

## Les fibulines : une nouvelle famille de protéines de la matrice extracellulaire

A ce jour, de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire ont été clairement identifiées [1]. Parmi celles-ci on trouve non seulement les collagènes, les laminines, la fibronectine, le nidogène mais aussi une famille particulière incluant les fibrillines [2], les fibulines [3, 4], des protéines liant le facteur TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor*) et les MFAP (*microfibril-associated proteins*) [2]. Ces protéines ont une structure très proche et possèdent une suite plus ou moins longue de motifs répétés EGF (*epidermal growth factor*) qui comporte une séquence consensus pour la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  [2, 3]. Le  $\text{Ca}^{2+}$  impose aux motifs EGF, entre lesquels il se fixe, un alignement relativement rectiligne qui aboutit à une forme en haltères lors d'analyse en microscopie électronique après ombrage rotatif. Leur longueur varie, d'une trentaine de nm pour les fibrillines à 140 nm pour la fibrilline-1 [2]. La fibrilline-1, constituant majeur des microfibrilles y est associée à l'élastine et à la fibronectine. Certaines protéines liant le facteur TGF $\beta$ -1 sont impliquées directement dans la structure des fibres élastiques [5]. Les fibulines se trouvent dans les lames basales de nombreux tissus, associées à la fibronectine [6], dans les zones subissant au cours du développement une transition d'un tissu épithélial vers un tissu mésenchymateux. L'intérêt biologique de ces protéines a été renforcé par la mise à jour d'un rôle possible dans les processus invasifs des cancers ovariens [7].

### Structures des fibulines

Les fibulines, du nom latin *fibul* « étrenne, boucle » sont des glycopro-

téines de la matrice extracellulaire que l'on trouve aussi en très faibles concentrations dans le plasma. Elles comprennent trois protéines différentes.

La fibuline-1 est une protéine de 100 kDa isolée à partir de fibroblastes en cultures, issus de lignées de tétarcarinomes et du placenta. Elle présente quatre isoformes A, B, C, D qui diffèrent par leurs extrémités carboxy-terminales [3]. Elles possèdent en commun une séquence unique de 537 acides aminés riche en cystéines et un peptide signal de 29 acides aminés. Les polypeptides B et C ont une longueur respective de 601 et 683 acides aminés correspondant à un allongement de la séquence primaire en position carboxy-terminale respectivement de 35 et 117 acides aminés [8]. La quatrième forme D, isolée à partir d'une tumeur d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) ne diffère de la C que par un allongement de l'extrémité carboxy-terminale de 137 acides aminés. Les interactions des isoformes C et D avec le nidogène ont permis toutefois de les différencier sans ambiguïté.

La fibuline-2 d'un poids moléculaire de 200 kDa, correspond à une chaîne polypeptidique de 1195 acides aminés précédée d'un peptide signal de 27 acides aminés [9]. Précédant le domaine I, analogue à celui de la fibuline-1, elle possède un domaine de 150 acides aminés, domaine Na, riche en cystéines suivi d'un domaine Nb sans cystéine. Le domaine II contient 10 motifs répétés EGF. Dans la fibuline-2, le segment de connexion entre les domaines I et II est séparé par une région II<sup>x</sup> de type EGF. L'extrémité carboxy-terminale ou domaine III, comporte 115 acides

aminés et est identique à celle de l'isoforme C de la fibuline-1 (117 acides aminés) (*figure 1*).

Des comparaisons de séquences ont montré que les régions carboxy-terminales des fibulines 1C, 1D et -2 sont semblables à la région carboxy-terminale de la protéine S1-5. Cette protéine a été isolée par la méthode de banque soustractive à partir de fibroblastes sénescents et quiescents d'un malade atteint d'un syndrome de Werner (*m/s n° 6-7, vol. 12, p. 602*). Sa structure est analogue à celle des fibulines 1 et 2 : elle possède aussi des motifs répétés de type EGF et une extrémité amino-terminale conservée. La protéine S1-5 est donc un troisième membre de la famille des fibulines, et on l'a renommée fibuline-3. Sa synthèse est induite par l'arrêt de croissance de cellules jeunes normales mais décroît dans les conditions permettant la prolifération cellulaire (forte concentration en sérum) [10].

### Les fibulines au cours du développement, et localisations tissulaires

Les fibulines sont synthétisées en grande quantité dans le système cardiovasculaire au cours du développement embryonnaire. Au niveau du cœur, des transformations complexes accompagnent le dépôt de lames basales le long des fibres musculaires du tube cardiaque. Les cellules de la couche sous-endothéliale se dissocient de l'endothélium et se transforment en mésenchyme [11] (*figure 2*). C'est durant cette transition que les cellules produisent une large quantité d'un tissu interstitiel du type de la matrice extracellulaire appelé tissu de soutien

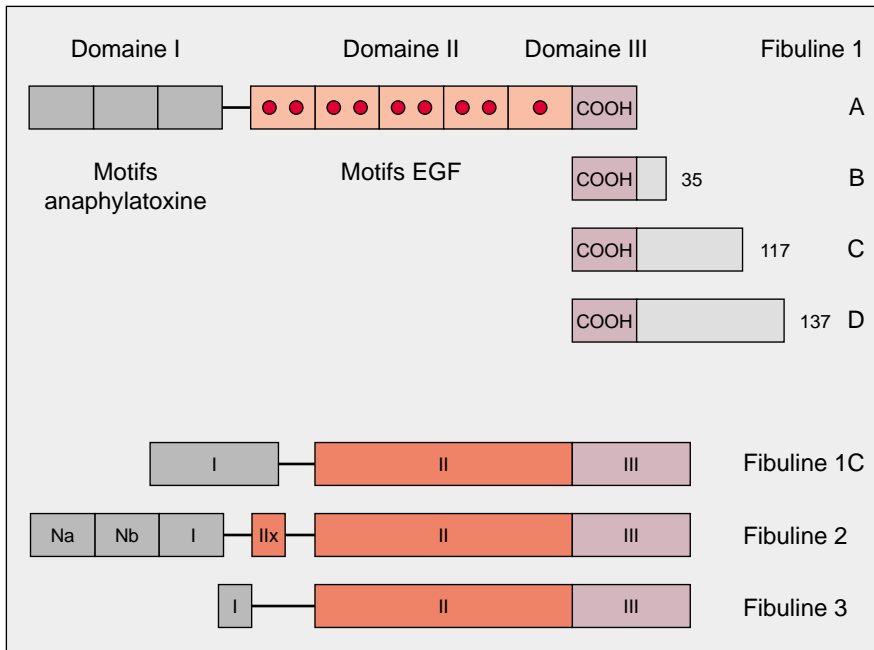


Figure 1. **Représentation schématique des domaines structuraux des fibulines.** La fibuline-1 possède un domaine I comportant trois motifs d'anaphylatoxines, un domaine II composé de 9 motifs répétés EGF et un domaine III carboxy-terminal dont la longueur est croissante de l'isoforme 1A à l'isoforme 1D. La fibuline-2 est très proche de la fibuline-1C mais elle possède une extrémité amino-terminale plus complexe, faite de deux domaines associés au domaine I, les domaines Na et Nb et un domaine IIx, de type EGF, qui sépare le domaine I du domaine II. Celui-ci comporte 10 motifs répétés EGF. La fibuline-3 ou protéine S1-5 contient une extrémité amino-terminale courte et seulement 6 motifs répétés EGF dans son domaine II. Son extrémité carboxy-terminale est semblable à celle de la fibuline-1C (117 acides aminés).

endocardique [12]. Progressivement ce tissu se transforme en tissu conjonctif plus dense formant les valves auriculo-ventriculaires et les septums. La fibuline-1 qui est présente en association avec la fibronectine dans beaucoup de tissus embryonnaires, est retrouvée de manière importante dans les territoires soumis à cette transformation, comme dans les myotomes en développement ou dans la crête neurale. La fibuline-1 est aussi exprimée dans la couche périphérique du cerveau, dans le mésenchyme des plexus choroïdes et les méninges qui entourent la moelle épinière. L'expression de la fibuline-2 est beaucoup plus limitée dans les tissus embryonnaires que celle de la fibuline-1. On la trouve en quantité importante dans les cellules mésenchymateuses du tissu de soutien endocardique, dans l'épicarde, de même qu'au niveau du cartilage en développement.

Dans les tissus adultes, les fibulines-1 sont ubiquitaires mais en quantité particulièrement importante au niveau du cœur. La fibuline-2 est décelée dans les mêmes tissus que la fibuline-1, par exemple la couche basale de la cornée, la couche fibrillaire entourant les muscles, et les glomérules rénaux. Mais il existe des localisations différentes de la fibuline-2, comme la couche de kératinocytes de l'épiderme, les artérioles rénales et la veine porte du foie. Enfin, ces protéines se retrouvent dans le sang : la fibuline-1 (30 µg/ml) y est à une concentration 1000 fois supérieure à celle de la fibuline-2.

#### Interactions de la fibuline-1 et -2 avec les protéines de la matrice extracellulaire et les intégrines

Les interactions avec le nidogène des fibulines 1C et 1D sont sous la dépendance

du  $\text{Ca}^{2+}$  avec une constante de dissociation  $K_d = 60 \text{ nM}$  pour la fibuline 1C et de  $1 \mu\text{M}$  pour la forme D [13]. Les différences de fixation de ces deux formes avec la fibronectine, la laminine-1, la laminine-4 et le collagène IV, sont mineures.

La fibuline-1 a la propriété de se fixer à elle-même ( $K_d = 322 \text{ nM}$ ) mais surtout à la fibronectine ( $K_d = 139 \text{ nM}$ ) [6]. Par son intermédiaire, et aussi directement, la fibuline-1 se fixe aux intégrines, établissant ainsi un lien avec le cytosquelette de la cellule. Elle est aussi localisée au sein même des fibres élastiques et est associée aux fibres du tissu conjonctif contenant l'élastine [14]. Dans la peau humaine on la trouve dans les cellules épidermiques, surtout dans les couches basales, ainsi que dans le derme. La fibuline-1, protéine plasmatique et le fibrinogène, grosse protéine de 340 kDa, copurifient facilement, bien qu'elles aient une constante de dissociation de  $2,9 \mu\text{M}$ . De tels complexes fibrinogène-fibuline-1 existent dans le sang et des expériences de protéolyse séquentielle montrent que la fixation de la fibuline-1 s'effectue au niveau de la chaîne B $\beta$  du fibrinogène [15].

En présence de calcium, la fibuline-2 s'associe à la fibrilline-1, constituant majeur des microfibrilles, avec une constante de dissociation de 56 nM, ce qui n'est pas le cas de la fibuline-1 de souris. Les microfibrilles qui ont un petit diamètre de 8 à 12 nm s'étendent de la lame basale aux fibres élastiques par l'intermédiaire de la fibuline-2, ce qui contribue dans certains territoires à la continuité et à la rigidité du tissu conjonctif [16]. La fibuline-2 se fixe aussi faiblement à la fibronectine et au nidogène, au collagène de type IV, à la laminine-1, à la protéine BM-40, à la fibuline-1 et à la vitronectine. La fixation du nidogène à une fibuline-2 immobilisée permet la formation de complexes ternaires avec le collagène IV, le perlecan et la fibuline-1 qui viennent se fixer de manière indépendante au domaine carboxy-terminal [17]. Les possibilités et les voies de fixation de la fibuline-2 sont donc multiples et lui permettent de s'intégrer aux lames basales et aux structures complexes extracellulaires.

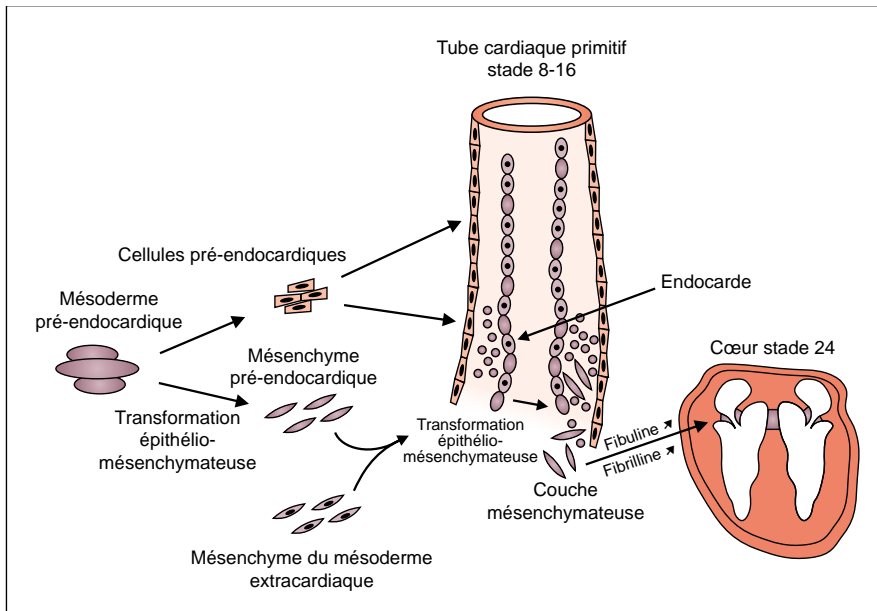


Figure 2. **Représentation schématique de la morphogenèse valvulo-septale du cœur. Implication des fibulines dans le développement.** Les cellules souches du mésoderme préendocardique se différencient en mésenchyme préendocardique puis, après coalescence, en endothélium endocardique. Les cellules de la couche sous-endothéliale se dissocient de l'endothélium et se transforment en mésenchyme. C'est durant cette transition que les cellules produisent une large quantité d'un tissu interstitiel du type de la matrice extracellulaire appelé tissu de soutien endocardique. Les ébauches primaires du tissu des valvules et du septum sont constituées de ce tissu. Progressivement il se transforme en tissu conjonctif plus dense formant les valvules auriculo-ventriculaires et les septums. La fibuline-1 qui est présente en association avec la fibronectine dans beaucoup de tissus embryonnaires, est retrouvée de manière importante dans les territoires soumis à cette transformation.

Le fait que la fibuline-1 soit un constituant de la matrice extracellulaire entourant les muscles lisses des vaisseaux et qu'elle se lie en même temps au fibrinogène a fait rechercher un rôle comme agent thrombogène. On a montré, dans les conditions de circulation normale et par des tests d'adhérence statiques que la fibuline-1 joue un rôle dans l'adhérence plaquettaire par l'intermédiaire d'un pont de fibrinogène qui se fixe à l'intégrine  $\alpha^{IIb}\beta^3$  des plaquettes et qui est incorporé au sous-endothélium à partir du plasma [18]. En outre, le marquage des zones thrombosées à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la fibuline-1 a montré la co-localisation de celle-ci avec la fibrine. La fibuline-1 s'incorpore aussi dans les caillots de fibrine qui se forment *in vitro* et *in vivo*. Le rôle des fibulines aussi bien

dans l'hémostase que dans les processus de thrombose reste à préciser. Plus récemment, la recherche d'hormones et de facteurs impliqués dans le contrôle de l'invasion tumorale et métastatique des cancers ovariens a conduit à une protéine de 120 kDa qui s'est avérée être la fibuline-1 [19]. Les quantités de fibuline-1 sécrétées dans trois lignées cancéreuses différentes, sensibles aux œstrogènes, ont été trouvées dix fois supérieures à la normale. La fibuline-1 ayant été également mise en évidence par immunohistochimie dans les cancers ovariens, l'excès de sécrétion de la fibuline-1 par ces tumeurs pourrait être en relation avec le processus d'invasion péritonéale et métastatique [7]. Le rôle biologique de la fibuline et sa signification comme marqueur dans les cancers ovariens restent toutefois à préciser.

## Conclusion

Les fibulines constituent donc une nouvelle classe de protéines de la matrice extracellulaire et trois formes différentes, les fibuline-1, -2 et -3 ont pu être isolées. Bien que leurs propriétés de fixation entre elles et aux autres protéines de la matrice extracellulaire aient fait l'objet d'études approfondies, leur rôle biologique est encore mal défini. Il apparaît néanmoins qu'elles jouent un rôle de tissu de soutien dans la lame basale élastique des vaisseaux sanguins, dans les couches musculaires lisses de la média des vaisseaux sanguins et le tissu conjonctif élastique. Il est aussi possible qu'en tant que protéines plasmatiques présentes dans les parois des vaisseaux sanguins, les fibulines puissent jouer un rôle dans l'hémostase et le mécanisme de thrombose. En outre, la découverte de l'hypersécrétion de la fibuline-1 sous l'action de l'œstradiol dans les tumeurs ovariennes épithéliales pourrait suggérer un rôle nouveau dans les mécanismes de carcinogenèse.

J.F.R.

1. Giry-Lozingue C, Kleman J, Van der Rest M. Interactions moléculaires et modularité des protéines au sein des matrices extracellulaires. *Med Sci* 1994; 10: 1234-43.
2. Collod G, Boileau C. Fibrillines et fibrillinopathies. *Med Sci* 1996; 12: 1077-86.
3. Argraves WS, Tran H, Burgess WH, Dickerson K. Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *J Cell Biol* 1990; 111: 3155-64.
4. Pan TC, Sasaki T, Zhang RZ, Faessler R, Timpl R, Chu ML. Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium-binding. *J Cell Biol* 1993; 123: 1269-77.
5. Ramirez F, Pereira L, Zhang H, Lee B. The fibrillin-Marfan syndrome connection. *Bioassays* 1993; 15: 589-94.
6. Balbona K, Tran H, Godyna S, Ingham KC, Strickland DK, Argraves WS. Fibulin binds to itself and to the carboxy-terminal heparin binding region of fibronectin. *J Biol Chem* 1992; 267: 20120-25.
7. Clinton GM, Rougeot C, Derancourt J, Roger P, Defrenne A, Godyna S, Argraves WS, Rochefort H. Estrogens increase the expression of fibulin-1, an extra cellular matrix protein secreted by human ovarian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 316-20.
8. Pan TC, Kluge M, Zhang RZ, Mayer U, Timpl R, Chu ML. Sequence of extracellular mouse protein BM90/fibulin and its calcium dependent binding to other basement-membrane ligands. *Eur J Biochem* 1993; 215: 733-40.

9. Sasaki T, Mann K, Murphy G, Chu ML, Timpl R. Different susceptibilities of fibulin-1 and fibulin-2 to cleavage by matrix metalloproteinases and other tissue proteases. *Eur J Biochem* 1996; 240: 427-34.

10. Tran H, Mattei M, Godyna S, Argraves WS. Human fibulin-1D: molecular cloning, expression and similarity with S1-5protein, a new member of the fibulin gene family. *Matrix Biol* 1996; 15: 479-93.

11. Zhang HY, Chu ML, Pan TC, Sasaki T, Timpl R, Ekblom P. Extracellular matrix protein fibulin-2 is expressed in the embryonic endocardial cushion tissue and is a prominent component of valves in adult heart. *Dev Biol* 1995; 167: 18-26.

12. Zhang HY, Kluge M, Timpl R, Chu ML, Ekblom P. The extracellular matrix glycoproteins BM-90 and tenascin are expressed in the mesen-

chyme at sites of endothelial-mesenchymal conversion in the embryonic mouse heart. *Differentiation* 1993; 52: 211-20.

13. Sasaki T, Kostka G, Goehring W, Wiedemann H, Mann K, Chu ML, Timpl R. Structural characterization of two variants of fibulin-1 that differ in nidogen affinity. *J Mol Biol* 1995; 245: 241-50.

14. Roark EF, Keene DR, Haudenschild CC, Godyna SV, Little CD, Argraves WS. The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural and RNA study. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 401-10.

15. Tran H, Tanaka A, Litvinovich SV, Medved LV, Haudenschild CC, Argraves WS. The interaction of fibulin-1 with fibrinogen. A potential role in hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* 1995; 270: 19458-64.

16. Reinhardt DP, Sasaki T, Dzamba BJ, Keene DR, Chu ML, Goering W, Timpl R, Sakai LY. Fibrillin1 and Fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J Biol Chem* 1996; 271: 19489-96.

17. Sasaki T, Goehring W, Pan TC, Chu ML, Timpl R. Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands. *J Mol Biol* 1995; 254: 892-9.

18. Godyna S, Diaz-Ricart M, Argraves WS. Fibulin-1 mediates platelet adhesion via a bridge of fibrinogen. *Blood* 1996; 88: 2569-77.

19. Galtier-Dereure, Capony F, Maudelonde T, Rochefort H. Estradiol stimulates cell growth and secretion of procathepsin D and a 120-Kilodalton protein in the human ovarian cancer cell line BG1. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1497-502.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **La neuropiline-1, un récepteur du VEGF dans les cellules endothéliales.** La neuropiline-1, exprimée à la surface des neurones, fixe la sémaphorine III (collapsine-1) et d'autres sémaphorines, et ce signal répulsif pour l'axone joue un rôle essentiel dans le guidage axonal au cours du développement [1]. Certaines observations suggéraient déjà l'intervention possible de ces molécules dans l'angiogenèse: l'expression ectopique de la neuropiline-1 entraîne une prolifération anarchique des capillaires, et les embryons murins dont le gène de la neuropiline a été invalidé (*knock-out*) meurent d'anomalies cardiaques. L'identification, par le groupe de Klagsburn (Boston, MA, USA), de la neuropiline-1 à la surface des cellules endothéliales, et la démonstration que cette molécule est un des récepteurs d'une isoforme du VEGF (VEGF<sup>165</sup>) confirment que l'expression de la neuropiline-1 n'est pas restreinte aux tissus nerveux [2].

Jusqu'à présent on connaissait l'interaction de deux récepteurs à domaine tyrosine-kinase, Flt1 et Flk1/KDR avec les cinq isoformes identifiées du VEGF. L'existence d'un troisième récepteur du VEGF, spécifique de l'isoforme VEGF<sup>165</sup>, était soupçonnée par le même groupe depuis 1996 [3, 4]. Les expériences de clonage par expression et de purification biochimique par chromatographie d'affinité et séquençage protéique révèlent aujourd'hui son identité avec la neuropiline-1. Seule l'isoforme VEGF<sup>165</sup> lie la neuropiline, mais cette interaction entraîne peu d'effets biologiques. Surtout, la neuropiline modulerait la fixation du VEGF au récepteur KDR/Flk1 comme en témoigne, dans les cellules co-exprimant la neuropiline et KDR/Flk1, l'augmentation de la liaison du VEGF<sup>165</sup>-I<sup>125</sup> et, sur le plan fonctionnel, de la prolifération cellulaire et de la migration en réponse au VEGF<sup>165</sup>. Il est assez rare qu'un

même récepteur, ici la neuropiline-1, lie deux ligands aux fonctions apparemment très distinctes, comme une sémaphorine et le VEGF. Reste à déterminer si la neuropiline endothéliale fixe des sémaphorines et est impliquée dans le guidage des capillaires, et si, à l'inverse, le VEGF peut influencer sur le développement et la migration des neurones. Une autre observation intéressante de cette étude est que la neuropiline-1 est exprimée par des lignées tumorales, à l'exclusion des autres récepteurs du VEGF, suggérant peut-être un rôle autocrine du VEGF dans la croissance tumorale, hypothèse qui reste à explorer.

[1. Bloch-Gallego E, Sotelo C. *Med Sci* 1998; 14 : 44-52.]

[2. Soker S, *et al. Cell* 1998; 92: 735-45.]

[3. Soker S, *et al. J Biol Chem* 1996; 271; 5761-7.]

[4. Soker S, *et al. J Biol Chem* 1997; 272: 31582-8.]



**INSTITUT COCHIN DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE**  
 XV<sup>e</sup> Journée Jean-Claude Dreyfus  
 de Génétique et de Pathologie Moléculaires  
**GÉNOMIQUE FONCTIONNELLE**

**Vendredi 18 septembre 1998**

Grand Amphithéâtre de la Faculté de Médecine Cochin Port-Royal  
 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques – 75014 PARIS, France

Renseignements auprès du secrétariat d'Axel KAHN – Tél.-fax : 01 44 41 24 41