Journal de la Société de Biologie, 195 (2), 131-141 (2001)

Régulation de la synthèse de l'élastine

Marie Paule Jacob, Marie Sauvage & Mary Osborne-Pellegrin

INSERM U460, UFR de Médecine Xavier Bichat ,16, rue Henri Huchard, 75870 Paris cedex 18
La correspondance doit être adressée à :
Marie Paule Jacob, UFR de Médecine Xavier Bichat, 16, rue Henri Huchard, 75870 Paris Cedex 18
Tél. : 33 (0) 1.44 85 61 53
Fax : 33 (0) 1.44 85 61 57
E-Mail : jacob@bichat.inserm.fr

reçu le 9 mars 2001

RÉSUMÉ

L'élastine confère la propriété d'élasticité aux organes qui la contiennent (aorte, poumon, cartilage élastique,...). Les différentes étapes de synthèse de l'élastine sont : la transcription du gène, l'épissage différentiel des ARN prémessagers, la traduction des ARNm, l'hydroxylation de quelques résidus proline, l'association de la protéine néosynthétisée -la tropoélastine- avec une protéine chaperonne de 67 kDa, la sécrétion des molécules de tropoélastine dans l'espace extracellulaire et leur déposition sur le réseau des glycoprotéines de structure microfibrillaires -fibrillines 1 et 2, MAGP 1 et 2,...-. L'élastine devient insoluble et assure sa fonction d'élasticité après la synthèse des acides aminés de pontage. Des mécanismes de régulation interviennent à chacune de ces étapes. Le mécanisme de régulation le plus récemment mis en évidence concerne la stabilité des ARNm. La synthèse de l'élastine est très contrôlée au cours du développement. De nombreux facteurs solubles (cytokines, vitamines, hormones,...) et les contraintes hémodynamiques la régulent. Pour assurer sa fonction, la quantité et la qualité de l'élastine dans les tissus doivent être et rester optimales.

SUMMARY Regulation of elastin synthesis

Elastin is the main protein of elastic fibers and confers the property of elastic recoil to the tissues such as arteries, lung, elastic cartilage,... Elastin synthesis goes through several steps : gene transcription, alternative splicing of pre-mRNA, mRNA translation, hydroxylation of some proline residues of the newly synthetized protein -tropoelastin-, association of with a 67 kDa chaperon protein, secretion of tropoelastin molecules in the extracellular space, and their deposition on the microfibrillar scaffold which contains fibrillin 1, fibrillin 2, MAGP 1 and MAGP 2,.... After the synthesis of cross-links -lysinonorleucine, desmosine, isodesmosine-, elastin becomes insoluble and elastic. The elastogenic pathway is regulated at many levels. The most recently described regulatory mechanism of elastin synthesis is the control of elastin mRNA stability. Elastogenesis is well controlled during development and aging but remains responsive to external factors such as soluble compounds -cytokines, vitamins, hormones,...- and hemodynamic stress. In order to ensure its function, both quantity and quality of elastin should be and should remain optimal in elastic tissues.

Liste des abréviations utilisées :
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNmE : ARNm codant la tropoélastine
CML : Cellules Musculaires Lisses
bFGF : « basic Fibroblast Growth Factor »
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique
IGF-I : « Insulin Growth Factor-I »
IL-1β : Interleukine-1β
MAGP : « Microfibrillar-Associated Glycoproteins »
TGF-α : « Transforming-Growth Factor-α »
TGF-β : « Transforming-Growth Factor-β »
TNF-α : « Tumor Necrosis Factor-α »

INTRODUCTION

L'élastine est l'un des composants des fibres élastiques. Les autres composants sont les glycoprotéines de structure microfibrillaires que sont les fibrillines 1 et 2 et les « Microfibrillar-Associated GlycoProteins » (MAGP) 1 et 2. Les fibres élastiques confèrent la propriété d'élasticité aux organes qui les contiennent : les artères et les veines, le parenchyme pulmonaire, les cartilages élastiques... (Jacob, 1993, Jacob & Robert, 1989).

L'élastine est synthétisée par les cellules de ces tissus : les cellules musculaires lisses artérielles (Sauvage *et al.*, 1998), les fibroblastes de la peau (Kähäri *et al.*, 1992 a et b, du parenchyme pulmonaire, du ligament large de la nuque de bœuf (Wrenn *et al.*, 1987), ou de l'adventice de l'aorte (Davidson *et al.*, 1985), les cellules endothéliales d'artère pulmonaire (Mecham *et al.*, 1983), les chondrocytes du cartilage élastique (Wrenn *et al.*, 1987),...

Les différentes étapes de synthèse de l'élastine sont : la transcription du gène, l'épissage alternatif des ARN prémessagers, la traduction de l'ARN messager (ARNmE), la coupure du peptide signal N-terminal (26 acides aminés) (Davidson *et al.*, 1982) de la protéine synthétisée. La protéine alors synthétisée est la tropoélastine. Quelques résidus de proline (≈ 10 %) sont hydroxylés, la tropoélastine n'est pas glycosylée.

Ces cinq premières étapes intracellulaires se poursuivent par le transport des molécules de tropoélastine à l'intérieur de l'appareil de Golgi et leur sécrétion, la déposition des molécules de tropoélastine sur le réseau des glycoprotéines de structure microfibrillaires, puis la synthèse des acides aminés de pontage (Figure).

La synthèse d'élastine par les cellules et tissus est mise en évidence par l'incorporation d'un acide aminé radioactif (Gly, Pro, Ala, Val ou Lys). Vingt minutes après l'incorporation de l'acide aminé radioactif, la tropoélastine est sécrétée dans l'espace extracellulaire (Rosenbloom & Cywinski, 1976).

Chacune de ces étapes qui conduisent à la formation de l'élastine est susceptible à régulation. Les principaux facteurs qui régulent la synthèse de l'élastine sont le développement/vieillissement, les facteurs solubles (cytokines, hormones, vitamines...), les contraintes hémodynamiques. Tant qu'il n'y a pas eu synthèse des acides aminés de pontage, l'élastine ne peut assurer sa fonction principale, l'élasticité. De plus, cette synthèse des acides aminés de pontage rend la protéine insoluble et résistante à la dégradation par les protéases.

SYNTHÈSE DE L'ÉLASTINE

Structure du gène de l'élastine

Il n'existe qu'une seule copie du gène de l'élastine par génome haploïde (Olliver *et al.*, 1987). Le gène humain est localisé sur le chromosome 7 (7 q11.1-21.1) (Fazio *et al.*, 1991) et le gène du Rat sur le chromosome 8 (Mathern *et al.*, 1994). Les gènes codant pour les tropoélastines humaine et bovine ont été isolés et séquen-

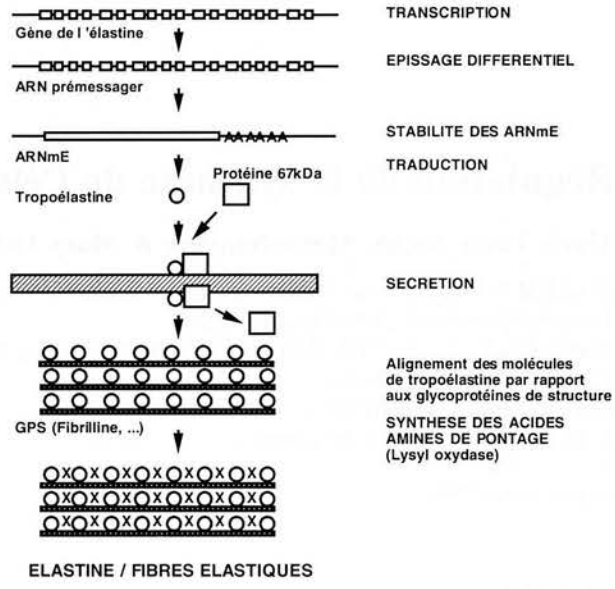

FIG. 1. – Étapes de synthèse de l'élastine et régulations

cés (Indik *et al.*, 1987 ; Yeh *et al.*, 1989 ; Bashir *et al.*, 1989). A l'intérieur du gène de l'élastine, les exons sont relativement petits (27 à 186 pb) et sont séparés par de larges introns ; seul l'exon 36 qui contient une large séquence non codante fait ≈ 1 kpb. Les séquences codantes ne représentent qu'un vingtième du gène. La structure de la protéine est le reflet de l'organisation des exons sur le gène : les séquences hydrophobes et les séquences Ala-Lys sont codées par des exons différents. A de rares exceptions, ces deux types d'exons alternent.

Une forte homologie (≈ 80 %) (Indik et al., 1990 ; Rosenbloom *et al.*, 1993 ; Parks *et al.*, 1993) existe lorsque les séquences 3' codant la courte séquence C-terminale très basique et les séquences 3' non traduites de la plupart des mammifères (Homme, Bœuf, Mouton, Rat, Poulet) sont analysées. Deux sites de polyadénylation situés à 230 pb l'un de l'autre sont apparemment fonctionnels. Les gènes humain et bovin ont été séquencés sur 750 pb en aval du deuxième site de polyadénylation mais aucun autre site n'a été trouvé (Rosenbloom *et al.*, 1995).

Le séquençage de la région en amont du codon d'initiation des gènes de l'élastine humain et bovin a révélé de fortes homologies de certaines séquences : 94 % de -1 à -192 et 86 % de -193 à -588. Cela suggère que ces séquences ont un rôle fonctionnel important (Yeh *et al.*, 1989 ; Bashir *et al.*, 1989). Le promoteur ne contient pas de boîte TATA. Deux boîtes CAAT ont été trouvées, mais ne semblent pas fonctionnelles étant donné leurs positions: -57 à -61 et -599 à -603. Cette région est en général riche en G + C (66 %) avec une fréquence importante de dinucléotides CpG.

Le promoteur du gène de l'élastine présente plusieurs sites potentiels de fixation de facteurs de transcription. Il y a quatre sites SP1 et quatre sites AP2, et des éléments de réponse aux glucocorticoïdes, esters de phorbol et AMPc ; des éléments de réponse aux TNF-α, IGF-I et

TGF-β ont également été mis en évidence. L'absence de boîte TATA laisse supposer qu'il y a plusieurs sites d'initiation de la transcription. Des expériences de digestion par la nucléase S1 et d'extension de primers sur des ARNm extraits d'aorte fœtale humaine ont permis l'identification de trois sites d'initiation centrés autour des nucléotides -(7, 8), -(15, 16) et -(32, 33). Cinq autres sites mineurs d'initiation ont été trouvés entre -45 et -195 (Bashir *et al.*, 1989). Il reste à déterminer si ces sites d'initiation ont un rôle et à savoir si la position de l'initiation de la transcription influe le dépissage différentiel que subissent les ARN prémessagers.

Les séquences au niveau des jonctions exon/intron ont été analysées. Le codon formé lors de la jonction de deux exons code le plus souvent pour une Gly. Dans le but de mieux comprendre l'épissage différentiel des ARN prémessagers de la tropoélastine, Pierce et collaborateurs (1992a) ont étudié les séquences introniques flanquant les exons soumis à l'épissage différentiel. Ces séquences sont différentes des séquences flanquant les exons présents dans tous les ARNmE : les introns 14 et 33, par exemple, n'ont pas de séquences polypyrimidine normalement présentes dans la séquence consensus du site accepteur.

Il existe environ 300 000 copies de séquences ALU par génome humain (Schmid & Jelinek, 1982). Ces séquences répétées d'une longueur de 300 pb, de la famille des rétrotransposons, sont dispersées dans tout le génome aussi bien dans les introns que dans les exons. Une séquence consensus a été établie par Deininger et collaborateurs en 1981 à partir de dix séquences ALU différentes (Deininger *et al.*, 1981). Etant donné leur nombre et la taille du génome humain, il a été démontré que le gène de l'élastine contient quatre fois plus de séquences ALU que le reste du génome (Rosenbloom *et al.*, 1995). En plus de ces séquences ALU, de longues répétitions de dinucléotides ont été trouvées. La fonction de ces éléments répétitifs, s'ils en ont une, doit être élucidée. Chez l'Homme, des délétions qui résultent d'une recombinaison entre ces séquences ALU homologues et qui sont liées à des maladies ont été décrites pour d'autres gènes. Cela pose la question de la stabilité du gène de l'élastine, des expériences ayant montré une instabilité du génome liée à un enrichissement en séquences ALU (Calabretta *et al.*, 1982). En ce qui concerne le gène de l'élastine, la sténose aortique supravalvulaire et le syndrome de Williams sont étroitement liés à la dislocation du gène de l'élastine (Milewicz *et al.*, 2000) mais celle-ci ne serait pas due à un mécanisme impliquant les séquences ALU. Quelques sites polymorphiques ont été identifiés par PCR et action d'endonucléases de restriction (Thromp *et al.*, 1991).

Épissage différentiel des ARNmE.

Les ARNmE ont une longueur d'environ 3,5 kb. Lors de la détermination des séquences des ADNc humain et bovin, il est apparu que toutes les séquences d'une même espèce ne sont pas identiques. Ceci est le résultat de l'épissage différentiel des ARN prémessagers.

Chez l'Homme, les exons susceptibles d'être épissés sont les exons 13, 22, 23, 24A, 26A, 32 et 33 ; chez le Bœuf, les exons 13, 14, 27, 30, 32 et 33 ; et chez le Rat, les exons 12 à 15 et 33. Dans la plupart des cas, l'épissage est de type « cassette-like » c'est-à-dire qu'il inclut ou exclut un exon. Cependant, au niveau des exons 24 et 26 de l'ARN humain, l'épissage se fait au sein de l'exon qui se trouve ainsi scindé. Les domaines hydrophobes et les séquences Ala-Lys sont concernés par l'épissage différentiel de telle sorte que deux régions de pontage peuvent se trouver juxtaposées après épissage, ou à l'opposé, l'intervalle entre deux régions de pontage peut se trouver accru. Il n'est pour l'instant pas possible de prédire le rôle des variations de l'épissage différentiel sinon qu'il est sans doute à l'origine d'un réseau de fibres élastiques plus ou moins compact.

Pour connaître la fréquence d'épissage des exons en fonction du stade de développement, des essais de protection contre la digestion par la nucléase S1 ont été réalisés avec des ARNm isolés du ligament large de la nuque de bœuf à différents âges (fœtus, nouveau-né et adulte (Parks & Deak, 1990). Ces expériences montrent que les exons 13, 14, 27, 30 et 33 sont épissés à tout âge (Yeh *et al.*, 1989) et que l'exon 33 est épissé à la même fréquence quel que soit l'âge de l'animal (40-45 %). En revanche, les exons 13, 14 et 27 sont épissés plus fréquemment à 270 jours de gestation (4,0-7,9 %, 2,5-8,8 %, 7,8-12,6 % respectivement) qu'à 14 jours (0,2-3 %, 0,3-1,9 %, 1,3-1,6 % respectivement). Ces différences d'épissage au cours du développement suggèrent que les isoformes produites après la naissance sont de plus grands poids moléculaires que celles produites *in utero* pendant le développement embryonnaire (Parks *et al.*, 1988). Le nombre d'exons épissés à l'âge adulte est plus grand.

Des expériences ont également été réalisées chez le rat âgé de 10 jours et 6 semaines avec des ARNm extraits à partir de l'aorte, de la peau et des poumons (Heim *et al.*, 1991). Les exons 12 à 15 et l'exon 33 peuvent être épissés. Les exons 12 à 15 sont épissés avec la même fréquence dans les trois tissus (moins de 1 %), quel que soit l'âge des rats. En revanche, l'utilisation du site d'épissage de l'exon 33 est tissu-spécifique et dépendante de l'âge. A 10 jours, les ARNmE extraits de l'aorte et des poumons sont épissés à ce site 10 fois plus fréquemment que ceux extraits de la peau (≈ 9-12 % vs ≈ 2 %). Entre l'âge de 10 jours et de 6 semaines, la fréquence d'épissage de l'exon 33 est diminuée de 20 fois au niveau de la peau (2,1±1,4 % vs 0,2±0,1 %), 10 fois au niveau des poumons (9,3±0,4 % vs 0,9±0,7 %), et 2 fois pour les ARNm extraits de l'aorte (11,8±1,6 % vs 4,8±0,4 %).

Les ARN prémessagers de l'élastine de Poulet sont également soumis à l'épissage différentiel (Baule & Foster, 1988).

Ces expériences suggèrent que l'épissage des exons est différent selon les tissus et le stade de développement. Cela explique la présence des isoformes de la tropoélastine trouvées dans différentes espèces (Rich & Foster, 1984 ; Wrenn *et al.*, 1987). L'importance de ce phénomène dans certaines pathologies doit être étudiée. Le cas de l'exon humain 26A est particulièrement intrigant : cet exon correspond à une séquence en acides aminés

très hydrophile. Cette séquence est rarement exprimée en conditions normales. Lorsqu'elle est incluse, cette séquence doit sans doute modifier les propriétés de la protéine correspondante (Rosenbloom *et al.*, 1995).

Sécrétion des molécules de tropoélastine

La tropoélastine ne subit que peu de modifications post-traductionnelles intracellulaires. L'une d'entre elles est l'hydroxylation de quelques résidus proline, en position 4, par la prolyl hydroxylase avec le fer et l'ascorbate comme co-facteurs (Barone *et al.*, 1985). La teneur en hydroxyproline de l'élastine (1 à 2 %) (Sykes & Partridge, 1974) est néanmoins très inférieure à celle des collagènes, où elle atteint 13 %. La conséquence fonctionnelle de l'hydroxylation des résidus proline de l'élastine est incertaine. A la différence de ce qui se passe pour les collagènes, l'hydroxylation des résidus proline ne semble pas indispensable à la fibrillogenèse de l'élastine (Kao *et al.*, 1982 ; Rosenbloom & Cywinski, 1976 ; Uitto *et al.*, 1976). Il a été émis l'hypothèse que la tropoélastine serait « accidentellement » hydroxylée par la prolyl hydroxylase lors de la synthèse concomitante d'élastine et du collagène par la cellule (Rosenbloom, 1982). Mais une hydroxylation trop importante compromet la formation des fibres d'élastine matures (Urry *et al.*, 1979).

Les molécules de tropoélastine néosynthétisées suivent un routage d'exocytose typique des protéines sécrétées via l'appareil de Golgi et les vésicules de sécrétion vers la surface de la membrane (Thyberg *et al.*, 1979 ; Saunders & Grant M. E, 1984 ; Damiano *et al.*, 1984 ; Daga-Gordini *et al.*, 1987). La voie passant par le Golgi est souvent empruntée par les molécules glycosylées ; or, la molécule de tropoélastine n'est pas glycosylée. Pourquoi ces molécules extrêmement hydrophobes ne forment-elles pas spontanément des agrégats avant d'avoir atteint la surface membranaire ? Le milieu modifie-t-il temporairement les propriétés hydrophobes de la molécule pendant son transit ? Il a été supposé l'existence d'un milieu acide dans le compartiment trans de l'appareil de Golgi (Anderson & Pathak, 1985) et cela pourrait favoriser la solubilité de la protéine. L'autre possibilité est que chaque molécule de tropoélastine est prise en charge par une protéine chaperonne (Grosso & Mecham, 1988 ; Hinek, 1994). Cette protéine chaperonne est le récepteur de l'élastine-laminine (Mecham *et al.*, 1989). Ce récepteur se comporterait comme transporteur et protéine d'assemblage de la matrice. Cette protéine de 67 kDa a également été identifiée comme étant le récepteur des peptides d'élastine à la surface des cellules (Mecham, 1991 ; Robert *et al.*, 1989). Elle est un variant de la β-galactosidase (S-gal) résultant de l'épissage différentiel des ARN prémessagers (Privitera *et al.*, 1998). Avant même que soit caractérisé le récepteur de l'élastine, il avait été observé que la présence de β-galactose ou d'agarose dans le milieu de culture de CML ou de chondroblastes perturbe la formation des fibres élastiques (Hinek *et al.*, 1984). De plus, dans les coussins intimaux qui se développent lors de l'occlusion du *ductus arteriosus* et dans les plaques athéroscléreuses, la désorganisation des fibres élastiques et la diminution des quantités d'élastine insoluble coïncident avec une augmentation des concentrations en glycosaminoglycannes à chondroïtine sulfate ou à dermatane sulfate et une déficience en récepteurs de l'élastine (Hinek *et al.*, 1991 et 1992). Un site de fixation des lectines au niveau du récepteur explique son affinité pour les sucres à galactose. Lorsqu'un sucre à galactose se fixe sur le récepteur, le changement conformationnel qui en résulte diminue l'affinité du récepteur pour la tropoélastine d'une part et pour les protéines transmembranaires du récepteur d'autre part. Le rôle du récepteur dans la formation des fibres élastiques a été confirmé par le fait que les CML isolées à partir de *ductus arteriosus*, déficientes en récepteur, ne déposent pas l'élastine dans les mêmes proportions que les CML d'aorte mais sécrètent abondamment un produit de dégradation de la tropoélastine -tropoélastine dont la région C-terminale a été clivée- qui ne s'assemble pas en fibres élastiques (Hinek & Rabinovitch, 1993). L'utilisation de chloroquine ou de bafilomycine A1, qui bloque l'acidification des endosomes, bloque le recyclage du récepteur dans les CML aortiques en culture ; ceci entraîne la rétention de la tropoélastine dans les cellules et donc inhibe la formation des fibres élastiques. La tropoélastine nouvellement synthétisée serait donc transportée dans l'espace extracellulaire par le récepteur. Au contact des glycosaminoglycannes, le récepteur relargue la tropoélastine. En bloquant la sécrétion des protéines entre les compartiments cis et trans de l'appareil Golgi par la monensine, Frish et collaborateurs (Frish *et al.*, 1985) ont mis en évidence une diminution du taux d'ARNmE ; ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de régulation de la synthèse de tropoélastine par le taux de sécrétion des molécules de tropoélastine néosynthétisées. Ikeda et collaborateurs (1997) ajoutent que la régulation par la monensine interviendrait non seulement au niveau transcriptionnel mais également post-traductionnelle. En effet, ils démontrent que la dégradation intracellulaire de la tropoélastine est augmentée en présence de monensine.

Formation des fibres élastiques et synthèse des acides aminés de pontage

Lorsque les molécules de tropoélastine se dissocient de leurs protéines chaperones, elles s'associent entre elles et s'associent aux microfibrilles. La quantité de tropoélastine est très faible dans les tissus car, dès sa sécrétion dans l'espace extracellulaire et déposition sur le réseau microfibrillaire, débute la formation des acides aminés de pontage. La première étape fait intervenir une enzyme, la lysyl oxydase. Cette enzyme, dépendante du cuivre, catalyse la déamination oxydative de quelques résidus lysine de la tropoélastine en présence d'oxygène (Reiser *et al.*, 1992 ; Jacob, 1993). L'allysine formée, ou acide α-aminoadipique δ-semi aldehyde, s'associe « spontanément » avec un, deux ou trois autres résidus allysine/lysine pour former les acides aminés de pontage de l'élastine : la lysinonorleucine, la mérodesmosine, la desmosine ou son isomère, l'isodesmosine, respective-

ment produits de condensation de deux, trois ou quatre résidus allysine/lysine.

La formation de ces acides aminés de pontage confère à l'élastine ses propriétés d'élasticité, d'insolubilité et de résistance à de très nombreuses enzymes.

RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE DE L'ÉLASTINE

Régulation au cours du développement

La tropoélastine est synthétisée au cours de la deuxième moitié de la gestation et de la phase de croissance de l'individu (Davidson *et al.*, 1984 ; Sephel & Davidson, 1986). Le métabolisme de l'élastine chez l'adulte est très lent (Lefèvre & Rucker, 1993 ; Davis, 1993). Des expériences pertinentes ont déterminé que la durée de vie de l'élastine dans le parenchyme pulmonaire humain normal est égale à la durée de vie de l'Homme (≈70 ans) (Shapiro *et al.*, 1991). Ce résultat confirme ceux antérieurement obtenus au cours des études de biosynthèse de l'élastine (Moczar *et al.*, 1976). Cette diminution de la synthèse de l'élastine chez l'individu adulte est liée à une diminution de la stabilité des ARNmE (voir § II.4). Dans de multiples situations pathologiques, le métabolisme de l'élastine est modifié (Kramsh *et al.*, 1971 ; Goldstein & Starcher, 1978), d'où l'intérêt d'étudier sa régulation.

Analyse fonctionnelle du promoteur du gène de l'élastine

Des expériences de transfection transitoire, dans des CML de rat, de constructions promoteur-gène rapporteur ont démontré l'existence de multiples séquences qui augmentent ou diminuent l'activité du promoteur (localisées sur 2,2 kpb en amont du codon d'initiation) (Kähäri *et al* ; 1990 ; Wolfe *et al.*, 1993). Les séquences importantes pour le maintien d'un taux d'expression basal sont contenues dans la région -148 à -1 car leur suppression abolit toute activité du promoteur. Les sites SP1 et AP2 sont souvent décrits comme étant des sites activateurs de la transcription. Ceci est encore vérifié au niveau du promoteur du gène de l'élastine car la délétion de la séquence -134 à -87 contenant potentiellement trois sites SP1 réduit l'activité promotrice à 10-20 % de l'activité promotrice prise en référence – séquence -475 à -1-. Ces résultats établis avec des CML ont été confirmées avec des cellules NIH/3T3, avec des fibroblastes de peau humaine, avec des cellules de fibrosarcome humain HT-1080 et les cellules HeLa. Le gène de l'élastine est faiblement exprimé dans les fibroblastes de peau et les cellules HT-1080, et ne l'est pas du tout dans les cellules HeLa et NIH/3T3. Des expériences de retardement sur gel avec le segment –195+2 du promoteur du gène de l'élastine ont montré que les extraits nucléaires des cellules exprimant l'élastine donnent un déplacement différent de celui obtenu avec des cellules n'exprimant pas l'élastine (HeLa). Cela suggère que des protéines différentes se fixent sur le promoteur suivant le type cellulaire (Rosenbloom *et al.*, 1995).

Lorsque les tissus de souris transgéniques exprimant 5,2 kpb du promoteur du gène de l'élastine humaine sont analysés, l'expression du transgène correspond à celle du gène endogène : le taux d'expression est important dans les poumons et l'aorte, et plus faible dans les reins, le cerveau, la peau et le cœur. Au cours du développement, la distribution de l'expression du transgène suit celle des animaux témoins (Hsu-Wong *et al.*, 1994). Cependant, il existe quelques incohérences entre l'expression du transgène et celle du gène endogène, tous les éléments de régulation cis ne sont donc pas contenus dans cette région du promoteur. Il a été observé dans de nombreux gènes et, en particulier, dans trois gènes de collagène que le premier intron contient des séquences qui augmentent l'activité promotrice. La comparaison des séquences des introns 1 humain et bovin a montré 77 % d'homologie mais l'activité stimulatrice de cette séquence sur le promoteur n'a pas encore été démontrée (Rosenbloom *et al.*, 1995).

Polymorphisme du gène de l'élastine et synthèse d'élastine

Le gène de l'élastine contient des sites de restriction et des microsatellites polymorphiques (Raybould *et al.*, 1995). Ce polymorphisme du gène de l'élastine a été décrit chez l'Homme et le Rat (Mathern *et al.*, 1994). Les deux souches de Rat BN et LOU se différenciant par le contenu en élastine de leur aorte, deux questions ont été posées :

– Ces quantités d'élastine différentes sont-elles déterminées par des synthèses différentes ?

– Le polymorphisme du gène de l'élastine détermine-t-il le taux de synthèse et la quantité d'élastine dans la paroi artérielle ?

Pour répondre à ces deux questions, un croisement entre les rats BN et LOU a été réalisé, la quantité d'ARNmE a été mesurée dans les aortes des rats F0, F1 et F2 âgés de 6 semaines, et la quantité d'élastine déterminée chez les Rats F0, F1 et F2 âgés de 18 semaines. L'étude de liaison entre le polymorphisme du gène de l'élastine et la quantité d'élastine dans l'aorte des rats F2 a été réalisée.

Les résultats ont montré que :

– la plus faible quantité d'élastine dans l'aorte des rats BN est liée à une synthèse de l'élastine plus faible chez les animaux en croissance,

– le polymorphisme du gène de l'élastine ne détermine que 4 % de la variance totale dans la population des rats F2, bien que la quantité d'élastine dans l'aorte des rats F2 adultes soit déterminée à 72 % par des facteurs génétiques. Le polymorphisme d'un ou plusieurs autres gènes détermine donc ces quantités d'élastine différentes dans l'aorte des rats BN et LOU (Sauvage *et al.*, 1999). Des investigations sont actuellement entreprises pour mettre en évidence ce ou ces autres gènes.

Stabilité des ARNmE

L'effet stimulateur ou inhibiteur de plusieurs facteurs solubles sur la synthèse de l'élastine passant par des mécanismes post-transcriptionnels et, en particulier, par une augmentation (TGF-β) ou une diminution (ester de phorbol, 1,25-dihydroxyvitamine D3) de la stabilité des ARNmE, la question s'est posée de savoir si, plus généralement, le contrôle de la synthèse de l'élastine était lié à la stabilité des ARNmE.

En quantifiant dans les mêmes tissus, le taux de transcription du gène de l'élastine par le dosage des ARN prémessagers d'une part, et la quantité d'ARNmE d'autre part, il a été démontré que l'induction et l'augmentation de la synthèse de l'élastine au cours du développement fœtal sont liées à une augmentation de la transcription du gène de l'élastine. Par contre, la diminution de la synthèse de l'élastine dans les tissus adultes est liée à une diminution de la stabilité des ARNmE, alors que la transcription se maintient à un niveau élevé (Swee *et al.*, 1995).

Deux séquences contrôlant la stabilité des ARNmE ont été identifiées à ce jour : une séquence de 10 nucléotides dans l'exon 30 qui, lorsqu'elle est fixée à une protéine cytosolique de 50 kDa, diminue la stabilité des ARNmE (Zhang *et al.*, 1999a), et une séquence riche en GA, désignée G3A et localisée dans la séquence 3' non traduite de l'ARNmE, qui augmente la stabilité des ARNmE lorsqu'elle fixe des protéines cytosoliques ou nucléaires (Hew *et al.*, 2000).

Régulation de la synthèse de l'élastine par des facteurs solubles

Beaucoup d'études sur la régulation de la biosynthèse de l'élastine ont été réalisées au niveau protéique (dosage ELISA de la tropoélastine dans les milieux de culture ou incorporation d'un acide aminé radioactif dans l'élastine insoluble *ex vivo*). Les études sur la régulation de la biosynthèse au niveau de la transcription du gène de l'élastine sont récentes et le plus souvent incomplètes. En effet, souvent la transcription est étudiée par mesure du taux d'ARNmE. Or cette mesure est le résultat de la synthèse et de la dégradation de ces ARN. La quantité d'ARNm mesurée est-elle alors le reflet d'une variation au niveau de la synthèse ou de la dégradation ? Y a-t-il modification au niveau de la production d'ARNm ou de la stabilité des ARNm ? Quoi qu'il en soit, toutes les études s'accordent pour dire que la production de tropoélastine est proportionnelle à l'abondance des ARNmE (Burnett *et al.*, 1980, Davidson *et al.*, 1984).

De nombreuses cytokines, hormones, vitamines, facteurs de croissance et autres facteurs solubles régulent la synthèse de l'élastine. Ainsi, l'injection de dexaméthasone à des embryons de poulet augmente l'accumulation d'élastine dans leur aorte (Eichner & Rosenbloom, 1979). Le même traitement de trois jours par la dexaméthasone (1 mg/kg/jour) de rattes gestantes augmente d'un facteur 3 le taux d'ARNmE au niveau des poumons de l'embryon âgé de 19 jours. Cette augmentation est liée à une augmentation du nombre de cellules qui synthétisent la tropoélastine et une augmentation de la synthèse par cellule (Pierce *et al.*, 1995). Ces glucocorticoïdes stimulent la synthèse de l'élastine par les cellules déjà productrices d'élastine mais n'induisent pas la synthèse dans les cellules non productrices (Mecham *et al.*, 1984).

Dans les fibroblastes du ligament large de la nuque de Bœuf, la biosynthèse de l'élastine est stimulée par l'addition de dérivés du GMPc. Cet effet des dérivés du GMPc n'est pas observable dans les cellules dépourvues de Ca2 +. Les dérivés de l'AMPc ou l'isoprotérénol (qui induit une augmentation de l'AMPc intracellulaire) ne modifient pas la biosynthèse de l'élastine ; par contre, lorsqu'il y a augmentation simultanée de GMPc et d'AMPc intracellulaires, l'effet du GMPc est aboli par celui de l'AMPc (Mecham *et al.*, 1985). Rappelons que, dans la paroi artérielle, la concentration de GMPc dans les CML est sous le contrôle de la fonction endothéliale (Arnal *et al.*, 1992).

L'acide rétinoïque stimule la synthèse de l'élastine par les fibroblastes de poumon de rat (Liu *et al.*, 1993). Par contre, les esters de phorbol et la vitamine D3 inhibent la synthèse de l'élastine (Parks *et al.*, 1992 ; Pierce *et al.*, 1992b).

L'effet de nombreuses cytokines et facteurs de croissance a également été testé. L'IGF-I (« Insulin Growth Factor-I ») stimule l'expression du gène de l'élastine *in vitro* (Rich *et al.*, 1992) et *in vivo* (Foster *et al.*, 1989). Dans des cultures de CML d'aorte de Rat nouveau-né mises en présence d'IGF-I pendant 24 heures, le taux d'ARNmE est augmenté ainsi que la quantité de tropoélastine. Cet effet n'est pas observé avec des fibroblastes de poumon des mêmes rats bien que les récepteurs soient présents et fonctionnels (Rich *et al.*, 1992). Des expériences de transfection des CML ont démontré que l'IGF-I agissait au niveau de la transcription et la séquence sensible du promoteur est la séquence -195 -136 (Wolfe *et al.*, 1993). *In vivo*, un traitement de deux semaines par l'IGF-I (1,2 mg/kg/jour) de rats âgés de 2 à 25 mois stimule la synthèse d'élastine au niveau de l'aorte mais pas au niveau des poumons (Foster *et al.*, 1989). L'effet de l'IGF-I sur la synthèse de l'élastine est donc cellule- et tissu-spécifique. En 1996, Coon et collaborateurs (Coon *et al.*, 1996) démontrent que l'IGF-I déréprimerait la transcription du gène de l'élastine en inhibant la fixation de l'inhibiteur Sp3 au site RCE («Retinoblastoma Control Element »). Ce site -séquence en – 137-123 du promoteur – se trouve plus en aval que celle qui avait précédemment été supposée intervenir dans la réponse à l'IGF-I.

Le TNF-α («Tumor Necrosis Factor-α ») réprime jusqu'à 91 % la synthèse des ARNmE dans les fibroblastes de peau humaine et les cellules musculaires lisses d'aorte de Rat ; cet effet est dépendant du temps (maximum à 24 heures) et de la dose (maximum à 10 ng/ml) (Kähäri *et al.*, 1992a). Cette diminution de l'expression du gène de l'élastine est précédée d'une augmentation rapide et transitoire de l'expression des oncogènes c-jun et c-fos. La fixation du complexe Jun/Fos au site AP1 - 223 – 229 du promoteur est le médiateur de la répression. Comme le TNF-α, l'interféron inhibe la synthèse de

l'élastine mais la régulation intervient au niveau post-transcriptionnel (Kähäri *et al.*, 1992a).

Les effets de l'IL-1β (interleukine-1β) sont différents selon le type cellulaire auquel elle est ajoutée. Cette cytokine diminue la quantité d'élastine déposée et diminue le taux d'ARNmE lorsqu'elle est ajoutée à une population particulière de fibroblastes de poumon de Rat nouveau-né (Berk *et al.*, 1991). Ajoutée à des fibroblastes de peau humaine, l'IL-1β stimule l'expression du gène de l'élastine en agissant au niveau de la transcription (Mauviel *et al.*, 1993).

Liu et Davidson (1988) ont démontré en utilisant l'ELISA que le TGF-β augmente fortement la production de tropoélastine par les CML d'aorte de Porc. Cet effet du TGF-β est supprimé lors de l'addition simultanée de βFGF (basic Fibroblast Growth Factor) ou de TGF-α (Transforming Growth Factor-α) (Davidson *et al.*, 1993). Les TGF-β1 et TGF-β2 induisent également une augmentation de la quantité d'ARNmE dans les fibroblastes de peau humaine ; cette augmentation résulte d'une augmentation de la stabilité des ARNmE (Kähäri *et al.*, 1992b). Pourtant, un « TGF-β responsive element » a été mis en évidence dans le promoteur du gène de l'élastine (Marigo *et al.*, 1994). La transfection de constructions promoteur du gène de l'élastine humain-gène reporter CAT dans des cellules musculaires d'aorte d'une part, et des fibroblastes de tendon d'embryon de Poulet d'autre part, a démontré que 1) le TGF-β1 n'active le promoteur du gène de l'élastine que dans les CML d'aorte fortement productrices d'élastine mais pas dans les fibroblastes de tendon qui en produisent peu et, 2) la séquence impliquée est localisée entre les bases -138 et -127 du promoteur (Marigo *et al.*, 1993, 1994).

Au niveau de l'aorte, nous avons plus précisément démontré que le TGF-β1 stimule la synthèse de l'élastine par les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales artérielles mais il ne modifie pas la synthèse de l'élastine par les fibroblastes de l'adventice (Sauvage *et al.*, 1998). Une étude de Kucich et collaborateurs (1997) avec des fibroblastes de poumon confirme l'augmentation des ARNmE après addition de TGF-β1. Des expériences de run-on et de mesure de la stabilité des ARNm confirment également que l'effet du TGF-β1 passe par une augmentation de la stabilité des ARNmE. Le TGF-β1 induit l'activation d'une PKC via la PLC spécifique de la phosphatidylcholine.

De l'ensemble de ces études, il émane qu'une extrême prudence est de rigueur pour l'extrapolation des résultats à d'autres systèmes que ceux étudiés. En effet, un même facteur peut être inhibiteur pour un type cellulaire et activateur pour un autre, ou bien même activateur ou inhibiteur pour un même type cellulaire suivant que les cellules ont été mises en culture à partir d'un organe de fœtus, nouveau-né ou d'adulte. La technique de mise en culture, explant ou digestion enzymatique, détermine également le niveau basal de synthèse de l'élastine par les cellules (Ruckman *et al.*, 1994). Le sérum de veau fœtal (SVF) utilisé pour le maintien des cellules en culture modifie aussi le niveau de synthèse de l'élastine. Il ne faut donc pas négliger de préciser les conditions de culture. Il faut également tenir compte du fait que l'agent pharmacologique a été ajouté à la culture cellulaire en présence ou en absence de SVF.

Contrairement à ce qui est observé pour beaucoup de gènes, la synthèse de l'élastine est plus modulable dans les cellules déjà fortement productrices d'élastine.

II.6. Régulation de la synthèse de l'élastine par des facteurs hémodynamiques

La quantité d'élastine diminue le long de l'aorte, du cœur à la bifurcation des artères iliaques (Cleary, 1977). Ainsi, l'aorte abdominale contient relativement moins d'élastine (30 %) que l'aorte thoracique (40 %) et les segments proximaux des artères distributrices – les branches majeures de l'aorte telles que les artères mésentériques, rénales, iliaques – en contiennent encore moins. Au niveau de l'aorte, ceci est le résultat d'une synthèse différentielle le long de l'axe aortique (Davidson *et al.*, 1985). Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer cette synthèse différentielle : réponse directe ou indirecte des cellules aux contraintes hémodynamiques, différents phénotypes de CML et/ou environnement différent des cellules. Chez l'animal adulte, les cellules de l'aorte resynthétisent l'élastine lorsqu'il y a une augmentation des contraintes (Jacob *et al.*, 1997). Cette augmentation est proportionnelle à l'augmentation des contraintes. Lorsque les contraintes se stabilisent, la biosynthèse de l'élastine redevient nulle (Keeley *et al.*, 1990).

Quelques observations cliniques appuient ces observations expérimentales. L'aorte d'un jumeau parasite acardiaque, qui ne reçoit pas de volume d'éjection systolique, présente la structure d'une artère musculaire (Arey, 1963). De plus, chez les enfants présentant le syndrome de l'artère ombilicale unique, l'artère iliaque située du côté où l'artère ombilicale manque se développe en artère musculaire alors qu'une artère élastique est observée de l'autre côté (Berry, 1978). Cet effet des contraintes hémodynamiques sur la biosynthèse de l'élastine n'exclut pas différents phénotypes de CML ni l'effet de l'environnement sur les cellules.

Il est probable que l'étirement rythmique des cellules musculaires pendant le cycle systole-diastole joue un rôle dans la détermination du phénotype des CML et donc des macromolécules qu'elles sécrètent. Dès 1976, Leung et collaborateurs ont montré que les CML d'aorte de Lapin cultivées sur des membranes élastiques et soumises à un étirement rythmique synthétisaient 2 à 4 fois plus de collagène et certains protéoglycannes que les cultures stationnaires (Leung et al., 1976). Lei et collaborateurs ont fourni plus tard une preuve plus directe que la stimulation mécanique des CML par des pulsations artérielles est un stimulus important pour la formation des lames élastiques dans le tissu artériel (Lei., 1986). Ils ont étudié, chez le Rat, la régénération du tissu artériel après la mise en place de greffes biodégradables dans l'aorte qui sert de support à cette régénération. Si ces greffes sont entourées d'un matériel rigide, des quantités limitées d'élastine sont synthétisées et disposées de façon

irrégulière entre les CML. Par contre, si la greffe est compliante et subit des pulsations depuis 6 semaines, des quantités importantes d'élastine sont déposées en lames concentriques parallèles à la surface du vaisseau dans le tissu vasculaire néoformé.

Des modifications hémodynamiques surviennent dans des pathologies comme l'hypertension artérielle essentielle. Cette pathologie est associée à une hypertrophie des grosses artères (Wolinsky, 1970 ; Lévy *et al.*, 1988). Bien qu'une augmentation de la taille (hypertrophie) et du nombre de cellules (hyperplasie) soient en partie responsable de cette hypertrophie pariétale (Girerd *et al.*, 1994), Wolinski (1970), d'autres auteurs (Poiani *et al.*, 1990 ; Keeley & Johnson, 1986 ; Keeley & Alatawi, 1991) ont démontré une augmentation de la quantité totale d'élastine et de collagènes.

Keeley et collaborateurs (Keeley & Johnson, 1986 ; Keeley & Alatawi, 1991) ont démontré une augmentation rapide et coordonnée de la quantité d'élastine, de collagènes, et de protéines totales dans trois modèles d'hypertension systémique chez le Rat (occlusion de l'artère rénale, Doca-sel, rat Dahl sensible au sel). L'hypertension pulmonaire induite par une hypoxie entraîne également une synthèse rapide de matrice caractérisée par une augmentation parallèle des quantités de collagènes et d'élastine (Poiani *et al.*, 1990 ; Stenmark *et al.*, 1987). La quantité de matrice extracellulaire dans les artères et, en particulier, les quantités de collagènes et d'élastine, s'adaptent donc aux contraintes tensionnelles que subit le tissu.

Régulation au niveau de la formation des fibres élastiques

La première étape de synthèse des acides aminés de pontage fait intervenir la lysyl oxydase, enzyme dépendante du cuivre. Un régime alimentaire déficient en cuivre a donc pour conséquence une réduction de l'activité de la lysyl oxydase et une diminution des acides aminés de pontage dans l'élastine et les collagènes (Jacob, 1993). Un régime déficient en cuivre prolongé conduit à la formation d'anévrismes vasculaires, voire à la rupture de l'aorte. La formation des acides aminés de pontage peut être inhibée expérimentalement en traitant les animaux avec le β-aminopropionitrile, agent lathyrogène qui est un substrat compétitif pour la lysyl oxydase.

CONCLUSIONS

La formation des fibres élastiques est liée à l'expression de multiples gènes. La formation de fibres défectueuses peut être le résultat d'une mutation sur le gène de l'élastine lui-même ou bien sur ceux des multiples autres protéines impliquées dans la formation des fibres élastiques (Tableau) (Zhang *et al.*, 1999b ; Bergen *et al.*, 2000 ; Hinek *et al.*, 2000 ; Le Saux *et al.*, 2000 ; Milewicz *et al.*, 2000 ; Ringpfeil *et al.*, 2001). L'intégrité des deux allèles du gène de l'élastine est le premier élément indispensable à la synthèse d'une quantité optimale d'élastine dans les tissus. Un état pathologique est induit dès qu'un allèle est déficient soit à la suite d'une délétion, soit à la suite d'une mutation ponctuelle (Tableau). L'intégrité du réseau des microfibrilles sur lequel se déposent les molécules de tropoélastine après leur sécrétion, et une lysyl oxydase pleinement fonctionnelle sont d'autres éléments indispensables à la synthèse optimale de l'élastine. Ce n'est qu'après formation des acides aminés de pontage que l'élastine confère la fonction d'élasticité aux organes qui la contiennent. En absence de ces maladies génétiques, la quantité d'élastine synthétisée au cours du développement dans les artères, les poumons, la peau,... est optimale pour la fonction qu'ils doivent assurer. Le métabolisme de l'élastine chez l'adulte est ensuite très lent. Préserver la qualité de l'élastine est donc très important. Le dépôt de lipides au cours de l'athérosclérose ou de calcium au cours du vieillissement et dans les cas de *Pseudoxanthoma elasticum* conduit à une perte de fonctionnalité de l'élastine. La néosynthèse d'élastine chez l'individu adulte peut être observée (hypertension, élastose solaire, cancer mammaire) mais l'organisation tridimensionnelle des fibres élastiques néosynthétisées n'est jamais aussi optimale que celle des fibres synthétiséees au cours du développement.

TABLEAU. – Mutations induisant des altérations dans la synthèse des fibres élastiques.

Gènes (altérations)	Maladies
Elastine (délétion d'un allèle)	Syndrome de Williams-Burren
Elastine (mutations ponctuelles)	Sténose supravalvulaire aortique
	Cutis laxa autosomal dominant
Fibrilline 1 (mutations ponctuelles)	Syndrome de Marfan
Fibrilline 2 (mutations ponctuelles)	Arachnodactylie contracturante congénitale
ß- galactosidase	Syndrome de Morquio B
« Copper-transporting P-type ATPase A [ATP7A] »	Syndrome de Menkes
« ATP-Binding Cassette transporter [ABCC6] » = « Multidrug resistance protein 6 [MRP6] »	*Pseudoxanthoma elasticum*

Remerciements. – Les auteurs remercient Laetitia CAILLAUD pour la réalisation matérielle de cet article.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson R.G., Pathak R.K., Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments. *Cell*, 1985, *40*, 635-643.

Arey L.B., The development of peripheral blood vessels. In : « The peripheral blood vessels ». Orbison J.L., Smith D.E., Eds, Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1963, pp 1-16.

Arnal J.F., Warin L., Michel J.B. Determinants of aortic cGMP in hypertension induced by chronic inhibition of NO-synthase. *J. Clin. Invest.*, 1992, *90*, 647-652.

Barone I.M., Faris B., Chipman S.D., Tosseli P., Oakes B.W., Franzblau C., Alteration of the extracellular matrix of smooth muscle cells by ascorbate treatment. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, *840*, 245-254.

Bashir M.M., Indik Z., Yeh H., Ornstein-Goldstein N., Rosenbloom J.C., Abrams W., Fazio M.J., Uitto J., Rosenbloom J., Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unsual features in the 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.*, 1989, *264*, 8887-8891.

Baule V.J., Foster J.A., Multiple chick tropoelastin mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, *154*, 1054-1060.

Berry C.L., Hypertension and arterial development. Long-term considerations. *Brit. Heart J.* 1978, *40*, 709-717.

Bergen A.A., Plomp A.S., Schuurman E.J., Terry S., Breuning M., Dauwerse H., Swart J., Kool M., van Soest S., Baas F., ten Brink J.-B., de Jong P.T., Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nature Gen.*, 2000, *25*, 228-231.

Berk J.L., Franzblau C., Goldstein R.H., Recombinant interleukin-1β inhibits elastin formation by a neonatal rat lung fibroblast subtype. *J. Biol. Chem.*, 1991, *266*, 3192-3197.

Burnett W., Eichner R., Rosenbloom J., Correlation of functional elastin messenger ribonucleic acid levels and rate of elastin synthesis in the developing chick aorta. *Biochemistry*, 1980, *19*, 1106-1111.

Calabretta B., Robberson D.L., Berra-Saldana H.A., Lambrou T.P., Suanders G.F., Genome instability in a region of human DNA enriched in ALU repeat sequences. *Nature*, 1982, *296*, 219-225.

Cleary E.G., Some observations on tissue sampling lessons from the arterial wall. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1977, *79*, 577-588.

Coon K.J., Rich C.B., Jensen D.E., Fontanillia M.R., Bashir M.M., Rosenbloom J., Foster J.A., Insulin-like growth factor-I regulates transcription of the elastin gene through a putative retinoblastoma control element. *J. Biol. Chem.*, 1996, *271*, 28853-28860.

Daga-Gordini D., Bressan G.M., Castellani I., Volpin D., Detection of elastin by immunoelectron microscopy. A comparison of different procedures. *Histochemistry*, 1987, *87*, 573-578.

Damiano V., Tsang A.L., Weinbaum G., Christner P., Rosenbloom J., Secretion of elastin in the embryonic chick aorta as visualized by immunoelectron microscopy. *Collagen Relat. Res.*, 1984, *4*, 153-164.

Davidson J.M., Leslie B., Wolt T., Crystal R.G., Sandberg L.B., Characterization of a signal peptide sequence in the cell-free translation product of sheep elastin mRNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, *218*, 31-37.

Davidson J.M., Shibahara S., Boyd C., Mason M.L., Tolstoshev P., Crystal R.G., Elastin mRNA levels during fœtal development of sheep nuchal ligament and lung. Hybridization to complementary and clone cDNA. *Biochem. J.*, 1984, *220*, 653-663.

Davidson J.M., Hill K.E., Mason M.L., Giro M.G., Longtudinal gradients of collagen and elastin gene expression in the porcine aorta. *J. Biol. Chem.*, 1985, *260*, 1901-1908.

Davidson J.M., Zoia O., Liu J.M., Modulation of transforming growth factor-beta 1 stimulated elastin and collagen production and proliferation in porcine vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-alpha, and insulin-like growth factor-I. *J. Cell. Physiol.*, 1993, *155*, 149-156.

Davis E.C., Stability of elastin in the developing mouse aorta: a quantitative radioautographic study. *Histochemistry*, 1993, *100*, 17-26.

Deininger P.L., Jolly D.J., Rubin C.M., Friedman T., Schmid C.W., Base sequence studies of 300 nucleotide renatured human DNA clones. *J. Mol. Biol.*, 1981, *151*, 17-33.

Eichner R., Rosenbloom J., Collagen and elastin synthesis in the developing chick aorta. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, *198*, 414-423.

Fazio M.J., Mattei M.G., Passage E., Chu M.L., Black D., Solomon E., Davidson J.M., Uitto J., Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, *48*, 696-703.

Foster J.A., Miller M.L., Benedict M.R., Richmann R.A., Rich C.B., Evidence for Insulin-like growth factor-I regulation of chick aortic elastogenesis. *Matrix*, 1989, *9*, 328-335.

Frisch S.M., Davidson J.M., Werb Z., Blockage of tropoelastin secretion by monensin represses tropoelastin synthesis at a pretranslational level in rat smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, *5*, 253-258.

Girerd X., Mourad J.J., Copie X., Moulin C., Acar C., Safar M., Laurent S., Noninvasive detection of an increased vascular mass in untreated hypertensive patients. *Am. J. Hypertension*, 1994, *7*, 1076-1084.

Golstein R.A., Starcher B.C., Urinary excretion of elastin peptides containing desmosine after intratracheal injection of elastase in hamsters. *J. Clin. Invest.*, 1978, *61*, 1286-1290.

Grosso L.E., Mecham R.P., *In vitro* processing of tropoelastin: investigation of a possible transport function associated with the carboxy-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1988, *153*, 545-551.

Heim R.A., Pierce R.A., Deak S.B., Riley D.J., Boyd C.D., Stolle C.A., Alternative splicing of rat tropoelastin messenger RNA is tissue-specific and developmentally regulated. *Matrix*, 1991, *11*, 359-366.

Hew Y., Lau C., Grzelczak Z., Keeley F.W., Identification of a GA-rich sequence as a protein-binding site in the 3'-untranslated region of chicken elastin mRNA with a potential role in the developmental regulation of elastin mRNA stability. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275*, 24857-24864.

Hinek A., Kawiak J., Czarnowska E., Barcew B., The effect of agarose and dexamethasone on the nature and production of extracellular matrix components by elastic cartilage chondrocytes. *Acta Biol. Hung.*, 1984, *35*, 245-258.

Hinek A., Mecham R.P., Keeley F.W., Rabinovitch M., Impaired elastin fiber assembly related to reduced 67-kD elastin-binding protein in fetal lamb ductus arteriosus and in cultured aortic smooth muscle cells treated with chondroitin sulfate. *J. Clin. Invest.*, 1991, *88*, 2083-2094.

Hinek A., Boyle J., Rabinovitch M. Vascular smooth muscle cell detachment from elastin and migration through elastic laminae is promoted by chondroitin sulfate-induced « shedding » of 67-kDa cell surface elastin binding protein. *Exp. Cell Res.*, 1992, *203*, 344-353.

Hinek A., Rabinovitch M., The ductus arteriosus migratory smooth muscle cell phenotype processes tropoelastin to a 52-kDa product associated with impaired assembly of elastic laminae. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 1405-1413.

Hinek A., Nature and the multiple functions of 67-kD elastin-laminin binding protein. *Cell Adh. Commun.*, 1994, *2*, 185-193.

Hinek A., Zhang S., Smith A.C., Callahan J.W., Impaired elastic-fiber assembly by fibroblasts from patients with either Morquio B disease or infantile GM1-gangliosidosis is linked to

deficiency in the 67-kD spliced variant of beta-galactosidase. *Am. J. Human Gen.*, 2000, *67*, 23-36.

Hsu-Wong S., Katchman S.D., Ledo I., Wu M., Khillan J., Bashir M.M., Rosenbloom J., Uitto J., Tissue-specific and developmentally regulated expression of human elastin promoter activity in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, 1994, *269*, 18072-18075.

Ikeda K., Wachi H., Seyama Y., Tajima S., Effects of monensin on tropoelastin metabolism in vascular smooth muscle cells: monensin causes intracellular degradation of accumulated tropoelastin. *J. Biochem.*, 1997, *121*, 5-7.

Indik Z., Yeh H., Ornstein-Goldstein N., Sheppard P., Anderson N., Rosenbloom J.C., Peltonen L., Rosenbloom J., Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, *84*, 5680-5684.

Indik Z., Yeh H., Ornstein-Goldstein N., Rosenbloom J., Structure of the elastin gene and alternative splicing of elastin mRNA. In « Extracellular matrix gene » Sandell L.J., Boyd C.D., eds., Academic Press, San Diego, 1990, pp 221-250.

Jacob M.P., Robert L., Isolation, characterization and biochemical properties of elastin. In : « Elastin & Elastases », Vol. I, Robert L., Hornebeck W., Eds, CRC Press, Boca Raton, 1989, pp 49-65.

Jacob M.P., L'élastine : préparation, caractérisation, structure, biosynthèse et catabolisme. C. *R. Soc. Biol.*, 1993, *187*, 166-181.

Jacob M.P., Sauvage M., Badier C., Osborne-Pellegrin M., Régulation of elastin synthesis in rat aorta. In : « Elastin & Elastic Tissue », Tamburro A.M., ed, Azienda Ospedaliera, San Carlo, 1997, pp 107-116.

Kähäri V.M., Fazio M.J., Chen Y.Q., Bashir M.M., Rosenbloom J., Uitto J., Deletion analyses of 5' flanking region of the human elastin gene: delineation of functional promoter and regulatory cis-elements. *J. Biol. Chem.*, 1990, *265*, 9485-9490.

Kähäri V.M., Chen Y.Q., Bashir M.M., Rosenbloom J., Uitto J., Tumor necrosis factor-α down-regulates human elastin gene expression. *J. Biol. Chem.*, 1992a, *267*, 26134-26141.

Kähäri V.M., Olsen D.R., Rhudy R.W., Carillo P., Chen Y.Q., Uitto J., Transforming growth factor-beta up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts. Evidence for post-transcriptional modulation. *Lab. Invest.*, 1992b, *66*, 580-588.

Kao W.W.Y., Bressan G.W., Prockop D.J., Kinetics of incorporation of tropoelastin into elastic fibers in embryonic chick aorta. *Connect. Tissue Res.*, 1982, *10*, 263-274.

Keeley F.W., Johnson D.J., The effect of developing hypertension on the synthesis and accumulation of elastin in the aorta of the rat. *Can. J. Biochem.*, 1986, *64*, 38-43.

Keeley F.W., Alatawi A., Cho A., The effect of wall stress on the production and accumulation of vascular elastin. In « Elastin », Tamburro A.M, Davidson J.M., eds, Congedo editore, Galatina, 1990, pp 340-356.

Keeley F.W., Alatawi A., The response of aortic elastin synthesis and accumulation to developing hypertension. The inhibitory effect of colchicine on the response. *Lab. Invest.*, 1991, *64*, 499-507.

Kramsch M., Franzblau C., Hollander W., The protein and lipid composition of arterial elastin and its relationship to lipid accumulation in the atherosclerotic plaque. *J. Clin. Invest.*, 1971, *50*, 1666-1677.

Kucich U., Rosenbloom J.C., Abrams W.R., Bashir M.M., Rosenbloom J., Stabilization of elastin mRNA by TGF-beta: initial characterization of signaling pathway. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 1997, *17*, 10-16.

Lefevre M., Rucker R.B., Aorta elastin turnover in normal and hypercholesterolemic Japonese quail. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, *630*, 519-529.

Le Saux O., Urban Z., Tschuch C., Csiszar K., Bacchelli B., Quaglino D., Pasquali-Ronchetti I., Pope F.M., Richards A., Terry S., Bercovitch L., de Paepe A., Boyd C.D., Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nature Gen.*, 2000, *25*, 223-227.

Leung D., Glagov S., Matthews M., Cyclic stretching stimulates synthesis of the matrix components by arterial smooth muscle cells « *in vitro* ». *Science*, 1976, *191*, 475-477.

Levy B.I., Michel J.B., Salzmann J.L., Azizi M., Poitevin P., Safar M.E., Camilleri J.P., Effects of chronic inhibition of converting enzyme on the mechanical and structural properties of arteries of rat renovascular hypertension. *Circ. Res.*, 1988, *63*, 227-239.

Liu J.M., Davidson J.M., The elastogenic effect of recombinant transforming growth factor-beta on porcine aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1988, *154*, 895-901.

Liu R., Harvey C.S., McGowan S.E., Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblasts cultures. *Am. J. Physiol.*, 1993, *265*, L430-L437.

Marigo V., Volpin D., Bressan G.M., Regulation of the human elastin promoter in chick embryo cells. Tissue-specific effect of TGF-β. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, *1172*, 31-36.

Marigo V., Volpin D., Vitale G., Bressan G.M., Identification of a TGF-β responsive element in the human elastin promoter. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1994, *199*, 1049-1056.

Mathern P., Goldmuntz E.A., Du Y., Zha H., Cash J. M., Crofford L.J., Wilder R.L., Remmers E.F., Nine polymorphic markers characterized by polymerase chain reaction technique form two linkage groups on rat chromosome 8. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1994, *66*, 283-286.

Mauviel A., Chen Y.Q., Kähäri V.M., Ledo I., Wu M., Rudnicka L., Uitto J., Human recombinant interleukin-1β up-regulates elastin gene expression in dermal fibroblasts-evidence for transcriptional regulation *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 6520-6524.

Mecham R.P., Madaras J., McDonald J.A., Ryan U., Elastin production by cultured calf pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 1983, *116*, 282-288.

Mecham R.P., Morris S.L., Levy B.D., Wrenn D.S., Glucocorticoids stimulate elastin production in differentiated bovine ligament fibroblasts but do not induce elastin synthesis in undifferentiated cells. *J. Biol. Chem.*, 1984, *259*, 12414-12420.

Mecham R.P., Levy B.D., Morris S.L., Madaras G.J., Wrenn D.S., Increased cyclic GMP levels lead to a stimulation of elastin production in ligament fibroblasts that is reversed by cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*, 1985, *260*, 3255-3258.

Mecham R.P., Hinek A., Entwistle R., Wrenn D.S., Griffin G.L., Senior R.M., Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. *Biochemistry*, 1989, *28*, 3716-3722.

Mecham R.P., Laminin receptors. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1991, *7*, 71-91.

Milewicz D.M., Urban Z., Boyd C., Genetic disorders of the elastic fiber system. *Matrix Biol.* 2000, *19*, 471-480.

Moczar M., Ouzilou J., Courtois Y., Robert L., Age-dependance of the biosynthesis of extracellular matrix macromolecules of rabbit aorta in organ culture and cell culture. *Gerontology*, 1976, *22*, 461-472.

Olliver L., Luvalle P.A., Davidson J.M., Rosenbloom J., Mathew C.G., Bester A.J., Boyd C.D., The gene coding for tropoelastin is represented as a single copy sequence in the haploid sheep genome. *Collagen Relat. Res.*, 1987, *7*, 77-89.

Parks W.C., Secrist H., Wu L.C., Mecham R.P., Developmental regulation of tropoelastin isoforms. *J. Biol. Chem.*, 1988, *263*, 4416-4423.

Parks W.C., Deaks S.B., Tropoelastin heterogeneity: implication for protein function and disease. *Am. J.* Respir. *Cell. Mol. Biol.*, 1990, *2*, 399-406.

Parks W.C., Kolodziej M.E., Pierce R.A., Phorbol ester-mediated down regulation of tropoelastin expression is controlled by

a post transcriptional mechanism. *Biochemistry*, 1992, *31*, 6639-6645.

Parks W.C., Pierce R.A., Lee K.A., Mecham R.P. ,Elastin. *Adv. Mol. Cell. Biol.*, 1993, *6*, 133-182.

Pierce R.A., Alatawi A., Deak S.B., Boyd C.D., Elements of the rat tropoelastin gene associated with alternative splicing. *Genomics*, 1992a, *12*, 651-658.

Pierce R.A., Kolodziej M.E., Parks W.C., 1,25-dihydroxyvitamin D3 represses tropoelastin expression by a posttranscriptional mechanism. *J. Biol. Chem.*, 1992b, *267*, 11593-11599.

Pierce R.A., Mariencheck W.I., Sandefur S., Crouch E.C., Parks W.C., Glucocorticoids up-regulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. *Am. J. Physiol.*, 1995, *268*, L491-L500.

Poiani G.J., Tozzi C.A., Yohn S.E., Pierce R.A., Belsky S.A., Berg R.A., Yu S.Y., Deak S.B., Riley D.J., Collagen and elastin metabolism in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Circ. Res.*, 1990, *66*, 968-978.

Privitera S., Prody C.A., Callahan J.W., Hinek A., The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273*, 6319-6326.

Raybould M.C., Birley A.J., Hulten M., Molecular variation of the human elastin (ELN) gene in a normal human population. *Ann. Human Gen.*, 1995, *59*, 149-161.

Reiser K., McCormick R.J., Rucker R.B., Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J.*, 1992, *6*, 2439-2449.

Rich C.B., Foster J.A., Isolation of tropoelastin from lathyritic chick aortae. *Biochem. J.*, 1984, *217*, 581-584.

Rich C.B., Ewton D.Z., Martin B.M., Florini J.R., Bashir M., Rosenbloom J., Foster J.A., IGF-I regulation of elastogenesis: comparison of aortic and lung cells. *Am. J. Physiol.*, 1992, *263*, L276-L282.

Ringpfeil F., Nakano A., Uitto J., Pulkkinen L., Compound Heterozygosity for a Recurrent 16.5-kb Alu-Mediated Deletion Mutation and Single-Base-Pair Substitutions in the ABCC6 Gene Results in Pseudoxanthoma Elasticum. *Am. J. Human Gen.*, 2001, *68*, 642-652.

Robert L., Jacob M.P., Fulop T., Timar J., Hornebeck W., Elastonectin and the elastin receptor. *Pathol. Biol.*, 1989, *37*, 736-741.

Rosenbloom J., Cywinski A., Inhibition of proline hydroxylation does not inhibit secretion of tropoelastin by chick aorta cells. *FEBS Letters*, 1976, *65*, 246-250.

Rosenbloom J. ,Elastin: biosynthesis, structure, degradation, and role in disease process. *Connect. Tissue Res.*, 1982, *10*, 73-91.

Rosenbloom J., Abrams W.R., Mecham R., Extracellular matrix. 4. The elastic fiber. *FASEB J.*, 1993, *7*, 1208-1218.

Rosenbloom J., Abrams W.R., Indik Z., Yeh Z., Yeh H., Ornstein-Goldstein N., Bashir M.M., Structure of the elastin gene. In : « The molecular biology and pathology of elastic tissues ». Ciba Foundation Symposium 192, John Wiley & Sons, Chichester, 1995, pp 59-73.

Rucker R.B., Tinker D., Structure and metabolism of arterial elastin. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 1977, *17*, 1-47.

Ruckman J.L., Luvalle P.A., Hill K.E., Giro M.G., Davidson J.M., Phenotypic stability and variation in cells of the porcine aorta: collagen and elastin production. *Matrix Biol.*, 1994, *14*, 135-145.

Sauvage M., Hinglais N., Mandet C., Badier C., Deslandes F., Michel J. B., Jacob M.P., Localization of elastin mRNA and TGF-β1 in rat aorta and caudal artery as a function of age. *Cell Tissue Res.*, 1998, *291*, 305-314.

Sauvage M., Osborne-Pellegrin M., Deslandes-Le Flohic F., Jacob M.P., Influence of elastin gene polymorphism on the elastin content of the aorta: A study in 2 strains of rat. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, *19*, 2308-2315.

Saunders N.A., Grant M.E., Elastin biosynthesis in chick embryo arteries. Studies on the intracellular site synthesis of tropoelastin. *Biochem. J.*, 1984, *221*, 393-400.

Schmid C.W., Jelinek W.R., The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science*, 1982, *216*, 1065-1070.

Sephel G.C., Davidson J.M., Elastin production in human skin fibroblast cultures and its decline with age. *J. Invest. Dermatol.*, 1986, *86*, 279-285.

Shapiro S.D., Endicott S.K., Province M.A., Pierce J.A., Campbell E.J., Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J. Clin. Invest.*, 1991, *87*, 1828-1834.

Stenmark K.R., Fasules J., Hyde D.M., Voelkel N.F., Henson J., Tucker A., Wilson H., Reeves J.T., Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4,300 m. *J. Applied Physiol.*, 1987, *62*, 821-830.

Swee M.H., Parks W.C., Pierce R.A., 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.

Sykes B.C., Partridge S.M., Isolation of a soluble elastin from lathyric chicks. *Biochem. J.*, 1974, *141*, 567-572.

Thromp G., Christiano A., Goldstein N., Indik Z., Boyd C., Rosenbloom J., Deaks S., Prockop D., Kuivaniemi H., A to G polymorphism in ELN gene. *Nucleic Acids Res.*, 1991, *19*, 4314.

Thyberg J., Hinek A., Nilsson J., Frieberg U., Electron microscopic and cytochemical studies of rat aorta. Intracellular vesicules containing elastin- and collagen-like material. *Histochem. J.*, 1979, *11*, 1-17.

Uitto J., Hoffman H.P., Prockop D.J., Synthesis of elastin and procollagen by cells from embryonic aorta. Differences in the role of hydroxyproline and the effects of proline analogs on the secretion of the two proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, *173*, 187-200.

Urry D.W., Sugano H., Prasard K.U., Long M.M., Bhatnagar R.S., Prolyl hydroxylation of the pentapeptide model of elastin impairs fiber formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, *90*, 194-198.

Wolfe B.L., Rich C.B., Goud H.D., Terpstra A.J., Bashir M.M., Rosenbloom J., Soneenshein G.E., Foster J.A., Insulin growth factor-I regulates transcription of the elastin gene. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 12418-12426.

Wolinsky H., Response of the rat aortic wall to hypertension: importance of comparing absolute amounts of wall components. *Atherosclerosis*, 1970, *11*, 251-255.

Wrenn D.S., Parks W.C., Whitehouse L.A., Crouch E.C., Kucich U., Rosenbloom J., Mecham R.P., Identification of multiple tropoelastins secreted by bovine cells. *J. Biol. Chem.*, 1987, *262*, 2244-2249.

Yeh H., Anderson N., Orstein-Goldstein N., Bashir M.M., Rosenbloom J.C., Abrams W., Indik Z., Yoon K., Parks W., Mecham R., Rosenbloom J., Structure of the bovine elastin gene and S1 nuclease analysis of alternative splicing of elastin mRNA in the bovine nuchal ligament. *Biochemistry*, 1989, *28*, 2365-2370.

Zhang M., Pierce R.A., Wachi H., Mecham R.P., Parks W.C., An open reading frame element mediates posttranscriptional regulation of tropoelastin and responsiveness to transforming growth factor beta1. *Mol. Cell. Biol.*, 1999a, *19*, 7314-7326.

Zhang M.C., He L., Giro M., Yong S.L., Tiller G.E., Davidson J.M., Cutis laxa arising from frameshift mutations in exon 30 of the elastin gene (ELN). *J. Biol. Chem.*, 1999b, *274*, 981-986.

Séance du 20 décembre 2000