion, l'étalement et la migration de plusieurs types cellulaires incluant les cellules vasculaires (endothéliales et musculaires lisses). Aussi des fragments de fibrilline-1 induisent une signalisation dans les cellules endothéliales humaines (voir article précédent sur les fragments de la fibrilline-1). La synthèse de la fibrilline-1 débute pendant les phases initiales de la gestation chez l'humain et atteint son pic à la naissance avant de décroître et de rester à un niveau faible après la naissance. Après leur formation, suite à l'assemblage de l'élastine, la fibrilline-1 et d'autres protéines associées, les fibres élastiques subissent une dégradation progressive au cours du vieillissement par des enzymes élastolytiques. (Jacob MP 2003).

Des études précédentes sur des modèles de souris portant une mutation dans le gène de la fibrilline-1 ont montré que la fibrilline-1 joue un rôle important dans l'homéostasie tissulaire (Perera L et al. 1997, Pereira L et al. 1999, Marque V et al. 2001, Carta L et al. 2006). Ces souris présentent des caractéristiques du syndrome de Marfan, comme des dilatations anévrismales de l'aorte ascendante qui apparaissent souvent assez tôt au cours de leur vie. Contrairement à l'insuffisance quantitative en fibrilline-1, la perte de l'élastine chez les souris *Eln*^{-/-} conduit à une occlusion de la lumière artérielle suite à une prolifération des cellules musculaires lisses et une augmentation du nombre d'unités lamellaires. Des études récentes ont montré que la déficience quantitative en élastine aux cours du développement peut avoir des répercussions à long terme sur les processus de vieillissement artériel chez les souris hétérozygotes pour le gène de l'élastine (souris *Eln* ^{+/-}) (Pezet M et al. 2008). En effet chez les souris *Eln* ^{+/-}, dès l'âge adulte, on voit l'apparition d'évènements spécifiques au vieillissement comme la fragmentation des lames élastiques, l'épaississement de la paroi aortique et l'altération des paramètres biomécaniques comme la distensibilité et rigidité vasculaire. Il nous a ainsi paru intéressant de voir si la fibrilline-1, l'autre composant majeur des fibres élastiques, à l'instar de l'élastine, contribue à la régulation de la structure et fonction de système cardiovasculaire non seulement pendant les phases initiales de la vie mais aussi au cours du vieillissement, en passant par l'âge adulte.

Pour ce faire, nous avons étudié la structure et la fonction du système cardiovasculaire chez les souris jeunes (3 semaines), adultes (6 mois) et âgées (24 mois) portant une délétion hypomorphique (seulement 10% d'expression de l'allèle mutée) des exons 19 à 24 du gène de la fibrilline-1 (souris *Fbn-1* ^{+/*mgΔ*}). Cette délétion recouvre une partie du gène de la fibrilline-1 où apparaissent fréquemment des mutations conduisant à la forme néonatale et sévère du syndrome de Marfan. Les souris homozygotes *Fbn-1* *mgΔ* /*mgΔ* meurent au bout de 2 à 3 semaines et ne pouvaient donc être utilisées ici pour l'étude longitudinale allant jusqu'aux souris âgées. Les paramètres biomécaniques, histologiques, la réactivité vasculaire et la fonction cardiaque ont été étudiés.

II.2.2. Article souris 2

Fibrillin-1 genetic deficiency modifies arterial physiology and morphology during aging in mice

Mariko B[#], Pezet M⁺, Escoubet B[£], Bouillot S[#], Andrieu JP[^], Starcher B[@], Quaglini D[&], Jacob MP[§], Huber P[#], Ramirez F^{*} and Faury G[#]

[#] 1 Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38041, FRANCE ; 2 CEA, Grenoble, F-38054, FRANCE ; 3 INSERM, U882, Grenoble, F-38054, FRANCE ; [§] 1 INSERM, U698, Paris, F-75877, FRANCE ; 2 Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, F-75877, FRANCE ; [£] 1 INSERM, U772, Collège de France, Paris, F-75231, FRANCE ; 2 Assistance-Publique-Hopitaux de Paris-Hôpital Bichat, Service de Physiologie, Paris, F-75018, FRANCE ; 3 Université Paris 7, Faculté de Médecine Denis Diderot, Paris, F-75018, FRANCE ; 4 INSERM, CEFI-IFR2, Paris, F-75018, FRANCE ; [&]Department of Biomedical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, ITALY; ⁺ INSERM, CEFI-IFR2, Paris, F-75018, FRANCE; [@]Department of Biomedical Research, University of Texas Health Center, Tyler, Texas, USA; ^{*} Department of Pharmacology and Systems Therapeutics, Mount Sinai School of Medicine, New-York, NY, USA; [^] Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale, Université Joseph Fourier - CEA, Grenoble, France.

Corresponding author : G Faury. Laboratoire "Physiopathologies vasculaires : interactions cellulaires, signalisation et vieillissement" - INSERM U 882 - CEA - Université Joseph Fourier. iRTSV-APV. CEA-Grenoble - 17 rue des Martyrs - 38 054 Grenoble cedex 9 - FRANCE. Tel: (33) 4 38 78 23 48 ; Fax: (33) 4 38 78 49 64 ; E-mail: Gilles.Faury@ujf-grenoble.fr

ABSTRACT

Fibrillin-1, the major component of microfibrils and second main constituent of elastic fibers, is synthesized during development and participates to the initial phase of elastic fiber assembly. Mutations in the fibrillin-1 gene are responsible for Marfan syndrome, characterized at the vascular level by aortic aneurysms and dissections. After the recent finding that early deficiency of elastin, the major component of elastic fibers, modifies vascular aging, the question was raised of a similar involvement of early fibrillin-1 deficiency in late-onset vascular remodeling or pathologies. Here we investigated the cardiovascular structure and function of mice bearing fibrillin-1 heterozygous hypomorphic mutation (Fbn-1+/mgΔ) in young (3 weeks), adult (6 months) and aged (24 months). Fbn-1+/mgΔ mice were found slightly hypotensive, especially in aged animals, compared to their wild-type counterpart. Aneurysm and aortic insufficiency were present in 31% of adult Fbn-1+/mgΔ mice and more frequently (67%) in aged Fbn-1+/mgΔ while, in wild-types, such vascular pathologies appeared only in aged animals and were unfrequent. In the aorta wall of Fbn-1+/mgΔ, one elastic lamellae was missing and the elastic lamellae were overfragmented throughout the life. The aortic stiffness was consistently increased with the decrease of the elastin / collagen ratio in Fbn-1+/mgΔ compared to wild-type during the aging. Our result suggests that fibrillin-1 mutation mgΔ leads to accelerated aging and Marfan-like pathology of the aorta, including effects opposed to these induced during aging by elastin haploinsufficiency, regarding blood pressure, vascular dimensions and number of elastic fibers.

INTRODUCTION

Elasticity of large arteries is of major importance regarding their ability to accomplish their function. During the systole, the pressurized blood dilates the large arteries, while the arterial wall elastic components store the energy. During the diastole, the wall elastic components release the accumulated energy by compressing the blood, therefore maintaining a substantial blood pressure and flow into the arterial tree and “smoothing” the discrete blood flow delivered by the heart (Belz GG 1995). In vertebrates, it is essentially the arterial elastic fibers, in particular their major component elastin, present in the circumferentially-oriented elastic lamellae which make this function possible. Whereas vertebrate elastic fibers are made of elastin and microfibrils, the absence of elastin in invertebrates lead to an increased and essential role in arterial mechanics for microfibrils, which are the only significant elastic component in invertebrate arteries (Faury G 2001). As does the elastin network, microfibrils have directly been shown to gradually increase their length when solicited by an external force (Kielty CM et al. 2002a). In mammals, despite the relatively low amount of microfibrils in elastic fibers (90% elastin ; 10% microfibrils), it has been shown that microfibrils also exert a significant mechanical function, in addition to the important role of elastin (Lillie MA, 1999). Microfibrils are macromolecular structures composed of several molecules, the major of which is fibrillin-1 (90% of microfibrillar components), including also microfibril-associated glycoproteins (MAGPs), latent TGF- β -binding proteins (LTBPs) and fibulins (Kielty CM 2002b). Fibrillin-1 is a 350 kDa glycoprotein which brings a major contribution to the elastic properties of microfibrils (Wang MC et al 2009, Glab J and Weiss T 2008). When there is an alteration of the fibrillin-1 content, the structure and function of the large arteries become abnormal, such as in the genetic disease Marfan syndrome due to autosomal dominant mutations of the fibrillin-1 gene (Vitarelli A et al. 2006; Dingeman KP et al. 2006). The main features of Marfan syndrome are an increased arterial stiffness (Jeremy RW et al.

1994, Adams JN et al. 2005, Baumgartner D et al 2005, Vitarelli A et al. 2006, Ahimastos AA et al. 2007), a dysfunctional endothelium and a modified architecture of the aorta, including the frequent appearance of aneurysms (Wilson DG 1999, Dietz HC et al 1991). A signalling role for fibrillin-1 is therefore suggested, this hypothesis being supported by the findings that fibrillin-1 anchors endothelial cells and several of its sequences modulate cell attachment, spreading and migration through the mediation of integrins (Williamson et al. 2008; Bax DV et al 2003 and 2007, Pfaff M et al. 1999; Sakamoto H et al 1996; Porst M et al. 2006). While elastin is synthesized only during the last third of gestation and infancy, fibrillin-1 synthesis begins in the early steps of development (5th week of pregnancy in humans), peaks at birth then decreases and stays low after birth until advanced ages (Pezet et al. 2008; Quondamatteo F et al. 2002). After assembly of elastin, fibrillin-1 and associated proteins, the resulting elastic fibers normally undergo a slow age-dependent degradation due to the progressive imbalance between elastolytic and anti-elastolytic enzymes (Jacob MP 2003). Resulting degradation peptides have been shown to have many biological activities in the cardiovascular system, such as the age-dependent vasodilatory activity of elastin peptides (Faury et al 1997, Faury G et al 1998). Moreover, after the recent discovery that early elastin quantitative deficiency can modify in the long term the arterial aging processes in mice hemizygous for elastin (Eln^{+/-}) (Pezet et al., 2008), it was postulated that elastic fiber components, as part of intact fibers or degraded into peptides or short sequences, act as important physiological signals contributing to the regulation of the cardiovascular function throughout life. Several models of genetically-engineered mice have already shown that mutations or deletions in the fibrillin-1 gene leads to aneurysmal pathologies early in life (Carta L et al. 2006, Pareira L et al. 1999, Pareira L et al. 1997, Judge DP et al. 2004). It therefore seemed interesting to understand whether fibrillin-1 also contributes more generally to the regulation of the cardiovascular physiology -structure and function- not only in the early steps of life, but also throughout adulthood and aging. For this purpose, we have used a genetically-engineered

strain of mice bearing an heterozygous deletion in the fibrillin-1 gene, on chromosome 2, between exon 19 and exon 24 (mg Δ deletion) (Pereira et 1997). This deletion encompasses a region of fibrillin-1 in which appear mutations frequently present in severe and early onset form of Marfan syndrome (Pereira L et al. 1997, Collod-Beroud G and Boileau C 2002). While Fbn-1 mg Δ /mg Δ mice die between 2 and 3 weeks after birth, Fbn-1 +/-mg Δ mice live until an advanced age although they have only 60% of the normal content in Fibrillin-1 (gene-dosage effect) (Pereira L et al. 1997). We have studied in these mice of different ages, the main physiological cardiovascular parameters that classically/potentially vary with age. These include blood pressure, heart function, arterial mechanics and reactivity, as well as the arterial structure, in particular the elastic lamella number and elastic fiber integrity. We have found that aged Fbn-1 +/-mg Δ mice present substantial differences in the age-related changes of their heart and arteries, including enlargement and frequent aneurysms. Because, on the contrary, decreased arterial diameters were found in aged mice hemizygous for the elastin gene (Pezet et al., 2008), these news results suggest that early elastin and fibrillin-1 contents could modulate arterial aging in opposite ways.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Eighty male mice, C57Bl/6J (Fib-1^{+/+}) or mice bearing a heterozygous deletion of exons 19-24 in the fibrillin-1 gene (Fib-1^{+/mgΔ}), which leads to a dysfunctional allele and lower expression level, were backcrossed for >5 generations into the C57Bl/6J background and used in these experiments (Pereira L et al 1997). Studies were performed in three age-groups: 3 week-old (young), 5-7 month-old (6 month-old = adults) and aged mice 23-27 month-old (24 months-old = aged). Littermates from Fbn-1^{+/mgΔ} crosses were used whenever possible. All housing and surgical procedures were in accordance with institutional guidelines.

Blood pressure measurements and heart weight

Mice were anesthetized using isoflurane (1.5-2%), and placed on a heating table to maintain body temperature at 37°C. Blood pressure was measured using a Millar probe SPR838 inserted into the ascending aorta.

In other animals, anesthetized with pentobarbital (60mg/kg, IP), hearts and left ventricles were dissected, washed, and weighed (wet weight).

Untrasound study

Ultrasound studies were performed as previously described (Parlakian A et al. 2005, Royer A et al. 2005, Pezet M et al 2008), using a Toshiba Powervision 6000, SSA 370A device equipped with an 8- to 14-MHz linear transducer under isoflurane anesthesia (0.75% to 1.0% in oxygen) with spontaneous ventilation. In vivo ascending aorta systolic and diastolic diameters were measured from time mode imaging as gated on R wave from simultaneous ECG tracing.

Arterial desmosine and hydroxyproline contents

Desmosine levels, considered as representative of the elastin content, and total protein contents were determined by radioimmunoassay, as described (Starcher B and Conrad M 1995). Hydroxyproline levels, considered as representative of the collagen content, were determined by amino-acid analysis using standard techniques. Samples were dried under vacuum and then dissolved in 0.2 M Na citrate, pH 2.2. Analyses were performed by high-pressure ion-exchange chromatography on a Biochrom 30 amino acid analyser as described by the manufacturer, except that elution was carried out for 40 min instead of 65 min. Norleucin was used as an internal standard. Results are expressed as amino-acid mass per vessel segment length and as amino-acid mass per vessel total protein content.

Cannulated aorta mechanics

Mechanical studies were performed on cannulated ascending aortas, excised from mice anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (60mg/kg), and placed in a heated organ bath. The inner and outer diameters were measured by videomicroscopy at different pressures upon inflation using a physiological solution. Below 100mmHg, the inner diameter was calculated as described (Faury G et al. 2003, Pezet M et al 2008).

Distensibility is the change in relative luminal volume (percentage) per mmHg (Smith JJ, Kampine, JP 1990). Here, we calculated the distensibility per 25mmHg increment (D_{25}) (Faury G et al. 2003, Pezet M et al 2008).

Circumferential midwall strain (ε), circumferential wall stress (σ), and incremental elastic modulus (E) were calculated according to classical formulas (Gibbons CA, and Shadwick RE 1989). ε : relative increase in diameter, at a given pressure, as compared to the diameter at no

pressure. σ : forces that are circumferentially applied on a each small portion (surface) of the vessel wall. E: wall stiffness.

Cannulated aorta reactivity

Variations of the ascending aorta diameters in response to 10 μ mol/L phenylephrine (PE), a VSMC-dependent vasoconstrictor mainly acting through the α_1 -adrenoceptors, then 10 μ mol/L acetylcholine (Ach), an endothelial cell-dependent vasodilator, was assessed at 75mmHg (Faury G et al. 2003, Pezet M et al 2008). Control diameters of Fbn-1+/mg Δ mouse aortas, before PE application, were normalized to the mean control diameter of Fbn-1+/+ mouse aortas prior to comparisons of the effect of treatment as a function of genotype (Faury G et al. 1997).

Histological examination

Vessels excised from anesthetized mice were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C and processed for paraffin embedding. Transverse sections (5 μ m) of the ascending aorta were stained with hematoxylin-eosin for cells staining, Weigert for elastic fibers, and picrosirius red for collagen.

Some ascending aortas were fixed by cardiac perfusion with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), then embedded in Epon for ultrastructural analyses. Semi-thin sections were stained according to a previously described method (Franc S et al 1984), and pretreated with tannic acid before uranyl acetate staining. Sections were examined on a JEM 1200 EX II (Jeol, Japan) electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

Expression of tropoelastin, lysyl-oxidase, lysyl-oxidase-like-1, fibrillin-1, fibrillin-2, fibulin-5 and type I collagen in the mouse aorta

RNA isolation and reverse transcription from entire aortas was performed according to a classical method (Chomczynski P and Sacchi N 1987). The yield of total RNA from a single ascending aorta was typically 2.9-7.5 µg. Gene expressions were evaluated by real-time PCR using a Light-Cycler with the FastStart DNA Master SYBR Green Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) after mRNA reverse transcription of 400 ng total RNA in the presence of oligodT, then normalized to the housekeeping gene beta-actin. Measured transcript levels were reproducible, at levels that were significantly above background. Oligo primers used were:

-tropoelastin (TE): 5'-AAGCTGCTGCTAAGGCTGC-3' (antisense) and 5'-TGCAACTCCTCCACCTGGGAA-3' (sense),

-lysyl-oxidase (LOX): 5'-AATTCAGCCACTATGACCTGCTTGA-3' (antisense) and 5'-GTAGCGAATGTC ACAGCGTACAACA-3' (sense),

-fibrillin-1: 5'-TGCCAGCAGCGAGATGGACGA-3' (antisense) and 5'-TGGCGAGGCTCACGTTGGCTT-3' (sense),

-fibrillin-2: 5'-AGTAGCCGCAACCTCGTCACAAA-3' (antisense) and 5'-AGCACTGGTAAC TGCCCTTGGTGT-3' (sense),

-type I collagen: 5'-GTTCGTGACCGTGACCTTGA-3' (antisense) and 5'-GGTGAAGCGACTGTTGCCT-3' (sense),

mRNA expressions were normalized to the total mRNA amount.

Statistics

Comparisons, as a function of age, of Fbn-1 +/mg Δ and Fbn-1 +/+ mouse body weight, heart weight/body weight ratios, heart rate, mean blood pressure, ultrasonography parameters, mRNA dosages, desmosine, hydroxyproline and total protein contents (and their ratios), and vessel diameters (OD and ID) in response to vasoactive agonists were assessed using two-way ANOVA, followed when necessary by Fisher's least significant difference test (LSD) or t-test for paired value comparisons. Vessel diameters were compared as a function of transmural pressure level (0–175mmHg), genotype (Fbn-1 +/mg Δ and Fbn-1 +/+) and age (6- or 24-month-old) using a three-way ANOVA followed when necessary by LSD tests. Vessel midwall strain, stress, incremental elasticity modulus and distensibility, comparisons were assessed using the nonparametric Mann-Whitney U test. Unless otherwise indicated, the results are presented as mean values $\pm$ standard error of the mean (SEM), and P values $\leq$ 0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Physiology parameters

General physiology parameters were measured in Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ and Fbn-1 $+/+$. No significant difference in total lifespan was found between Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ and Fbn-1 $+/+$. However, in Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice, we noticed a tendency to a survival rate decrease between 12 and 20 months of age, peaking at 18 months (Khi2 Test at 18 months: $p = 0.06$), before convergence of the Fbn-1 $+/+$ and $+/\text{mg}\Delta$ survival rate curves after 20 months of age (figure 1A). The body weight was approximately the same in both genotypes (30-33 g) (Table 1).

Systolic, mean and diastolic blood pressures were decreased and the pulse pressure increased in Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice compared to wild-type mice of matching age, possibly in relation with the degree of aortic insufficiency observed in each animal (see below). No age-dependant change in blood pressure could be noted.

In vivo arterial dimensions - arterial and cardiac ultrasonography

Imaging of the ascending aorta diameter was assessed through the cardiac cycle during ultrasound study. Measurements of systolic and diastolic diameters were gated on the ECG signal (online supplemental figure 1). Compared to wild type animals of the same age, adult Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice presented increases in aortic dimensions of +38 % and +71 % for the diastolic diameter and the aortic surface, respectively (Table 1). In wild-type mice, aneurysms were virtually absent in adults, and were present at the rate of only 17% (2 out of 12) in aged animals. In Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice, however, aneurysms were present in 31% (4 out of 13) of adults and became even more frequent in aged animals: 67% (8 out of 12 mice) (figure 1B). Wild-type animals presented a normal increase in aortic diameter during aging, while this did not occur in Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ animals (Table 1).

Aorta compliance was also estimated in vivo from the ratio of the diameters and pressure gradients between systole and diastole. The decreased compliance of adult Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ vessels illustrates the heterogeneity in this population with some animals not clearly different from their wild type counterparts and others with a massive alteration of this mechanical property. Compliance also decreased with aging in wild type mice ($P=0,056$) while Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ did not seem to present the same alteration (Table 1).

Regarding cardiac function, retrograde flow during diastole was identified using colour-Doppler mode, in the adult (2 out of 8) and aged (3 out of 5) Fbn-1 +/-mgΔ mice, the latter also presenting the most dilated aortas (online supplemental figure 2). These aortic insufficiencies (AI) were mild with no cardiac complications or severe with a consistent pattern of LV global dysfunction illustrated by LV remodelling (dilation and wall thickening leading to hypertrophy) associated with ventricular dysfunction affecting both contraction and relaxation. Cardiac dimensions and function were not modified in non-symptomatic (non AI) Fbn-1 +/-mgΔ as compared with wild-type mice of the same age. No adult wild-type mice were affected whereas some aged wild-type mice also developed aortic regurgitation, although at a reduced frequency (2 out 8) (online supplemental Table 1).

Histology of the ascending aorta

The histological staining showed an overall disorganisation of the smooth muscle cells layer in Fbn-1 +/-mgΔ compared to Fbn-1 +/+ at any age, from 3 weeks to 24 months (figures 1C and 2). While this disorganisation become obvious only at 24 month-old in Fbn-1 +/+, it appeared already during adulthood or even before in Fbn-1 +/-mgΔ mice. The histological examinations (figures 1C and 2H-M) and morphometric analyses (Table 2) showed that the elastic lamellas were found slightly thinner, more frequently disrupted, and with increased distance between each other in Fbn-1 +/-mgΔ mice compared to Fbn1 +/+. Globally, one elastic lamellae was missing in the ascending aorta of Fbn-1 +/-mgΔ at any age compared to Fbn-1 +/+ animals, and no age-dependant change was found in the number of elastic lamellae within a same genotype (Table 2). The collagen staining of the ascending aorta was slightly diffuse in adult Fbn-1 +/-mgΔ mice compared to their counterpart Fbn-1 +/+ mice of the same age in which the staining was almost focused on the elastic lamellas. In aged animal of both genotypes, the collagen staining was diffuse and this was exacerbated in Fbn-1 +/-mgΔ mice (Figure 2O-T). Aortic aneurysms were present in adult Fbn-1 +/-mgΔ mice, and became highly frequent and in some cases associated with dissection in aged Fbn-1 +/-mgΔ animals. The aged mice with severe aneurysm and/or dissection were classified as pathologic Fbn-1 +/-mgΔ mice. In this group of mice, the histological features observed in “normal” aged Fbn-1 +/-mgΔ mice, was exacerbated. Namely, there was a tear, splitting of the media of ascending aorta, with complete disorganisation of the smooth muscle cell layer and elastic lamellas, as well as abnormal accumulation of collagen (figure 2G,N,U).

Biomechanical parameters of ascending aorta:

At 3 weeks of age, the diameters and wall thickness were increased in Fbn-1 +/mg Δ mice compared to Fbn-1 +/+ mice (Figure 3A-C). No difference was found in the wall stress and incremental elastic modulus (Einc) between young animals of both genotypes, while strain was increased in Fbn-1 +/mg Δ mice. The aorta distensibility was increased at pressure below 100 mmHg, and decreased at pressure above 125 mmHg in young Fbn-1 +/mg Δ mice compared to their wild-type counterparts (Figure 3D-H).

In adult and aged animals, the outer and inner diameters were increased in Fbn-1 +/mg Δ mice compared to their Fbn-1 +/+ counterpart of matching age (figure 4A,B). The diameter was increased with age in both genotypes, although to a higher extent in Fbn-1 +/mg Δ mice. In adults, the aorta wall was found to be thicker in Fbn-1 +/mg Δ compared to Fbn-1 +/+ whereas, in aged animals, Fbn-1 +/mg Δ aortas had a wall thinner than that of Fbn-1 +/+ animals (figure 4C). In Fbn-1 +/+ mice, a classical wall thickening was observed during aging while, on the contrary, a thinning of the Fbn-1 +/mg Δ ascending aortic wall took place during aging.

Compared to Fbn-1 +/+ mice of matching ages, aortic wall stress (σ) was decreased in adult and increased in aged Fbn-1 +/mg Δ mice, at pressures above 125 mm Hg. Also, σ substantially decreased with age in Fbn-1 +/+ animals and, to a lower extent, increased with age in Fbn-1 +/mg Δ mice (figure 4D). No significant difference was found in the strain values (ϵ) between both genotypes in adult mice. In aged animals, however, ϵ was lower in Fbn-1 +/mg Δ compared to Fbn-1+/+ mice (figure 4E). At similar strains, aging increased σ in Fbn-1 +/mg Δ mice and decreased σ in Fbn-1+/+ animals (figure 4F).

Globally, at pressures above 75 mm Hg, the aorta distensibility was lower in Fbn-1 +/mg Δ compared to Fbn-1 +/+ mice at any age, and decreased with age at pressures above 100 mm Hg in both genotypes (figure 4G). The incremental elastic modulus (Einc) was not different between both genotypes in adult mice. During aging, Einc did not change in Fbn-1 +/+ mice while it increased substantially in Fbn-1 +/mg Δ animals at pressure above 100 mm Hg (figure 4H).

Desmosine and hydroxyproline contents:

The contents in desmosine and hydroxyproline were measured in order to quantify the elastin and collagen contents, respectively, as previously described (Pezet M et al 2008). The desmosine levels were reduced while the hydroxyproline levels were increased in Fbn-1 +/mgΔ mice compared to their wild-type counterparts of the same age. Also, in both genotypes, desmosine and hydroxyproline contents per vessel length increased with age (figure 5A-C). No genotype- or age-related change was found in the total protein contents of the ascending aorta (figure 5C). The desmosine content ratioed to total protein (%) was lower in Fbn-1 +/mgΔ mice and unchanged with age in mice of both genotype, whereas hydroxyproline content per total protein was increased with age Fbn-1 +/mgΔ mice (figure 5D,E). The desmosine to hydroxyproline ratio was decreased by 10-13 % in the ascending aorta of Fbn-1 +/mgΔ compared to Fbn-1 +/+ mice, but remained unchanged during aging within the same genotype (figure 5F).

Elastic fiber-related gene expression:

Gene expression studies by RT-PCR were performed on RNA extracts from the ascending aorta of young (3 weeks), adult (6 months) and aged (24 months) mice. As expected, the expression level of the elastic fiber-related genes studied here was elevated in young animals compared to adult and aged animals except for fibrillin-1 in Fbn-1 +/mgΔ mice (figure 5G-K). In young Fbn-1 +/mgΔ mice, fibrillin-1 gene expression level was reduced to less than half (47%) of the level present in Fbn-1 +/+ mice of the same age. No significant difference could be detected in fibrillin-1 gene expression between both genotypes in adults mice, while a slight increase was noted in aged Fbn-1 +/mgΔ compared to Fbn-1 +/+ animals (figure 5G). Fibrillin-2 expression tended to be increased ($P = 0.07$) in Fbn-1 +/mgΔ mice at any age compared to their wild-type counterpart of the same age (figure 5H). Tropoelastin and collagen-1 were under-expressed in young Fbn-1 +/mgΔ animals compared to their wild-type counterpart of the same age (figure 5I,J). Collagen-1 expression was increased in aged Fbn-1 +/mgΔ mice compared to Fbn-1 +/+ of the same age (figure 6J), while no difference could be not between adult and aged animal for the other genes studied here. No difference could be noted in LOX expression between Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mgΔ animals at any age (figure 5K).

Ascending aorta reactivity

Ascending aorta response to phenylephrine (PE) and acetylcholine (Ach) was assessed. Response to PE was slightly higher in Fbn-1 $+/+$ than in Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice at any age (figure 6A). There was no age-related change in response to PE within each age. A great dispersion in the response of aged Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice aorta to PE was observed. When this group was separated in non-pathologic and pathologic (=presenting aneurysms) animals, we found that the aortas of the latter group did not respond at all to PE, whereas the response to PE of the aorta of non-pathologic mice was similar to that of wild-type mice of the same age (figure 6B). The Ach-induced vasorelaxation seemed paradoxally increased in adult Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice compared to that of the wild-types of matching age. The Ach-induced vasorelaxation in non-pathologic aged Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice was decreased, compared to their wild-type counterparts of matching age (figure 6C). Response to Ach in the aorta of pathologic aged Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ animals was not measured because of absence of PE-induced pre-contraction, which is required for the measurement of the response to Ach.

DISCUSSION

Elastic fiber components regulate cell proliferation, migration, arterial morphogenesis and provides the blood vessels with elastic properties (Li DY 1998a, Dietz HC and Mecham RP 2000, Maki JM et al. 2001, Nakamura et al. 2002, Urban Z et al. 2002, Wagenseil JE and Mecham RP 2007). Elastin deficiency is responsible for the human genetic diseases supravalvular aortic stenosis (SVAS) and, regarding the cardiovascular features of the disease, Williams syndrome (Curran ME et al. 1993, Ewart AK et al. 1993 (a and b) and 1994, Olson TM et al. 1995, Li DY et al. 1997). These pathologies are characterized by a hyperproliferation of the vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the large arteries, leading to additional VSMC layers and elastic lamellas which eventually occlude the vessels. The major microfibrillar component, fibrillin-1, also plays an important role in the aorta morphogenesis and homeostasis (Pereira L et al 1997), and its genetic deficiency leads to vessel enlargements, aortic aneurysms and dissections (Marfan syndrome). In order to understand the pathogeneses and the somehow opposite effects of elastin and fibrillin-1 genetic deficiencies in vivo, several mouse strains have been generated.

Previous studies in mice showed that genetic deficiency for microfibrillar constituents can lead to altered arterial structure and function. In particular, mice deficient for fibulin-5 present altered elastic fibers as well as more and tortuous arteries (Nakamura et al 2002) possibly through alteration of angiogenesis due to fibulin-5 imbalance (Albig AR et al 2004). More recently, fibrillin-1 gene modifications in mice also permitted to understand that fibrillin-1 regulates cell adhesion and spreading, and participates to arterial morphogenesis and homeostasis (Carta L et al. 2006, Pareira L et al. 1999, Pareira L et al. 1997, Judge DP et al. 2004). Mutations or deletions in the fibrillin-1 gene (Fbn-1) lead to aneurysms resembling those observed in Marfan syndrome (Dietz HC 1991). The C1039G mutation and the homozygous mgR deletion (hypomorphic, disruption of exon 8) in the fibrillin-1 gene resulted in adult mice with arteries presenting substantially enlarged diameters, increased stiffness and extensive elastic fiber fragmentation (Marque V et al 2001, Chung AW 2007b and 2008). A larger deletion of the fibrillin-1 gene, i.e. mg Δ (exons 19 to 24), mimics the deletions observed in the neonatal forms of Marfan syndrome. In Fbn-1 mg Δ /mg Δ mice, severe aneurysms were observed and the animals died 2-3 weeks after birth (Pareira L et al.1997). In the present study, the use of Fbn-1 +/-mg Δ mice allowed to study the physiology of animals

until advanced ages, since the heterozygous deletion was less deleterious on survival, i.e. no clear change in survival rate could be detected between Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ and wild-type mice during aging. Nevertheless, Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice were slightly hypotensive (especially aged animals) and had arteries with fragmented elastic fibers and generally larger diameters. Also, cardiac hypertrophy, aortic insufficiency and aortic aneurysms were substantially more frequent in Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ than in $+/+$ mice. The ascending aorta wall remodelling / thinning could be the consequence of its degradation by matrix metalloproteases (MMPs) since MMP secretion is increased in the aorta of Marfan syndrome affected patients and other fibrillin-1 deficient mice models, starting at an early age (Ahimastos AA et al 2007, Chung AW et al. 2007b, Xiong W et al. 2008). To support this hypothesis, an early and progressive fragmentation of elastic fibers is observed Marfan patients and mice genetically deficient for fibrillin-1 (Carta L et al 2006, Chung AW et al 2007 b, Bunton TE et al 2001, Dingemans KP et al. 2006). However, in these patients and murine models, the elastic fiber alteration could also result from a direct negative effect of the limited availability of fibrillin-1 on elastic fiber assembly/production (Dietz HC et al. 1993, Eldadah ZA et al. 1995).

Our results indicate that a heterozygous deletion in the mouse fibrillin-1 gene is enough to trigger a series of mechanisms progressively leading to aortic aneurysms, similar to the processes occurring in humans. However, it has been observed that the pathogenesis of the murine disease followed a slower time-course with the appearance of the major manifestations during aging, probably because of wall mechanical constraints lower in mice than in humans. A better adaptation of mice, compared to humans, to similar genetic modifications was also observed in mice hemizygous for elastin (Eln $+/-$). In mice, elastin haploinsufficiency (Eln $+/-$) results in consequences close to the cardiovascular features of SVAS and Williams syndrome in humans, although some differences appear. Whereas an increased number of thinner lamellar units, cardiac hypertrophy, arteries of smaller diameter and decreased elastin content, hypertension and altered mechanics are present in SVAS and Williams patients as well as in Eln $+/-$ mice, no clear arterial stenosis could be observed in these animals (Li et al 1998b, Faury et al 2003, Pezet et al 2008). Only mice presenting an even lower content in elastin, i.e. Eln $-/-$ and humanized hBAC-mNull mice, exhibit arterial stenosis (Li et al., 1998a; Hirano et al, 2007).

A second lesson from these experiments was the surprising finding that two sub-populations of Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice clearly coexist: i) one with close to normal arteries, except for some modified parameters (diameter enlargement, larger wall thickness, higher stiffness), and ii)

another one with clearly pathological aortas, with the presence of the same -although enhanced- modifications, together with aneurysms, cardiac hypertrophy and aortic insufficiency. This suggests that, even in an inbred mouse strain, the phenotype resulting from the same genetic modification does not have the same penetrance in all the animals. This resembles the situation in humans, i.e. Marfan syndrome patients (Hutchinson S et al. 2003, Faivre L et al. 2007).

Our results confirm that fibrillin-1 acts as an important structural and mechanical constituent of the arterial wall, which is an important contributor in arterial morphogenesis. To explain the exact role of fibrillin-1, previous studies and our present data suggest that fibrillin-1 is a signal stimulating cell receptors, in particular integrins (Sakamoto H et al. 1996, Pfaff M et al. 1996, Bax DV et al 2003, Porst M et al. 2006, McGowan SE et al. 2008). This signal could regulate cell adhesion and spreading, including in vascular cells (Bax DV et al. 2003, Williamson MR 2007), and other cellular pathways necessary for the proper establishment of the tissue organization during development. Of particular importance is our observation that Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice have one less elastic lamella than their wild-type counterparts, marking a clear wall remodelling related to a modified synthetic activity of the vascular cells.

Given the fact that fibrillin-1 is expressed very early in development, impairment of the normal amount of the signal fibrillin-1 at certain key time-points could alter normal developmental signalling and organ morphogenesis, as suggested by the decreased elastin content and altered structure and function observed in Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice. A similar hypothesis was proposed in previous works regarding the role of elastin, showing that cultured Eln $-/-$ VSMCs hyperproliferate compared to wild-type VSMCs, leading to think that a decreased presence of elastin is a signal which stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and alters arterial morphogenesis (Li et al 1998 (a and b), Karnik SK et al 2003, Faury G et al 2003, Hirano E et al, 2007, Pezet M et al 2008).

Additionally, the present results confirm that early modifications of the tissular structure, even minor, can lead to late dysfunctions during aging, as seen in Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ and in Eln $+/-$ mice (Pereira L et al. 1997, Pezet M et al. 2008, Faury G et al. 2003). This hypothesis was initially raised in a previous study showing that elastin hemizyosity induce an alternative aging of the aorta, including some aspects of premature aging (early fragmentation of elastic fibers and cardiac hypertrophy) and inhibited aging (no wall thickening and no altered contractile response to alpha-adrenergic agonists during aging) (Pezet M et al 2008).

Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice are an interesting model to study the early and late consequences of the gene-dosage effect. Future studies should in particular explain the reasons of the apparent opposite effects of elastin and fibrillin-1 haploinsufficiency, i.e. hypertension and increased number of elastic lamellae in Eln $+/-$ mice vs. hypotension and decreased number of elastic lamellae in Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ mice. More generally, further investigations in cells from these animals should further explain the consequences of a decreased fibrillin-1 production on cell signalling, in particular the mechanisms leading to extracellular matrix production, cell proliferation and vasoactivity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the following institutions for fundings: European Commission (contracts TELASTAR, 5th PCRD, number QLK6-CT-2001-00332; and ELAST-AGE, 6th PCRD, number LSHM-CT-2005-018960), the French Ministry of Foreign Affairs-EGIDE (fellowship to B. Mariko) and Association Française contre les Myopathies.

REFERENCES

Adams, J. N., M. Brooks, et al. (1995). "Aortic distensibility and stiffness index measured by magnetic resonance imaging in patients with Marfan's syndrome." *Br Heart J* **73**(3): 265-9.

Ahimastos, A. A., A. Aggarwal, et al. (2007). "Effect of perindopril on large artery stiffness and aortic root diameter in patients with Marfan syndrome: a randomized controlled trial." *Jama* **298**(13): 1539-47.

Albig, A. R. and W. P. Schiemann (2004). "Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells." *DNA Cell Biol* **23**(6): 367-79.

Baumgartner, D., C. Baumgartner, et al. (2005). "Diagnostic power of aortic elastic properties in young patients with Marfan syndrome." *J Thorac Cardiovasc Surg* **129**(4): 730-9.

Bax, D. V., S. E. Bernard, et al. (2003). "Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins." *J Biol Chem* **278**(36): 34605-16.

Bax, D. V., Y. Mahalingam, et al. (2007). "Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation." *J Cell Sci* **120**(Pt 8): 1383-92.

Belz, G. G. (1995). "Elastic properties and Windkessel function of the human aorta." *Cardiovasc Drugs Ther* **9**(1): 73-83.

Brown-Augsburger, P., C. Tisdale, et al. (1995). "Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly." *J Biol Chem* **270**(30): 17778-83.

Bunton, T. E., N. J. Biery, et al. (2001). "Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome." *Circ Res* **88**(1): 37-43.

Carta, L., L. Pereira, et al. (2006). "Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development." *J Biol Chem* **281**(12): 8016-23.

Carta, L., S. Smaldone, et al. (2009). "p38 MAPK Is an Early Determinant of Promiscuous Smad2/3 Signaling in the Aortas of Fibrillin-1 (Fbn1)-null Mice." *J Biol Chem* **284**(9): 5630-6.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.

Chung, A. W., K. Au Yeung, et al. (2007a). "Endothelial dysfunction and compromised eNOS/Akt signaling in the thoracic aorta during the progression of Marfan syndrome." *Br J Pharmacol* **150**(8): 1075-83.

Chung, A. W., K. Au Yeung, et al. (2007b). "Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome." *Circ Res* **101**(5): 512-22.

Chung, A. W., H. H. Yang, et al. (2008). "Mechanical and pharmacological approaches to investigate the pathogenesis of Marfan syndrome in the abdominal aorta." *J Vasc Res* **45**(4): 314-22.

Collod-Beroud, G. and C. Boileau (2002). "Marfan syndrome in the third Millennium." *Eur J Hum Genet* **10**(11): 673-81.

Curran, M. E., D. L. Atkinson, et al. (1993). "The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis." *Cell* **73**(1): 159-68.

Dietz, H. C., G. R. Cutting, et al. (1991). "Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene." *Nature* **352**(6333): 337-9.

Dietz, H. C., I. McIntosh, et al. (1993). "Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome." *Genomics* **17**(2): 468-75.

Dietz, H. C. and R. P. Mecham (2000). "Mouse models of genetic diseases resulting from mutations in elastic fiber proteins." *Matrix Biol* **19**(6): 481-8.

Dingemans, K. P., P. Teeling, et al. (2006). "Ultrastructural pathology of aortic dissections in patients with Marfan syndrome: Comparison with dissections in patients without Marfan syndrome." *Cardiovasc Pathol* **15**(4): 203-12.

Eldadah, Z. A., T. Brenn, et al. (1995). "Expression of a mutant human fibrillin allele upon a normal human or murine genetic background recapitulates a Marfan cellular phenotype." *J Clin Invest* **95**(2): 874-80.

Ewart, A. K., W. Jin, et al. (1994). "Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene." *J Clin Invest* **93**(3): 1071-7.

Ewart, A. K., C. A. Morris, et al. (1993a). "Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome." *Nat Genet* **5**(1): 11-6.

Ewart, A. K., C. A. Morris, et al. (1993b). "A human vascular disorder, supravalvular aortic stenosis, maps to chromosome 7." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3226-30.

Faivre, L., G. Collod-Beroud, et al. (2007). "Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and

Faury, G. (2001). "Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres." *Pathol Biol (Paris)* **49**(4): 310-25.

- Faury, G., A. Chabaud, et al. (1997). "Effect of age on the vasodilatory action of elastin peptides." *Mech Ageing Dev* **95**(1-2): 31-42.
- Faury, G., S. Garnier, et al. (1998). "Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells." *Circ Res* **82**(3): 328-36.
- Faury, G., M. Pezet, et al. (2003). "Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency." *J Clin Invest* **112**(9): 1419-28.
- Franc, S., R. Garrone, et al. (1984). "A routine method for contrasting elastin at the ultrastructural level." *J Histochem Cytochem* **32**(2): 251-8.
- Gibbons, C. A. and R. E. Shadwick (1989). "Functional similarities in the mechanical design of the aorta in lower vertebrates and mammals." *Experientia* **45**(11-12): 1083-8.
- Glab, J. and T. Wess (2008). "Changes in the molecular packing of fibrillin microfibrils during extension indicate intrafibrillar and interfibrillar reorganization in elastic response." *J Mol Biol* **383**(5): 1171-80.
- Hirano, E., R. H. Knutsen, et al. (2007). "Functional rescue of elastin insufficiency in mice by the human elastin gene: implications for mouse models of human disease." *Circ Res* **101**(5): 523-31.
- Hutchinson, S., A. Furger, et al. (2003). "Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: a potential modifier of phenotype?" *Hum Mol Genet* **12**(18): 2269-76.
- Jacob, M. P. (2003). "Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions." *Biomed Pharmacother* **57**(5-6): 195-202.

- Jeremy, R. W., H. Huang, et al. (1994). "Relation between age, arterial distensibility, and aortic dilatation in the Marfan syndrome." *Am J Cardiol* **74**(4): 369-73.
- Judge, D. P., N. J. Biery, et al. (2004). "Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome." *J Clin Invest* **114**(2): 172-81.
- Kielty CM, C. Baldock, et al. (2002a). "Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**(1418): 207-17.
- Kielty CM, C. M., M. J. Sherratt, et al. (2002b). "Elastic fibres." *J Cell Sci* **115**(Pt 14): 2817-28.
- Li, D. Y., B. Brooke, et al. (1998a). "Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis." *Nature* **393**(6682): 276-80.
- Li, D. Y., G. Faury, et al. (1998b). "Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin." *J Clin Invest* **102**(10): 1783-7.
- Li, D. Y., A. E. Toland, et al. (1997). "Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supraaortic stenosis." *Hum Mol Genet* **6**(7): 1021-8.
- Lillie MA, M. A., G. J. David, et al. (1998). "Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue." *Connect Tissue Res* **37**(1-2): 121-41.
- Maki, J. M., J. Rasanen, et al. (2002). "Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice." *Circulation* **106**(19): 2503-9.
- Marque, V., P. Kieffer, et al. (2001). "Aortic wall mechanics and composition in a transgenic mouse model of Marfan syndrome." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(7): 1184-9.

McGowan, S. E., A. J. Holmes, et al. (2008). "Arg-Gly-Asp-containing domains of fibrillins-1 and -2 distinctly regulate lung fibroblast migration." *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**(4): 435-45.

Nakamura, T., P. R. Lozano, et al. (2002). "Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo." *Nature* **415**(6868): 171-5.

Olson, T. M., V. V. Michels, et al. (1995). "A 30 kb deletion within the elastin gene results in familial supraaortic stenosis." *Hum Mol Genet* **4**(9): 1677-9.

Parlakian, A., C. Charvet, et al. (2005). "Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart." *Circulation* **112**(19): 2930-9.

Pereira, L., K. Andrikopoulos, et al. (1997). "Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome." *Nat Genet* **17**(2): 218-22.

Pezet, M., M. P. Jacob, et al. (2008). "Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta." *Rejuvenation Res* **11**(1): 97-112.

Pfaff, M., D. P. Reinhardt, et al. (1996). "Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1." *FEBS Lett* **384**(3): 247-50.

Porst, M., C. Plank, et al. (2006). "Fibrillin-1 regulates mesangial cell attachment, spreading, migration and proliferation." *Kidney Int* **69**(3): 450-6.

Quondamatteo, F., D. P. Reinhardt, et al. (2002). "Fibrillin-1 and fibrillin-2 in human embryonic and early fetal development." *Matrix Biol* **21**(8): 637-46.

Royer, A., T. A. van Veen, et al. (2005). "Mouse model of SCN5A-linked hereditary

- Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis." *Circulation* **111**(14): 1738-46.
- Sakamoto, H., T. Broekelmann, et al. (1996). "Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1." *J Biol Chem* **271**(9): 4916-22.
- Smith JJ, K. J. (1990). *Circulatory Physiology. The essentials*. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Starcher, B. and M. Conrad (1995). "A role for neutrophil elastase in the progression of solar elastosis." *Connect Tissue Res* **31**(2): 133-40.
- Urban, Z., S. Riazi, et al. (2002). "Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supraaortic stenosis and Williams-Beuren syndrome." *Am J Hum Genet* **71**(1): 30-44.
- Vitarelli, A., Y. Conde, et al. (2006). "Aortic wall mechanics in the Marfan syndrome assessed by transesophageal tissue Doppler echocardiography." *Am J Cardiol* **97**(4): 571-7.
- Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2007). "New insights into elastic fiber assembly." *Birth Defects Res C Embryo Today* **81**(4): 229-40.
- Wang, M. C., Y. Lu, et al. (2009). "Fibrillin Microfibrils: A Key Role for the Interbead Region in Elasticity." *J Mol Biol*.
- Williamson, M. R., A. Shuttleworth, et al. (2007). "The role of endothelial cell attachment to elastic fibre molecules in the enhancement of monolayer formation and retention, and the inhibition of smooth muscle cell recruitment." *Biomaterials* **28**(35): 5307-18.
- Wilson, D. G., M. F. Bellamy, et al. (1999). "Endothelial function in Marfan syndrome: selective impairment of flow-mediated vasodilation." *Circulation* **99**(7): 909-15.

Xiong, W., R. A. Knispel, et al. (2008). "Doxycycline delays aneurysm rupture in a mouse model of Marfan syndrome." *J Vasc Surg* **47**(1): 166-72; discussion 172.

Table 1: Hemodynamic and ultrasound parameters of ascending aorta. Values are mean $\pm$ SEM

	<i>6-7 month-old Males</i>				<i>23-26 month-old Males</i>			
	Fbn-1 +/+		Fbn-1 +/mgΔ		Fbn-1 +/+		Fbn-1 +/mgΔ	
Number of Animals	8		8		7		5	
Body Weight (g)	29.5	± 0.9	31.8	$\pm 0.7^*$	33.2	± 1.3 §	31.6	± 0.8
Entire Heart weight / BW (mg/g)	4.92	± 0.13	5.99	± 0.91	5.72	± 0.35	6.25	± 0.94
Systolic Arterial Pressure (mmHg)	105	± 2	104	$\pm 3^*$	110	± 4	104	$\pm 5^*$
Mean Arterial Pressure (mmHg)	85	± 1	81	$\pm 2^*$	84	± 3	76	$\pm 6^*$
Diastolic Arterial Pressure (mmHg)	75	± 1	70	$\pm 2^*$	72	± 3	62	$\pm 6^*$
Ultrasound study								
Ascending aorta:								
Systolic Diameter (mm)	1.70	± 0.05	2.18	$\pm 0.17^*$	2.11	± 0.07 §	2.26	$\pm 0.19^*$
Diastolic Diameter (mm)	1.48	± 0.04	2.04	$\pm 0.19^*$	1.97	± 0.08 §	2.05	$\pm 0.21^*$
Surface (mm ²)	2.28	± 0.14	3.90	$\pm 0.66^*$	3.53	± 0.22 §	4.09	± 0.66
Compliance (mm/mmHg)	0.720	± 0.137	0.520	± 0.112	0.383	± 0.07 ¶	0.579	± 0.173
Cardiac data :								
Heart Rate (bpm)	504	± 11	485	± 25	475	± 16	456	± 22
Left Atria Dimension (mm)	2.7	± 0.1	2.7	± 0.1	2.7	± 0.1	2.9	± 0.4
Left Ventricle EDD	4.36	± 0.18	5.00	± 0.54	5.13	± 0.15 §	5.11	± 0.26
Left Ventricle EDD/BW (mm/g)	0.148	± 0.005	0.158	± 0.017	0.156	± 0.008	0.162	± 0.011
Fractional Shortening (%)	40	± 2	31	± 4	36	± 3	35	± 4
LV Weight/ BW (mg/g)	3.58	± 0.20	5.40	± 1.56	4.32	± 0.24 §	4.76	± 0.72
Vcfc (circ/s)	2.9	± 0.2	2.3	± 0.3	2.5	± 0.3	2.5	± 0.2
Sa (cm/s)	2.93	± 0.15	2.61	± 0.21	2.84	± 0.26	2.98	± 0.50
Spw (cm/s)	2.94	± 0.3	2.77	± 0.26	3.22	± 0.22	3.24	± 0.22
Isovolumic Relaxation Time (ms)	17	± 1	20	± 2	19	± 1	21	± 1
Ea (cm/s)	4.53	± 0.32	4.56	± 0.37	4.74	± 0.26	5.01	± 0.77
Epw (cm/s)	4.34	± 0.45	3.84	± 0.4	4.97	± 0.21	4.49	± 0.49
E/Ea	20.6	± 1.0	18.9	± 2.5	21.6	± 1.4	18.2	± 2.4
Aortic Regurgitation Frequency	0/8		2/8		2/7		3/5	

Values are mean $\pm$ sem. * Significant difference with wild-type (wt) animals of matching age.

§ Significant difference with adult animals of the same genotype. Compliance is a local estimation calculated from the Δ diameter/ Δ pressure between systolic and diastolic values.

LVEDD. left ventricle end diastolic diameter; Vcfc. mean shortening velocity of circumferential fibers corrected for time(=FS/rate-corrected ejection time); Sa. Spw: maximal systolic velocity of the mitral annulus and posterior wall respectively. Ea. Epw: maximal diastolic velocity of the mitral annulus and posterior wall respectively. E/Ea: maximal velocity of LV mitral inflow to Ea.

Table 2: Histomorphometric parameters of ascending aorta wall.

<i>Age</i>		<i>3 weeks</i>		<i>6 months</i>		<i>24 months</i>	
<i>Genotype</i>		<i>+/+</i>	<i>+/<i>mg</i>Δ</i>	<i>+/+</i>	<i>+/<i>mg</i>Δ</i>	<i>+/+</i>	<i>+/<i>mg</i>Δ</i>
Elastic lamellae (EL)		7,1 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,2*	7,7 $\pm$ 0,5	7,1 $\pm$ 0,4*	8,4 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,9 *
Distance between EL (μ m)		0.85 $\pm$ 0.34	0.70 $\pm$ 0.27	0.92 $\pm$ 0.24	1.18 $\pm$ 0.37*	0.96 $\pm$ 0.19	1.23 $\pm$ 0.6*
Rupture of EL ($\times 10^{-4}$)		2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2,8*	2 $\pm$ 1,4	6 $\pm$ 2*	3,2 $\pm$ 2,1	7.8 $\pm$ 3.6*

Values are mean $\pm$ SEM.

* Significant difference ($p < 0.05$) between Fbn-1 $+/+$ and Fbn-1 $+/*mg* $\Delta$$ mice of the same age.

Online supplemental table 1 : Hemodynamic and ultrasound parameter of pathological vs non pathological mice.

6-7 month-old Males				
	Fbn-1 +/+		Fbn-1 +/-mgΔ	
	non pathol	non pathol	pathol	
<u>Number of Animals</u>	8	6	2	
Body Weight (g)	29,5 ± 0,9	31,7 ± 1,0	32,1 ± 0,1	
Heart weight / BW (mg/g)	4,92 ± 0,13	4,78 ± 0,11	9,61 ± 2,31	
Systolic Pressure (mmHg)	105 ± 2	102 ± 3	114 (n=1)	
Mean Pressure (mmHg)	85 ± 1	82 ± 2	80 (n=1)	
Diastolic Pressure (mmHg)	75 ± 1	71 ± 2	63 (n=1)	
<u>Ultrasound study</u>				
<u>Ascending aorta:</u>				
Systolic Diameter (mm)	1,70 ± 0,05	1,92* ± 0,06	2,95* ± 0,09	
Diastolic Diameter (mm)	1,48 ± 0,04	1,75* ± 0,05	2,92 *± 0,00	
Surface (mm²)	2,28 ± 0,14	2,92* ± 0,17	6,84 *± 0,42	
Compliance (mm/mmHg)	0,72 ± 0,14	0,57 ± 0,12	0,23* (n=1)	

23-26 month-old Males				
	Fbn-1 +/+		Fbn-1 +/-mgΔ	
	non pathol	pathol	non pathol	pathol
<u>Number of Animals</u>	5	2	2	3
Body Weight (g)	33,9*± 1,7	31,4 ± 0,8	31,8 ± 1,4	31,5 ± 1,3
Heart weight / BW (mg/g)	5,47 ± 0,44	6,33 ± 0,38	4,88 ± 0,51	7,17*± 1,34
Systolic Pressure (mmHg)	111*± 1	107 ± 16	112 ± 5	97* ± 1
Mean Pressure (mmHg)	87 ± 2	78 ± 8	85 ± 7	68* ± 3
Diastolic Pressure (mmHg)	75 ± 3	64* ± 4	72 ± 8	53* ± 4
<u>Ultrasound study</u>				
<u>Ascending aorta:</u>				
Systolic Diameter (mm)	2,10*± 0,09	2,14*± 0,06	1,99 ± 0,22 ¹	2,53*± 0,15
Diastolic Diameter (mm)	1,95*± 0,11	2,02*± 0,12	1,82 ± 0,27	2,29*± 0,27
Surface (mm²)	3,50*± 0,31	3,60*± 0,20	3,13 ± 0,67 ²	5,04*± 0,60
Compliance (mm/mmHg)	0,43 ± 0,09	0,26 ± 0,07	0,43 ± 0,15	0,88*± (n=1)

¹ (p=0.07)

² (p=0.06)

* p ≤ 0.05 : test-t vs WT (6mo)

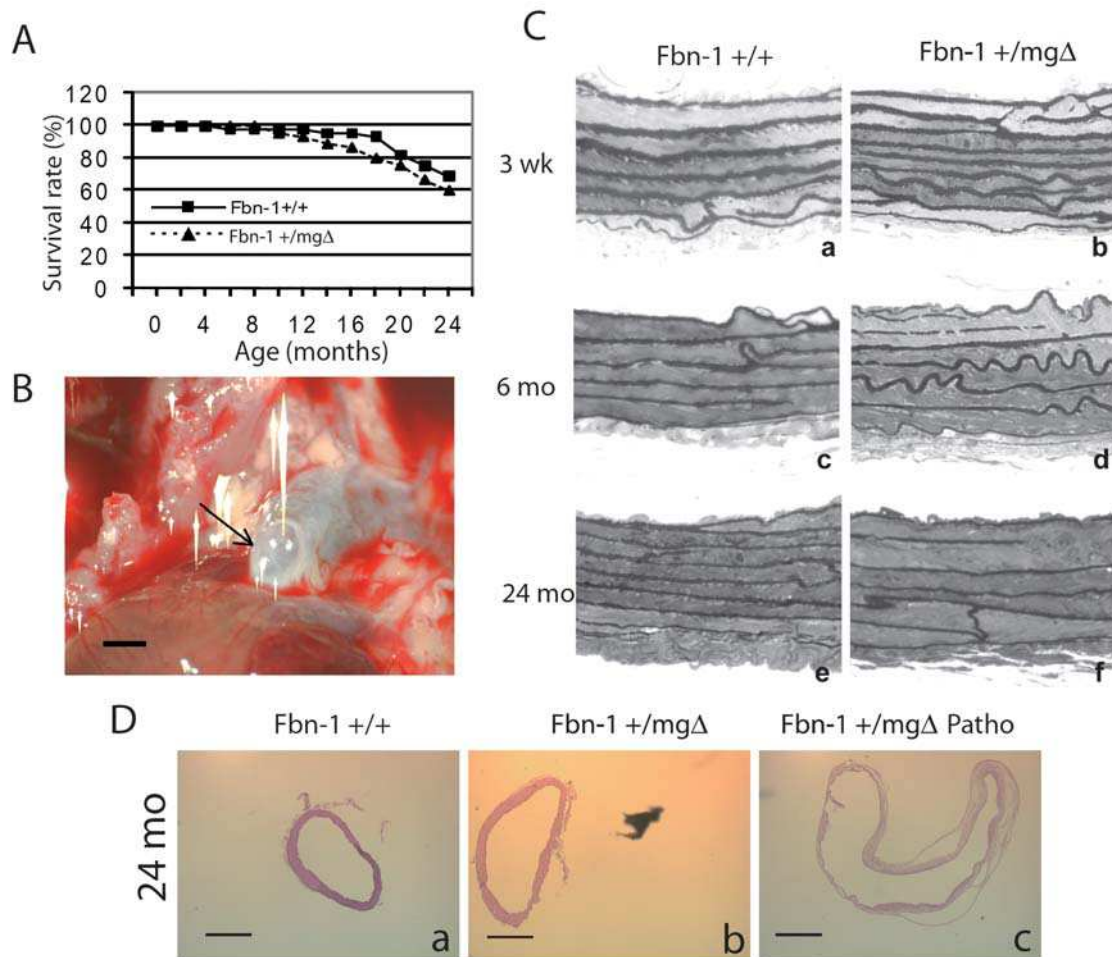


Figure 1 : Effect of aging and genotype on the survival rate (A), aneurismal ascending aorta of 24 month-old Fbn1^{+/-} mouse (B) (the arrow indicate the saccular aneurysm at the vessel root), and histological examination of semi-thin sections of ascending aorta of 3 weeks, 6 and 24 month-old mice (C). Eosin/Hematoxylin staining of cross-sections of ascending aorta of Fbn1^{+/+}, non-pathological Fbn1^{+/-}, and pathological Fbn1^{+/-} (Patho) 24 month-old mice (D). n = 45 for (A). Bar sizes: 1 mm (B) and 500 μ m (D).

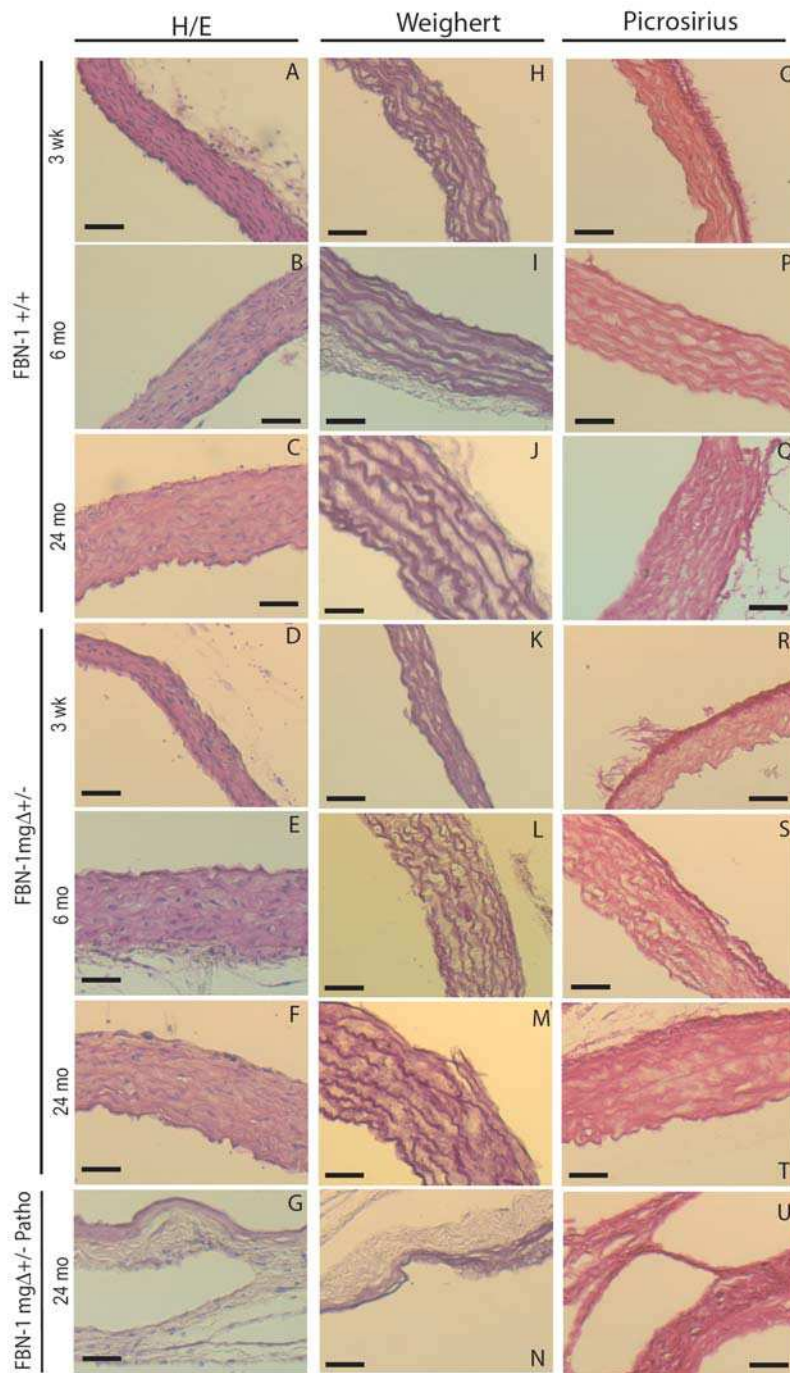


Figure 2: Histological examinations of paraffin-embedded cross-sections of the ascending aorta of 3 week-old, 6- and 24-month-old Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/-mgΔ mice, and 24-month-old pathological Fbn-1 +/-mgΔ mice (Patho). The elastic lamellae were thinner and disorganized in adult and aged Fbn-1 +/-mgΔ mice. H/E: Hematoxylin / Eosin staining. Bar size: 50 μm.

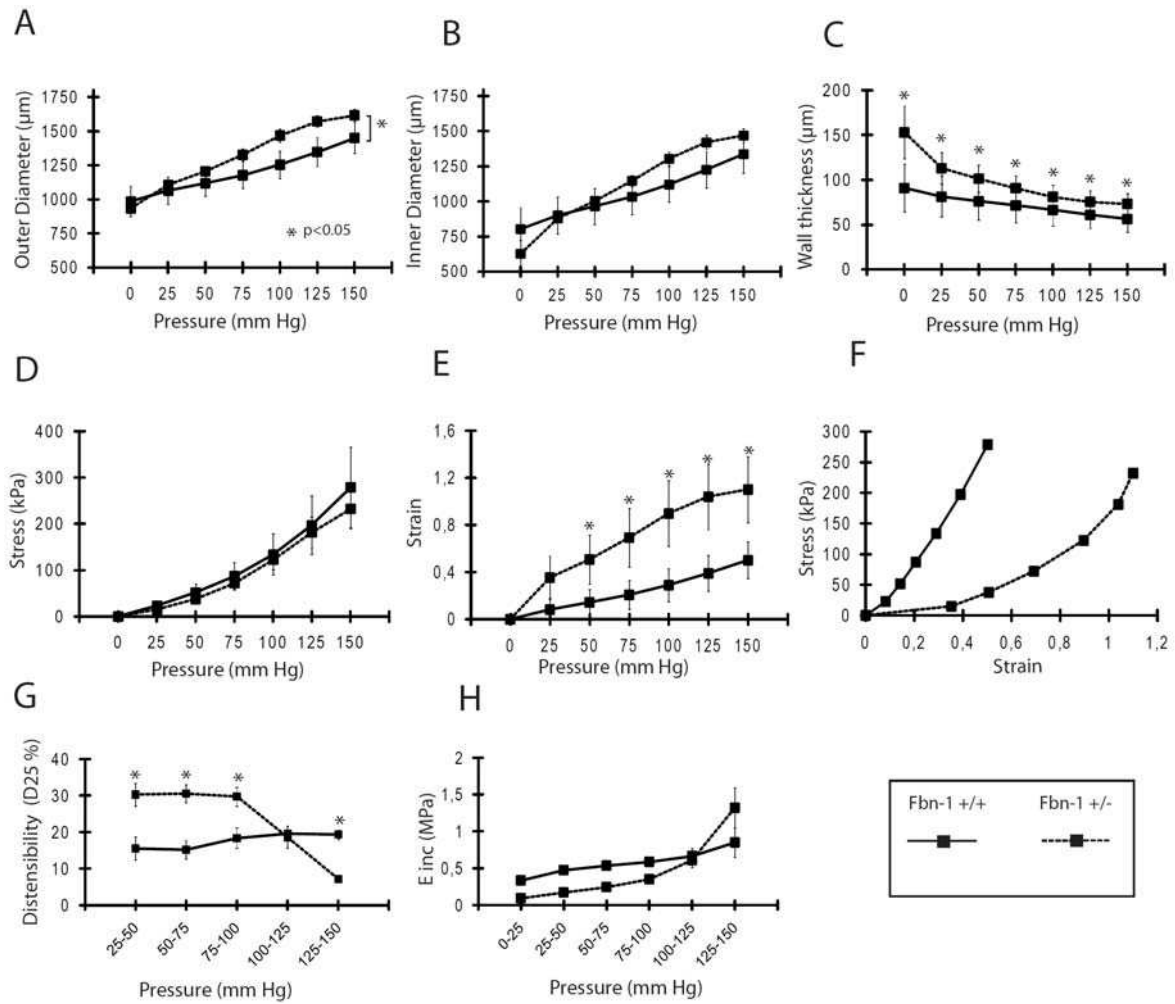


Figure 3: Diameter-pressure curves and derived mechanical parameters of the ascending aorta of 3-week-old Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/-mg Δ mice. *, Significant difference between Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/-mg Δ mice. In each group, n = 4-7.

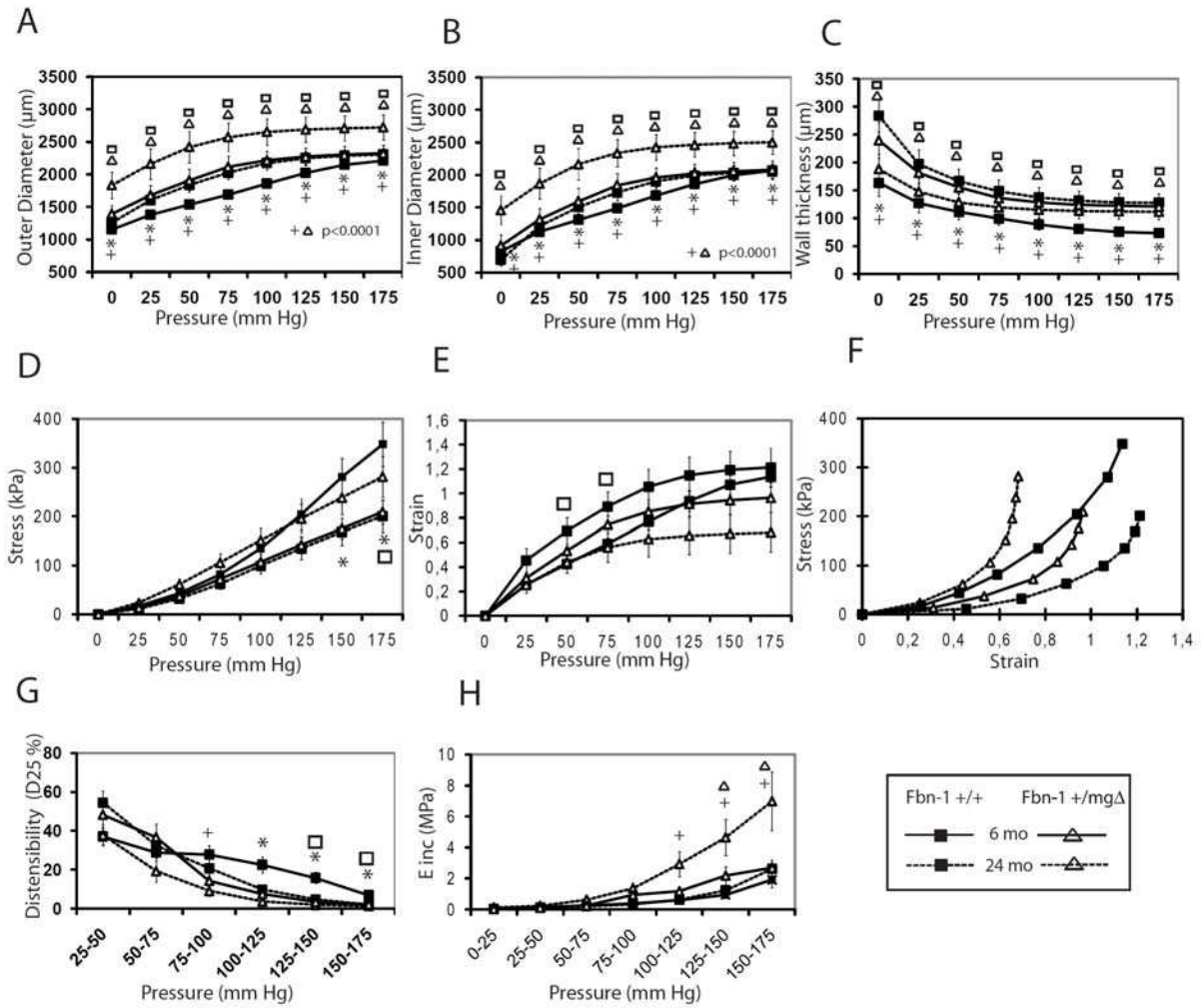


Figure 4: Diameter-pressure curves and derived mechanical parameters of the ascending aorta of 6 and 24-month-old Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mg Δ mice. *, + Significant difference between 6 -month-old Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mg Δ mice or between 24-month-old Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mg Δ mice, respectively. $\square$, Δ Significant difference between 6 -month-old and 24-month-old values for Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mg Δ respectively. In each group, n = 5-6.

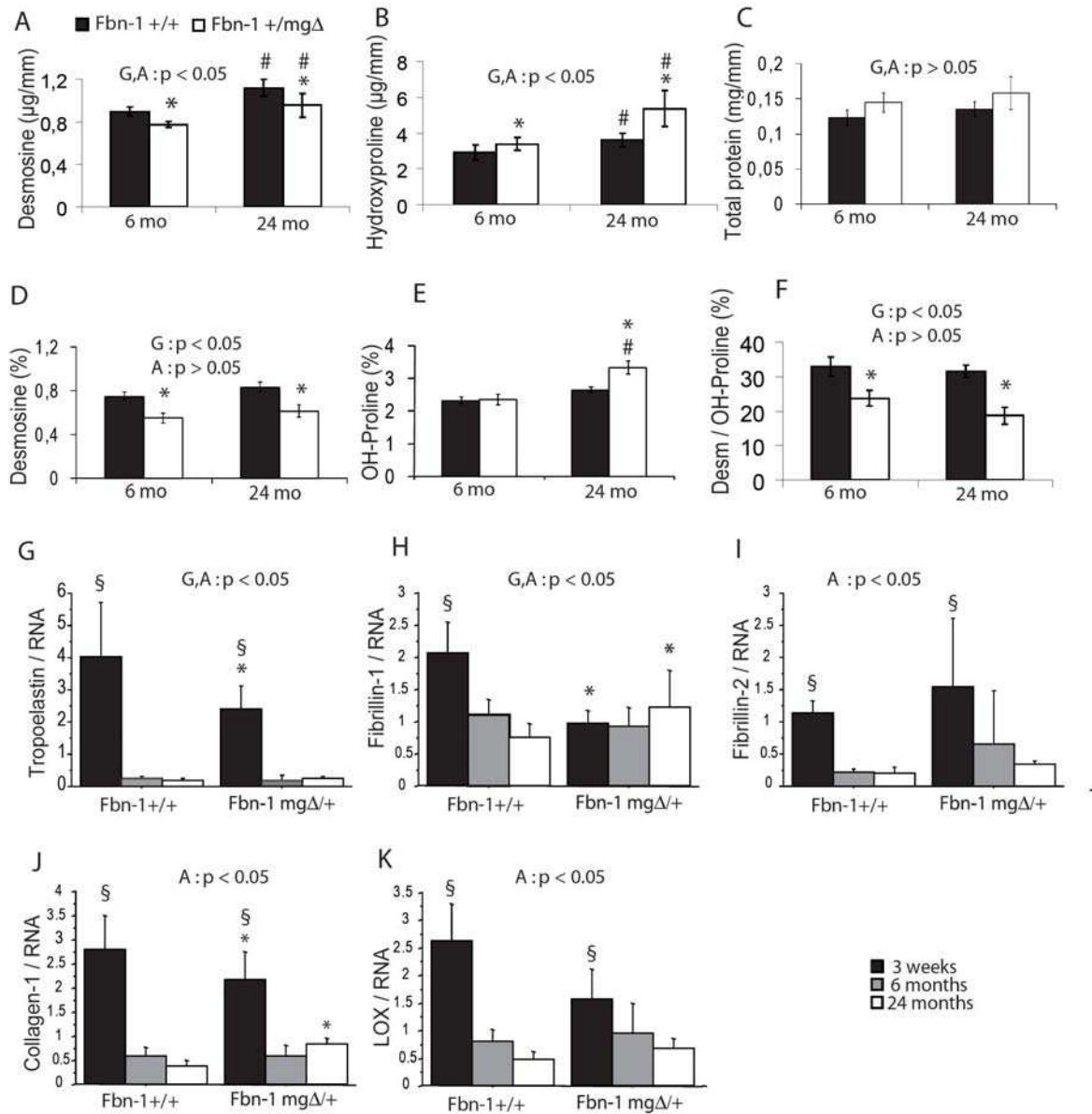
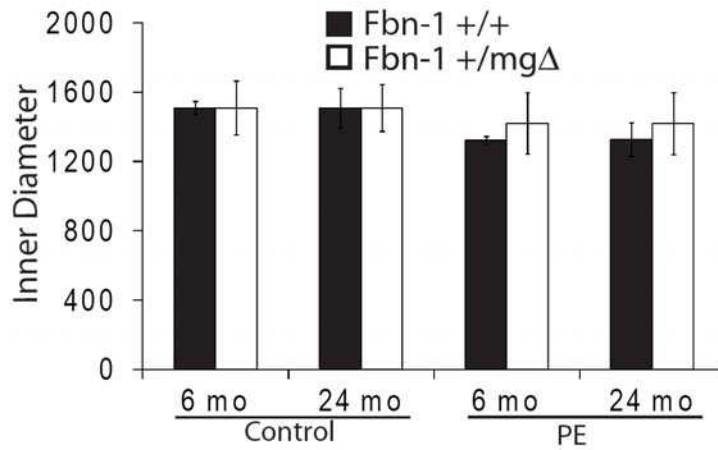
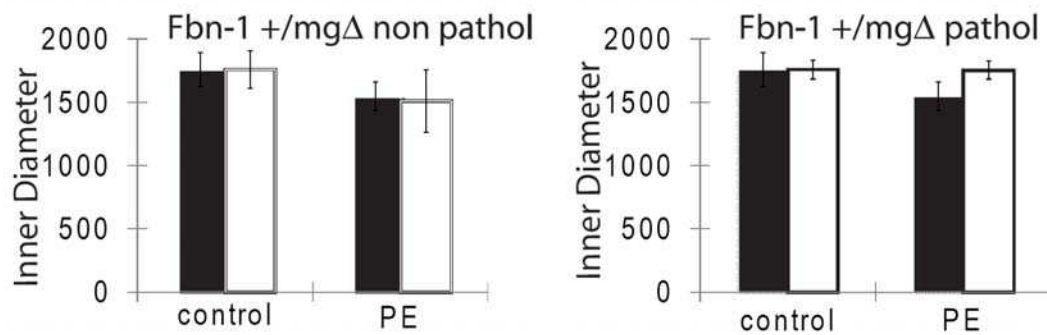


Figure 5: Desmosine and hydroxyproline contents (A-F) and elastic fiber-related gene expression of the ascending aorta of 3 weeks, 6 and 24-month-old Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mgΔ mice. Two-way ANOVA (A-E, G-K)) and Mann-Whitney non parametric test U (F): the general effect of genotype (G) and age (A) are indicated. *, Significant difference between Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mgΔ mice of the same age, and between 6- and 24 months-old age of the same genotype respectively. §, Significant difference between young (3 weeks) on one hand and 6- and 24 months-old animals of the same genotype on the other hand.

A



B



C

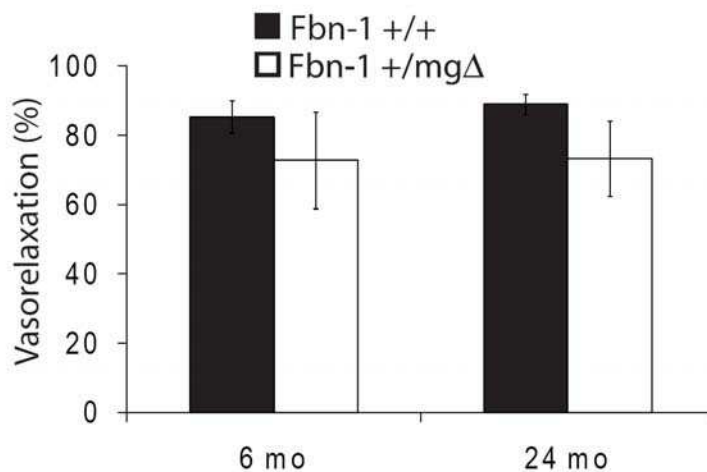
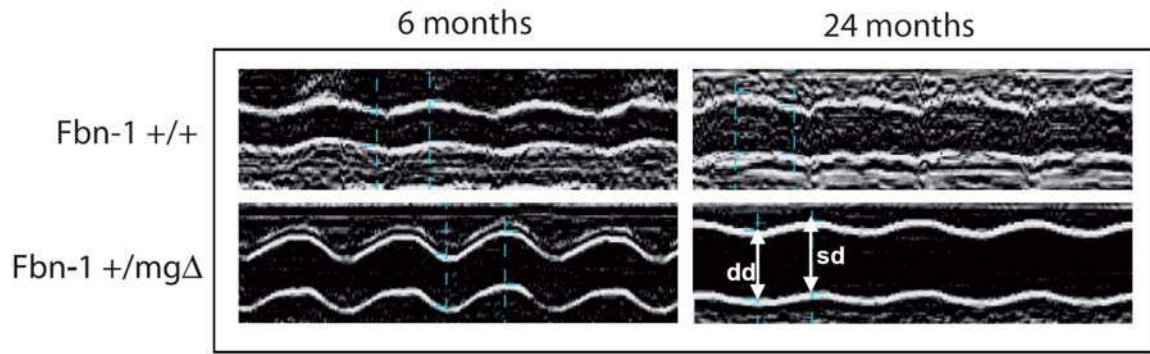
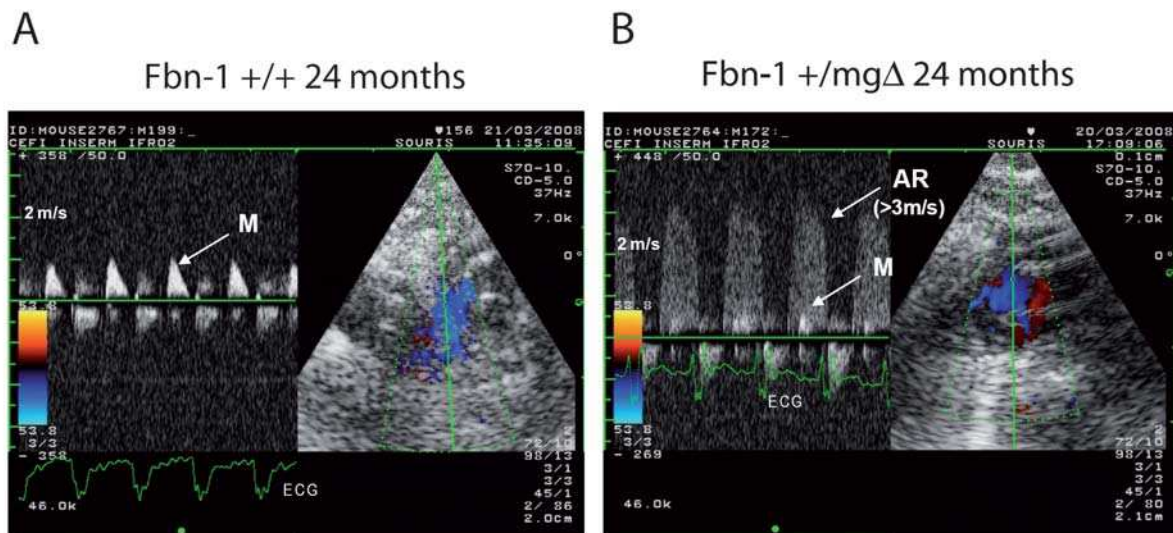


Figure 6: Reactivity to vasoactive agents of the ascending aorta of 6- and 24-month-old Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mgΔ mice. (A,B) 10 μmol/L phenylephrine (PE). 24 month-old Fbn-1 +/mgΔ mice were pooled (A) or separated (B) in non pathological and pathological group. Ach-induced vasorelaxation (10 μmol/L phenylephrine + 10 μmol/L acetylcholine) is represented as the reversal of the PE-induced vasoconstriction, in percent (C). # Significant difference for the same treatment between control and post treatment values at the same age and genotype. + Significant difference for the same treatment between Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mgΔ mice of matching ages. n = 5-6



Online supplemental figure 1: *In vivo* arterial diameter at the level of the ascending aorta. Measurements of systolic (sd) and diastolic (dd) diameters are gated on the ECG signal in time-motion mode.



Online supplemental figure 2: Continuous wave Doppler images from the apical two-chamber view. **A.** Normal mitral diastolic inflow (M) of a wild-type 24 month-old mouse. **B.** Detection of a simultaneous rapid (> 3m/s) diastolic retrograde flow from the aorta, indicative of aortic regurgitation (AR) in a 24 month-old Fbn-1 +/-mgΔ mouse. ECG, electrocardiogram.

II.2.3. Discussion de l'article 2

Les fibres élastiques jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire, la morphogénèse vasculaire et sont responsables de l'élasticité des tissus extensibles. L'élastine, le composant majeur des fibres élastiques régule la prolifération des cellules musculaires lisses et induit une signalisation dans les cellules endothéliales. Sa mutation chez la souris conduit, de manière précoce, à un remodelage de la paroi artérielle et une altération des paramètres biomécaniques des grosses artères similaires à ceux survenant au cours du vieillissement. Ces altérations précoces ont un effet sur le cours normal du vieillissement chez ces souris, en aggravant certains phénomènes comme la rigidité vasculaire et en faisant disparaître d'autres comme l'épaississement de la paroi artérielle.

La fibrilline-1, l'autre composant majeur des fibres élastiques, joue aussi un rôle de signalisation dans les cellules vasculaires. Sa mutation chez la souris conduit à l'apparition précoce d'anévrismes aortiques. Nous avons voulu savoir quel était l'effet de cette mutation à long terme sur le vieillissement du système cardiovasculaire.

Plusieurs modèles de souris portant une mutation dans le gène de la fibrilline-1 ont été créés et leur étude a conduit à la formulation de deux hypothèses pour le syndrome de Marfan. La première étant un effet dominant négatif (la protéine mutée empêche la formation des fibres élastiques) et la deuxième, l'haploinsuffisance. Dans notre étude nous avons utilisé les souris hétérozygotes portant une délétion hypomorphique des exons 19 à 24 de la fibrilline-1 (souris *Fbn-1* $+/\text{mg}\Delta$). Nous avons montré ici que ces souris présentent des caractéristiques du syndrome de Marfan (anévrismes et anomalies squelettiques) et que l'expression du gène de la fibrilline-1 est diminuée de moitié dans l'aorte des souris jeunes *Fbn-1* $+/\text{mg}\Delta$ comparées aux souris sauvages du même âge. Ceci confirme les résultats déjà obtenus avec ces souris (Pereira L et al 1997) et conforte l'hypothèse de l'haploinsuffisance dans la pathogénèse du syndrome de Marfan. Les souris *Fbn-1* $+/\text{mg}\Delta$ vivent jusqu'à un âge très avancé (24 mois), sans une différence notable de survie par rapport aux souris sauvages, ce qui permet de les étudier au cours du vieillissement. Cette longévité des souris pourrait s'expliquer par la légère baisse de la pression aortique surtout chez les souris âgées épargnant ainsi la présence de dissections malgré les remodelages de la paroi aortique. Une adaptation du système cardiovasculaire semble opérer ici comme chez les souris *Eln* $+/-$ qui augmentent leur pression aortique en réponse à la rigidification de la paroi aortique (Pezet M et al. 2008). Les souris *Fbn-1* $+/\text{mg}\Delta$ présentent des anomalies dans le fonctionnement du cœur qui sont corrélées

avec la présence d'insuffisance aortique. L'incidence de ces événements augmentent (dédoublément) avec l'âge les souris Fbn-1 +/-mgΔ. Les fragmentations des lames élastiques apparaissent assez tôt (dès 3 semaines) chez ces souris et évoluent avec l'âge atteignant des proportions telles que la structure de la paroi aortique s'en trouve presque totalement bouleversée, chez les souris plus âgées. Ces fragmentations pourraient être la conséquence d'une dégradation par les métalloprotéases (MMP) comme c'est le cas chez certains patients atteints du syndrome de Marfan, et des souris déficientes en fibrilline-1 (Carta L et al. 2006, Chung AW et al. 2007, Xiong W et al. 2008). On pourrait penser aussi à une fragilisation des fibres élastiques du fait de la présence d'une quantité insuffisante de fibrilline-1 et du manque d'une lame élastique (virtuellement). La fragmentation des lames élastiques a pour conséquence d'augmenter la rigidité vasculaire. La baisse de la distensibilité et l'augmentation de la rigidité de l'aorte ascendante chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ évoluent en parallèle avec la fragmentation des lames élastiques en fonction de l'âge. L'altération des paramètres biomécaniques traduit aussi une baisse de la quantité d'élastine chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ. Elle est accentuée par l'accumulation de collagène chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ âgées. Ceci pourrait être une réponse à l'augmentation du diamètre de l'aorte afin de supporter le stress hémodynamique exercé sur l'adventice, qui en découle, pour empêcher la rupture de la paroi aortique.

Un élément particulier de cette étude a été l'observation de la présence de deux groupes distincts chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ, en particulier âgées, classées selon la présence d'anévrisme ou non. La même différence de pénétrance a été observée chez les patients atteints du syndrome de Marfan. Les effets de la mutation du gène de la fibrilline-1 relatés ici sont plus marqués chez les souris présentant un anévrisme aortique (souris pathologiques). Notamment, la réactivité vasculaire est altérée surtout chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ âgées pathologiques. Des études *in vivo* avaient montré que les microfibrilles, ancrent les cellules musculaires lisses et endothéliales aux lames élastiques (Davis EC 1999). La perte de contact entre les cellules musculaires lisses et les lames élastiques suite à la mutation du gène de la fibrilline-1, couplée à la contrainte mécanique, pourrait expliquer la diminution ou l'absence de la réactivité vasculaire chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ. Dans certains cas, chez les patients atteints de Marfan, on note aussi une perte accrue de cellules musculaires lisses (Segura AM et al. 1998, Nataatmadja M et al. 2006). Cette possibilité aussi pourrait être considérée dans la non-réponse de l'aorte des souris Fbn-1 +/-mgΔ, surtout chez celles présentant un anévrisme sévère.

Nos résultats montrent que la fibrilline-1 joue un rôle essentiel sur le plan structural et fonctionnel dans la morphogénèse vasculaire. La quantité initiale de fibrilline-1 est critique pour le maintien de l'intégrité tissulaire tout au long de la vie. Si cette quantité venait à diminuer à cause d'une mutation ou même suite à la fragmentation des lames élastiques au cours du vieillissement et atteindre un seuil critique, cela pourrait avoir des conséquences sur la structure et le fonctionnement des organes exprimant la fibrilline-1 comme les vaisseaux sanguins via des causes purement mécaniques dues à la modification structurale du vaisseau ou à un défaut de signalisation de la fibrilline-1 ou des microfibrilles en général (voir partie signalisation par microfibrilles et PF14). Les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ présentent un phénotype opposé à celui des souris Eln $+/-$ en terme de pression aortique (hypotension contre hypertension), diamètre artériel (augmentation contre diminution), nombre de lames élastiques (diminution contre augmentation, respectivement). Dans l'avenir, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur la signalisation induite par la fibrilline-1 et par l'élastine, ainsi que la sensibilité spécifique aux différents stimuli mécaniques ou chimiques, dans les cellules vasculaires provenant des souris déficientes dans l'un ou l'autre de ces deux protéines, ceci afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux phénotypes observés à long terme chez ces souris.

II.2.4. Résultats complémentaires sur l'artère pulmonaire et l'aorte abdominale

En complément de ce qui a été présenté dans l'article précédent concernant l'aorte ascendante, nous avons réalisé les mêmes expériences sur l'aorte abdominale et l'artère pulmonaire gauche. Ces deux vaisseaux sanguins, bien que pas aussi touchés que l'aorte ascendante, peuvent aussi avoir une structure et une fonction modifiées par l'hétérozygotie du gène de la fibrilline-1, surtout au cours du vieillissement. L'aorte abdominale semble intéressante à analyser car ce vaisseau a une propension à développer naturellement des anévrismes surtout au cours du vieillissement. De plus, sa fonction est quelquefois affectée chez les patients atteints du syndrome de Marfan, et dans certains modèles de souris hétérozygotes pour le gène de la fibrilline-1. Chez les patients atteints du syndrome de Marfan, on note une diminution de la distensibilité et une augmentation de la rigidité de l'aorte abdominale (Santavy P et al. 2007, Wolfgarten B et al. 2001, Sonesson B et al. 1994). Sporadiquement, on note la présence d'anévrisme et/ou dissection au niveau de l'aorte abdominale (Van Ooijen B 1988, Lafferty K et al. 1987). Chez les souris Fbn-1(C1039G/+), on observe dans l'aorte abdominale une désorganisation et fragmentation des lames élastiques survenant de manière concomitante avec une augmentation de la rigidité vasculaire avec l'âge (Chung AW et al. 2008). En ce qui concerne l'artère pulmonaire, ce vaisseau est beaucoup moins altéré chez les patients atteints du syndrome de Marfan, et les données sont quasi inexistantes chez la souris modèles. On note toutefois, chez les patients atteints du syndrome de Marfan, un élargissement du tronc pulmonaire commun qui survient avec l'âge (Nollen GJ et al. 2002). Ainsi, il est apparu utile de comparer l'évolution de ces deux vaisseaux que sont l'aorte abdominale et l'artère pulmonaire gauche chez les souris Fbn-1 +/+ et Fbn-1 +/mgΔ, au cours du vieillissement.

II.2.4.1. L'artère pulmonaire

II.2.4.1.1. Histologie de la paroi de l'artère pulmonaire

Les analyses histologiques ont été effectuées sur l'artère pulmonaire de souris de 3 semaines, 6 mois et 24 mois. La structure de la paroi de l'artère pulmonaire ressemble à celle des grosses artères élastiques excepté le fait que moins de lames élastiques et de cellules sont présentes, la paroi de l'artère pulmonaire étant beaucoup plus fine (figure 30 A-L). On observe un arrangement correct des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) qui alternent avec les fibres élastiques (figure 30 A-F). Globalement, la structure de l'artère pulmonaire est la même chez les souris des deux génotypes.

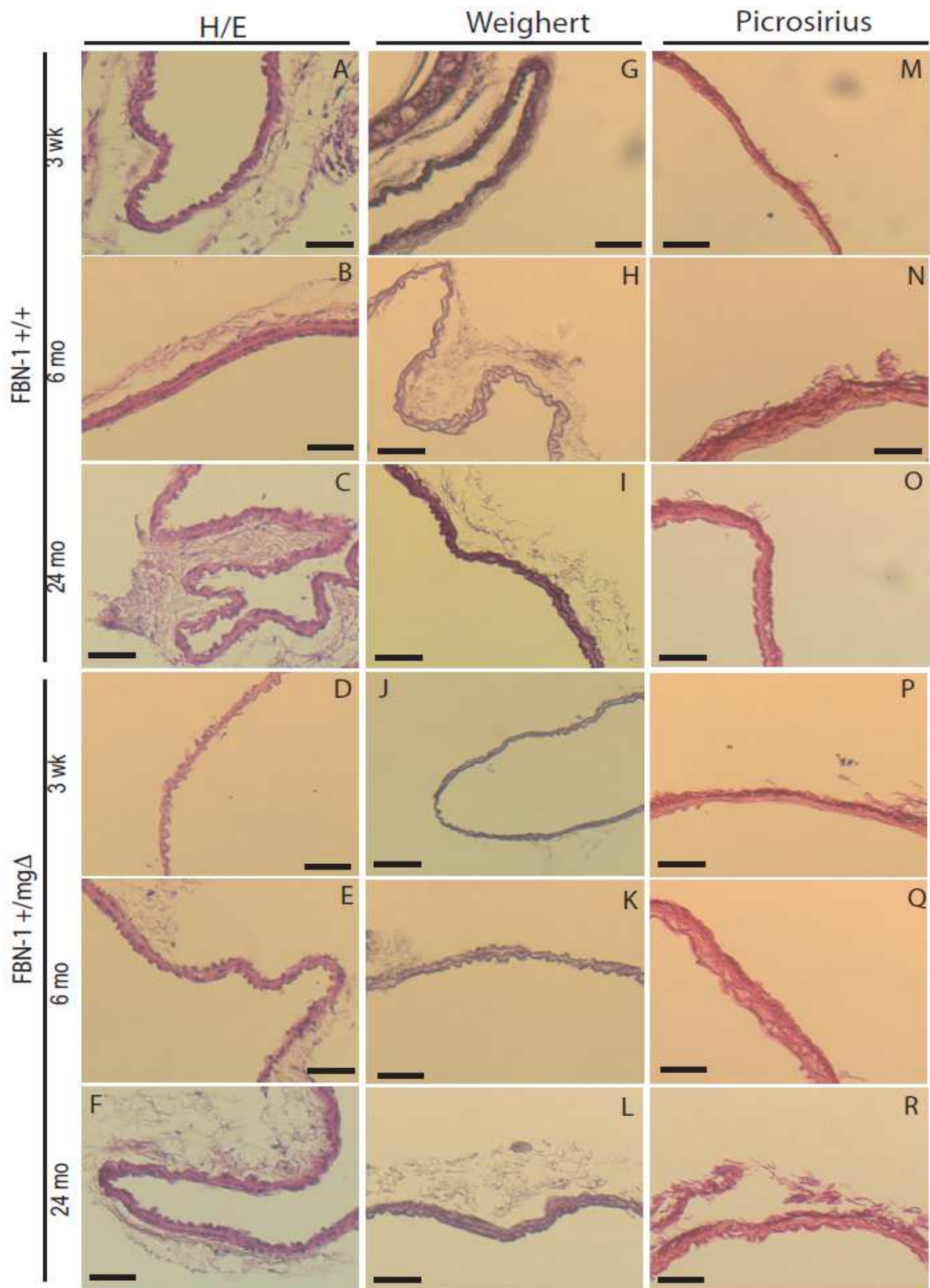


Figure 30 : Analyses histologiques des coupes transversales (5µm) de l'artère pulmonaire de souris Fbn-1 +/+ and Fbn-1 +/mgΔ jeunes (3 semaines), adultes (6 mois) et âgées (24 mois). H/E: marquage Hematoxyline / Eosine. Barre: 50 µm.

Au contraire de la situation dans l'aorte ascendante, les lames élastiques ne sont pas fragmentées dans l'artère pulmonaire des souris Fbn-1 +/-mgΔ (figures 2 L-M-aorte ascendante et 30 G-L-artère pulmonaire). Dans l'artère pulmonaire, le nombre de lames élastiques reste le même chez les souris Fbn-1 +/-+ et Fbn-1 +/-mgΔ à tous âges : 2,46 ±0,24 ; 2,74±0,50; 2,66±0,15 (souris Fbn-1 +/-+) et 2,84±0,25 ; 2,67±0,13 ; 2,85±0,43 (souris Fbn-1 +/-mgΔ), pour les animaux âgés respectivement de 3 semaines, 6 mois et 24 mois. Le marquage du collagène au rouge Picrosirius laisse apparaître des structures arrangées circonférentiellement et marquées intensément, en parallèle à la présence de zones intermédiaires présentant un marquage plus diffus. Concernant le marquage du collagène, on ne détecte ni différence liée au génotype, ni différence liée à l'âge (figure 30M-R).

II.2.4.1.2. Paramètres biomécaniques de l'artère pulmonaire gauche

Chez les souris plus jeunes (3 semaines) on ne note aucune différence entre les deux génotypes pour la plupart des paramètres biomécaniques de l'artère pulmonaire mesurés, à l'exception de l'épaisseur de la paroi artérielle qui est plus fine chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ et du stress qui est plus grand chez souris Fbn-1 +/-mgΔ que chez les souris sauvages (Fbn-1 +/-+) aux pressions physiologiques (figure 31).

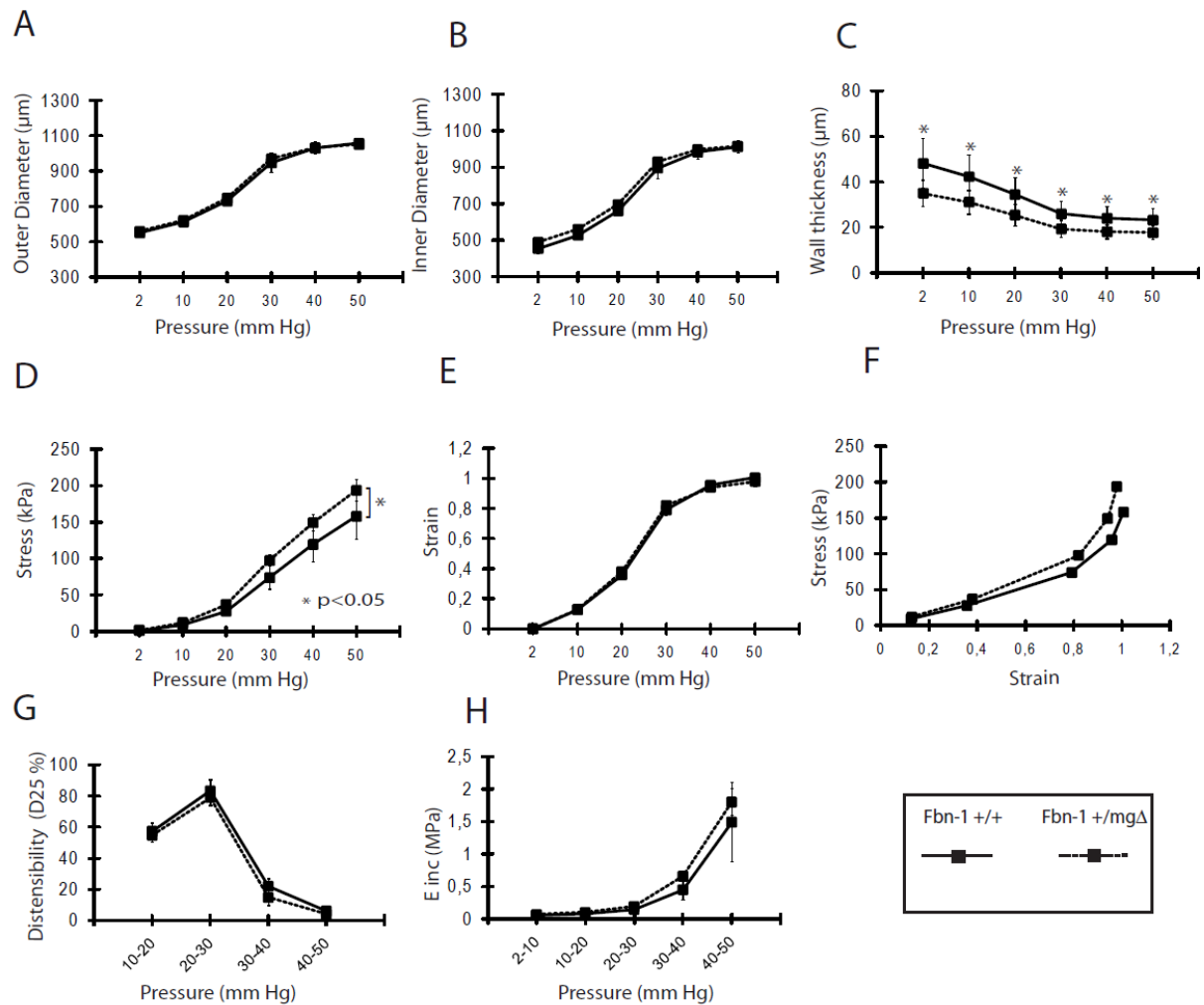


Figure 31 : Relation diamètre-pression et les paramètres biomécaniques dérivés, de l'artère pulmonaire de souris jeunes (3 semaines) Fbn-1 +/+ et Fbn-1 +/mgΔ. *, Différence significative entre les souris Fbn-1 +/+ et Fbn-1 +/mgΔ. Dans chaque groupe, n = 3-6.

Chez les souris adultes et âgées, les diamètres externes et internes de l'artère pulmonaire sont plus grands, à des pressions inférieures à 150 mmHg, chez les souris Fbn-1 +/mgΔ adultes et âgées comparées aux souris Fbn-1 +/+ du même âge (figure 32A, B). On observe une augmentation du diamètre de l'artère pulmonaire au cours du vieillissement chez les souris des deux génotypes (figure 32A, B). Chez les souris adultes, l'épaisseur de la paroi artérielle est identique chez les souris des deux génotypes. Cependant, au cours du vieillissement, l'épaisseur de la paroi de l'artère pulmonaire augmente chez les souris Fbn-1 +/mgΔ, et pas chez les Fbn-1 +/+, ce qui conduit à une épaisseur de paroi plus élevée Fbn-1 +/mgΔ âgées comparées aux souris Fbn-1 +/+ du même âge (Figure 32C). Le stress de la paroi artérielle est globalement moins élevé chez les souris âgées Fbn-1 +/mgΔ que chez les

souris Fbn-1 +/+ du même âge, alors qu'il est identique chez les souris adultes des deux génotypes (Figure 32D).

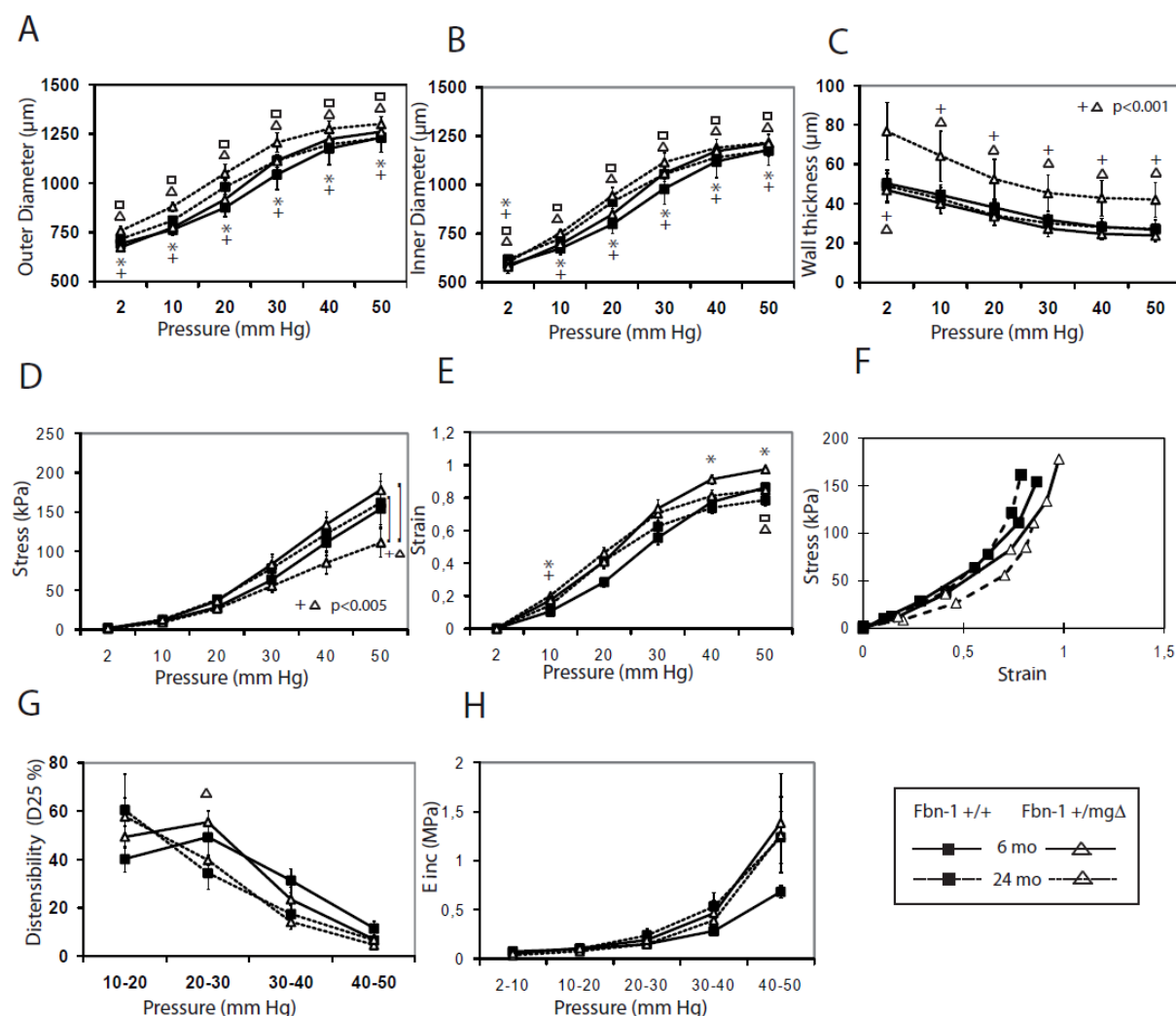


Figure 32 : Relation diamètre-pression et les paramètres biomécaniques dérivés, de l'artère pulmonaire de souris Fbn-1 +/+ et Fbn-1 +/mgΔ, adultes et âgées. *, + Différence significative entre respectivement, les souris Fbn-1 +/+ et Fbn-1 +/mgΔ adultes et âgées. □, Δ Différence significative entre respectivement, les souris Fbn-1 +/+ adultes et âgées et les souris Fbn-1 +/mgΔ adultes et âgées. Dans chaque groupe, n = 4-5.

Chez les souris Fbn-1 +/mgΔ, le stress diminue avec l'âge alors que l'âge n'a pas d'effet sur ce paramètre chez les souris sauvages (Figure 32D). L'étirement (strain) est plus élevé chez les souris adultes Fbn-1 +/mgΔ comparées aux souris sauvages à tout âge. Il n'y a pas d'effet de l'âge sur l'étirement chez les souris des deux génotypes (Figure 32E). La distensibilité reste identique entre les deux génotypes. Elle ne change pas avec l'âge sauf entre

les pressions 20 et 30 mmHg où elle diminue chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ âgées comparées aux souris adultes du même génotype. Enfin, il n'a pas été observé de différence significative du module incrémental élastique (rigidité vasculaire) entre les souris des deux génotypes à tout âge (figure 32H).

II.2.4.1.3. Dosage de desmosine et d'hydroxyproline

Les quantités de desmosine et d'hydroxyproline de l'artère pulmonaire ont été mesurées chez les souris adultes. On constate qu'il n'y pas de différence significative entre les quantités de desmosine et d'hydroxyproline d'une part, les valeurs du rapport desmosine sur hydroxyproline, chez les souris adultes des deux génotypes d'autre part (Tableau 3).

Tableau 3 : Quantité d'élastine et d'hydroxyproline par rapport à la quantité totale de protéines dans l'artère pulmonaire de souris adultes.

	Fbn-1 +/+	Fbn-1 +/-mgΔ
Desmosine (%)	0,27 ± 0,02	0,28 ± 0,03
Hydroxyproline (%)	2,69 ± 0,27	2,97 ± 0,15
Desmosine/HydroxyProline	10,14 ± 0,95	9,63 ± 1,17
Protéine totale (mg)	0,055 ± 0,005	0,053 ± 0,006

II.2.4.2. L'aorte abdominale

II.2.4.2.1. Paramètres biomécaniques de l'aorte abdominale

Chez les souris âgées de 3 semaines, on ne note pas de différence de diamètre entre les souris des deux génotypes à un âge donné, et les diamètres augmentent avec l'âge aussi bien chez les souris Fbn-1 +/+ que Fbn-1 +/-mgΔ (Figure 33A,B). La paroi de l'aorte abdominale est cependant plus fine chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ que chez les souris sauvages (Figure 33C). Enfin, excepté aux pressions les plus basses, la distensibilité est plus faible et la rigidité

(Einc) est plus grande chez les souris Fbn-1 +/mgΔ comparées aux souris Fbn-1 +/+ (Figure 33G,H).

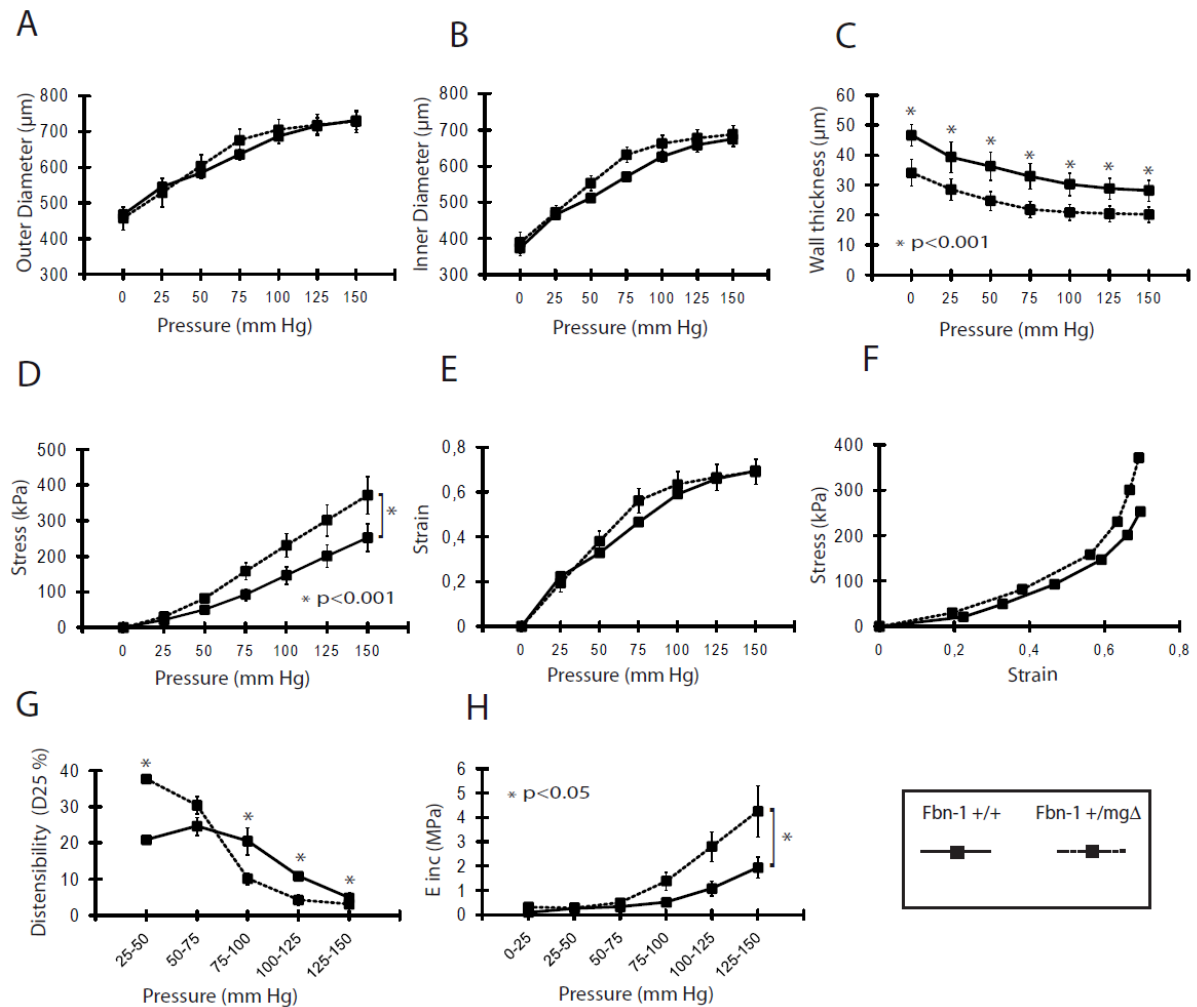


Figure 33 : Relation diamètre-pression et les paramètres biomécaniques dérivés, de l'aorte abdominale de souris jeunes (3 semaines) Fbn-1 +/+ et Fbn-1 +/mgΔ. *, Différence significative entre les souris Fbn-1 +/+ et Fbn-1 +/mgΔ. Dans chaque groupe, n = 4-5.

Chez les souris adultes et âgées, le diamètre de l'aorte abdominale est globalement plus élevé chez les Fbn-1 +/mgΔ comparées aux souris Fbn-1 +/+ à tout âge (Figure 34A,B). L'épaisseur de la paroi est plus grande chez les souris adultes mais plus petite chez les souris Fbn-1 +/mgΔ comparées aux souris Fbn-1 +/+ du même âge. Alors qu'on note un épaississement de la paroi de l'aorte abdominale, chez les souris Fbn-1 +/+, ce phénomène ne survient chez les souris Fbn-1 +/mgΔ (Figure 34C). La distensibilité est plus faible chez les souris Fbn-1 +/mgΔ à des pressions supérieures à 75 mmHg comparées aux souris Fbn-1 +/+ du même âge (figure 34G). Aussi, l'aorte abdominale est plus rigide (module élastique

incrémental plus élevé) chez souris Fbn-1 +/mgΔ comparées aux souris Fbn-1 +/+ du même âge, à des pressions très élevées 125 – 175 mmHg (figure 34H).

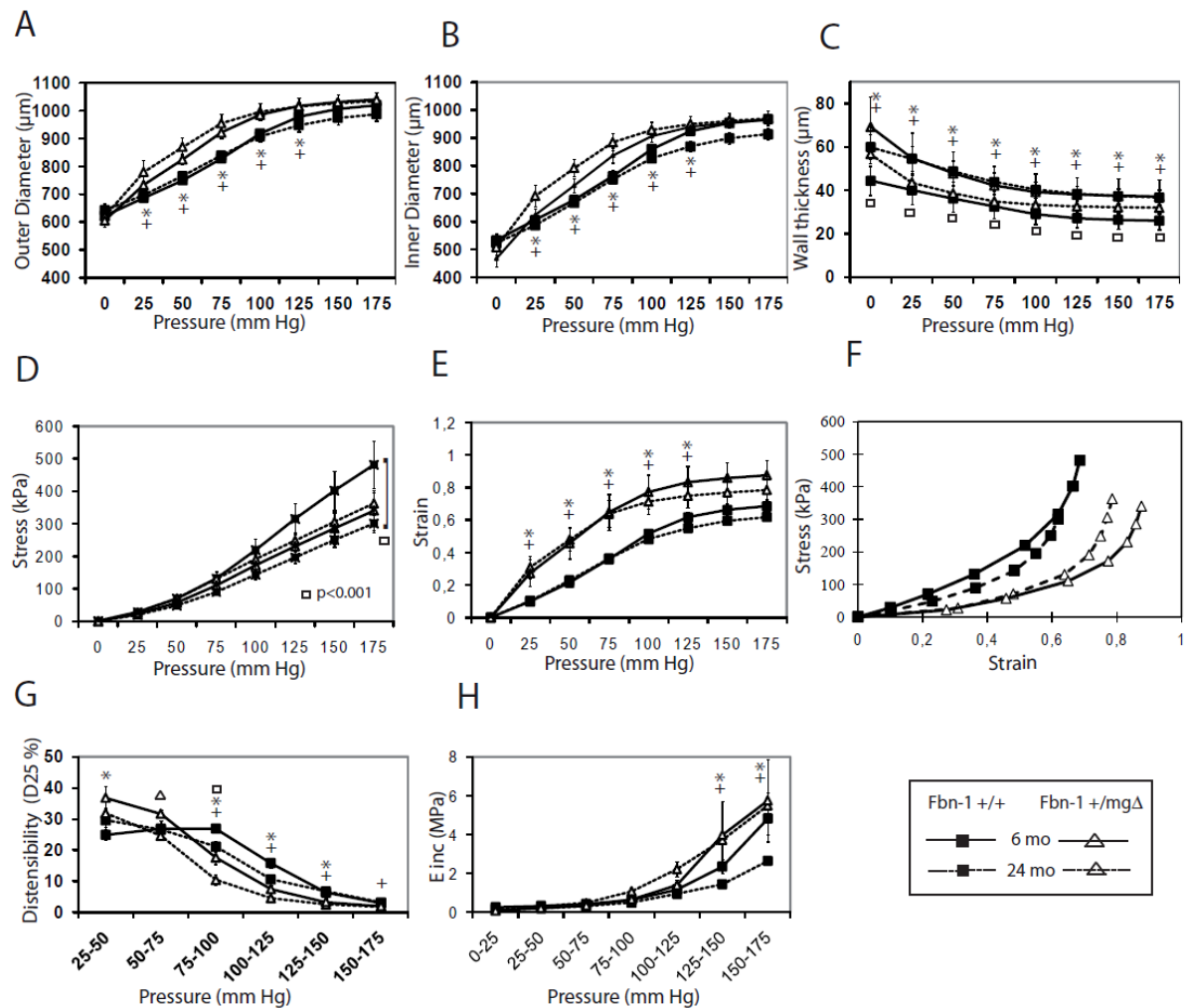


Figure 34 : Relation diamètre-pression et les paramètres biomécaniques dérivés, de l'aorte abdominale de souris Fbn-1 +/+ et Fbn-1 +/mgΔ, adultes et âgées. *, + Différence significative entre respectivement, les souris Fbn-1 +/+ et Fbn-1 +/mgΔ adultes et âgées. □, Δ Différence significative entre respectivement, les souris Fbn-1 +/+ adultes et âgées et les souris Fbn-1 +/mgΔ adultes et âgées. Dans chaque groupe, n = 4-5.

II.2.4.3. Discussion des résultats complémentaires sur l'artère pulmonaire et l'aorte abdominale

Bien que souvent relayées au second plan au profit de l'aorte ascendante, l'aorte abdominale et l'artère pulmonaire revêtent un réel intérêt. Les quelques rares études

effectuées sur l'artère pulmonaire de patient atteints du syndrome de Marfan montrent une augmentation du diamètre du tronc pulmonaire, corrélée à une augmentation du diamètre de l'aorte ascendante ($r = 0,76$), mais souvent sans affecter l'artère pulmonaire sauf dans certains cas (Nollen GJ et al 2002, Disler LJ et al 1998). Cependant, des études chez les patients en âge avancé sont manquantes à cause de la longévité limitée des patients atteints du syndrome de Marfan. L'artère pulmonaire contrairement aux aortes ascendante et abdominale subit moins de stress (lié à la pression exercée sur la paroi artérielle) après la naissance et semble moins affectée au cours du vieillissement. Sa dilatation chez les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ âgées semble être un élément précurseur de l'apparition d'une pathologie à l'instar de ce que l'on observe dans l'aorte ascendante de ces souris. Mais ce phénomène progresserait trop lentement et ne pourrait avoir lieu avant la mort de la souris. Nous avons montré que le rapport desmosine/hydroxyproline (indicateur de la rigidité vasculaire) est similaire chez les souris adultes des deux génotypes.

Dans l'aorte abdominale, l'augmentation du diamètre chez les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ est un phénomène qui apparaît dès l'âge adulte et ne semble pas évoluer au cours du vieillissement. L'altération de la fonction biomécanique (augmentation de la rigidité) de l'aorte abdominale chez les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ est compatible avec ce qui a été observé chez les patients atteints du syndrome de Marfan (Ichihashi K 2000, Vitarelli A et al. 2006). Dans d'autres modèles de souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ (Fbn-1(C1039G/+)), les lames élastiques de l'aorte abdominale sont dégradées avec une désorganisation structurale. Ceci est accompagné d'une augmentation de la rigidité qui augmente avec l'âge chez ces souris (Chung AW et al. 2008). La diminution de la distensibilité et l'augmentation de la rigidité sont des phénomènes qui apparaissent assez tôt (chez l'adolescent) chez les patients atteints du syndrome de Marfan et évoluent avec l'âge (Ichihashi K 2000). Elles précèdent et même prédisent une dilatation de l'aorte (Ichihashi K 2000).

Nos travaux montrent que des modifications fonctionnelles surviennent dans l'aorte abdominale et dans l'artère pulmonaire dès l'âge adulte. Ces modifications étaient méconnues ou négligées jusque là car les patients ne vivaient pas suffisamment longtemps pour voir leur apparition et évolution avec l'âge. Mais avec l'amélioration des techniques de chirurgie de l'aorte ascendante, et l'augmentation de l'expérience de vie des patients, il devient nécessaire de suivre cliniquement l'aorte abdominale et l'artère pulmonaire.

III. DISCUSSION

D'une manière générale, la matrice extracellulaire sert de soutien pour l'organisation tridimensionnelle des tissus et organes qui composent l'organisme. Elle est produite par une multitude de types cellulaires. Elle interagit avec les cellules environnantes en envoyant et en recevant des signaux via les récepteurs cellulaires.

Les fibres élastiques sont l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire. Elles sont présentes dans les organes extensibles comme la peau, les poumons, le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles sont particulièrement importantes dans le système cardiovasculaire qui subit des étirements cycliques tout au long de la vie. Les altérations des fibres élastiques ont des conséquences souvent graves sur la structure et le fonctionnement du système cardiovasculaire. Ces altérations peuvent être la conséquence de mutations génétiques ou de processus dégradatifs survenant au cours du vieillissement. De plus, ces modifications altèrent le dialogue entre les composantes des fibres élastiques et les cellules.

La mutation du gène de l'élastine (principal composant des fibres élastiques), responsable de la sténose aortique supra-valvulaire chez l'Homme, entraîne des anomalies sur le plan organisationnel et fonctionnel au niveau du système cardiovasculaire (Dridi SM et al. 2005, Ewart AK et al. 1994, Curran ME et al. 1993). Des expériences chez la souris ont confirmé ces observations (Li DY et al. 1998, Faury G et al. 2003, Pezet M et al. 2008). Ces anomalies qui apparaissent dès la naissance retentissent sur le cours normal du vieillissement vasculaire en l'accéléralant ou en changeant certaines de ses caractéristiques (Pezet M et al. 2008). L'étude de souris déficientes en élastine a laissé supposer que l'élastine induit une signalisation dans les cellules vasculaires, musculaire lisses en particulier (Li DY et al. 1998). Plus tard, ceci a été confirmé par des études in vitro qui ont montré que l'élastine régule la prolifération des cellules musculaires lisses via son récepteur couplé à une protéine G (Karnik SK et al. 2003). Les peptides d'élastine ont été également impliqués dans la signalisation des cellules endothéliales (Faury G et al. 1998 (a et b)). Ils induisent l'augmentation du niveau de calcium dans ces cellules via le récepteur de l'élastine-laminine.

L'autre composant majeur des fibres élastiques est représenté par les microfibrilles qui contribuent aussi à leurs propriétés élastiques, bien que l'élastine en soit le principal acteur (Lillie MA et al. 1998). La fibrilline-1 est le composant majeur des microfibrilles. Des mutations dans le gène de la fibrilline-1 sont responsables du syndrome de Marfan (Dietz HC et al. 1991). Plusieurs modèles de souris portant une mutation dans le gène de la fibrilline-1

ont été créés pour comprendre la pathogénèse du syndrome de Marfan. Cependant la fonction de la fibrilline-1 reste mal définie tant du point de vue des voies de signalisation, qu'au cours du vieillissement.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à comprendre la fonction des microfibrilles et en particulier de la fibrilline-1 dans la fonction vasculaire. Pour ce faire, nous avons étudié le rôle de la fibrilline-1 dans les cellules endothéliales humaines d'une part et dans le système cardiovasculaire chez les souris de différents âges (jeunes, adultes et âgées), portant une mutation hypomorphique hétérozygote (mutation *mgΔ*) du gène de la fibrilline-1.

III.1. La fibrilline-1 est un signal déterminant dans la morphogenèse artérielle.

La formation de vaisseaux sanguins est un processus qui débute très tôt dès la mise en place des organes. Pendant cette phase, les phénomènes de signalisation entre la matrice extracellulaire et les cellules vasculaires sont très importants. Cette signalisation permet la prolifération, la migration et même la différenciation des cellules vasculaires et leur permet de réguler la disposition des éléments dans la paroi artérielle (Patan S et al. 2000, Hultgardh- Nilsson A et Durbeej M 2007). La morphogenèse vasculaire continue après la naissance par des phénomènes de maturation (modifications du calibre et de l'épaisseur de la paroi) spécifiques selon le lit vasculaire et en lien avec les modifications hémodynamiques liées au passage de la vie intra- à la vie extra-utérine, afin de garantir des propriétés biomécaniques optimales.

Chez la souris, la synthèse de la fibrilline-1 débute à partir de la deuxième moitié du développement embryonnaire et atteint son niveau maximal à la naissance. Puis l'expression décroît régulièrement jusqu'à atteindre son niveau le plus bas à partir de 6 mois (Kelleher CM et al. 2004). Dans les vaisseaux de souris en développement, il a été montré des interactions physiques entre les cellules endothéliales et les microfibrilles, dont certaines traversent la membrane basale sur laquelle sont fixées les cellules endothéliales (Davis EC et al. 1994). Des expériences *in vivo* ont montré que les microfibrilles, via la fibrilline-1, ancrent les cellules endothéliales et musculaires lisses à la matrice sous-jacente dans l'aorte de souris en développement (Davis EC et al. 1998 et 1999). Ceci a été corroboré par le fait qu'on observe un décollement endothélial chez les souris totalement déficientes en fibrilline-1 (*Fbn-1* *-/-*) (Carta L et al. 2006). D'autres études réalisées avec des fragments de fibrilline-1

recombinantes ont montré que la fibrilline-1 permet l'adhésion de plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires (Sakamoto H et al. 1996, Pfaff M et al 1996, Bax DV et al. 2003 et 2007, Porst M et al. 2006, Williamson R et al. 2008). Toutes ces données laissent supposer que la fibrilline-1 puisse induire une signalisation dans les cellules vasculaires.

Nous avons montré que les microfibrilles aortiques, tout comme les peptides d'élastine, induisent une signalisation dans les cellules endothéliales en augmentant le niveau de calcium libre intracellulaire. Cette signalisation se ferait au moins, en partie, par la fibrilline-1 d'autant que celle-ci permet l'adhésion de cellules endothéliales tout comme la MAGP2, les fibuline-1 et -5 entre autres (Gibson MA et al. 1999, Preis M et al 2006, Williamson MR et al. 2008). En effet, les fragments de fibrilline-1 contenant le motif RGD sont capables d'induire une signalisation dans les cellules endothéliales. Cette signalisation est transduite dans les cellules endothéliales par les intégrines $\alpha V \beta 5$ et $\alpha 5 \beta 1$.

Les intégrines sont des hétérodimères (α/β) transmembranaires se liant à beaucoup de composants de la matrice extracellulaire. Chez les vertébrés, il existe 18 gènes exprimant la chaîne α et 8 gènes, la chaîne β et au moins 24 combinaisons α - β (intégrines) ont été identifiées au niveau protéique (Humphries JD et al. 2006). Les intégrines n'ont pas d'activité kinase proprement dite comme les récepteurs de facteurs de croissance (Legate KR et al. 2009a). Elles recrutent sur leur domaine intracellulaire des molécules présentant une activité kinase et qui vont permettre la transduction du signal qui aboutit à des événements comme la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire (Legate et al. 2009b).

L'interaction de la fibrilline-1 avec les intégrines suppose la participation de ces dernières dans l'assemblage des microfibrilles. En effet des expériences récentes ont montré que les intégrines $\alpha V \beta 3$ régulent l'assemblage de la fibrilline-1 dans les microfibrilles (Tsuruga E et al. 2009). En plus des intégrines, d'autres éléments rentrent en jeu dans l'interaction des intégrines avec la fibrilline-1. Nous avons montré que malgré la présence du motif RGD, le fragment PF9 de la fibrilline-1 ne permettait pas d'induire une augmentation du niveau de calcium comme le fait PF14. La partie N-terminale de PF14 qui manque dans PF9, contient un domaine de fixation de l'héparine. Des expériences réalisées avec d'autres fragments de fibrilline-1 ont montré qu'en enlevant ce domaine de liaison à l'héparine, l'adhésion et la migration des cellules sont très fortement diminuées (Bax DV et al 2007). Par ailleurs, d'autres expériences montrent clairement que le site de fixation de l'héparine sur la

fibrilline-1 intervient dans l'assemblage des microfibrilles (Tiedemann K et al. 2001, Ritty TM et al. 2003).

L'implication des intégrines $\alpha V \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 1$ dans la signalisation induite par la fibrilline-1 dans les cellules endothéliales laisse penser que cette protéine matricielle joue un rôle important dans la formation des vaisseaux normaux et/ou dans la croissance de vaisseaux préexistants (angiogénèse). En effet, une grande majorité des intégrines (plus de 16 sur 24), dont les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha V \beta 3$, jouent un rôle important dans la morphogénèse vasculaire (Drake CJ et al 1998). La sous-unité $\beta 1$ des intégrines est indispensable à la formation des vaisseaux sanguins car son inactivation entraîne une mort prévasculogénique (6^{ème} jour) des embryons (Brooks PC et al. 1994b). La déficience en la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines aboutit, chez l'embryon, à la formation de vaisseaux sanguins anormaux, dilatés et anormalement perméables (leaky). Plusieurs études menées par l'équipe de David Cheresh sur l'angiogénèse ont montré que l'intégrine $\alpha V \beta 3$ joue un rôle important dans ce phénomène en promouvant l'interaction entre la matrice extracellulaire et les cellules endothéliales et que l'interruption de cette interaction constitue un frein à l'angiogénèse (Brooks PC et al 1994 a et b). Le rôle de l'intégrine $\alpha V \beta 3$ a été aussi établi dans la vasculogénèse par des études d'injection d'anticorps bloquants (LM609) chez les embryons d'oiseaux (Drake CJ et al 1998). Ces anticorps empêchent la formation du réseau primaire de vaisseaux.

Nous avons montré que la fibrilline-1 active la voie de signalisation FAK/src (résultat non montré) qui est impliquée dans la prolifération et la migration cellulaire (Oliveira-Ferrer L et al. 2008). Cette signalisation par la fibrilline-1 et les microfibrilles aboutit à l'augmentation du niveau de calcium cytoplasmique et nucléaire dans les cellules endothéliales. Le calcium est un élément clé de la signalisation qui se trouve au carrefour de plusieurs phénomènes comme la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire et l'expression génique (Berridge MJ et al. 2000).

Cette hypothèse du rôle déterminant de la fibrilline-1 dans la morphogénèse vasculaire est étayée par le fait que le fragment PF14 de la fibrilline-1 induit aussi la prolifération et la migration des cellules endothéliales, deux phénomènes cruciaux dans les phases initiales de l'angiogénèse (Garmy-Susini B et Varner JA. 2008).

Dans les cellules musculaires lisses, la fibrilline-1 induirait également une signalisation. En effet, les cellules musculaires lisses vasculaires issues de souris déficientes

en fibrilline-1 présentent un phénotype synthétique et secrètent des métalloprotéases (Bunton TE et al. 2001). La déficience en fibrilline-1 empêche la maturation de la paroi aortique, en inhibant la différenciation des cellules musculaires lisses, phénomène observé dans la paroi aortique des souris *Fbn-1*^{-/-} (Carta L et al. 2006). Cependant, il n'y a pas d'étude *in vitro* décrivant la voie de signalisation induite par la fibrilline-1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Une telle étude pourrait permettre de mieux comprendre la contribution de la fibrilline-1 dans la formation des vaisseaux sanguins, et d'élucider les phénomènes sous-jacents à la pathologie anévrismale qui survient dans le syndrome de Marfan ou chez les souris déficientes en fibrilline-1.

La fibrilline-1 est également indispensable à l'homéostasie tissulaire (Pereira L et al. 1997). La déficience en fibrilline-1 empêche la formation de fibres élastiques normales. Elle fragilise les fibres élastiques qui deviennent plus fines, discontinues et plus susceptibles à des fractures et ce, dès la période postnatale (Carta L et al. 2006). Cependant il n'a pas été déterminé si cette fragilisation des fibres élastiques dans l'aorte fait suite à une action plus précoce des métalloprotéases même s'il est connu que celles-ci interviennent tardivement dans le processus dégradatif des lames élastiques chez les souris déficientes en fibrilline-1 et les patients atteints du syndrome de Marfan (Dingemans KP et al. 2006, Chung AW et al. 2007). Nos résultats font pencher la réponse vers une altération du développement et/ou de la maturation de la paroi aortique et des fibres élastiques plutôt que vers un processus secondaire de l'action des métalloprotéases. En effet, nous avons montré que l'expression de la fibrilline-1 et de l'élastine, deux composants majeurs et critiques des fibres élastiques, est diminuée chez les souris *Fbn-1*^{+/-} *mgΔ*. De plus, la déficience en fibrilline-1 entraîne une diminution du nombre de lames élastiques dans la média de l'aorte des souris *Fbn-1*^{+/-} *mgΔ* comparées aux souris sauvages à tout âge. Le nombre de lames élastiques dans la paroi artérielle est très finement contrôlé. Il varie en fonction du stress subi par la paroi artérielle de sorte que plus on s'éloigne du cœur dans l'arbre vasculaire, plus le nombre de lames élastiques décroît (Sokolis DP et al. 2002). La conséquence de l'inadéquation entre le stress exercé sur la paroi de l'aorte ascendante et le nombre de lames élastiques que celle-ci contient est l'augmentation du diamètre aortique que l'on observe chez les souris déficientes en fibrilline-1. Les microfibrilles, dont le composant majeur est la fibrilline-1, sont présentes dans la média mais aussi dans l'adventice où elle forment avec le collagène un maillage qui contrôle la dilatation maximale de l'aorte. Pour conclure à l'une de ces deux hypothèses, il faudrait entreprendre dans le futur une étude ultrastructurale et biochimique des fibres élastiques, ainsi qu'une

évaluation du profil d'expression et d'activité des métalloprotéases dans l'aorte de souris déficientes en fibrilline-1 pendant les premiers jours de la vie postnatale.

III.2. Effet-dose de la quantité de fibrilline-1 synthétisée sur la morphogenèse artérielle.

La synthèse de la fibrilline-1 débute dans la seconde moitié du développement embryonnaire et atteint son niveau maximal à la naissance. Puis l'expression décroît régulièrement jusqu'à atteindre son niveau le plus bas à l'âge adulte (Kelleher CM et al. 2004).

La diminution de l'expression de la quantité de fibrilline-1 chez les souris Fbn-1 +/- mg Δ pendant les étapes initiales de la vie prénatale et de la vie postnatale démontrée par nos travaux, s'accompagne de l'absence d'une lame élastique dans l'aorte ascendante et d'une altération de la morphologie des lames élastiques qui paraissent plus fines et plus fragmentées. Dans d'autres modèles de souris chez qui la quantité de fibrilline-1 est diminuée (souris Fbn-1 mgR/mgR et Fbn-1 -/-), on retrouve toujours la même altération des lames élastiques à différents degrés selon la quantité de fibrilline-1 synthétisée. La maturation de la paroi aortique est aussi fortement altérée chez les souris totalement dépourvues de fibrilline-1 (Fbn-1 null = Fbn-1 -/-). Dans les cellules musculaires lisses de l'aorte de ces souris, on note en effet la persistance de l'expression d'un marqueur embryonnaire (SMemb) de ces cellules après la naissance (Carta L et al. 2006). L'hypothèse de l'influence de la quantité de fibrilline-1 sur la morphogénèse vasculaire est étayée par le fait que plus la quantité de fibrilline-1 exprimée est faible, plus l'altération de la paroi aortique est accentuée et précoce. Ceci est constaté en comparant les souris exprimant différentes quantités de fibrilline-1 (souris Fbn-1 -/-, Fbn-1 mg Δ /mg Δ , et Fbn-1 mgR/mgR). L'effet de la quantité de fibrilline-1 est aussi constaté sur la survie des souris : les souris qui expriment au moins la moitié de la quantité de fibrilline-1 (souris hétérozygotes) vivent jusqu'à un âge avancé alors que celles exprimant très peu ou pas du tout de fibrilline-1 (souris Fbn-1 mg Δ /mg Δ , Fbn-1 -/-) meurent très tôt (dans les deux semaines après la naissance). Ceci est encore confirmé par le fait que l'introduction du gène de la fibrilline-1 humaine, et son expression, chez la souris exprimant une quantité faible de fibrilline-1 (souris Fbn-1 C1039G/+) restaure une structure normale de la paroi aortique (Judge DP et al. 2004).

Chez les souris Fbn-1 +/mgΔ, on note aussi une tendance à la hausse de l'expression de la fibrilline-2. La fibrilline-2 semble en partie compenser fonctionnellement le manque de fibrilline-1 en initiant la formation des fibres élastiques et permettant ainsi aux souris déficientes en fibrilline-1 de dépasser l'étape embryonnaire jusqu'à atteindre quelques jours de vie postnatale (une à deux semaines) (Carta L et al. 2006). Mais elle faillit dans ce rôle pendant la vie postnatale à une période où le stress exercé sur la paroi des vaisseaux (en particulier l'aorte) augmente. En effet, les souris déficientes à la fois en fibrilline-1 et en fibrilline-2 meurent virtuellement toutes in utero, alors que celles déficientes en fibrilline-1 meurent dans les deux semaines après la naissance (Carta L et al. 2006).

Comme la fibrilline-1, la quantité d'élastine aussi est déterminante dans la morphogénèse artérielle. La déficience en élastine conduit à une altération de la paroi vasculaire (aortique) avec une augmentation du nombre d'unités lamellaires aboutissant à l'occlusion de la lumière de l'aorte ascendante et la mort des souris dans les deux –trois jours après la naissance (Li DY et al. 1998). Alors que lorsqu'un seul allèle de l'élastine est exprimé, la paroi aortique est certes épaissie mais il n'y a pas d'occlusion de la lumière aortique et les souris vivent jusqu'à un âge avancé, les conséquences sont donc moindre qu'en cas d'absence totale d'expression du gène de l'élastine (Faury et al 2003, Pezet M et al. 2008). L'importance de la quantité d'élastine dans la morphogénèse vasculaire est illustrée par les conséquences différentes chez les souris Eln +/+, Eln +/- et Eln -/- (le degré d'occlusion de la lumière de l'aorte est inversement corrélé à la quantité d'élastine exprimée) et par l'étude montrant une restauration du phénotype normal du système cardiovasculaire lorsque l'élastine humaine est exprimée chez les souris déficientes en élastine (eln -/-) (Li DY et al. 1998 a et b, Pezet M et al. 2008, Hirano E et al. 2007). Les conséquences opposées des déficiences en élastine et en fibrilline-1 (sténose contre anévrisme) soulèvent la question de savoir si ces deux composants majeurs des fibres élastiques n'ont pas des rôles opposés dans la morphogénèse vasculaire.

III.3. La déficience en fibrilline-1 altère le cours normal du vieillissement vasculaire et conduit à un vieillissement artériel pathologique

Le vieillissement vasculaire touche particulièrement les grosses artères élastiques et s'accompagne d'un certain nombre d'évènements. Parmi ces évènements, on compte la fragmentation des fibres élastiques, la dilatation, la baisse de la distensibilité, l'épaississement

et l'accumulation de la matrice extracellulaire (en particulier les collagènes) dans la paroi de la des artères (Camilleri, J. P. 1992, Greenwald SE 2007).

Les fibres élastiques sont assemblées au cours du développement selon un processus hautement régulé dans le temps et dans l'espace tant au niveau de l'expression génique que dans l'agencement des protéines (Wagenseil JE et Mecham RP 2007). Les composantes sont ajoutées selon un ordre précis. Les composantes des fibres élastiques sont synthétisées pendant le développement embryonnaire et aux alentours du début de la vie postnatale. Plus tard dans la vie, l'expression des gènes et la synthèse des protéines composant les fibres élastiques est stoppée et ne reprennent qu'en des cas particuliers comme lors d'une blessure, ou dans des pathologies comme certains cancers (Kirschmann DA et al. 2006, Porst M et al. 2006, Sinha S et al. 2002). Une fois les fibres élastiques formées, elles entament un processus, lent mais irréversible, de dégradation au cours du vieillissement. La mutation d'une des composantes clés des fibres élastiques peut mettre en danger l'équilibre du complexe. La mutation de certains de ces gènes, comme ceux de l'élastine, des fibuline-4 et -5, de LOX, de la fibrilline-1, a des conséquences importantes sur le système cardiovasculaire (Li DY et al. 1998, Pereira L et al 1997, Carta L et al. 2006, McLaughlin PJ et al. 2006, Nakamura T et al. 2002, Maki JM et al. 2002).

Des études récentes ont montré que l'haploinsuffisance en élastine entraîne certaines modifications précoces du système cardiovasculaire ressemblant à celles qui surviennent au cours du vieillissement normal (Pezet M et al. 2008). Ces modifications, évoluant avec l'âge, incluent la fragmentation des lames élastiques, l'altération de paramètres biomécaniques comme la distensibilité, la pression exercée sur la paroi aortique (stress circonférentiel) et la rigidité, l'hypertension artérielle, l'accumulation relative de protéines matricielles (comme les collagènes) dans la paroi aortique. Par ailleurs, la paroi aortique adopte par d'autres aspects un processus alternatif de vieillissement en maintenant son épaisseur et la réponse vasoconstrictrice aux agonistes alpha-adrénergiques inchangés avec l'âge alors qu'il est classiquement observé au cours du vieillissement, un épaississement de la paroi et une altération de la réponse vasoconstrictrice.

Nous avons étudié l'impact de l'haploinsuffisance de l'autre composant majeur des fibres élastiques, la fibrilline-1, sur le processus de vieillissement. Nos résultats et ceux d'autres équipes montrent que la déficience quantitative de la fibrilline-1 entraîne une altération précoce des fibres élastiques, qui sont plus fragmentées dès l'âge adulte, alors que ce phénomène est généralement associé au vieillissement artériel. La déficience en fibrilline-1

rend les fibres élastiques plus fragiles et la fréquence de fragmentations, déjà importante dans l'aorte de souris Fbn-1 +/- mgΔ adultes, le devient encore plus chez les souris âgées du même génotype lorsqu'elles sont comparées aux souris sauvages. La conséquence de la fragmentation des lames élastiques est l'accroissement du diamètre artériel qui survient au cours du vieillissement (Camilleri JP 1992, Greenwald SE 2007). En effet, on note une dilatation de l'aorte ascendante apparaissant avec l'âge comme chez les souris sauvages. Chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ adultes, le diamètre artériel est de même calibre que celui des souris sauvages âgées et il s'accroît encore plus avec l'âge. Au cours du vieillissement normal, la dilatation aortique est compensée par un épaississement de la paroi pour limiter le stress appliqué selon la loi de Laplace ($\text{stress} = \text{Pression} \times \text{rayon} / \text{épaisseur}$). Cette compensation de la dilatation par une augmentation de l'épaisseur de la paroi aortique est observée chez les souris sauvages âgées mais aussi chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ adultes. Elle est curieusement absente dans la paroi de l'aorte ascendante de souris âgées Fbn-1 +/-mgΔ qui, au contraire, tend à s'amincir. La quantité totale de protéines, qui est souvent à l'origine de l'épaississement de la paroi aortique, n'est pas significativement différente quelque soit l'âge et le génotype des souris. Il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie la morphologie des cellules musculaires lisses vasculaires, dont l'accroissement de la taille chez les animaux pourrait aussi être à l'origine de l'épaississement de la paroi aortique (Campbell JH et al. 1991).

Une autre caractéristique du vieillissement artériel est la baisse de la distensibilité et l'augmentation de la rigidité. Chez les souris Fbn-1 +/- mgΔ, on observe une baisse de la distensibilité dès l'âge adulte alors que l'augmentation de la rigidité survient uniquement à un âge avancé. L'altération de ces paramètres biomécaniques peut trouver son origine au niveau du rapport élastine / collagène, qui est diminué chez les souris Fbn-1 +/- mgΔ dès l'âge adulte et tend encore à diminuer avec l'âge. La quantité d'élastine dans l'aorte est toujours plus faible chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ comparée aux souris sauvages et ce dès l'âge adulte ; et elle n'évolue pas avec l'âge. Parallèlement, l'expression du gène du collagène de type I et la quantité des collagènes sont augmentées chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ âgées, comparées aux souris sauvages. Ces mêmes phénomènes sont observés chez les patients atteints du syndrome de Marfan (Halme T et al. 1985, Dingemans KP et al. 2006).

La dégradation des fibres élastiques par les MMPs participe à l'augmentation de la rigidité de l'aorte. Dans certains modèles de souris déficientes en fibrilline-1, la production de MMP est accrue très tôt (dès 3 mois) comme dans le cas du vieillissement artériel. Une étude

réalisée sur l'un de ces modèles de souris (Fbn-1 (C1039G/+)), a montré que les MMP-2 et -9 sont activées dans l'aorte de ses souris à 3, 6 et 9 mois (Chung AW et al. 2008). Dans de futures expériences, il serait intéressant de vérifier si l'expression des MMPs est augmentée chez les souris Fbn-1 +/- mgΔ et de suivre leur évolution avec l'âge pour estimer leur contribution aux modifications histologiques et mécaniques observées dans les artères de ces souris.

Une augmentation de l'expression des MMPs pourrait être envisagée chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ car nous avons effectivement noté une dégradation progressive des fibres élastiques, qui évolue parallèlement à l'apparition des anévrismes aortiques au cours du vieillissement.

La dilatation de la racine de l'aorte ascendante est la cause de l'apparition de l'insuffisance de la valve aortique chez les patients atteints du syndrome de Marfan. Nous avons noté l'apparition d'une insuffisance aortique (régurgitation aortique en diastole) corrélée au degré de sévérité de l'anévrisme chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ.

L'hypertension artérielle est un signe du vieillissement cardiaque chez l'Homme. Ce phénomène ne survient pas chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ qui maintiennent leur pression systolique constante au cours du vieillissement. Par contre leur pression diastolique est plus faible et diminue avec l'âge ce qui est corrélée à la présence plus fréquente d'insuffisance aortique chez les souris Fbn-1 +/-mgΔ adultes et âgées. L'hypertrophie cardiaque survient plus tôt aussi, dès l'âge adulte, chez les souris Fbn-1 +/- mgΔ présentant un anévrisme aortique sévère alors que c'est un phénomène lié au vieillissement et n'apparaît que chez les souris sauvages âgés.

La déficience en fibrilline-1 a plus d'impact sur l'aorte ascendante mais l'aorte abdominale et l'artère pulmonaire sont aussi affectées. L'aorte abdominale présente les mêmes caractéristiques que l'aorte ascendante, à savoir l'augmentation du diamètre, la rigidité et la baisse de la distensibilité. Ces phénomènes qui apparaissent dès l'âge adulte semblent rester stables jusqu'à un âge avancé. La paroi de l'aorte abdominale s'épaissit à l'âge adulte et a tendance à s'affiner au cours du vieillissement. La déficience de la fibrilline-1 entraîne aussi une augmentation du diamètre de l'artère pulmonaire dès l'âge adulte et un épaississement de la paroi au cours du vieillissement. Chez les souris sauvages aussi le diamètre artériel pulmonaire augmente avec l'âge sans qu'il ait une modification de l'épaisseur de la paroi. La paroi de l'artère pulmonaire ne semble pas affectée du point de vue histologique. Le

vieillessement de l'artère pulmonaire suit le même schéma chez les souris sauvages que chez les souris Fbn-1 +/- mgΔ, à l'exception de la survenue d'un épaississement de la paroi chez ces dernières au cours du vieillissement.

La réponse vasomotrice de l'aorte ascendante à la phényléphrine est altérée chez les souris Fbn-1 +/- mgΔ au cours du vieillissement. Cette réponse est même presque absente dans les cas où le vaisseau est anévrisimal (pathologique). Ceci pourrait être dû à une baisse de la densité de cellules musculaires lisses ou tout simplement une diminution du nombre ou de l'affinité des récepteurs alpha-adrénergiques de ces cellules. L'hypothèse de la baisse de la densité de cellules est soutenue par l'observation d'une apoptose accrue des cellules musculaires lisses dans l'aorte de patients atteints de syndrome de Marfan (Segura AM et al. 1998, Nataatmadja M et al. 2006). Enfin, la perte de contact entre les cellules musculaires lisses et les lames élastiques mais aussi le stress subi par la paroi de l'aorte peut désensibiliser les cellules musculaires lisses aux agonistes chez les souris Fbn-1 +/- mgΔ (Bunton TE et al. 2001).

III.4. Contribution de la déficience en fibrilline-1 dans la pathogenèse du syndrome de Marfan

La mutation du gène de la fibrilline a été identifiée comme étant responsable du syndrome de Marfan par Dietz et ses collaborateurs (Dietz H et al. 1991). Dès lors, plusieurs modèles de souris portant une mutation dans le gène de la fibrilline-1 ont été créés pour étudier la pathogenèse de cette maladie génétique humaine. A l'issue de ces études, plusieurs modèles de la pathogenèse ont été établis (Robinson PN et Booms P 2001, Dietz HC et al. 2005). Les principaux d'entre eux sont : 1) le modèle dominant négatif, selon lequel la mutation de la fibrilline-1 interfère avec la formation des fibres élastiques et 2) le modèle de l'haploinsuffisance qui considère que la baisse de la quantité de fibrilline-1 en dessous d'un seuil critique est à l'origine du syndrome de Marfan (Aoyama T et al. 1994, Eldadah ZA et al. 1995, Judge DP et al. 2004), et 3) un modèle plus récent qui repose sur l'augmentation de la signalisation induite par le TGF β suite à la mutation de la fibrilline-1 ou de l'un des récepteurs 1 et 2 du TGF β (TβR1 et TβR2) (Neptune ER et al. 2003, Stheneur C et al. 2008). Les souris que nous avons utilisées dans cette étude présentent certaines caractéristiques du syndrome de Marfan, à savoir l'anévrisme et dissection aortique, la malformation osseuse

(scoliose) et même la différence de pénétrance du phénotype entre les animaux portant la même mutation. La faible expression de la fibrilline-1 chez ces souris permet de conforter l'hypothèse de l'haploinsuffisance dans la pathogénèse du syndrome de Marfan. La déficience quantitative en fibrilline-1 rend les lames élastiques plus fragiles et donc plus susceptibles à la fracture suite à un étirement répétitif qui leur est appliqué dans la paroi aortique. En plus de cela, la déficience quantitative en fibrilline-1 pourrait empêcher une bonne organisation des fibres de collagène par les microfibrilles dans l'adventice, ce qui affaiblit la capacité de cette tunique à limiter la dilatation maximale de l'aorte. L'aorte serait alors soumise à un stress qui conduirait à la dilatation aortique et au remodelage de la paroi artérielle. L'étirement subi par les cellules musculaires lisses de la paroi et/ou la rupture de l'interaction entre ces cellules et les fibres élastiques pourrait induire un changement de phénotype de ces cellules qui se mettraient à synthétiser les MMPs. Ces dernières pourraient être synthétisées aussi par les cellules monocytaires qui infiltreraient dans la média comme dans certains cas d'anévrismes (Koch AE et al. 1990, Kuivaniemi H et al. 2008). Les MMPs peuvent accélérer la destruction de la matrice extracellulaire et couper le contact entre les cellules musculaires lisses et les fibres élastiques. L'implication des MMP dans la pathogénèse du syndrome de Marfan a été établie par des études qui montrent une augmentation de leur sécrétion et activation dans la paroi aortique de patients atteints du syndrome de Marfan et des souris déficientes en fibrilline-1 (Ikonomidis JS et al. 2006, Segura AM et al. 1998, Chung AW et al. 2007 et 2008). Aussi l'administration d'inhibiteur de MMP comme la doxycycline ou d'anticorps anti-MMP permet d'atténuer la fracture des fibres élastiques et empêcher les modifications délétères de la paroi aortique chez les souris mimant le syndrome de Marfan (Chung AW et al. 2008, Xiong W et al. 2008).

De récentes études ont montré que le TGF beta est aussi impliqué dans la pathogénèse du syndrome de Marfan (Neptune ER et al. 2003, Habashi JP et al. 2006, Kaartinen V et Warburton D 2003). La fibrilline-1 contrôle la biodisponibilité du TGF-beta1 (Chaudhry SS et al. 2007). Le TGF-beta est synthétisé sous forme d'un complexe latent (LLC) qui interagit avec la fibrilline-1 via le LTBP qui est un élément de ce complexe. Lorsque la fibrilline-1 est mutée ou absente, le complexe LLC n'est plus séquestré et le TGF-beta est activé et agit sur son récepteur. Les études sur les souris déficientes en fibrilline-1 ont montré en effet une hyper-activation du TGF-beta dans la paroi aortique de ces souris et une activation de la signalisation TGF-beta dépendante (voie Smad-2/3) (Nataatmadja M et al. 2006, Carta L et al. 2006 et 2009, Neptune ER et al. 2003). L'activation de la voie de signalisation Smad-2 est corrélée avec le degré de fragmentation des lames élastiques ce qui fait penser à un lien entre

le TGF beta1 et les MMP (Gomez D et al. 2009). En effet, les inhibiteurs de MMP diminuent aussi l'activation du TGF beta dans la paroi de l'aorte de souris modèles du syndrome de Marfan (Xiong W et al. 2008).

L'hypothèse de l'implication de la voie du TGF-beta 1 dans la pathogénèse du syndrome de Marfan est étayée par le fait que l'inhibition de celle-ci atténue la dilatation aortique et empêche les altérations de la paroi aortique et restaure le phénotype valvulaire mitral chez les souris déficientes en fibrilline-1 (modèle de Marfan) (Habashi JP et al. 2006, Ng CM et al. 2004).

Le tableau de la pathogénèse du syndrome de Marfan pourrait être complété dans l'avenir par la perturbation de la signalisation induite par la fibrilline-1 dans les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires. Ces signalisations étant d'une importance capitale dans la morphogénèse vasculaire, leur perturbation entraîne des anomalies qui, plus tard, auront un impact sur la structure et la fonction du vaisseau.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La mutation du gène de la fibrilline-1 a été identifiée comme étant la principale cause de la pathologie génétique humaine appelée syndrome de Marfan. Les différents modèles murins portant différentes mutations dans le gène de la fibrilline-1 et mimant certaines caractéristiques du syndrome de Marfan ont montré que la fibrilline-1 contribue à la morphogénèse vasculaire. Notre étude chez les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ confirme ce fait et montre qu'une baisse de la quantité de fibrilline-1 conduit à l'altération du développement du système cardiovasculaire. Cette altération a lieu tant sur le plan structural que fonctionnel. L'absence d'une quantité suffisante de fibrilline-1 se répercute sur la formation des lames élastiques. Ces dernières semblent fragilisées en conséquence et subissent des fragmentations très tôt dans la vie post-natale. La fibrilline-1 interagit avec les cellules vasculaires et induit une signalisation dans les cellules endothéliales via les récepteurs intégrines. Elle régule les fonctions comme la prolifération et la migration des cellules endothéliales, deux phénomènes importants dans la morphogénèse vasculaire. Ceci suggère que la fibrilline-1 pourrait avoir un rôle important dans ce phénomène. La perte de cette signalisation induite par la fibrilline-1 dans les cellules vasculaires pourrait être une explication de l'altération du développement aortique observée en cas de déficit quantitatif de la fibrilline-1.

Ce déficit des répercussions sur le système vasculaire qui ressemblent à celles observées chez les souris âgées sauvages. Les modifications du système cardiovasculaire apparaissent assez tôt chez les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ et s'aggravent au cours du vieillissement. Le vieillissement est pathologique et plus précoce chez les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ et certaines de ses caractéristiques comme l'épaississement de la paroi aortique sont modifiées. La quantité de fibrilline-1 est aussi déterminante dans la morphogénèse vasculaire. Les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ vivent jusqu'à un âge avancé comme les souris sauvages. Alors que les souris Fbn-1 $\text{mg}\Delta/\text{mg}\Delta$ meurent plus tôt dans les 2 à 3 semaines après la naissance. Il serait intéressant de comparer les vaisseaux des souris hétérozygotes, des souris homozygotes et des souris sauvages du même âge pour mieux évaluer l'importance de la quantité de fibrilline-1 dans le développement vasculaire et plus tard dans la vie. En particulier, chez les souris âgées de 3 semaines, la formation/maturation des vaisseaux sanguins est presque effective. L'étude de la structure et de la biochimie des fibres élastiques plus tôt, au cours de la vie embryonnaire ou à la naissance permettrait également de vérifier si les fragmentations des lames élastiques sont dues à une anomalie de l'élastogénèse ou si c'est un phénomène secondaire.

Une autre particularité des souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ est la variation du degré de pénétrance de la pathologie aortique. Ceci suppose l'intervention d'un facteur autre que la seule mutation

du gène de la fibrilline-1. Dans d'autres modèles de souris, l'activation du TGF beta a été observée dans la paroi aortique. L'étude de l'activation et de l'évolution TGF-beta chez les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$ à différents âges permettra de connaître la contribution de ce facteur de croissance dans l'évolution de la pathologie chez ces souris. De plus, les études *in vitro* ont montré que les fragments de fibrilline-1 sont capables d'activer les MMP-1 et -3 et ont une activité chimiotactique et que les extraits de l'aorte de souris déficientes en fibrilline-1 (souris Fbn-1 mgR/mgR) ont une activité chimiotactique sur les macrophages (Booms P et al. 2005 et 2006). Les lames élastiques sont fragmentées au cours du vieillissement normal et encore plus chez les souris Fbn-1 $+/\text{mg}\Delta$. La détection des fragments de fibrilline-1 dans le sang de ses souris permettrait de vérifier l'hypothèse selon laquelle ces fragments participent à la pathogénèse du syndrome de Marfan (Booms P et al. 2005).

L'une des principales causes du syndrome de Marfan étant la déficience quantitative en fibrilline-1, l'induction de l'expression de cette dernière très tôt après la naissance pourrait être considérée comme stratégie thérapeutique prometteuse contre le syndrome de Marfan. La thérapie génique pourrait aussi être envisagée comme stratégie qui consiste au remplacement du gène défectueux de la fibrilline-1 par le gène sauvage ou tout simplement par une réexpression du gène de la fibrilline-1. Cette stratégie a déjà montré son utilité chez la souris quant à la restauration d'un phénotype normal de l'aorte chez les souris modèles du syndrome de Marfan (Judge DP et al. 2004). En effet, l'expression de la fibrilline-1 humaine chez les souris Fbn-1(C1039G/+), modèles du syndrome de Marfan, restaure les paramètres histologiques (absence de fragmentation de lames élastiques et de dépôt de protéoglycanes) et morphométriques de la paroi aortique chez ces souris (Judge DP et al. 2004). Enfin, nous avons montré que la déficience en fibrilline-1 aboutit à des effets opposés à ceux de l'haploinsuffisance en élastine, à savoir respectivement la dilatation contre la sténose, et l'hypotension contre l'hypertension. Il serait d'une importance capitale d'explorer l'effet de la double mutation hétérozygote de la fibrilline-1 et de l'élastine sur la fonction cardiovasculaire des souris pour voir s'il y a une compensation, un retour à un phénotype intermédiaire entre les souris hétérozygotes en fibrilline-1 d'une part et en élastine d'autre part. Cette étude nous permettrait de mieux comprendre la contribution de chacune de ces deux protéines matricielles sur la morphogénèse vasculaire. Nous savons déjà que l'élastine régule la prolifération des cellules musculaires lisses (Karnik SK et al. 2003) et que sa déficience entraîne une hyperprolifération de ces cellules conduisant à l'occlusion de la lumière de l'aorte. L'étude de l'effet de la fibrilline-1 sur les cellules musculaires lisses pourrait

permettre de savoir si les effets antagonistes de la fibrilline-1 et de l'élastine sont également observés au niveau cellulaire comme c'est le cas au niveau intégré.

La compréhension de la signalisation par la fibrilline-1 et des conséquences de son déficit quantitatif sur le système vasculaire à différents stades de la vie permet de mieux décrire le rôle de cette protéine dans la physiologie vasculaire et d'aider à la compréhension de la pathogenèse du syndrome de Marfan. Nos travaux ont aussi permis de valider, sur les plans structural et fonctionnel, les souris $Fbn-1^{+}/mg\Delta$ comme modèles du syndrome de Marfan et pourraient aider à concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées contre cette pathologie.

IV. REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adams JN, Brooks M, Redpath TW, Smith FW, Dean J, Gray J, Walton S, Trent RJ. Aortic distensibility and stiffness index measured by magnetic resonance imaging in patients with Marfan's syndrome. *Br Heart J*. 1995;73:265-269.
2. Ades LC, Holman KJ, Brett MS, Edwards MJ, Bennetts B. Ectopia lentis phenotypes and the FBN1 gene. *Am J Med Genet A*. 2004;126A:284-289.
3. Ahimastos AA, Aggarwal A, D'Orsa KM, Formosa MF, White AJ, Savarirayan R, Dart AM, Kingwell BA. Effect of perindopril on large artery stiffness and aortic root diameter in patients with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. *Jama*. 2007;298:1539-1547.
4. Albig AR, Schiemann WP. Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *DNA Cell Biol*. 2004;23:367-379.
5. Ali M, McKibbin M, Booth A, Parry DA, Jain P, Riazuddin SA, Hejtmancik JF, Khan SN, Firasat S, Shires M, Gilmour DF, Towns K, Murphy AL, Azmanov D, Tournev I, Cherninkova S, Jafri H, Raashid Y, Toomes C, Craig J, Mackey DA, Kalaydjieva L, Riazuddin S, Inglehearn CF. Null mutations in LTBP2 cause primary congenital glaucoma. *Am J Hum Genet*. 2009;84:664-671.
6. Andres E, Molinari J, Peterszegi G, Mariko B, Ruszova E, Velebny V, Faury G, Robert L. Pharmacological properties of rhamnose-rich polysaccharides, potential interest in age-dependent alterations of connectives tissues. *Pathol Biol (Paris)*. 2006;54:420-425.
7. Aoyama T, Francke U, Dietz HC, Furthmayr H. Quantitative differences in biosynthesis and extracellular deposition of fibrillin in cultured fibroblasts distinguish five groups of Marfan syndrome patients and suggest distinct pathogenetic mechanisms. *J Clin Invest*. 1994;94:130-137.
8. Arteaga-Solis E, Gayraud B, Lee SY, Shum L, Sakai L, Ramirez F. Regulation of limb patterning by extracellular microfibrils. *J Cell Biol*. 2001;154:275-281.

9. Ashworth JL, Kielty CM, McLeod D. Fibrillin and the eye. *Br J Ophthalmol*. 2000;84:1312-1317.
10. Babbitt BA, Parkos CA, Mandell KJ, Winfree LM, Laur O, Ivanov AI, Nusrat A. Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J Pathol*. 2007;170:951-966.
11. Bailey SR, Polan JL, Munoz OC, Agrawal MC, Goswami NJ. Proliferation and beta-tubulin for human aortic endothelial cells within gas-plasma scaffolds. *Cardiovasc Radiat Med*. 2004;5:119-124.
12. Baldock C, Koster AJ, Ziese U, Rock MJ, Sherratt MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA, Kielty CM. The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol*. 2001;152:1045-1056.
13. Baumgartner D, Baumgartner C, Matyas G, Steinmann B, Löffler-Ragg J, Schermer E, Schweigmann U, Baldissera I, Frischhut B, Hess J, Hammerer I. Diagnostic power of aortic elastic properties in young patients with Marfan syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;129:730-739.
14. Bax DV, Bernard SE, Lomas A, Morgan A, Humphries J, Shuttleworth CA, Humphries MJ, Kielty CM. Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Biol Chem*. 2003;278:34605-34616.
15. Bax DV, Mahalingam Y, Cain S, Mellody K, Freeman L, Younger K, Shuttleworth CA, Humphries MJ, Couchman JR, Kielty CM. Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation. *J Cell Sci*. 2007;120:1383-1392.
16. Baxter BT. Heritable diseases of the blood vessels. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:185-188.

17. Bellingham CM, Woodhouse KA, Robson P, Rothstein SJ, Keeley FW. Self-aggregation characteristics of recombinantly expressed human elastin polypeptides. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1550:6-19.
18. Belz GG. Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1995;9:73-83.
19. Berk JL, Franzblau C, Goldstein RH. Recombinant interleukin-1 beta inhibits elastin formation by a neonatal rat lung fibroblast subtype. *J Biol Chem*. 1991;266:3192-3197.
20. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1:11-21.
21. Beuren AJ, Apitz J, Harmjanz D. Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation*. 1962;26:1235-1240.
22. Booms P, Ney A, Barthel F, Moroy G, Counsell D, Gille C, Guo G, Pregla R, Mundlos S, Alix AJ, Robinson PN. A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational analysis. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40:234-246.
23. Booms P, Pregla R, Ney A, Barthel F, Reinhardt DP, Pletschacher A, Mundlos S, Robinson PN. RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: a potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome. *Hum Genet*. 2005;116:51-61.
24. Booms P, Tiecke F, Rosenberg T, Hagemeyer C, Robinson PN. Differential effect of FBN1 mutations on in vitro proteolysis of recombinant fibrillin-1 fragments. *Hum Genet*. 2000;107:216-224.
25. Borel A, Eichenberger D, Farjanel J, Kessler E, Gleyzal C, Hulmes DJ, Sommer P, Font B. Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *J Biol Chem*. 2001;276:48944-48949.

26. Broder K, Reinhardt E, Ahern J, Lifton R, Tamborlane W, Pober B. Elevated ambulatory blood pressure in 20 subjects with Williams syndrome. *Am J Med Genet.* 1999;83:356-360.
27. Broekelmann TJ, Kozel BA, Ishibashi H, Werneck CC, Keeley FW, Zhang L, Mecham RP. Tropoelastin interacts with cell-surface glycosaminoglycans via its COOH-terminal domain. *J Biol Chem.* 2005;280:40939-40947.
28. Brooks PC, Clark RA, Cheresch DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 1994;264:569-571.
29. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.* 1994;79:1157-1164.
30. Brown-Augsburger P, Broekelmann T, Mecham L, Mercer R, Gibson MA, Cleary EG, Abrams WR, Rosenbloom J, Mecham RP. Microfibril-associated glycoprotein binds to the carboxyl-terminal domain of tropoelastin and is a substrate for transglutaminase. *J Biol Chem.* 1994;269:28443-28449.
31. Brown-Augsburger P, Tisdale C, Broekelmann T, Sloan C, Mecham RP. Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly. *J Biol Chem.* 1995;270:17778-17783.
32. Bruno E, Rossi N, Thuer O, Cordoba R, Alday LE. Cardiovascular findings, and clinical course, in patients with Williams syndrome. *Cardiol Young.* 2003;13:532-536.
33. Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, Dietz HC. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res.* 2001;88:37-43.
34. Cain SA, Baldock C, Gallagher J, Morgan A, Bax DV, Weiss AS, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-1 interactions with heparin. Implications for microfibril and elastic fiber assembly. *J Biol Chem.* 2005;280:30526-30537.

35. Camilleri JP. [Structural approach of vascular aging]. *Presse Med.* 1992;21:1184-1187.
36. Campbell JH, Tachas G, Black MJ, Cockerill G, Campbell GR. Molecular biology of vascular hypertrophy. *Basic Res Cardiol.* 1991;86 Suppl 1:3-11.
37. Carta L, Pereira L, Arteaga-Solis E, Lee-Arteaga SY, Lenart B, Starcher B, Merkel CA, Sukoyan M, Kerkis A, Hazeki N, Keene DR, Sakai LY, Ramirez F. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem.* 2006;281:8016-8023.
38. Carta L, Smaldone S, Zilberberg L, Loch D, Dietz HC, Rifkin DB, Ramirez F. p38 MAPK Is an Early Determinant of Promiscuous Smad2/3 Signaling in the Aortas of Fibrillin-1 (Fbn1)-null Mice. *J Biol Chem.* 2009;284:5630-5636.
39. Charbonneau NL, Dzamba BJ, Ono RN, Keene DR, Corson GM, Reinhardt DP, Sakai LY. Fibrillins can co-assemble in fibrils, but fibrillin fibril composition displays cell-specific differences. *J Biol Chem.* 2003;278:2740-2749.
40. Chaudhry SS, Cain SA, Morgan A, Dallas SL, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. *J Cell Biol.* 2007;176:355-367.
41. Chaudhry SS, Gazzard J, Baldock C, Dixon J, Rock MJ, Skinner GC, Steel KP, Kielty CM, Dixon MJ. Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice. *Hum Mol Genet.* 2001;10:835-843.
42. Cho SJ, Kim JS, Kim JM, Lee JY, Jung HC, Song IS. Simvastatin induces apoptosis in human colon cancer cells and in tumor xenografts, and attenuates colitis-associated colon cancer in mice. *Int J Cancer.* 2008;123:951-957.
43. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.

44. Christensen KL, Mulvany MJ. Location of resistance arteries. *J Vasc Res.* 2001;38:1-12.
45. Chung AW, Au Yeung K, Cortes SF, Sandor GG, Judge DP, Dietz HC, van Breemen C. Endothelial dysfunction and compromised eNOS/Akt signaling in the thoracic aorta during the progression of Marfan syndrome. *Br J Pharmacol.* 2007;150:1075-1083.
46. Chung AW, Au Yeung K, Sandor GG, Judge DP, Dietz HC, van Breemen C. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res.* 2007;101:512-522.
47. Chung AW, Yang HH, Yeung KA, van Breemen C. Mechanical and pharmacological approaches to investigate the pathogenesis of Marfan syndrome in the abdominal aorta. *J Vasc Res.* 2008;45:314-322.
48. Clarke AW, Arnspang EC, Mithieux SM, Korkmaz E, Braet F, Weiss AS. Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry.* 2006;45:9989-9996.
49. Clementi M, Notari L, Borghi A, Tenconi R. Familial congenital bicuspid aortic valve: a disorder of uncertain inheritance. *Am J Med Genet.* 1996;62:336-338.
50. Colarossi C, Chen Y, Obata H, Jurukovski V, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. Lung alveolar septation defects in *Ltbp-3*-null mice. *Am J Pathol.* 2005;167:419-428.
51. Collod-Beroud G, Boileau C. Marfan syndrome in the third Millennium. *Eur J Hum Genet.* 2002;10:673-681.
52. Corson GM, Charbonneau NL, Keene DR, Sakai LY. Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics.* 2004;83:461-472.

53. Cox RH. Age-related changes in arterial wall mechanics and composition of NIA Fischer rats. *Mech Ageing Dev.* 1983;23:21-36.
54. Curran ME, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, Leppert MF, Keating MT. The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. *Cell.* 1993;73:159-168.
55. Dabovic B, Chen Y, Colarossi C, Obata H, Zambuto L, Perle MA, Rifkin DB. Bone abnormalities in latent TGF-[beta] binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-[beta] bioavailability. *J Cell Biol.* 2002;156:227-232.
56. Dasouki M, Markova D, Garola R, Sasaki T, Charbonneau NL, Sakai LY, Chu ML. Compound heterozygous mutations in fibulin-4 causing neonatal lethal pulmonary artery occlusion, aortic aneurysm, arachnodactyly, and mild cutis laxa. *Am J Med Genet A.* 2007;143A:2635-2641.
57. Davies Cde L, Melder RJ, Munn LL, Mouta-Carreira C, Jain RK, Boucher Y. Decorin inhibits endothelial migration and tube-like structure formation: role of thrombospondin-1. *Microvasc Res.* 2001;62:26-42.
58. Davis EC. Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. *Lab Invest.* 1993;68:89-99.
59. Davis EC. Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta. *J Cell Sci.* 1994;107 (Pt 3):727-736.
60. Davis EC. Elastic lamina growth in the developing mouse aorta. *J Histochem Cytochem.* 1995;43:1115-1123.
61. de Carvalho Filho ET, de Carvalho CA, de Souza RR. [Changes in the elastic system fibers with aging]. *Rev Assoc Med Bras.* 1996;42:25-30.

62. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991;352:337-339.
63. Dietz HC, Loeys B, Carta L, Ramirez F. Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005;139C:4-9.
64. Dietz HC, McIntosh I, Sakai LY, Corson GM, Chalberg SC, Pyeritz RE, Francomano CA. Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics*. 1993;17:468-475.
65. Dietz HC, Mecham RP. Mouse models of genetic diseases resulting from mutations in elastic fiber proteins. *Matrix Biol*. 2000;19:481-488.
66. Dingemans KP, Teeling P, van der Wal AC, Becker AE. Ultrastructural pathology of aortic dissections in patients with Marfan syndrome: Comparison with dissections in patients without Marfan syndrome. *Cardiovasc Pathol*. 2006;15:203-212.
67. Drake CJ, Hungerford JE, Little CD. Morphogenesis of the first blood vessels. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;857:155-179.
68. Dridi SM, Foucault Bertaud A, Igondjo Tchen S, Senni K, Ejeil AL, Pellat B, Lyonnet S, Bonnet D, Charpiot P, Godeau G. Vascular wall remodeling in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams Beuren syndrome. *J Vasc Res*. 2005;42:190-201.
69. Duca L, Blanchevove C, Cantarelli B, Ghoneim C, Dedieu S, Delacoux F, Hornebeck W, Hinek A, Martiny L, Debelle L. The elastin receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its Neu-1 subunit. *J Biol Chem*. 2007;282:12484-12491.
70. Duca L, Lambert E, Debret R, Rothhut B, Blanchevove C, Delacoux F, Hornebeck W, Martiny L, Debelle L. Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts. *Mol Pharmacol*. 2005;67:1315-1324.

71. Eisenberg R, Young D, Jacobson B, Boito A. Familial Supravalvular Aortic Stenosis. *Am J Dis Child*. 1964;108:341-347.
72. Eldadah ZA, Brenn T, Furthmayr H, Dietz HC. Expression of a mutant human fibrillin allele upon a normal human or murine genetic background recapitulates a Marfan cellular phenotype. *J Clin Invest*. 1995;95:874-880.
73. El-Hallous E, Sasaki T, Hubmacher D, Getie M, Tiedemann K, Brinckmann J, Batge B, Davis EC, Reinhardt DP. Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *J Biol Chem*. 2007;282:8935-8946.
74. Ely JT. Aneurysm: prevention and nonsurgical repair. *Med Sci Monit*. 2004;10:HY1-4.
75. Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*. 1993;122:809-823.
76. Ewart AK, Jin W, Atkinson D, Morris CA, Keating MT. Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene. *J Clin Invest*. 1994;93:1071-1077.
77. Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet*. 1993;5:11-16.
78. Ewart AK, Morris CA, Ensing GJ, Loker J, Moore C, Leppert M, Keating M. A human vascular disorder, supravalvular aortic stenosis, maps to chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3226-3230.
79. Fahem A, Robinet A, Cauchard JH, Duca L, Soula-Rothhut M, Rothhut B, Soria C, Guenounou M, Hornebeck W, Bellon G. Elastokine-mediated up-regulation of MT1-MMP is triggered by nitric oxide in endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:1581-1596.

80. Faivre L, Collod-Beroud G, Loeys BL, Child A, Binquet C, Gautier E, Callewaert B, Arbustini E, Mayer K, Arslan-Kirchner M, Kiotsekoglou A, Comeglio P, Marziliano N, Dietz HC, Halliday D, Beroud C, Bonithon-Kopp C, Claustres M, Muti C, Plauchu H, Robinson PN, Ades LC, Biggin A, Benetts B, Brett M, Holman KJ, De Backer J, Coucke P, Francke U, De Paepe A, Jondeau G, Boileau C. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. *Am J Hum Genet.* 2007;81:454-466.
81. Faivre L, Dollfus H, Lyonnet S, Alembik Y, Megarbane A, Samples J, Gorlin RJ, Alswaid A, Feingold J, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. Clinical homogeneity and genetic heterogeneity in Weill-Marchesani syndrome. *Am J Med Genet A.* 2003;123A:204-207.
82. Faury G. Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathol Biol (Paris).* 2001;49:310-325.
83. Faury G, Chabaud A, Ristori MT, Robert L, Verdetti J. Effect of age on the vasodilatory action of elastin peptides. *Mech Ageing Dev.* 1997;95:31-42.
84. Faury G, Garnier S, Weiss AS, Wallach J, Fulop T, Jr., Jacob MP, Mecham RP, Robert L, Verdetti J. Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. *Circ Res.* 1998;82:328-336.
85. Faury G, Pezet M, Knutsen RH, Boyle WA, Heximer SP, McLean SE, Minkes RK, Blumer KJ, Kovacs A, Kelly DP, Li DY, Starcher B, Mecham RP. Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J Clin Invest.* 2003;112:1419-1428.
86. Faury G, Ristori MT, Verdetti J, Jacob MP, Robert L. [Role of the elastin-laminin receptor in the vasoregulation]. *C R Acad Sci III.* 1994;317:807-811.
87. Faury G, Ristori MT, Verdetti J, Jacob MP, Robert L. Effect of elastin peptides on vascular tone. *J Vasc Res.* 1995;32:112-119.

88. Faury G, Ruzsova E, Molinari J, Mariko B, Raveaud S, Velebny V, Robert L. The alpha-L-Rhamnose recognizing lectin site of human dermal fibroblasts functions as a signal transducer: modulation of Ca²⁺ fluxes and gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780:1388-1394.
89. Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L, Verdeti J. Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:2967-2972.
90. Fazio MJ, Mattei MG, Passage E, Chu ML, Black D, Solomon E, Davidson JM, Uitto J. Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet*. 1991;48:696-703.
91. Fornieri C, Taparelli F, Quaglino D, Jr., Contri MB, Davidson JM, Algeri S, Ronchetti IP. The effect of caloric restriction on the aortic tissue of aging rats. *Connect Tissue Res*. 1999;40:131-143.
92. Franc S, Garrone R, Bosch A, Franc JM. A routine method for contrasting elastin at the ultrastructural level. *J Histochem Cytochem*. 1984;32:251-258.
93. Fung YC. What are the residual stresses doing in our blood vessels? *Ann Biomed Eng*. 1991;19:237-249.
94. Gallagher BC, Sakai LY, Little CD. Fibrillin delineates the primary axis of the early avian embryo. *Dev Dyn*. 1993;196:70-78.
95. Garmy-Susini B, Varner JA. Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol*. 2008;6:155-163.
96. Gasparovic H, Nascimben L, Kindelberger DW, Byrne JG. Idiopathic inflammatory aneurysm of the ascending aorta. *Ann Thorac Surg*. 2005;80:1912-1914.

97. Gibbons CA, Shadwick RE. Functional similarities in the mechanical design of the aorta in lower vertebrates and mammals. *Experientia*. 1989;45:1083-1088.
98. Gibson MA, Leavesley DI, Ashman LK. Microfibril-associated glycoprotein-2 specifically interacts with a range of bovine and human cell types via $\alpha V\beta 3$ integrin. *J Biol Chem*. 1999;274:13060-13065.
99. Giordano U, Turchetta A, Giannotti A, Digilio MC, Virgili F, Calzolari A. Exercise testing and 24-hour ambulatory blood pressure monitoring in children with Williams syndrome. *Pediatr Cardiol*. 2001;22:509-511.
100. Giusti B, Porciani MC, Brunelli T, Evangelisti L, Fedi S, Gensini GF, Abbate R, Sani G, Yacoub M, Pepe G. Phenotypic variability of cardiovascular manifestations in Marfan Syndrome. Possible role of hyperhomocysteinemia and C677T MTHFR gene polymorphism. *Eur Heart J*. 2003;24:2038-2045.
101. Glab J, Wess T. Changes in the molecular packing of fibrillin microfibrils during extension indicate intrafibrillar and interfibrillar reorganization in elastic response. *J Mol Biol*. 2008;383:1171-1180.
102. Glick BN, Roberts WC. Congenitally bicuspid aortic valve in multiple family members. *Am J Cardiol*. 1994;73:400-404.
103. Gomez D, Al Haj Zen A, Borges LF, Philippe M, Gutierrez PS, Jondeau G, Michel JB, Vranckx R. Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *J Pathol*. 2009.
104. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. *J Pathol*. 2007;211:157-172.
105. Gregory KE, Ono RN, Charbonneau NL, Kuo CL, Keene DR, Bachinger HP, Sakai LY. The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 2005;280:27970-27980.

106. Grimshaw GM, Thompson JM. Changes in diameter of the abdominal aorta with age: an epidemiological study. *J Clin Ultrasound*. 1997;25:7-13.
107. Gualandris A, Annes JP, Arese M, Noguera I, Jurukovski V, Rifkin DB. The latent transforming growth factor-beta-binding protein-1 promotes in vitro differentiation of embryonic stem cells into endothelium. *Mol Biol Cell*. 2000;11:4295-4308.
108. Guo G, Booms P, Halushka M, Dietz HC, Ney A, Stricker S, Hecht J, Mundlos S, Robinson PN. Induction of macrophage chemotaxis by aortic extracts of the mgR Marfan mouse model and a GxxPG-containing fibrillin-1 fragment. *Circulation*. 2006;114:1855-1862.
109. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, Myers L, Klein EC, Liu G, Calvi C, Podowski M, Neptune ER, Halushka MK, Bedja D, Gabrielson K, Rifkin DB, Carta L, Ramirez F, Huso DL, Dietz HC. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*. 2006;312:117-121.
110. Halme T, Savunen T, Aho H, Vihersaari T, Penttinen R. Elastin and collagen in the aortic wall: changes in the Marfan syndrome and annuloaortic ectasia. *Exp Mol Pathol*. 1985;43:1-12.
111. Hanada K, Vermeij M, Garinis GA, de Waard MC, Kunen MG, Myers L, Maas A, Duncker DJ, Meijers C, Dietz HC, Kanaar R, Essers J. Perturbations of vascular homeostasis and aortic valve abnormalities in fibulin-4 deficient mice. *Circ Res*. 2007;100:738-746.
112. Hanssen E, Franc S, Garrone R. Fibrillin-rich microfibrils: structural modifications during ageing in normal human zonule. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1998;30:365-369.
113. Hanssen E, Hew FH, Moore E, Gibson MA. MAGP-2 has multiple binding regions on fibrillins and has covalent periodic association with fibrillin-containing microfibrils. *J Biol Chem*. 2004;279:29185-29194.
114. Hasham SN, Guo DC, Milewicz DM. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections. *Curr Opin Cardiol*. 2002;17:677-683.

115. Hayashi K, Fong KS, Mercier F, Boyd CD, Csiszar K, Hayashi M. Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. *J Mol Histol.* 2004;35:845-855.
116. Henderson M, Polewski R, Fanning JC, Gibson MA. Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) is specifically located on the beads of the beaded-filament structure for fibrillin-containing microfibrils as visualized by the rotary shadowing technique. *J Histochem Cytochem.* 1996;44:1389-1397.
117. Hill CH, Ashwell CM, Nolin SJ, Keeley F, Billingham C, Hinek A, Starcher B. Dietary iron deficiency compromises normal development of elastic fibers in the aorta and lungs of chicks. *J Nutr.* 2007;137:1895-1900.
118. Hinek A. Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor. *Biol Chem.* 1996;377:471-480.
119. Hinek A, Rabinovitch M. 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol.* 1994;126:563-574.
120. Hirano E, Knutsen RH, Sugitani H, Ciliberto CH, Mecham RP. Functional rescue of elastin insufficiency in mice by the human elastin gene: implications for mouse models of human disease. *Circ Res.* 2007;101:523-531.
121. Hotchkiss KA, Ashton AW, Schwartz EL. Thymidine phosphorylase and 2-deoxyribose stimulate human endothelial cell migration by specific activation of the integrins alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3. *J Biol Chem.* 2003;278:19272-19279.
122. Hu Q, Loeys BL, Coucke PJ, De Paepe A, Mecham RP, Choi J, Davis EC, Urban Z. Fibulin-5 mutations: mechanisms of impaired elastic fiber formation in recessive cutis laxa. *Hum Mol Genet.* 2006;15:3379-3386.
123. Hubmacher D, Tiedemann K, Reinhardt DP. Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions. *Curr Top Dev Biol.* 2006;75:93-123.

124. Huchtagowder V, Morava E, Kornak U, Lefeber DJ, Fischer B, Dimopoulou A, Aldinger A, Choi J, Davis EC, Abuelo DN, Adamowicz M, Al-Aama J, Basel-Vanagaite L, Fernandez B, Grealley MT, Gillessen-Kaesbach G, Kayserili H, Lemyre E, Tekin M, Turkmen S, Tuysuz B, Yuksel-Konuk B, Mundlos S, Van Maldergem L, Wevers RA, Urban Z. Loss-of-function mutations in ATP6V0A2 impair vesicular trafficking, tropoelastin secretion and cell survival. *Hum Mol Genet.* 2009;18:2149-2165.
125. Huchtagowder V, Sausgruber N, Kim KH, Angle B, Marmorstein LY, Urban Z. Fibulin-4: a novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006;78:1075-1080.
126. Hultgardh-Nilsson A, Durbeej M. Role of the extracellular matrix and its receptors in smooth muscle cell function: implications in vascular development and disease. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18:540-545.
127. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 2006;119:3901-3903.
128. Hutchinson S, Furger A, Halliday D, Judge DP, Jefferson A, Dietz HC, Firth H, Handford PA. Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: a potential modifier of phenotype? *Hum Mol Genet.* 2003;12:2269-2276.
129. Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, Stroud RE, Clark LL, Kaplan BS, Zeeshan A, Bavaria JE, Gorman JH, 3rd, Spinale FG, Gorman RC. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with Marfan syndrome. *Circulation.* 2006;114:I365-370.
130. Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazzieri R, Charbonneau NL, Reinhardt DP, Rifkin DB, Sakai LY. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem.* 2003;278:2750-2757.
131. Ito S, Ishimaru S, Wilson SE. Effect of coacervated alpha-elastin on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *Angiology.* 1998;49:289-297.

132. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother.* 2003;57:195-202.
133. Jacob MP, Fulop T, Jr., Foris G, Robert L. Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:995-999.
134. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973;52:2745-2756.
135. James MA, Tullett J, Hemsley AG, Shore AC. Effects of aging and hypertension on the microcirculation. *Hypertension.* 2006;47:968-974.
136. Jensen SA, Reinhardt DP, Gibson MA, Weiss AS. Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. *J Biol Chem.* 2001;276:39661-39666.
137. Jeremy RW, Huang H, Hwa J, McCarron H, Hughes CF, Richards JG. Relation between age, arterial distensibility, and aortic dilatation in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol.* 1994;74:369-373.
138. Jiang X, Yang F, Tan H, Liao D, Bryan RM, Jr., Randhawa JK, Rumbaut RE, Durante W, Schafer AI, Yang X, Wang H. Hyperhomocystinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2515-2521.
139. Jovanovic J, Takagi J, Choulier L, Abrescia NG, Stuart DI, van der Merwe PA, Mardon HJ, Handford PA. α V β 6 is a novel receptor for human fibrillin-1. Comparative studies of molecular determinants underlying integrin-rgd affinity and specificity. *J Biol Chem.* 2007;282:6743-6751.

140. Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY, Dietz HC. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114:172-181.
141. Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *Lancet*. 2005;366:1965-1976.
142. Kaartinen V, Warburton D. Fibrillin controls TGF-beta activation. *Nat Genet*. 2003;33:331-332.
143. Kahari VM, Olsen DR, Rhudy RW, Carrillo P, Chen YQ, Uitto J. Transforming growth factor-beta up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts. Evidence for post-transcriptional modulation. *Lab Invest*. 1992;66:580-588.
144. Kamoun A, Landeau JM, Godeau G, Wallach J, Duchesnay A, Pellat B, Hornebeck W. Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides. *Cell Adhes Commun*. 1995;3:273-281.
145. Kanzaki T, Otabe M. Latent transforming growth factor-beta binding protein-1, a component of latent transforming growth factor-beta complex, accelerates the migration of aortic smooth muscle cells in diabetic rats through integrin-beta3. *Diabetes*. 2003;52:824-828.
146. Karnik SK, Brooke BS, Bayes-Genis A, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS, Keating MT, Li DY. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development*. 2003;130:411-423.
147. Kelleher CM, McLean SE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and aortic development. *Curr Top Dev Biol*. 2004;62:153-188.
148. Kenagy RD, Min SK, Clowes AW, Sandy JD. Cell Death-associated ADAMTS4 and Versican Degradation in Vascular Tissue. *J Histochem Cytochem*. 2009;57:889-897.
149. Kenagy RD, Plaas AH, Wight TN. Versican degradation and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16:209-215.

150. Kielty CM. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med*. 2006;8:1-23.
151. Kielty CM, Baldock C, Lee D, Rock MJ, Ashworth JL, Shuttleworth CA. Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002;357:207-217.
152. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci*. 2002;115:2817-2828.
153. Kielty CM, Whittaker SP, Grant ME, Shuttleworth CA. Attachment of human vascular smooth muscles cells to intact microfibrillar assemblies of collagen VI and fibrillin. *J Cell Sci*. 1992;103 (Pt 2):445-451.
154. Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin $\alpha 5\beta 1$ with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol*. 2000;156:1345-1362.
155. Kim S, Harris M, Varner JA. Regulation of integrin $\alpha v\beta 3$ -mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin $\alpha 5\beta 1$ and protein kinase A. *J Biol Chem*. 2000;275:33920-33928.
156. Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sullivan CM, Edwards EM, Sommer P, Csiszar K, Hendrix MJ. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2002;62:4478-4483.
157. Kobayashi N, Kostka G, Garbe JH, Keene DR, Bachinger HP, Hanisch FG, Markova D, Tsuda T, Timpl R, Chu ML, Sasaki T. A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization. *J Biol Chem*. 2007;282:11805-11816.
158. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, Pearce WH. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol*. 1990;137:1199-1213.

159. Kostka G, Giltay R, Bloch W, Addicks K, Timpl R, Fassler R, Chu ML. Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of fibulin-1-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2001;21:7025-7034.
160. Kozel BA, Rongish BJ, Czirok A, Zach J, Little CD, Davis EC, Knutsen RH, Wagenseil JE, Levy MA, Mecham RP. Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *J Cell Physiol*. 2006;207:87-96.
161. Kuivaniemi H, Platsoucas CD, Tilson MD, 3rd. Aortic aneurysms: an immune disease with a strong genetic component. *Circulation*. 2008;117:242-252.
162. Kuo CL, Isogai Z, Keene DR, Hazeki N, Ono RN, Sengle G, Bachinger HP, Sakai LY. Effects of fibrillin-1 degradation on microfibril ultrastructure. *J Biol Chem*. 2007;282:4007-4020.
163. Kuo CL, Isogai Z, Keene DR, Hazeki N, Ono RN, Sengle G, Peter Bachinger H, Sakai LY. Effects of fibrillin-1 degradation on microfibril ultrastructure. *J Biol Chem*. 2007;282:4007-4020.
164. Lafferty K, McLean L, Salisbury J, Cotton LT. Ruptured abdominal aortic aneurysm in Marfan's syndrome. *Postgrad Med J*. 1987;63:685-687.
165. Lee B, Godfrey M, Vitale E, Hori H, Mattei MG, Sarfarazi M, Tsipouras P, Ramirez F, Hollister DW. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature*. 1991;352:330-334.
166. Lee SS, Knott V, Jovanovic J, Harlos K, Grimes JM, Choulier L, Mardon HJ, Stuart DI, Handford PA. Structure of the integrin binding fragment from fibrillin-1 gives new insights into microfibril organization. *Structure*. 2004;12:717-729.
167. Legate KR, Fassler R. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci*. 2009;122:187-198.

168. Legate KR, Wickstrom SA, Fassler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 2009;23:397-418.
169. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, Eichwald E, Keating MT. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature.* 1998;393:276-280.
170. Li DY, Faury G, Taylor DG, Davis EC, Boyle WA, Mecham RP, Stenzel P, Boak B, Keating MT. Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *J Clin Invest.* 1998;102:1783-1787.
171. Li DY, Toland AE, Boak BB, Atkinson DL, Ensing GJ, Morris CA, Keating MT. Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supralvalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet.* 1997;6:1021-1028.
172. Li S, Harrison D, Carbonetto S, Fassler R, Smyth N, Edgar D, Yurchenco PD. Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol.* 2002;157:1279-1290.
173. Lillie MA, David GJ, Gosline JM. Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue. *Connect Tissue Res.* 1998;37:121-141.
174. Liu JM, Davidson JM. The elastogenic effect of recombinant transforming growth factor-beta on porcine aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;154:895-901.
175. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, Yanagisawa H, Zuo J, Li T. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet.* 2004;36:178-182.
176. Loeys B, Van Maldergem L, Mortier G, Coucke P, Gerniers S, Naeyaert JM, De Paepe A. Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (FBLN5) results in a severe form of cutis laxa. *Hum Mol Genet.* 2002;11:2113-2118.

177. Lomas AC, Mellody KT, Freeman LJ, Bax DV, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibulin-5 binds human smooth-muscle cells through $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ integrins, but does not support receptor activation. *Biochem J.* 2007;405:417-428.
178. Lopes KR, Delezoide AL, Baumann C, Vuillard E, Luton D, Chitrit Y, Azancot A. Prenatal Marfan syndrome: report of one case and review of the literature. *Prenat Diagn.* 2006;26:696-699.
179. Lu Y, Sherratt MJ, Wang MC, Baldock C. Tissue specific differences in fibrillin microfibrils analysed using single particle image analysis. *J Struct Biol.* 2006;155:285-293.
180. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:2304-2316.
181. Maki JM, Rasanen J, Tikkanen H, Sormunen R, Makikallio K, Kivirikko KI, Soininen R. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation.* 2002;106:2503-2509.
182. Marin-Manzano E, Gonzalez-de-Olano D, Haurie-Girelli J, Herraiz-Sarachaga JJ, Bermudez-Canete R, Tamariz-Martel A, Cuesta-Gimeno C, Perez-de-Leon J. Idiopathic thoracic aortic aneurysm at pediatric age. *Ann Vasc Surg.* 2009;23:258 e219-221.
183. Markova D, Zou Y, Ringpfeil F, Sasaki T, Kostka G, Timpl R, Uitto J, Chu ML. Genetic heterogeneity of cutis laxa: a heterozygous tandem duplication within the fibulin-5 (*FBLN5*) gene. *Am J Hum Genet.* 2003;72:998-1004.
184. Marque V, Kieffer P, Gayraud B, Lartaud-Idjouadiene I, Ramirez F, Atkinson J. Aortic wall mechanics and composition in a transgenic mouse model of Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1184-1189.
185. McConnell CJ, DeMont ME, Wright GM. Microfibrils provide non-linear elastic behaviour in the abdominal artery of the lobster *Homarus americanus*. *J Physiol.* 1997;499 (Pt 2):513-526.

186. McGowan SE, Doro MM, Jackson SK. Endogenous retinoids increase perinatal elastin gene expression in rat lung fibroblasts and fetal explants. *Am J Physiol.* 1997;273:L410-416.
187. McGowan SE, Holmes AJ, Mecham RP, Ritty TM. Arg-Gly-Asp-containing domains of fibrillins-1 and -2 distinctly regulate lung fibroblast migration. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38:435-445.
188. McLaughlin PJ, Bakall B, Choi J, Liu Z, Sasaki T, Davis EC, Marmorstein AD, Marmorstein LY. Lack of fibulin-3 causes early aging and herniation, but not macular degeneration in mice. *Hum Mol Genet.* 2007;16:3059-3070.
189. McLaughlin PJ, Chen Q, Horiguchi M, Starcher BC, Stanton JB, Broekelmann TJ, Marmorstein AD, McKay B, Mecham R, Nakamura T, Marmorstein LY. Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol.* 2006;26:1700-1709.
190. Merla G, Howald C, Henrichsen CN, Lyle R, Wyss C, Zobot MT, Antonarakis SE, Reymond A. Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. *Am J Hum Genet.* 2006;79:332-341.
191. Metcalfe K, Rucka AK, Smoot L, Hofstadler G, Tuzler G, McKeown P, Siu V, Rauch A, Dean J, Dennis N, Ellis I, Reardon W, Cytrynbaum C, Osborne L, Yates JR, Read AP, Donnai D, Tassabehji M. Elastin: mutational spectrum in supravalvular aortic stenosis. *Eur J Hum Genet.* 2000;8:955-963.
192. Michaelides M, Jenkins SA, Brantley MA, Jr., Andrews RM, Waseem N, Luong V, Gregory-Evans K, Bhattacharya SS, Fitzke FW, Webster AR. Maculopathy due to the R345W substitution in fibulin-3: distinct clinical features, disease variability, and extent of retinal dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3085-3097.
193. Milewicz DM, Guo DC, Tran-Fadulu V, Lafont AL, Papke CL, Inamoto S, Kwartler CS, Pannu H. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: focus on smooth muscle cell contractile dysfunction. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:283-302.

194. Milewicz DM, Michael K, Fisher N, Coselli JS, Markello T, Biddinger A. Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms. *Circulation*. 1996;94:2708-2711.
195. Milewicz DM, Pyeritz RE, Crawford ES, Byers PH. Marfan syndrome: defective synthesis, secretion, and extracellular matrix formation of fibrillin by cultured dermal fibroblasts. *J Clin Invest*. 1992;89:79-86.
196. Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, Abifadel M, Harada N, Morisaki T, Allard D, Varret M, Claustres M, Morisaki H, Ihara M, Kinoshita A, Yoshiura K, Junien C, Kajii T, Jondeau G, Ohta T, Kishino T, Furukawa Y, Nakamura Y, Niiikawa N, Boileau C, Matsumoto N. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet*. 2004;36:855-860.
197. Mochizuki S, Brassart B, Hinek A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2002;277:44854-44863.
198. Munaron L. Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. *Recent Patents Anticancer Drug Discov*. 2006;1:105-119.
199. Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension*. 2005;46:454-462.
200. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross Jr J, Honjo T, Chien KR. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature*. 2002;415:171-175.
201. Nataatmadja M, West J, West M. Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm. *Circulation*. 2006;114:I371-377.

202. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003;33:407-411.
203. Ng CM, Cheng A, Myers LA, Martinez-Murillo F, Jie C, Bedja D, Gabrielson KL, Hausladen JM, Mecham RP, Judge DP, Dietz HC. TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1586-1592.
204. Noblesse E, Cenizo V, Bouez C, Borel A, Gleyzal C, Peyrol S, Jacob MP, Sommer P, Damour O. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J Invest Dermatol.* 2004;122:621-630.
205. Nollen GJ, van Schijndel KE, Timmermans J, Groenink M, Barentsz JO, van der Wall EE, Stoker J, Mulder BJ. Pulmonary artery root dilatation in Marfan syndrome: quantitative assessment of an unknown criterion. *Heart.* 2002;87:470-471.
206. Ohno-Jinno A, Isogai Z, Yoneda M, Kasai K, Miyaishi O, Inoue Y, Kataoka T, Zhao JS, Li H, Takeyama M, Keene DR, Sakai LY, Kimata K, Iwaki M, Zako M. Versican and fibrillin-1 form a major hyaluronan-binding complex in the ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2870-2877.
207. Oliveira-Ferrer L, Hauschild J, Fiedler W, Bokemeyer C, Nippgen J, Celik I, Schuch G. Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008;27:86.
208. Olson TM, Michels VV, Lindor NM, Pastores GM, Weber JL, Schaid DJ, Driscoll DJ, Feldt RH, Thibodeau SN. Autosomal dominant supravalvular aortic stenosis: localization to chromosome 7. *Hum Mol Genet.* 1993;2:869-873.
209. Olson TM, Michels VV, Urban Z, Csiszar K, Christiano AM, Driscoll DJ, Feldt RH, Boyd CD, Thibodeau SN. A 30 kb deletion within the elastin gene results in familial supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1677-1679.

210. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1-13.
211. Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G, De Windt LJ, Ludosky MA, Paulin D, Daegelen D, Tuil D, Li Z. Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation.* 2005;112:2930-2939.
212. Partridge SM, Elsdon DF, Thomas J. Constitution of the cross-linkages in elastin. *Nature.* 1963;197:1297-1298.
213. Partridge SM, Elsdon DF, Thomas J, Dorfman A, Telser A, Ho PL. Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin. *Biochem J.* 1964;93:30C-33C.
214. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* 2000;50:1-15.
215. Penner AS, Rock MJ, Kielty CM, Shipley JM. Microfibril-associated glycoprotein-2 interacts with fibrillin-1 and fibrillin-2 suggesting a role for MAGP-2 in elastic fiber assembly. *J Biol Chem.* 2002;277:35044-35049.
216. Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, Byers PH. Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type. *N Engl J Med.* 2000;342:673-680.
217. Pereira L, Andrikopoulos K, Tian J, Lee SY, Keene DR, Ono R, Reinhardt DP, Sakai LY, Biery NJ, Bunton T, Dietz HC, Ramirez F. Targeting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet.* 1997;17:218-222.
218. Pereira L, D'Alessio M, Ramirez F, Lynch JR, Sykes B, Pangilinan T, Bonadio J. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet.* 1993;2:1762.

219. Pezet M. Exploration fonctionnelle du système cardiovasculaire de souris invalidées pour le gène de l'élastine (Eln+/- et Eln-/-). Etude au cours du développement et du vieillissement. Laboratoire Développement et Vieillesse de l'Endothélium (EMI INSERM-0219). Grenoble: Université Joseph Fourier-Grenoble1; 2006.
220. Pezet M, Jacob MP, Escoubet B, Gheduzzi D, Tillet E, Perret P, Huber P, Quaglino D, Vranckx R, Li DY, Starcher B, Boyle WA, Mecham RP, Faury G. Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta. *Rejuvenation Res.* 2008;11:97-112.
221. Pfaff M, Reinhardt DP, Sakai LY, Timpl R. Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1. *FEBS Lett.* 1996;384:247-250.
222. Pierce RA, Mariencheck WI, Sandefur S, Crouch EC, Parks WC. Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. *Am J Physiol.* 1995;268:L491-500.
223. Pierce RA, Moore CH, Arikian MC. Positive transcriptional regulatory element located within exon 1 of elastin gene. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291:L391-399.
224. Pober BR, Johnson M, Urban Z. Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *J Clin Invest.* 2008;118:1606-1615.
225. Porst M, Daniel C, Plank C, Schocklmann HO, Reinhardt DP, Hartner A. Induction and coexpression of latent transforming growth factor beta-binding protein-1 and fibrillin-1 in experimental glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol.* 2006;102:e99-104.
226. Porst M, Plank C, Bieritz B, Konik E, Fees H, Dotsch J, Hilgers KF, Reinhardt DP, Hartner A. Fibrillin-1 regulates mesangial cell attachment, spreading, migration and proliferation. *Kidney Int.* 2006;69:450-456.
227. Preis M, Cohen T, Sarnatzki Y, Ben Yosef Y, Schneiderman J, Gluzman Z, Koren B, Lewis BS, Shaul Y, Flugelman MY. Effects of fibulin-5 on attachment, adhesion, and proliferation of primary human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348:1024-1033.

228. Qiu H, Depre C, Ghosh K, Resuello RG, Natividad FF, Rossi F, Peppas A, Shen YT, Vatner DE, Vatner SF. Mechanism of gender-specific differences in aortic stiffness with aging in nonhuman primates. *Circulation*. 2007;116:669-676.
229. Quondamatteo F, Reinhardt DP, Charbonneau NL, Pophal G, Sakai LY, Herken R. Fibrillin-1 and fibrillin-2 in human embryonic and early fetal development. *Matrix Biol*. 2002;21:637-646.
230. Raghunath M, Kielty CM, Steinmann B. Truncated profibrillin of a Marfan patient is of apparent similar size as fibrillin: intracellular retention leads to over-N-glycosylation. *J Mol Biol*. 1995;248:901-909.
231. Ramaswamy P, Lytrivi ID, Nguyen K, Gelb BD. Neonatal Marfan syndrome: in utero presentation with aortic and pulmonary artery dilatation and successful repair of an acute flail mitral valve leaflet in infancy. *Pediatr Cardiol*. 2006;27:763-765.
232. Reinboth B, Hanssen E, Cleary EG, Gibson MA. Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J Biol Chem*. 2002;277:3950-3957.
233. Reinhardt DP, Gambie JE, Ono RN, Bachinger HP, Sakai LY. Initial steps in assembly of microfibrils. Formation of disulfide-cross-linked multimers containing fibrillin-1. *J Biol Chem*. 2000;275:2205-2210.
234. Reinhardt DP, Ono RN, Notbohm H, Muller PK, Bachinger HP, Sakai LY. Mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules render fibrillin-1 susceptible to proteolysis. A potential disease-causing mechanism in Marfan syndrome. *J Biol Chem*. 2000;275:12339-12345.
235. Reinhardt DP, Sasaki T, Dzamba BJ, Keene DR, Chu ML, Gohring W, Timpl R, Sakai LY. Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J Biol Chem*. 1996;271:19489-19496.

236. Rich CB, Ewton DZ, Martin BM, Florini JR, Bashir M, Rosenbloom J, Foster JA. IGF-I regulation of elastogenesis: comparison of aortic and lung cells. *Am J Physiol.* 1992;263:L276-282.
237. Ritty TM, Broekelmann T, Tisdale C, Milewicz DM, Mecham RP. Processing of the fibrillin-1 carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem.* 1999;274:8933-8940.
238. Ritty TM, Broekelmann TJ, Werneck CC, Mecham RP. Fibrillin-1 and -2 contain heparin-binding sites important for matrix deposition and that support cell attachment. *Biochem J.* 2003;375:425-432.
239. Roach MR, Burton AC. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Can J Biochem Physiol.* 1957;35:681-690.
240. 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.
241. Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, Collod-Beroud G, Booms P, De Paepe A, Dietz HC, Guo G, Handford PA, Judge DP, Kielty CM, Loeys B, Milewicz DM, Ney A, Ramirez F, Reinhardt DP, Tiedemann K, Whiteman P, Godfrey M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet.* 2006;43:769-787.
242. Robinson PN, Booms P. The molecular pathogenesis of the Marfan syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58:1698-1707.
243. Rodgers UR, Weiss AS. Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie.* 2004;86:173-178.
244. Rodriguez-Revenga L, Iranzo P, Badenas C, Puig S, Carrio A, Mila M. A novel elastin gene mutation resulting in an autosomal dominant form of cutis laxa. *Arch Dermatol.* 2004;140:1135-1139.

245. Rongish BJ, Drake CJ, Argraves WS, Little CD. Identification of the developmental marker, JB3-antigen, as fibrillin-2 and its de novo organization into embryonic microfibrillar arrays. *Dev Dyn*. 1998;212:461-471.
246. Rosenbloom J, Bashir M, Yeh H, Rosenbloom J, Ornstein-Goldstein N, Fazio M, Kahari VM, Uitto J. Regulation of elastin gene expression. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;624:116-136.
247. Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbil V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. 2005;111:1738-1746.
248. Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:1135-1157.
249. Sadler LS, Pober BR, Grandinetti A, Scheiber D, Fekete G, Sharma AN, Urban Z. Differences by sex in cardiovascular disease in Williams syndrome. *J Pediatr*. 2001;139:849-853.
250. Safar ME, Boudier HS. Vascular development, pulse pressure, and the mechanisms of hypertension. *Hypertension*. 2005;46:205-209.
251. Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol*. 1986;103:2499-2509.
252. Sakai LY, Keene DR, Glanville RW, Bachinger HP. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J Biol Chem*. 1991;266:14763-14770.
253. Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresch DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem*. 1996;271:4916-4922.

254. Santavy P, Cermak M, Hajek R, Fabikova K, Novotny J, Nemec P. [Dissecting aortic aneurysm at Marfan syndrome--case report]. *Rozhl Chir.* 2007;86:359-362.
255. Schmidt MA, Ensing GJ, Michels VV, Carter GA, Hagler DJ, Feldt RH. Autosomal dominant supraaortic stenosis: large three-generation family. *Am J Med Genet.* 1989;32:384-389.
256. Schreiber MM, Tilley JC. Cutis laxa. *Arch Dermatol.* 1961;84:266-272.
257. Schrijver I, Liu W, Brenn T, Furthmayr H, Francke U. Cysteine substitutions in epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1: distinct effects on biochemical and clinical phenotypes. *Am J Hum Genet.* 1999;65:1007-1020.
258. Sechler JL, Rao H, Cumiskey AM, Vega-Colon I, Smith MS, Murata T, Schwarzbauer JE. A novel fibronectin binding site required for fibronectin fibril growth during matrix assembly. *J Cell Biol.* 2001;154:1081-1088.
259. Segura AM, Luna RE, Horiba K, Stetler-Stevenson WG, McAllister HA, Jr., Willerson JT, Ferrans VJ. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation.* 1998;98:II331-337; discussion II337-338.
260. Sengle G, Charbonneau NL, Ono RN, Sasaki T, Alvarez J, Keene DR, Bachinger HP, Sakai LY. Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J Biol Chem.* 2008;283:13874-13888.
261. Shadwick RE. Mechanical design in arteries. *J Exp Biol.* 1999;202:3305-3313.
262. Sherratt MJ, Wess TJ, Baldock C, Ashworth J, Purslow PP, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-rich microfibrils of the extracellular matrix: ultrastructure and assembly. *Micron.* 2001;32:185-200.

263. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113:685-700.
264. Shifren A, Durmowicz AG, Knutsen RH, Faury G, Mecham RP. Elastin insufficiency predisposes to elevated pulmonary circulatory pressures through changes in elastic artery structure. *J Appl Physiol*. 2008;105:1610-1619.
265. Shipley JM, Mecham RP, Maus E, Bonadio J, Rosenbloom J, McCarthy RT, Baumann ML, Frankfater C, Segade F, Shapiro SD. Developmental expression of latent transforming growth factor beta binding protein 2 and its requirement early in mouse development. *Mol Cell Biol*. 2000;20:4879-4887.
266. Sicot FX, Tsuda T, Markova D, Klement JF, Arita M, Zhang RZ, Pan TC, Mecham RP, Birk DE, Chu ML. Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation. *Mol Cell Biol*. 2008;28:1061-1067.
267. Singh KK, Rommel K, Mishra A, Karck M, Haverich A, Schmidtke J, Arslan-Kirchner M. TGFBR1 and TGFBR2 mutations in patients with features of Marfan syndrome and Loeys-Dietz syndrome. *Hum Mutat*. 2006;27:770-777.
268. Sinha S, Heagerty AM, Shuttleworth CA, Kielty CM. Expression of latent TGF-beta binding proteins and association with TGF-beta 1 and fibrillin-1 following arterial injury. *Cardiovasc Res*. 2002;53:971-983.
269. Smith JJ KJ. *Circulatory Physiology. The essentials*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990.
270. Sokolis DP, Boudoulas H, Kavantzias NG, Kostomitsopoulos N, Agapitos EV, Karayannacos PE. A morphometric study of the structural characteristics of the aorta in pigs using an image analysis method. *Anat Histol Embryol*. 2002;31:21-30.
271. Sonesson B, Hansen F, Lanne T. Abnormal mechanical properties of the aorta in Marfan's syndrome. *Eur J Vasc Surg*. 1994;8:595-601.

272. Sood S, Eldadah ZA, Krause WL, McIntosh I, Dietz HC. Mutation in fibrillin-1 and the Marfanoid-craniosynostosis (Shprintzen-Goldberg) syndrome. *Nat Genet.* 1996;12:209-211.
273. Spina M, Garbisa S, Hinnie J, Hunter JC, Serafini-Fracassini A. Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis.* 1983;3:64-76.
274. Stamm C, Friehs I, Ho SY, Moran AM, Jonas RA, del Nido PJ. Congenital supraaortic stenosis: a simple lesion? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001;19:195-202.
275. Starcher B, Conrad M. A role for neutrophil elastase in the progression of solar elastosis. *Connect Tissue Res.* 1995;31:133-140.
276. Sterner-Kock A, Thorey IS, Koli K, Wempe F, Otte J, Bangsow T, Kuhlmeier K, Kirchner T, Jin S, Keski-Oja J, von Melchner H. Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes Dev.* 2002;16:2264-2273.
277. Stheneur C, Collod-Beroud G, Faivre L, Gouya L, Sultan G, Le Parc JM, Moura B, Attias D, Muti C, Sznajder M, Claustres M, Junien C, Baumann C, Cormier-Daire V, Rio M, Lyonnet S, Plauchu H, Lacombe D, Chevallier B, Jondeau G, Boileau C. Identification of 23 TGFBR2 and 6 TGFBR1 gene mutations and genotype-phenotype investigations in 457 patients with Marfan syndrome type I and II, Loeys-Dietz syndrome and related disorders. *Hum Mutat.* 2008;29:E284-295.
278. Stupack DG, Cheresh DA. Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2004;64:207-238.
279. Sugi Y, Markwald RR. Formation and early morphogenesis of endocardial endothelial precursor cells and the role of endoderm. *Dev Biol.* 1996;175:66-83.

280. Swee MH, Parks WC, Pierce RA. Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. *J Biol Chem*. 1995;270:14899-14906.
281. Tassabehji M, Metcalfe K, Donnai D, Hurst J, Reardon W, Burch M, Read AP. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet*. 1997;6:1029-1036.
282. Tassabehji M, Metcalfe K, Hurst J, Ashcroft GS, Kielty CM C, Wilmot C, Donnai D, Read AP, Jones CJ. An elastin gene mutation producing abnormal tropoelastin and abnormal elastic fibres in a patient with autosomal dominant cutis laxa. *Hum Mol Genet*. 1998;7:1021-1028.
283. Thompson RW. Reflections on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Surg*. 2002;10:389-394.
284. Thurmond F, Trotter J. Morphology and biomechanics of the microfibrillar network of sea cucumber dermis. *J Exp Biol*. 1996;199:1817-1828.
285. Tiedemann K, Batge B, Muller PK, Reinhardt DP. Interactions of fibrillin-1 with heparin/heparan sulfate, implications for microfibrillar assembly. *J Biol Chem*. 2001;276:36035-36042.
286. Timpl R, Sasaki T, Kostka G, Chu ML. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:479-489.
287. Todorovic V, Friendewey D, Gutstein DE, Chen Y, Freyer L, Finnegan E, Liu F, Murphy A, Valenzuela D, Yancopoulos G, Rifkin DB. Long form of latent TGF-beta binding protein 1 (Ltbp1L) is essential for cardiac outflow tract septation and remodeling. *Development*. 2007;134:3723-3732.
288. Toonkool P, Regan DG, Kuchel PW, Morris MB, Weiss AS. Thermodynamic and hydrodynamic properties of human tropoelastin. Analytical ultracentrifuge and pulsed field-gradient spin-echo NMR studies. *J Biol Chem*. 2001;276:28042-28050.

289. Tsoporis J, Keeley FW, Lee RM, Leenen FH. Arterial vasodilation and vascular connective tissue changes in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:960-962.
290. Tsuruga E, Sato A, Ueki T, Nakashima K, Nakatomi Y, Ishikawa H, Yajima T, Sawa Y. Integrin α v β 3 regulates microfibril assembly in human periodontal ligament cells. *Tissue Cell.* 2009;41:85-89.
291. Urban Z, Michels VV, Thibodeau SN, Davis EC, Bonnefont JP, Munnich A, Eyskens B, Gewillig M, Devriendt K, Boyd CD. Isolated supravulvular aortic stenosis: functional haploinsufficiency of the elastin gene as a result of nonsense-mediated decay. *Hum Genet.* 2000;106:577-588.
292. Urban Z, Michels VV, Thibodeau SN, Donis-Keller H, Csiszar K, Boyd CD. Supravulvular aortic stenosis: a splice site mutation within the elastin gene results in reduced expression of two aberrantly spliced transcripts. *Hum Genet.* 1999;104:135-142.
293. Urban Z, Riazzi S, Seidl TL, Katahira J, Smoot LB, Chitayat D, Boyd CD, Hinek A. Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supravulvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002;71:30-44.
294. van Ooijen B. Marfan's syndrome and isolated aneurysm of the abdominal aorta. *Br Heart J.* 1988;59:81-84.
295. Vehvilainen P, Hyytiainen M, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta-binding protein 2 is an adhesion protein for melanoma cells. *J Biol Chem.* 2003;278:24705-24713.
296. Visconti RP, Barth JL, Keeley FW, Little CD. Codistribution analysis of elastin and related fibrillar proteins in early vertebrate development. *Matrix Biol.* 2003;22:109-121.

297. Vitarelli A, Conde Y, Cimino E, D'Angeli I, D'Orazio S, Stellato S, Padella V, Caranci F. Aortic wall mechanics in the Marfan syndrome assessed by transesophageal tissue Doppler echocardiography. *Am J Cardiol.* 2006;97:571-577.
298. Vollbrandt T, Tiedemann K, El-Hallous E, Lin G, Brinckmann J, John H, Batge B, Notbohm H, Reinhardt DP. Consequences of cysteine mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules of fibrillin-1. *J Biol Chem.* 2004;279:32924-32931.
299. Wagenseil JE, Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2007;81:229-240.
300. Wallace RN, Streeten BW, Hanna RB. Rotary shadowing of elastic system microfibrils in the ocular zonule, vitreous, and ligamentum nuchae. *Curr Eye Res.* 1991;10:99-109.
301. Wang MC, Lu Y, Baldock C. Fibrillin Microfibrils: A Key Role for the Interbead Region in Elasticity. *J Mol Biol.* 2009.
302. Whiteman P, Handford PA. Defective secretion of recombinant fragments of fibrillin-1: implications of protein misfolding for the pathogenesis of Marfan syndrome and related disorders. *Hum Mol Genet.* 2003;12:727-737.
303. Wiesner S, Legate KR, Fassler R. Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:1081-1099.
304. Williams JC, Barratt-Boyes BG, Lowe JB. Supravalvular aortic stenosis. *Circulation.* 1961;24:1311-1318.
305. Williamson MR, Shuttleworth A, Canfield AE, Black RA, Kielty CM. The role of endothelial cell attachment to elastic fibre molecules in the enhancement of monolayer formation and retention, and the inhibition of smooth muscle cell recruitment. *Biomaterials.* 2007;28:5307-5318.

306. Wilson DG, Bellamy MF, Ramsey MW, Goodfellow J, Brownlee M, Davies S, Wilson JF, Lewis MJ, Stuart AG. Endothelial function in Marfan syndrome: selective impairment of flow-mediated vasodilation. *Circulation*. 1999;99:909-915.
307. Wise SG, Weiss AS. Tropoelastin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:494-497.
308. Wolfgarten B, Kruger I, Gawenda M. Rare manifestation of abdominal aortic aneurysm and popliteal aneurysm in a patient with Marfan's syndrome: a case report. *Vasc Surg*. 2001;35:81-84.
309. Wunsch AM, Little CD, Markwald RR. Cardiac endothelial heterogeneity defines valvular development as demonstrated by the diverse expression of JB3, an antigen of the endocardial cushion tissue. *Dev Biol*. 1994;165:585-601.
310. Xiong W, Knispel RA, Dietz HC, Ramirez F, Baxter BT. Doxycycline delays aneurysm rupture in a mouse model of Marfan syndrome. *J Vasc Surg*. 2008;47:166-172; discussion 172.
311. Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature*. 2002;415:168-171.
312. Zacchigna L, Vecchione C, Notte A, Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Cifelli G, Ferrari A, Maffei A, Fabbro C, Braghetta P, Marino G, Selvetella G, Aretini A, Colonnese C, Bettarini U, Russo G, Soligo S, Adorno M, Bonaldo P, Volpin D, Piccolo S, Lembo G, Bressan GM. Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*. 2006;124:929-942.
313. Zanetti M, Braghetta P, Sabatelli P, Mura I, Doliana R, Colombatti A, Volpin D, Bonaldo P, Bressan GM. EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol Cell Biol*. 2004;24:638-650.

314. Zhang H, Apfelroth SD, Hu W, Davis EC, Sanguineti C, Bonadio J, Mecham RP, Ramirez F. Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J Cell Biol.* 1994;124:855-863.
315. Zhang H, Hu W, Ramirez F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol.* 1995;129:1165-1176.
316. Zhang MC, He L, Giro M, Yong SL, Tiller GE, Davidson JM. Cutis laxa arising from frameshift mutations in exon 30 of the elastin gene (ELN). *J Biol Chem.* 1999;274:981-986.
317. Zhou Y, Koli K, Hagood JS, Miao M, Mavalli M, Rifkin DB, Murphy-Ullrich JE. Latent transforming growth factor-beta-binding protein-4 regulates transforming growth factor-beta1 bioavailability for activation by fibrogenic lung fibroblasts in response to bleomycin. *Am J Pathol.* 2009;174:21-33.

V. ANNEXES

V.1. Article annexe 1

Andres E, Molinari J, Peterszegi G, Mariko B, Ruszova E, Velebny V, Faury G, Robert L: Pharmacological properties of rhamnose-rich polysaccharides, potential interest in age-dependent alterations of connectives tissues. *Pathol Biol (Paris)* 2006; 54:420-425.

Pharmacological properties of rhamnose-rich polysaccharides, potential interest in age-dependent alterations of connectives tissues

Propriétés pharmacologiques des polysaccharides riches en rhamnose et intérêt potentiel dans les altérations des tissus conjonctifs relatives à l'âge

E. Andrès^{a,1}, J. Molinari^{a,1}, G. Péterszegi^a, B. Mariko^b, E. Ruszova^c, V. Velebny^c
G. Faury^b, L. Robert^{a,*}

^a Laboratoire de recherches ophtalmologiques, Hôtel-Dieu, université Paris-VI, 1, place Parvis-Notre-Dame, 75181 Paris cedex 04, France

^b Laboratoire de développement et vieillissement de l'endothélium, Inserm EMI 0219/université Joseph-Fourier/CEA, DRDC, CEA, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France

^c Laboratory of Dermal Applications, R and D Department, Contipro Group, Dolni Dobrouc 401, 56102 Dolni Dobrouc, Czech Republic

Available online 21 August 2006

Abstract

Rhamnose-rich oligo- and polysaccharides (RROPs) were tested for their potential pharmacological properties using human skin fibroblasts in serial cultures. The substances tested were shown to stimulate cell proliferation, decrease elastase-type activity, stimulate collagen biosynthesis, and protect hyaluronan against free radical mediated degradation. These reactions appear to be triggered by the mediation of a specific α -L-rhamnose recognizing lectin-site acting as a receptor, transmitting signals to the cell-interior. The rapid increase of intracellular free calcium after addition of RROP-1 and preliminary data using micro arrays appear also to confirm this contention.

© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Les oligo- et polysaccharides riches en rhamnose (RROPs) ont été testés pour leurs propriétés pharmacologiques avec des fibroblastes de peau humaine cultivés en série. Des activités biologiques comme la stimulation de la prolifération, la diminution de l'activité élastasique et la protection de l'acide hyaluronique contre sa dégradation face aux radicaux libres ont été mises en évidence. Ces effets biologiques semblent être induits via une lectine reconnaissant l' α -L-rhamnose spécifiquement et qui agirait comme un récepteur en transmettant des signaux à la cellule. L'augmentation rapide du calcium libre intracellulaire après ajout du RROP-1, ainsi que des données préliminaires obtenues par micropuces à ADN semblent confirmer cette hypothèse.

© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Rhamnose; Polysaccharide; Intracellular calcium; Proliferation; Elastase-type activity; ROS; Scavenging; Lectin; Microarray

Mots clés : Polysaccharides ; Rhamnose ; Calcium intracellulaire ; Prolifération ; Activité élastasique ; Captage radicalaire ; Micropuces

1. Introduction

α -L-rhamnose-rich polysaccharides, obtained from *Klebsiella* strains as well as derived oligosaccharides were tested

for their pharmacological properties. Both parent polysaccharides as well as the derived oligosaccharides are rich in α -L-rhamnose (50–60%). Rhamnose-rich oligo- and polysaccharides (RROP)-1 (Rhamnosoft®) was previously shown to possess anti-inflammatory properties triggered by cytokines, IL-1 α and TNF α released by activated keratinocytes [1,2]. This same polysaccharide reduced also the adhesion of bacteria to the skin and protected against UV-induced erythema [1]. The anti-inflammatory effect was obtained by the inhibition of adhesion of polynuclear leukocytes to keratinocytes, as well as by the inhibition of phospholipase A2 and the release of prostaglan-

Abbreviation: RROP-s, rhamnose-rich oligo- and polysaccharides.

* Corresponding author.

E-mail address: lrobert5@wanadoo.fr (L. Robert).

¹ New address from September 2006: Laboratoire de recherches NATURA, 55, avenue Victor-Hugo, 75016 Paris, France.

dins as PGE₃ [1]. RROP-1 was also shown to decrease the adhesion of bacteria to skin surface [1]. The action of RROP-s was claimed to be mediated by an α -L-rhamnose recognizing lectin-site on human skin keratinocytes by the team of Cerdan et al. [3]. As shown on Fig. 1, the keratinocyte lectin-site recognized preferentially the α -L-rhamnose containing neoglycoproteins as compared to similar glycoconjugates containing other monosaccharides such as glucose, fucose or *N*-acetyl-glucosamine [3]. This interaction was shown by the Kieda–Monsigny team to be saturable (Fig. 2) and relatively specific. There appear to be however some interferences from the α -L-fucose rich glycoproteins at least at high concentrations. Our experiments aimed to extend the above-cited findings by testing the effect of several rhamnose-rich polysaccharides and derived oligosaccharides on human skin fibroblasts using tests related to cell-functions known to decline with age. Such functions are cell proliferation, collagen biosynthesis, and free radical scavenging activity [4]. Another function tested is the increased production of elastase-type endopeptidases with chronological age [5] and cell proliferation [6]. These results will be described because of their potential interest for the treatment of age-related functional decline and related pathologies.

2. Material and methods

2.1. Polysaccharides tested

All L-rhamnose-rich oligo- and polysaccharide preparations (RROPs) were obtained from Solabia (Pantin, France). RROP-1 is obtained from *Klebsiella pneumoniae* strains. The other polysaccharide RROP-2 is obtained from *Klebsiella plancticola*.

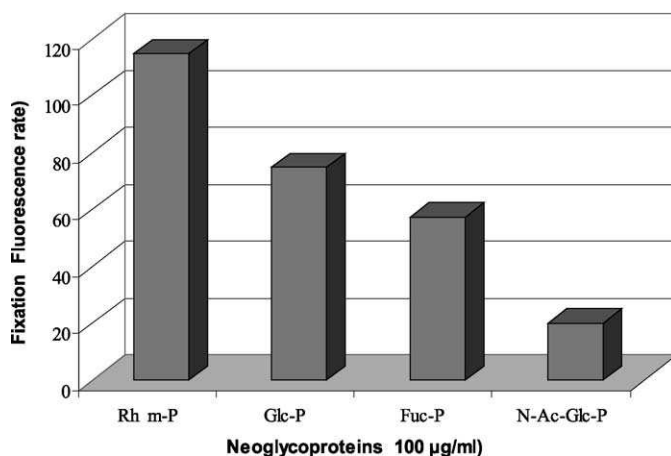


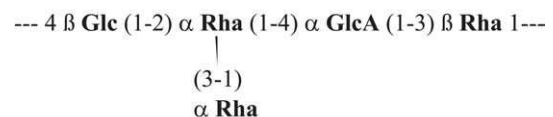
Fig. 1. Demonstration of specific recognition of α -L-rhamnose containing neoglycoproteins by a lectin-site on keratinocytes. Experiments of the Kieda–Monsigny team (reproduced from Ref. [1] with permission). (Rham-P: Rhamnose-Protein; Glc-P: Glucose-Protein; Fuc-P: Fucose-Protein; N-Ac-Glc-P: N-Acetyl-Glucose-Protein).

RROP-1 (commercial name: Rhamnosoft®) has the following structure of its repeating subunits:



It has an average molecular weight of 50 kDa with about a 50% of α -L-rhamnose content, the two other constituents are D-galactose and 3-*O*-acetyl-D-glucuronic acid.

The second polysaccharide RROP-2 (commercial name: BEC-291 polysaccharide) has the following composition of its repeating subunits:



Its average molecular weight is 45 kDa.

The oligosaccharides are obtained from these polysaccharides by acid hydrolysis, RROP-3, a 5 kDa oligosaccharide from RROP-2, RROP-4 (14.5 kDa) and RROP-5 (5 kDa) from RROP-1. These preparations were obtained as sterile, lyophilized powders and dissolved in sterile PBS at concentrations from 0.1 to 0.5 mg/ml for further use. The polysaccharide preparations were stored at -20°C .

2.2. Cell culture

The human skin fibroblasts were obtained from Cambrex (NHDF, from a 39 years old, female donor). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagles culture medium (DMEM-glutamax, Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum (FCS, Gibco), antibiotics: penicillin (100 U/ml; Gibco) and streptomycin (100 µg/ml; Gibco), and an antifongic (0.25 µg/ml Amphotericin B, Gibco). This was designated as the complete culture medium. Cells were incubated in a temperature-controlled, humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C. Cells were grown in the complete culture medium, in

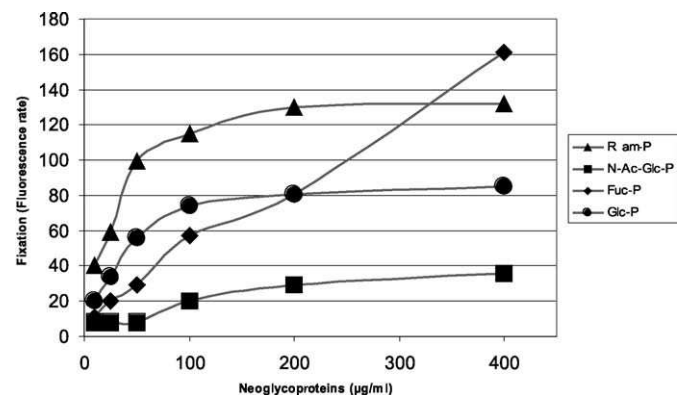


Fig. 2. Fixation of increasing concentrations of neoglycoproteins containing different monosaccharides on keratinocytes. The α -L-rhamnose-containing neoglycoprotein reaches the highest saturation density (except for fucose at the highest concentration used). Experiments of the Kieda–Monsigny team (reproduced from Ref. [1] with permission).

75 cm² surface ventilated culture flasks (Nunc) and subcultured by trypsinization (0.05% trypsin, Gibco). Culture medium was changed every 2–3 days. Cells were used between the 3rd and 19th passages for our experiments, seeded in complete culture medium in 12, 24 or 96-well culture plates, at a density of 5×10^4 cells per ml.

2.3. Cell proliferation

The MTT test was used according to the method described by Mosmann [7]. This test gives an indication of mitochondrial function and indirectly on cell number. The MTT test consists of measuring the mitochondrial succinate dehydrogenase activity of cells. This enzyme, by cutting the tetrazolium cycle, makes the yellow MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl 2H-tetrazolium bromide), turn into blue Formazan crystals. The optical densities obtained are directly proportional to the number of living cells. Therefore, the viable cells will produce an intense blue color and the dead ones a very light stain.

Electronic cell counting (Coulter Corp., Hialech, FL, USA) was performed after trypsinization of cell layer and in the culture medium to estimate cell detachment.

3. Collagen biosynthesis assays

Evaluation of collagen biosynthesis was obtained by the Sirius red staining method [8]. Cells were cultured in presence of RROP-s for 3 days and collagen accumulation was measured by spectrophotometry.

3.1. Intracellular free calcium measurements

All data were obtained and analyzed with the Olympus Cell^R microscopic system. After culture, the cells were washed with a Tyrode's buffer (NaCl 125 mM, KCl 5.6 mM, CaCl₂ 2.4 mM, MgCl₂ 1.2 mM, Hepes 10 mM, Glucose 11 mM, pH 7.4) and loaded in this same buffer in the presence of 0.5% BSA, 0.02% Pluronic F127 and 2.5 μ M Fluo 3/AM at 37 °C/5% CO₂ for 45 min, this loading protocol is derived and adapted from an original protocol using others cells [9]. This indicator detects Ca²⁺ concentration via its fluorescent spectral changes upon Ca²⁺ binding. The Fluo-3 is used in its membrane-permeable AM ester form. The AM ester of the Fluo-3 is membrane-permeable and thus can be loaded into cells by simple incubation of the cell in a buffer containing the AM ester and Pluronic F-127, a mild non-ionic detergent that can facilitate the loading of the AM ester. The AM ester itself does not bind Ca²⁺. However, once it has entered the cells, it is readily hydrolyzed by intracellular esterases into the non-AM ester form, thus becoming responsive to Ca²⁺. After loading, the cells were washed again with Tyrode's buffer and then introduced in the Cell^R microscopic system [9]. This system enables to record, as a function of time, images of the fluorescence released by the Fluo-3 probe when calcium concentration increases in the cell cytoplasm, for example, after

the addition of a well known transductional activator such as the agonist of a receptor. After acquisition, the image sequence was analyzed with a specific software that gives the kinetics of fluorescence intensity in each cell. The image acquisition rate was one image every 8 s.

3.2. Determination of elastase-type endopeptidase activity

The cells are incubated for 48 h with the plant extracts and then, their elastase activity was tested by using a chromophoric synthetic substrate, the *N*-succinyl-trialanyl-paranitroanilide (N-Suc) [10]. The hydrolysis of this substrate by elastase-type endopeptidases produces a chromogenic compound, absorbing at 410 nm. The cells were washed and the extracts recovered with a Triton $\times$ 100 1/100 treatment (500 μ l/10 min at 37 °C), then extracts were kept at –40 °C. Reaction was initiated with 100 μ l extract and 100 μ l substrate and DO at 410 nm was measured for 24 hours on a 96-well plate reader Metertech Σ 960.

3.3. Free radical scavenging assays

Free radical scavenging was determined with a previously described viscosimetric procedure [11]. Kinetics of viscosity changes of a 1 mg/ml hyaluronan solution in a rotating viscometer, alone and after addition of a highly diluted (1/1000) ascorbate–EDTA–FeCl₂ mixture, the Udenfriend reagent, were recorded. The Udenfriend reagent liberates essentially OH• radicals, which degrade rapidly hyaluronan and produce a rapid fall of its viscosity. In presence of adequate scavenging agents, this fall of viscosity is slowed down. The rotating viscometer used is from Fungilab S.A, model « Visco Basic Plus » giving directly viscosity readings in centipoises.

3.4. Assays of lectin-mediated intracellular effects

Microarrays were also used to characterize the modification of gene expression [12], only preliminary data will be given.

3.5. Statistics

All experiments were carried out with four to six parallels; significance was calculated with the Mann and Whitney distribution-free *U*-Test.

4. Results

4.1. Effect of RROPs on the biological activities of fibroblasts

Table 1 shows the results obtained with the rhamnose-rich preparations on the properties of fibroblasts such as proliferation, collagen biosynthesis, elastase-type endopeptidases activity, and free radical scavenging. The + signs for cell proliferation signify stimulation of proliferation as shown by the MTT procedure and cell counting. All these results were significant ($P < 0.001$). All the tested rhamnose-rich preparations stimu-

lated cell proliferation between + 40% for the 5 kDa RROP-5 preparation and up to + 80% for the 5 kDa RROP-3 preparation. These differences between their activity suggests that besides the rhamnose end-groups, others details of the polysaccharides structure might also play a role. Collagen biosynthesis was stimulated only by some of the preparations, strongest by the RROP-4 and somewhat less by RROP-2 and RROP-3 poly- and oligosaccharides. Curiously, elastase-type endopeptidases activity was down regulated only by the RROP-3 oligosaccharide, none of the other preparations showed significant activity. Fig. 3 shows a typical experiment showing the free radical quenching activity of some of the preparations tested. In presence of the diluted Udenfriend reagent, there is a rapid fall in viscosity because of the liberation of OH   radicals [11]. In presence of the rhamnose-rich preparations, the loss of viscosity was significantly reduced by 20–40%. Except free radical scavenging, all other activities shown on Table 1 are supposed to be mediated by intracellular mechanisms triggered by the activation of the α -L-rhamnose recognizing lectin-site detected by the team of Cerdan et al. [3]. This lectin-site functions apparently as a pharmacologically active receptor. In order to confirm this proposition, additional experiments were carried out.

Table 1
Biological activity of RROPs on parameters linked to cell and tissue aging

RROPs tested	Cell proliferation (%)	Collagen biosynthesis (%)	Elastase activity (%)	Free radical scavenging (%)
RROP-1	+60	No effect	NA	+40
RROP-2	+80	+20	NA	+40
RROP-3	+80	+20	–60	+20
RROP-4	+60	+40	NA	+40
RROP-5	+40	NT	NA	+20

NT: not tested; NA: no activity.

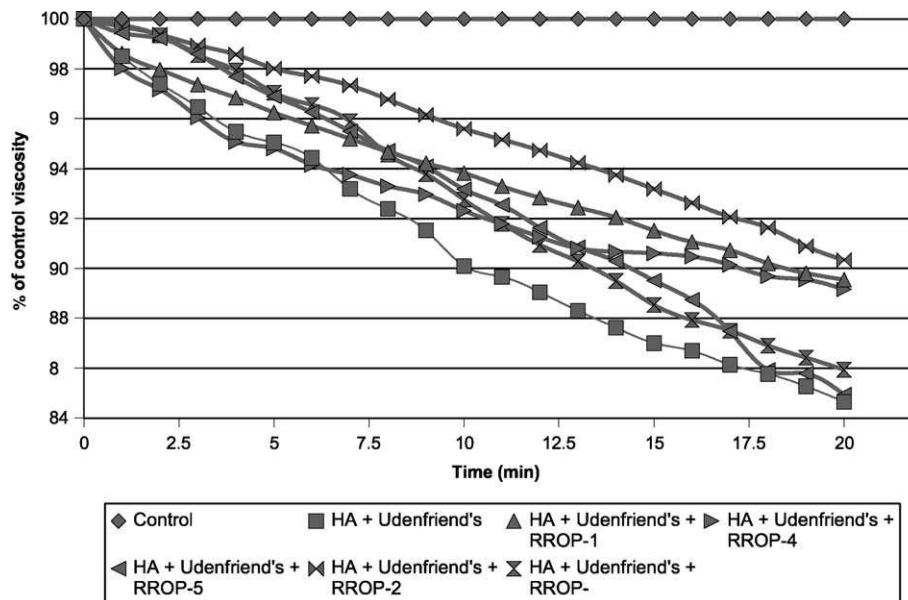


Fig. 3. Decrease of viscosity of a hyaluronan solution in presence of a free-radical generating reagent (see Section 2) and protection by RROP-s.

4.2. Effect on intracellular calcium

Fig. 4 show the response of NHDFs to stimulation by RROP-1. Fig. 4a presents the evolution over time of the fluorescence signal in the absence of RROPs, after addition of physiological solution alone for 120s. In this case, an illumination-dependent bleaching of the probe induced a slight decline of the fluorescence intensity over time, and no significant deviation from the basic signal can be seen.

By contrast to the control experiments (Fig. 4a), addition of RROP-1 (Fig. 4b) induced a rapid increase in $[Ca^{2+}]_i$ in most cells over a period of 10 min and more. One can notice that the intensity of the reaction is variable from one cell to the next: some cells hardly reacted, while others exhibited a clear increase in $[Ca^{2+}]_i$ (up to 50–100%) following addition of the rhamnose-rich-polysaccharides RROP-1. Addition of RROP-2 and RROP-3 induced similar effect (data not shown).

4.3. Effect of rhamnose-rich preparations on gene regulation

The results to be mentioned have to be considered as preliminary, experiments are still actively performed in order to control and substantiate the most crucial results [12]. It is however quite logical that the above presented biological activities are hard to understand without a signal transmission from the agonist-activated lectin-site to the cell interior. A “crosstalk” had to be assumed between the rhamnose-recognizing lectin-site and the regulatory pathways controlling cell proliferation, collagen biosynthesis and for RROP-3, MMP expression and regulation [13]. Some of the preliminary results obtained by the microarrays experiments are shown on Fig. 5 and Table 2. Fig. 5 shows the scattergram for gene-up or down regulations by the RROP-3 oligosaccharide. Table 2 shows the most important modifications of genes expression by two concentrations of RROP-1 and by RROP-3. These preliminary results

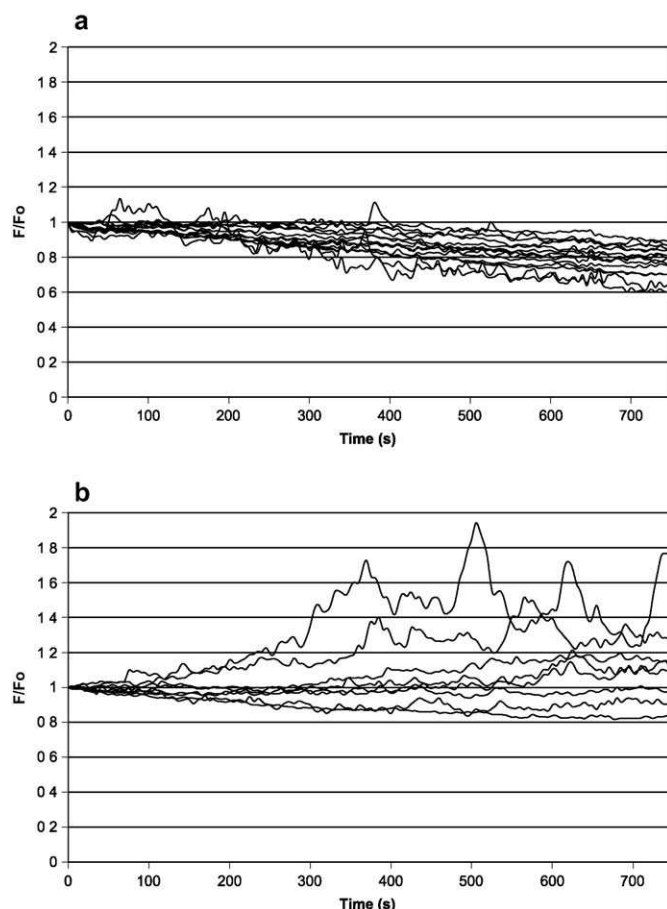


Fig. 4. **A.** Variation of fluorescence in individual fibroblasts as a sign of oscillation of intracellular free calcium (control). **B.** Variation of fluorescence in individual fibroblasts as a sign of oscillation of intracellular free calcium after addition of 10 µg/ml of RROP-1.

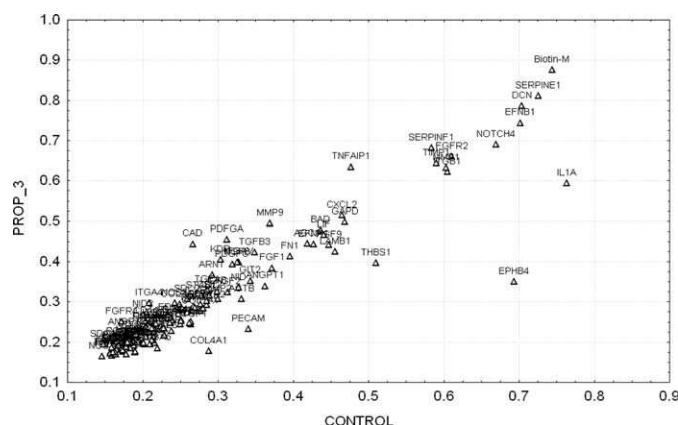


Fig. 5. Scatter plot obtained by microarrays experiments [12] showing the modulation of expression of certain genes by RROP-3.

tend to confirm the above contention by showing the modification of expression of several key-genes involved in the regulation of cell proliferation and of some cytokines involved in the inflammatory pathway. If confirmed by the ongoing control experiments, a more detailed description of the intracellular

Table 2

Microarrays experiments showing the modification of gene expression profiles by RROPs used at 10 or 100 µg/ml. Upregulation is indicated by +, down regulation by –, and intensity is expressed as % modification as compared to controls [12]

Gene	RROP-1 (10 ug/ml)	RROP-1 (100 ug/ml)	RROP-3 (100 ug/ml)
<i>Nidogen2</i>		+150	+134
<i>MMP-9</i>		+150	+134
<i>LIF</i>		–69	
<i>LAMÉ</i>	–68	–65	–65
<i>PECAM</i>	–66	–65	
<i>TSP-1</i>	–64	–65	
<i>EphrinB</i>	–48	–48	–50
<i>PDGFA</i>			+145
<i>INT��4</i>			+142
<i>CAD</i>			+167
<i>FGFR-4</i>			+146
<i>VEGFR</i>			+133

MMP: matrix metallo-proteinase; *LIF*: lymphocyte inducing factor; *LAMÉ*: laminin   ; *PECAM*: platelet endothelial cell adhesion molecule; *TSP*: thrombospondin; *PDGF*: platelet derived growth factor; *INT  4*: integrin   ; *FGFR*: fibroblast grow factor receptor; *VEGFR*: vascular epithelial grow factor receptor.

transmission pathways of the   -L-rhamnose recognizing receptor will become available.

5. Discussion

The above-described results strongly suggest that the   -L-rhamnose recognizing lectin-site detected first on keratinocytes [3] is present on human skin fibroblasts also. They also show that the addition of the RROPs to fibroblast cultures induced several modifications of cell behavior. The most interesting effect, as far as the pharmacological activities of these preparations are concerned, are their effect on cell proliferation and collagen biosynthesis (Table 1). All five preparations were active in these tests. Only RROP-3, a 5 kDa derivative from the RROP-2 polysaccharide showed activity on the down-regulation of elastase-type endopeptidases. Interestingly, this preparation turned out to be the most active in the microarray experiments also (Fig. 5). All the preparations tested protected hyaluronan against free radical mediated degradation. This effect might be attributed to the preferential attraction of free radicals to the rhamnose-rich polysaccharides, protecting thus hyaluronan from degradation. It is however also possible that the rhamnose-rich preparations increase the scavenging potential of cells against free radical damage, this hypothesis deserves to be further explored. Further experiments are clearly necessary in order to precise the details of the intracellular transmission pathways triggered by the action of the rhamnose-rich preparations on fibroblasts. As shown by the chemical composition of the tested preparations, mentioned in Section 2, there is about one end-standing rhamnose residue for every hexasaccharides subunit (see para 2.1). For a 5 kDa oligosaccharide, this would represent about 5 rhamnose residues per molecule, enough to trigger for instance a coordinated assembly of several lectin sites on the cell membrane, a neces-

sary step for the activation demonstrated for many cell membrane receptors [14]. The most intriguing aspect of these results is the absence of rhamnose in vertebrate glycoconjugates. The presence of this methyl pentose was demonstrated only in prokaryotes and mainly in plants. It is a component of the plant cell wall pectic polysaccharides rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II and is also present in diverse secondary metabolites including anthocyanins, flavonoids and triterpenoids.

Further studies conducted in our laboratory should confirm and extend the above results, substantiating the claim that rhamnose-rich preparations might well be considered as of pharmacological interest in the age-related decline of tissue and cell-functions and related pathologies.

Acknowledgements

Supported by Institut Derm, Paris and Natura Ltd., São Paulo, Brazil. We thankfully acknowledge the hospitality of Professor Gilles Renard, head of the department of ophthalmology of Hôtel Dieu, as well as fruitful discussions during these experiments, also with Eduardo Luppi, Daniel Gonzaga and Jean-Luc Gesztes from the R&D Department of Natura Ltd.

References

- [1] Rhamnosoft® polysaccharide atténuateur de l'inflammation. Solabia Report No. AC046. Pantin, France: Solabia BioEurope; 2001.
- [2] Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 1991;337(8735):211–4.
- [3] Cerdan D, Grillon C, Monsigny M, Redziniak G, Kieda C. Human keratinocyte membrane lectins: characterization and modulation of their expression by cytokines. *Biol Cell* 1991;73:35–42.
- [4] Robert L. *Le vieillissement*. Paris: CNRS-Belin; 1994.
- [5] Robert L, Hornbeck W. *Elastin and elastases I–II*. Boca Raton, USA: CRC Press; 1989.
- [6] Macieira-Coelho A. *Biology of normal proliferating cells in vitro relevance for in vivo aging*. Basel: Karger; 1998.
- [7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65(1–2):55–63.
- [8] Tullberg-Reinert H, Jundt G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid-2-phosphate. *Histochem Cell Biol* 1999;112:271–6.
- [9] Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L, Verdet J. Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2967–72.
- [10] Bieth J, Spiess B, Wermuth CG. The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem Med* 1974;11(4):350–7.
- [11] Deguine V, Menasche M, Fraisse L, Ferrari P, Pouliquen Y, Robert L. Determination of extracellular matrix degradation by free radicals using viscosity measurement of hyaluronan. *Clin Chim Acta* 1997;262(1–2):147–52.
- [12] Molinari J, Andrès E, Faury G, Mariko B, Ruzsova E, Velebny V, et al. Pharmacological properties of rhamnose-rich polysaccharides. Confirmation of microarrays experiments. In preparation. 2006.
- [13] Ravelojaona V, Molinari J, Robert L. Protection by rhamnose-rich polysaccharides against the cytotoxicity of Maillard reaction products, Bio-medicine and pharmacotherapy. In print. 2006.
- [14] Bradshaw R, Dennis E. *Handbook of cell signalling*. San Diego: Academic Press; 2004.

V.2. Article annexe 2

Faury G, Ruszova E, Molinari J, Mariko B, Raveaud S, Velebny V, Robert L: The alpha-L-Rhamnose recognizing lectin site of human dermal fibroblasts functions as a signal transducer: modulation of Ca²⁺ fluxes and gene expression. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780:1388-1394.



The α -L-Rhamnose recognizing lectin site of human dermal fibroblasts functions as a signal transducer Modulation of Ca^{2+} fluxes and gene expression

Gilles Faury^{a,b,c,d,*}, E. Ruszova^e, J. Molinari^f, B. Mariko^{a,b,c,d}, S. Raveaud^{a,b,c,d}, V. Velebny^e, L. Robert^f

^a Laboratoire Physiopathologies vasculaires: interactions cellulaires, signalisation et vieillissement, iRTSV-APV, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

^b Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38041, France

^c CEA, Grenoble, F-38054, France

^d INSERM, U882, Grenoble, F-38054, France

^e Laboratory of Dermal Applications, R & D Department, CPN s.r.o. Dolní Dobruška, 401, 561 02, Czech Republic

^f Laboratoire de Recherche Ophtalmologique, Université Paris 5, Hôpital Hôtel Dieu, 1 place du Parvis Notre Dame, 75181 Paris Cedex 04, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 December 2007

Received in revised form 5 July 2008

Accepted 10 July 2008

Available online 28 July 2008

Keywords:

Rhamnose

Lectin

Receptor

Calcium channel

Gene regulation

Human endothelial cell

Human dermal fibroblast

ABSTRACT

An α -L-Rhamnose specific lectin site was described on human skin keratinocytes and fibroblasts. The addition of Rhamnose-rich oligo- and polysaccharides (RROPs) to fibroblasts has been shown to stimulate cell proliferation and increase extracellular matrix biosynthesis, suggesting that this lectin site functions as a “true” receptor transmitting messages to the cell interior. It was confirmed here that addition of the Rhamnose-rich polysaccharide, RROP-1, to normal human dermal fibroblasts (NHDFs) and human endothelial cells produced a dose-dependent stimulation of the calcium-signaling pathway, inducing fast and transient increases in Ca^{2+} influx and intracellular free Ca^{2+} level. The Rhamnose-rich oligosaccharide RROP-3 as well as L-Rhamnose alone were also able to trigger similar intracellular free Ca^{2+} concentration increases in NHDFs. Moreover, the recording of the RROP-1-induced modification of the gene-expression profile in fibroblasts showed that this polysaccharide triggered a down-regulation of the expression of several growth factors, adhesion molecules and extracellular matrix proteins involved in pro-tumoral activity and/or fibrotic processes. These results further support the hypothesis of a receptor function for the Rhamnose-recognizing lectin site in fibroblasts. Anti-fibrotic and anti-tumoral potential of RROP-1 remains to be further explored.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oligo- and polysaccharides are ubiquitous components of biological macromolecules, present as side-chains on glycoproteins or as polysaccharides linked to proteins as in proteoglycans. Many studies have described the structure and function of the glycan components of glycoproteins and proteoglycans [1,2 for reviews]. Two major discoveries greatly accelerated these advances: i) blood group substances, identified with oligosaccharides [3 for review], and ii) lectins, mostly of plant origin and later identified in vertebrate tissues also [4 for review]. Interactions involving blood group substances or lectins, or sugars and proteins, were supposed to result in formation of non-covalent although strong complexes, such as in agglutination of

red cells or other cells, with no other functional consequences. Only more recent studies of animal lectins showed that carbohydrate-lectin interactions might result in message transmission to the cell interior, raising the hypothesis that some lectins could be considered as “true” receptors [5–7 for reviews]. Such interactions mainly concerned glycan components, currently found in vertebrate glycoconjugates, especially Galactose-recognizing lectins [8,9], which include the elastin-laminin receptor [10]. A surprising finding was the demonstration of an α -L-Rhamnose recognizing lectin on human keratinocytes by the team of Monsigny and Kieda [11], although Rhamnose is only present in plant and prokaryote glycoconjugates, but was not demonstrated in vertebrate glycoconjugates. These authors showed that the α -L-Rhamnose recognizing lectin presents only a relative specificity for rhamnose and binds also, although with a lower affinity, to at least glucose and fucose [11]. Previous experiments indicated that Rhamnose-rich oligo- and polysaccharides (RROPs), used as ligands for the α -L-Rhamnose recognizing lectin, did interact with normal human dermal fibroblasts (NHDFs), produced modifications of cell proliferation and matrix biosynthesis

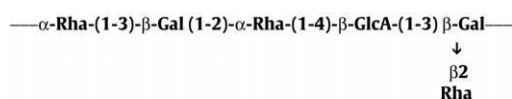
* Corresponding author. Laboratoire Physiopathologies vasculaires: interactions cellulaires, signalisation et vieillissement, INSERM U882, iRTSV-APV, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. Tel.: +33 4 38 78 23 48; fax: +33 4 38 78 49 64.

E-mail address: Gilles.Faury@ujf-grenoble.fr (G. Faury).

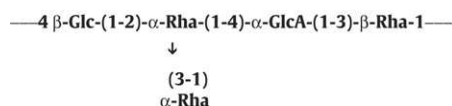
[12]. The suggestion of an α -L-Rhamnose recognizing lectin-mediated message transduction [12] was confirmed and extended here by showing that RROP-1, RROP-3 and L-Rhamnose rapidly and significantly increased calcium concentration in NHDFs. RROP-1 also changed the gene-expression profile of these cells.

2. Materials and methods

Rhamnose-rich polysaccharide-1 (commercial name: Rhamnosoft®, abbreviated RROP-1) was obtained from *Klebsellia pneumoniae*, a non pathogenic bacterial strain. RROP-1 has an average molecular weight of about 50 kDa and consists in repeating pentasaccharide units composed of α -L-Rhamnose (Rha), β -D-Galactose (Gal) and β -D-glucuronic acid (GlcA), with one Rhamnose per pentasaccharide protruding from the polysaccharide chain:



Rhamnose-rich oligosaccharide-3 (RROP-3) resulted from acid hydrolysis of a precursor (RROP-2) obtained from *Klebsellia planticola*. RROP-3 has a molecular weight of 5 kDa and consists in repeating tetrasaccharide units composed of α -L-Rhamnose (Rha), β -D-Glucose (Glc) and β -D-glucuronic acid (GlcA), with one Rhamnose per tetrasaccharide protruding from the oligosaccharide chain:



RROP-1 and RROP-3 were furnished by SOLABIA (Pantin, France) as sterile, lyophilised powder and kept at -20°C . Sterile solutions in PBS were prepared for the experiments.

2.1. Normal human dermal fibroblasts (NHDFs)

Cells were obtained from Cambrex (Emerainville, France) derived from a 39 year old woman (code CC-2511, lot n°4F1293) and cultured in a Dulbecco-modified Eagle's essential medium (DMEM glutamax, GIBCO-Invitrogen, Eragny, France) with penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B, with 10% fetal calf serum (FCS, GIBCO) in humidification-controlled culture flasks. Culture medium was changed every 2–3 days. Cells were seeded in 12, 24 or 96 well Nunc-plates, at a density of 5.10^4 cells/ml, or in 35 mm culture dishes. Cell proliferation was controlled by the MTT-test [13] and by counting trypsinized cells in a Coulter-counter.

2.2. Human umbilical venous endothelial cells (HUVEC)

HUVECs were obtained according to a protocol derived from Jaffe et al. [14,15]. Under a sterile hood the umbilical vein was cannulated and perfused with a physiological buffer solution containing: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 7.6 mM D-glucose, 15 mM HEPES, plus 0.1 mg/ml^{-1} streptomycin, 100 U/ml^{-1} penicillin, and 0.1% phenol red (pH 7.4). HUVECs were collected after perfusion of the umbilical vein with 0.1% collagenase 1A at 37°C for 10 min. The cells were cultured in medium 199 containing 22% human serum, 20 mM HEPES, 10 mM NaHCO_3 , 2 mM L-glutamine, 0.075 mg/ml streptomycin, 75 units/ml penicillin and 0.1% phenol red (37°C , 5% CO_2 , humid atmosphere), in 0.25 mg/ml fibronectin-coated dishes [16]. The culture medium was replaced after 2 h and the cells were grown in the same conditions. The cells were used before the second passage as primary culture.

2.3. Intracellular free calcium concentration in NHDFs and HUVECs

Fluorescence microscopy experiments were performed on adhering NHDFs or HUVECs by using the calcium-sensitive dye FLUO3 (excitation: 488 nm; emission: >510 nm), as previously described [15]. The cells were washed twice with physiological saline solution (PSS) containing: 125 mM NaCl; 5.6 mM KCl; 2.4 mM CaCl_2 ; 1.2 mM MgCl_2 ; 10 mM HEPES (pH 7.4). 0.75 ml PSS was then added followed by addition of 0.25 ml of a 2% bovine serum albumin and 0.08% Pluronic F127 solution in PSS containing 5 μl of a 0.5 mM FLUO3/AM solution in DMSO (final concentrations: 2.5 μM FLUO3/AM, $<1\%$ DMSO). After a 45 minute incubation of NHDFs at 37°C (25 min at room temperature for HUVECs) in the dark, the cells were washed twice and bathed in 1.5 ml PSS 10 min before and during the measurements (22°C). Fluorescence microscopy recordings were performed on a Cell-R system (Olympus, Rungis, France). In each experiment, fluorescence was recorded for about 15 min (1 image each 5 s). F/Fo is the ratio of current fluorescence to initial fluorescence and is assumed to be indicative of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. RROP-1 was added 2 min after recording has started. Experiments were at least triplicated for each RROP-1 concentration.

2.4. Patch-clamp experiments – Ca^{2+} influx in NHDFs

Single-channel currents were recorded at room temperature (22°C) from cell-attached patches on NHDF membranes (Holding Potential = +20 mV) and analyzed using previously described procedures and instrumentation [15]. Before recording, the cells were washed twice then bathed in PSS. The patch pipette was filled with 90 mM $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ and 10 mM HEPES (pH 7.4). Barium was used instead of calcium in order to improve signal resolution, because calcium channels are generally more permeable to this ion, and barium is known to inhibit potassium currents [17]. RROP-1 was added to the bath during the recording. NHDF membrane resting potential (V_m) was assumed to be -109 ± 3 mV [18]. The recorded transmembrane currents were integrated and analyzed using the software Biopatch (Biologic, Claix, France).

2.5. Microarray and ELISA experiments in NHDFs

First, the MTT viability method of Mossmann [13] was used to investigate the effect of four concentrations of RROP-1 (10, 100, 250, and 500 $\mu\text{g/ml}$) on NHDFs. 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ RROP-1 were found to be suitable for microarray experiments. After incubation of cells with RROP-1 for 48 h, supernatants were removed and cells were subjected to RNA isolation with Trisol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA (20 μg) was first incubated with random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 10 min at 65°C . cDNA strand synthesis was carried out by RevertAid H Minus M-MULV Reverse Transcriptase (Fremontas, Burlington, Ontario, CA) and labelled with Biotin-11-dUTP (Fremontas, Burlington, Ontario, CA). Array microtubes contained chips with 127 50-mer probes covering genes for cell cycle, cell migration, cell adhesion, homeostasis, cell adhesion to ECM, production of ECM components, angiogenesis, and inflammation (Clontech, Jena, Germany). Oligonucleotide probes were designed by using Oligoarray Designer 2.2 and input sequences were chosen in accordance with their GenBank reference accession numbers. Usually, 10 μl labeled genomic DNA were diluted in 100 μl hybridization buffer (Clontech, Jena, Germany), denatured at 94°C for 5 min, cooled down on ice for 2 min and added to the array tubes. The hybridization was carried out at 45°C for 3 h and the chips were subsequently washed. A blocking step was carried out with milk powder, before incubation with poly-horseradish peroxidase-streptavidin conjugate. Hybridized probes were revealed by addition of 100 μl peroxidase substrate True Blue (KPL Lab., Gaithersburg, Maryland, USA) to the array tubes. Detection of signals was done in an Array Tube Reader (ATRO1,

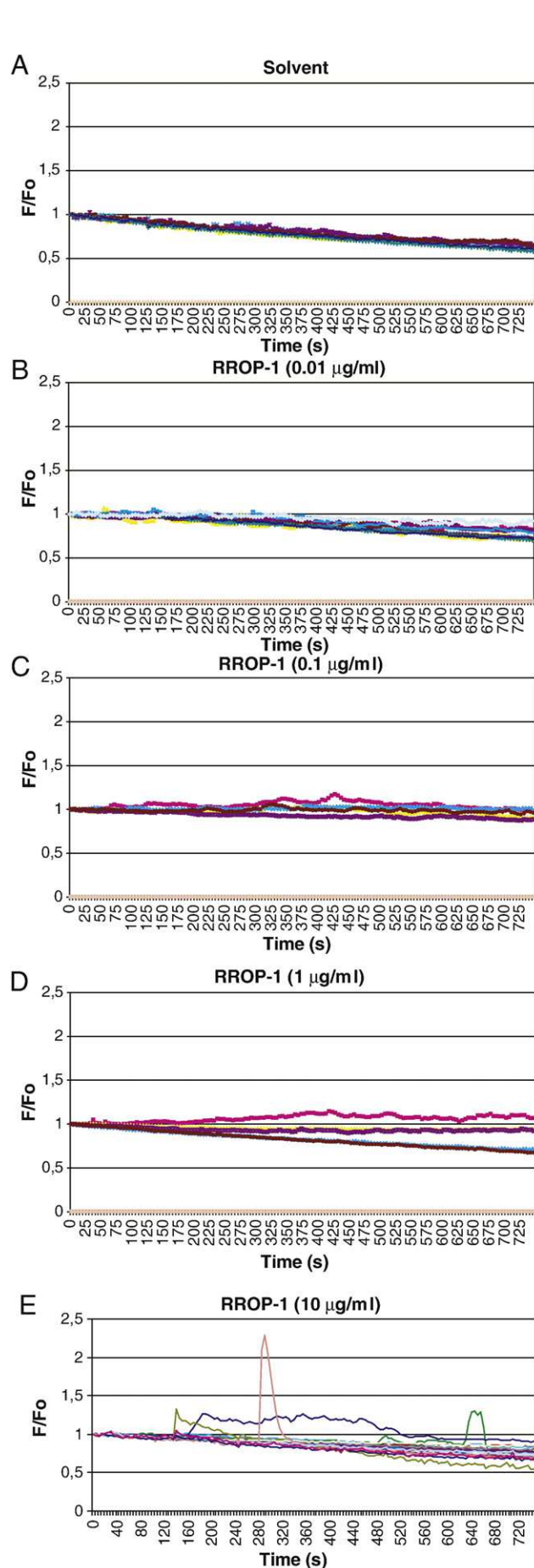


Fig. 2. Representative images of the evolution of Fluo-3 fluorescence over time in NHDFs stimulated with 10 µg/ml RROP-1 at 2 min. (A) Time 0 min: before RROP-1 addition. (B) Time 3.4 min: some cells already exhibited elevated fluorescence (left). (C) Time 11.3 min: some cells still presented elevated fluorescence, while some others just started to respond (right) and some other cell responses had ended (extreme upper left). Some cells did not respond at all to RROP-1 in the time-frame of the experiment and underwent a normal decrease in fluorescence over time because of Fluo-3 photobleaching (cell at the upper right of the images).

Clondia Chip Technologies, Jena, Germany). The data were then analyzed with the IconoClust version 2.2 software (Clondia Chip Technologies, Jena, Germany). A Mann-Whitney non parametric test was performed between the two series of values and significance was set at $p < 0.05$. The two normalization markers used were β -actin and GAPD. A more detailed protocol can be found in the online Supplementary material-1.

Fig. 1. Evolution of Fluo-3 fluorescence in NHDFs in response to RROP-1 added at 120 s: 0 µg/ml — solvent PBS (A), 0.01 µg/ml (B), 0.1 µg/ml (C), 1 µg/ml (D), 10 µg/ml (E). In each graph, one tracing corresponds to the response of one single cell ($n > 30$ cells for each concentration).

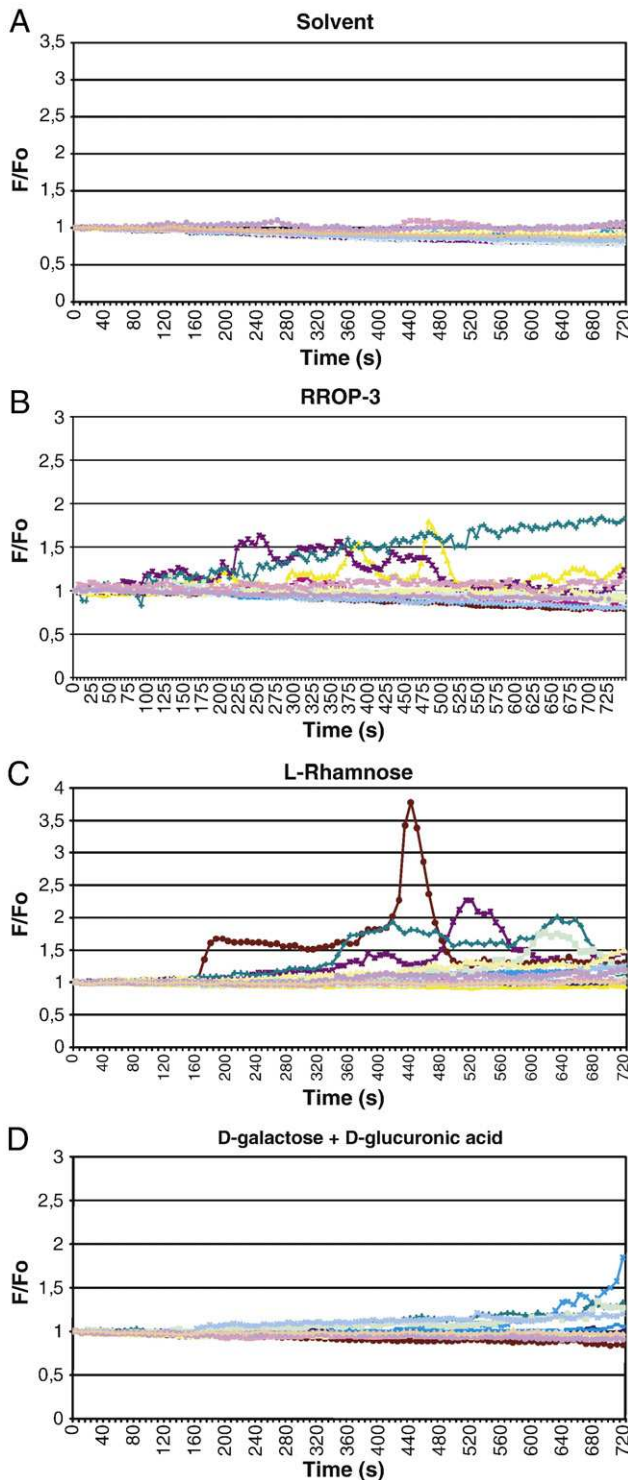


Fig. 3. Evolution of Fluo-3 fluorescence in NHDFs in response to solvent (A), 1.3 $\mu\text{g/ml}$ RROP-3 (B), 10 $\mu\text{g/ml}$ L-Rhamnose (C) and 10 $\mu\text{g/ml}$ D-Galactose + 10 $\mu\text{g/ml}$ D-Glucuronic acid (D). Agonists were added at 120 s. In each graph, one tracing corresponds to the response of one single cell ($n > 30$ cells for each concentration).

ELISA experiments for PDGF determination were performed according to standard technique. ELISA kit was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). After application or not of 10 $\mu\text{g/ml}$ RROP-1 to NHDFs, absorbance of 75 μl cell culture media was determined by using a microplate reader Versa max (Molecular devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.) at a wavelength 450 nm, with the correction wavelength set at 570 nm.

3. Results

3.1. Effect of RROP-1 on intracellular free calcium concentration

In NHDFs, no response of the solvent (PBS) of RROP-1 could be detected, while a dose-dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed in the 0.01–10 $\mu\text{g/ml}$ RROP-1 range. Only some cells, not all, responded to RROP-1, leading to fluorescence increases up to +50–150% at 10 $\mu\text{g/ml}$ RROP-1 concentration (Fig. 1A–E). The evolution pattern of fluorescence was variable in responding cells: most of them exhibited fast transient elevation of fluorescence, while a few others presented a slower and long-lasting elevation of fluorescence within the time-frame of the experiments (Figs. 1 and 2, and online Supplementary materials-(movie)-2–3).

There is no known specific blocker of Rhamnose-dependent binding to the Rhamnose-recognizing-lectin. Therefore, in order to verify that the RROP-1-induced elevation of NHDF $[\text{Ca}^{2+}]_i$ could be attributed to the activation of the Rhamnose-recognizing-lectin, we then stimulated NHDFs with different agonists. It is difficult, if not impossible, to find a “control” polysaccharide inactive on cells, since any carbohydrate chain could potentially bind to one of the wide

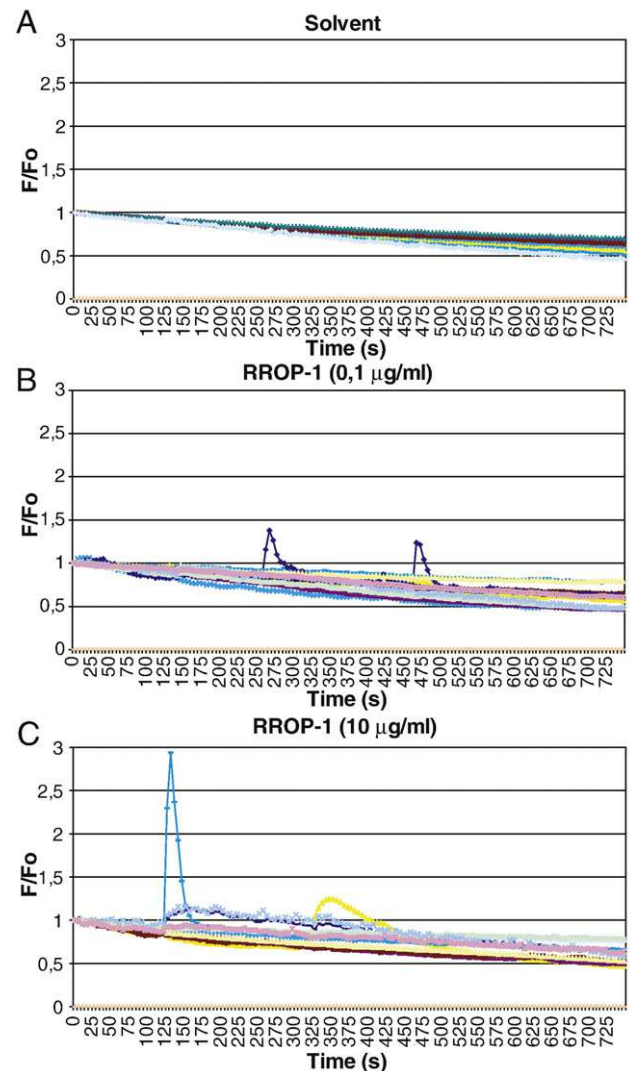


Fig. 4. Evolution of Fluo-3 fluorescence in HUVECs in response to RROP-1 added at 120 s. (A) solvent of RROP-1 (PBS). (B) 0.1 $\mu\text{g/ml}$ RROP-1. (C) 10 $\mu\text{g/ml}$ RROP-1. Beside cells responding to RROP-1, some other cells did not respond at all in the time-frame of the experiments. In each graph, one tracing corresponds to the response of one cell. $n = 14$ –30 cells for each concentration.

variety of lectins present on cell membranes, including galectins and selectins, and induce a variety of reactions [4–7,19–21]. For instance, fucose/lectin interaction triggers stimulation of fibroblast proliferation and inhibition of MMP-expression and activation [22,23] and lactose, galactose or *N*-acetylgalactosamine binding to the elastin receptor (a galectin) promotes dissociation of the receptor from elastin and the cell [24,25]. We therefore chose to study the effects on NHDF $[Ca^{2+}]_i$ of: i) a Rhamnose-rich oligosaccharide (RROP-3), ii) the monosaccharide α -Rhamnose, and separately iii) a mix of α -Galactose and α -Glucuronic acid (since RROP-1 is composed of α -Rhamnose, α -Galactose and α -Glucuronic acid). Our results showed that RROP-3 triggered mainly early/fast/transient and, to a lower extent, late/long-lasting elevations of NHDF $[Ca^{2+}]_i$, with a pattern similar to that induced by RROP-1. α -Rhamnose mainly induced early and transient increases in NHDF $[Ca^{2+}]_i$, and no late/long-lasting elevations. The differences between the effects of α -Rhamnose, RROP-3 and RROP-1 are likely due to the structural differences between these molecules: a 164 Da monosaccharide for Rhamnose vs. a 5 kDa oligosaccharide containing rhamnose, glucose and glucuronic acid for RROP-3 or a 50 kDa polysaccharide containing rhamnose, galactose and glucuronic acid for RROP-1. The α -Galactose and α -Glucuronic acid mix induced little effect with a different pattern, i.e. a slight, late and long-lasting increase in NHDF $[Ca^{2+}]_i$ in only few responding cells (Fig. 3).

Complementary experiments performed in HUVECs showed that the effect of 0.1–10 μ g/ml RROP-1 was also dose-dependent and heterogeneous, including the absence of response in some cells and, in responding cells, fast transient elevation or, to a lower extent, slow and long-lasting elevations of $[Ca^{2+}]_i$ (+30–200%) (Fig. 4).

3.2. Effect of RROP-1 on calcium channel activity in NHDFs

In order to elucidate the question of the origin of calcium in the above cited elevation of $[Ca^{2+}]_i$, we have performed patch-clamp experiments enabling to study the response of membrane calcium channels when NHDF were stimulated with RROP-1. The basal activity of NHDF calcium channels was low (Figs. 5A). Addition of 10 μ g/ml RROP-1 induced a strong activation of calcium channels (Fig. 5B) in all the cells tested. Integration of the calcium charges crossing the cell

membrane over time allowed the calculation of the transmembrane calcium current, which increased up to 4 pA (Fig. 5C) shortly after application of the polysaccharide. The conductance of the RROP-1-activated calcium channels was measured and found in the range of 23 pS (Fig. 5D).

3.3. Effect of RROP-1 on gene expression and protein release in NHDFs

Microarray experiments were carried out in order to explore modifications of gene expression as a result of the interaction between fibroblasts and RROP-1. Expression of twelve genes was found to be significantly modified by addition of 10 μ g/ml RROP-1, all of them being down-regulated by 20–30% (to about 70–80% of the control value): SERPINE1: plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), STAB2: stabilin-2, FGF1: fibroblast growth factor-1, FGF9: fibroblast growth factor-9, TGF β 3: transforming growth factor beta-3, ITGB1: integrin beta-1, COL1A1: collagen-I-alpha-1, NID: nidogen, IL-8: interleukin-8, PDGFC: platelet-derived growth factor-C, FGFR2: fibroblast growth factor receptor-2, LAMB1: laminin-beta-1 chain (Fig. 6A, B). In order to verify how the RROP-1-induced down-regulation of gene expression impacted the protein production level, control measurements of PDGF release by NHDFs were performed. Compared to control, the ELISA experiments showed a 20% decrease in PDGF release after cell stimulation by RROP-1 (Fig. 6C), in good agreement with the microarray experiments.

4. Discussion

The purpose of these experiments was to further explore the possibility of a receptor/signal transducer function for the α -L-Rhamnose recognizing lectin site, demonstrated to be present on human skin keratinocyte and fibroblast membranes [11,12]. Preliminary results were in favour of this contention, since they suggested that Rhamnose-rich oligo- and polysaccharides (RROPs) enhanced fibroblast proliferation and collagen production, increased intracellular calcium, and modulated gene expression [12]. Consistently, our present results showed that the Rhamnose-rich polysaccharide RROP-1 was able to induce a dose-dependent elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in

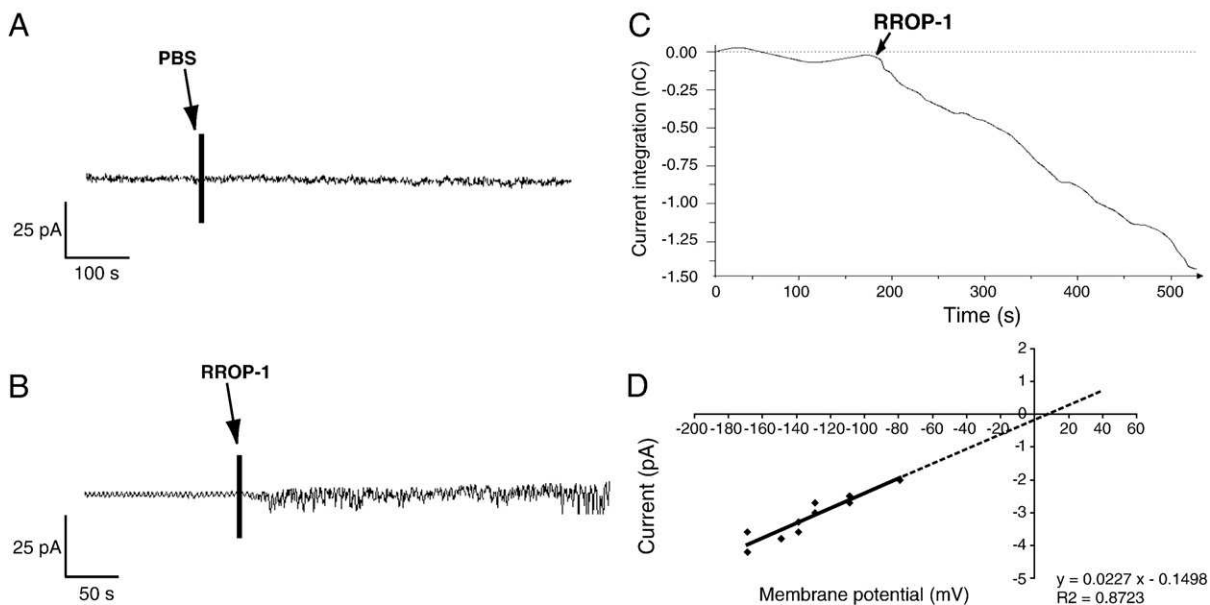


Fig. 5. Membrane calcium channel activation induced by RROP-1 in NHDFs demonstrated with the patch-clamp technique. (A) addition of the solvent (PBS). (B) addition of 10 μ g/ml RROP-1. (C) integration over time of the calcium charges passing through the cell membrane before and after addition of 10 μ g/ml RROP-1. (D) Current–membrane potential (*I/V*) curve, leading to calculation of the conductance of the RROP-1-activated calcium channels: 23 pS. $n = 7$ in each group.

studies should uncover the early signaling steps, downstream of the lectin site, leading to intracellular calcium mobilization and regulation of gene expression and determine whether RRORP-1 might present some anti-tumoral and/or anti-fibrotic properties.

Acknowledgements

This work was supported by Institut DERM, Paris.

We thank Professor Gilles Renard, Head of the Ophtalmology Department at the Hôtel Dieu Hospital, Paris 5 University, for his generous hospitality.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbagen.2008.07.008.

References

- [1] E.M. Culav, C.H. Clark, M.J. Merrilees, Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy, *Phys. Ther.* 79 (1999) 308–319.
- [2] F.T. Bosman, I. Stamenkovic, Functional structure and composition of the extracellular matrix, *J. Pathol.* 200 (2003) 423–428.
- [3] K.O. Lloyd, The chemistry and immunochemistry of blood group A, B, H, and Lewis antigens: past, present and future, *Glycoconj. J.* 17 (2000) 531–541.
- [4] H.J. Gabius, S. Gabius (Eds.), *Lectins and Glycobiology*, Springer Verlag, Berlin, 1993.
- [5] M. Monsigny, C. Kieda, A.C. Roche, Membrane glycoproteins glycolipids and membrane lectins as recognition signals in normal and malignant cells, *Biol. Cell* 47 (1986) 95–110.
- [6] K. Drickamer, M.E. Taylor, Biology of animal lectins, *Ann. Rev. Cell Biol.* 9 (1993) 237–264.
- [7] J.P. Zanetta, S. Kuchler, S. Lehmann, A. Badache, S. Maschke, D. Thomas, P. Dufourcq, G. Vincendon, Glycoproteins and lectins in cell adhesion and cell recognition processes, *Histochem. J.* 24 (1992) 791–804.
- [8] M. Caron, D. Bladier, R. Joubert, Soluble galactoside-binding vertebrate lectins: a protein family with common properties, *Int. J. Biochem.* 22 (1990) 1379–1385.
- [9] K. Smetana Jr., B. Dvorankova, M. Chovanec, J. Boucek, J. Klima, J. Motlik, M. Lensch, H. Kaltner, S. Andre, H.J. Gabius, Nuclear presence of adhesion-/growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin, *Histochem. Cell Biol.* 125 (2006) 171–182.
- [10] L. Robert, W. Hornebeck, Interaction between elastin fibers and cells, in: J. Labat-Robert, R. Timpl (Eds.), *Structural Glycoproteins in Cell-Matrix Interaction*, Frontiers of Matrix Biology, vol. 11, Karger Basel, 1986, pp. 58–77.
- [11] D. Cerdan, C. Grillon, M. Monsigny, G. Redziniak, C. Kieda, Human keratinocyte membrane lectins: characterization and modulation of their expression by cytokines, *Biol. Cell* 73 (1991) 35–42.
- [12] E. Andres, J. Molinari, G. Peterszegi, B. Mariko, E. Ruszova, V. Velebny, G. Faury, L. Robert, Pharmacological properties of rhamnose-rich polysaccharides, potential interest in age-dependent alterations of connective tissues, *Pathol. Biol. (Paris)* 54 (2006) 420–425.
- [13] T. Mossmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [14] E.A. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker, C.R. Minick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J. Clin. Invest.* 52 (1973) 2745–2756.
- [15] G. Faury, Y. Usson, M. Robert-Nicoud, L. Robert, J. Verdeti, Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 2967–2972.
- [16] K.M. Yamada, K. Olden, Fibronectins—adhesive glycoproteins of cell surface and blood, *Nature* 275 (1978) 179–184.
- [17] R.W. Tsien, P. Hess, E.W. McCleskey, R.L. Rosenberg, Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16 (1987) 265–290.
- [18] S.B. Russell, J.D. Russell, J.S. Trupin, Hydrocortisone induction of system A amino acid transport in human fibroblasts from normal dermis and keloid, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 11464–11469.
- [19] J. Hirabayashi, T. Hashidate, Y. Arata, N. Nishi, T. Nakamura, M. Hirashima, T. Urashima, T. Oka, M. Futai, W.E. Muller, F. Yagi, K. Kasai, Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta* 1572 (2002) 232–254.
- [20] E. Duverger, N. Frison, A.C. Roche, M. Monsigny, Carbohydrate–lectin interactions assessed by surface plasmon resonance, *Biochimie* 85 (2003) 167–179.
- [21] A. Varki, Selectin ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 7390–7397.
- [22] N. Isnard, G. Peterszegi, A.M. Robert, L. Robert, Regulation of elastase-type endopeptidase activity, MMP-2 and MMP-9 expression and activation in human dermal fibroblasts by fucose and a fucose-rich polysaccharide, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 258–264.
- [23] G. Peterszegi, I. Fodil-Bourahla, A.M. Robert, L. Robert, Pharmacological properties of fucose. Applications in age-related modifications of connective tissues, *Biomed. Pharmacother.* 57 (2003) 240–245.
- [24] A. Hinek, D.S. Wrenn, R.P. Mecham, S.H. Barondes, The elastin receptor: a galactoside-binding protein, *Science* 239 (1988) 1539–1541.
- [25] A. Hinek, J. Boyle, M. Rabinovitch, Vascular smooth muscle cell detachment from elastin and migration through elastic laminae is promoted by chondroitin sulfate-induced “shedding” of the 67-kDa cell surface elastin binding protein, *Exp. Cell Res.* 203 (1992) 344–353.
- [26] D. Hong, K.A. Barbee, D.G. Buerk, D. Jaron, Heterogeneous cytoplasmic calcium response in microvascular endothelial cells, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 7 (2005) 7493–7496.
- [27] A. Ben-Ze'ev, Cytoarchitecture and signal transduction, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2 (1992) 265–281.
- [28] P. Nicotera, B. Zhirovitsky, S. Orrenius, Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis, *Cell Calcium* 16 (1994) 279–288.
- [29] S. Matsumoto-Yoshitomi, J. Habashita, C. Nomura, K. Kuroshima, T. Kurokawa, Autocrine transformation by fibroblast growth factor 9 (FGF-9) and its possible participation in human oncogenesis, *Int. J. Cancer* 71 (1997) 442–450.
- [30] T. Todo, T. Kondo, T. Kirino, A. Asai, E.F. Adams, S. Nakamura, K. Ikeda, T. Kurokawa, Expression and growth stimulatory effect of fibroblast growth factor 9 in human brain tumors, *Neurosurgery* 43 (1998) 337–346.
- [31] J.P. Zwerner, W.A. May, PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors, *Oncogene* 20 (2001) 626–633.
- [32] N.A. Lokker, C.M. Sullivan, S.J. Hollenbach, M.A. Israel, N.A. Giese, Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors, *Cancer Res.* 62 (2002) 3729–3735.
- [33] G. Giannelli, E. Fransvea, F. Marinosci, C. Bergamini, S. Colucci, O. Schiraldi, S. Antonaci, Transforming growth factor-beta1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha3beta1 integrin, *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 183–193.
- [34] M. Granerus, W. Engstrom, Effects of fibroblast growth factor 8, fibroblast growth factor 9 and keratinocyte growth factor on multiplication and locomotion in human teratocarcinoma cells in vitro, *Anticancer Res.* 23 (2003) 1313–1316.
- [35] J.W. Martens, A.M. Sieuwerts, J. Bolt-deVries, P.T. Bosma, S.J. Swiggers, J.G. Klijn, J.A. Foekens, Aging of stromal-derived human breast fibroblasts might contribute to breast cancer progression, *Thromb. Haemost.* 89 (2003) 393–404.
- [36] I.A. Steele, R.J. Edmondson, H.Y. Leung, B.R. Davies, Ligands to FGF receptor 2-IIIb induce proliferation, motility, protection from cell death and cytoskeletal rearrangements in epithelial ovarian cancer cell lines, *Growth Factors* 24 (2006) 45–53.
- [37] S.J. Kim, H. Uehara, T. Karashima, M. McCarty, N. Shih, I.J. Fidler, Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice, *Neoplasia* 3 (2001) 33–42.
- [38] T. Nagatoro, K. Fujita, E. Murata, M. Akita, Angiogenesis and fibroblast growth factors (FGFs) in a three-dimensional collagen gel culture, *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 80 (2003) 7–14.
- [39] M. Tunyogi-Csapo, T. Koreny, C. Vermes, J.O. Galante, J.J. Jacobs, T.T. Glant, Role of fibroblasts and fibroblast-derived growth factors in periprosthetic angiogenesis, *J. Orthop. Res.* 25 (2007) 1378–1388.
- [40] J.H. Martens, J. Kzyshkowska, M. Falkowski-Hansen, K. Schledzewski, A. Gratchev, U. Mansmann, C. Schmuttermaier, E. Dippel, W. Koenen, F. Riedel, M. Sankala, K. Tryggvason, L. Kobzik, G. Moldenhauer, B. Arnold, S. Goerd, Differential expression of a gene signature for scavenger/lectin receptors by endothelial cells and macrophages in human lymph node sinuses, the primary sites of regional metastasis, *J. Pathol.* 208 (2006) 574–589.
- [41] M. Rusnati, M. Presta, Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenesis strategies, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 2025–2044.
- [42] L. Yu, W.A. Border, Y. Huang, N.A. Noble, TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis, *Kidney Int.* 64 (2003) 844–856.
- [43] J.S. Campbell, S.D. Hughes, D.G. Gilbertson, T.E. Palmer, M.S. Holdren, A.C. Haran, M.M. Odell, R.L. Bauer, H.P. Ren, H.S. Haugen, M.M. Yeh, N. Fausto, Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 3389–3394.
- [44] J.H. Distler, A. Jungel, L.C. Huber, U. Schulze-Horsel, J. Zwerina, R.E. Gay, B.A. Michel, T. Hauser, G. Schett, S. Gay, O. Distler, Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 311–322.

Résumé

La fibrilline-1, composant majeur des microfibrilles et second composant majeur des fibres élastiques, est une glycoprotéine dont la mutation du gène chez l'humain est responsable du syndrome de Marfan, caractérisé par des anévrismes et des dissections aortiques. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié d'une part le rôle de la fibrilline-1 dans la physiologie des cellules endothéliales vasculaires humaines et d'autre part la conséquence du déficit quantitatif de la fibrilline-1 sur la structure et la fonction du système cardiovasculaire au cours du vieillissement chez la souris. Le fragment de fibrilline-1 "PF14" induit une signalisation calcique via les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, l'activation de la phospholipase C et la mobilisation des réserves intracellulaires de calcium, ainsi que la prolifération et la migration des cellules endothéliales humaines. La déficience quantitative sévère ou totale de la fibrilline-1 entraîne une létalité chez la souris dans les deux semaines après la naissance alors que celle, partielle, due à la délétion hétérozygote hypomorphique des exons 19 à 24 du gène de la fibrilline-1 (délétion mg Δ) n'affecte pas la longévité des souris. Les souris Fbn-1+/mg Δ présentent une hypertrophie cardiaque et une hypotension ainsi que des anévrismes aortiques qui deviennent plus fréquents avec l'âge. La paroi aortique de ces souris présente des altérations structurales (fragmentations des lames élastiques), biomécaniques (l'augmentation de la rigidité) et de la vasomotricité, qui s'accroissent avec l'âge. Nos résultats suggèrent que la déficience quantitative de la fibrilline-1 pourrait altérer la signalisation que cette protéine déclenche normalement dans les cellules endothéliales dès la phase de morphogénèse artérielle, et induire en conséquence une pathologie anévrismale de la paroi aortique au cours du vieillissement. Les effets opposés des déficiences quantitatives en fibrilline-1 et en élastine sur la fonction vasculaire suggèrent des rôles opposés pour ces deux composants majeurs des fibres élastiques. Ce travail permet par ailleurs de valider les souris Fbn-1+/mg Δ , tant sur le plan structural que fonctionnel, comme modèle du syndrome de Marfan.

Mots clés : Fibrilline-1, microfibrilles, fibres élastiques, signalisation calcique, cellules endothéliales, biomécanique vasculaire, syndrome de Marfan, vieillissement.

Abstract

Fibrillin-1, the main component of microfibrils and second main component of elastic fibers, is a glycoprotein whose gene mutation in human is responsible for Marfan syndrome, characterized at the vascular level by aortic aneurysm and dissections. In this work, we investigated on the one hand, the role of fibrillin-1 in human endothelial cell physiology and, on the other hand, the effect of fibrillin-1 quantitative deficiency on the structure and function of the cardiovascular system during aging in mice. Fibrillin-1 fragment "PF14" induced calcium signaling through $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins, phospholipase C activation and intracellular calcium store mobilization, as well as endothelial cell proliferation and migration. Fibrillin-1 severe or full deficiency leads to premature lethality (within two weeks postnatal) in mice, while partial deficiency, through fibrillin-1 heterozygous hypomorphic deletion of exons 19 to 24 (mg Δ deletion), does not affect mice longevity. Fbn-1+/mg Δ mice were hypotensive with cardiac hypertrophy and presented aortic aneurysm becoming more frequent in aged animals. The aortic wall of Fbn-1+/mg Δ mice presented structural (elastic fibers fragmentations), biomechanical (increased aortic stiffness) and vasomotor alterations. This work suggests that fibrillin-1 quantitative deficiency may alter the signaling events normally triggered by this protein in endothelial cells during vascular morphogenesis, and subsequently induce aneurysms in the aorta wall during ageing. The opposite effects of fibrillin-1 and elastin deficiencies suggest opposite roles for these two major components of elastic fibers. Moreover, this work validates Fbn-1+/mg Δ mice as a structural and functional model for Marfan syndrome.

Key words: Fibrillin-1, microfibrils, elastic fibers, calcium signaling, endothelial cells, vascular biomechanics, Marfan syndrome, ageing.