

Fibrillines et fibrillinopathies,

Gwenaëlle COLLOD ¹, Catherine BOILEAU ^{1,2}.

1: INSERM U383, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université René Descartes, Paris V, 149-161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

2: Laboratoire Central de Biochimie et de Génétique Moléculaire, CHU Ambroise Paré, 9 avenue Charles de Gaulle, 92104 Boulogne Cedex, France.

La correspondance doit être adressée à C.B. :

INSERM U383
Hôpital Necker-Enfants Malades
Pavillon Maurice LAMY
149-161 rue de Sèvres
75743 Paris Cedex 15, France.
Tel : 44 49 44 85.
Fax : 47 83 32 06.

Mots clé : fibrillines, réseau microfibrillaire, syndrome de Marfan, fibrillinopathies.

Summary:

Fibrillins and fibrillinopathies.

Microfibrils contain a variety of proteins, the most prominent of which are the two fibrillins. Fibrillins are large glycoproteins (320 kDa) ubiquitously distributed in connective tissues. Together with amorphous elastin, fibrillin-containing microfibrils form the elastic fibers. Fibrillins are also found in microfibrils that are apparently unendowed with amorphous elastin, such as those forming the ciliary zonule. Fibrillins are encoded by two different genes: FBN1 on human chromosome 15q21 encodes type 1 fibrillin and FBN2 on human chromosome 5q23 encodes type 2 fibrillin. The most notable structural feature of these proteins is the presence of numerous calcium-binding epidermal growth factor like motifs interspersed with a few motifs homologous to those found in the binding protein for transforming growth factor β . The study of the developmental expression of the fibrillin genes has revealed different patterns: FBN1 is mainly expressed during late morphogenesis while FBN2 expression coincides with early morphogenesis and notably the beginning of elatogenesis. Therefore, fibrillins could contribute to the structural and functional heterogeneity of microfibrils. This heterogeneity is reflected in the large phenotypic spectrum associated with mutations in the fibrillin genes. These mutations are found in a new groupe of inherited connective-tissue disorders: the fibrillinopathies. To date, 76 mutations have been identified in FBN1 gene. These mutations are associated not only with the Marfan syndrome (MFS) but also with a spectrum of conditions phenotypically related to MFS including dominantly inherited ectopia lentis, severe neonatal Marfan syndrome and isolated typical features of Marfan syndrome. Conversely, only a few mutations have been reported in the FBN2 gene and observed in congenital contractural arachnodactyly. Important issues that will now have to be addressed concern the elucidation of the exact composition of the microfibrils and their spatial organization into tissue-specific macro-aggregates.

Les fibrillines sont les constituants majeurs du réseau microfibrillaire. Cette structure du tissu conjonctif est soit étroitement associée aux fibres d'élastine soit présente en agrégats isolés dans les tissus dépourvus d'élastine. Les travaux de biologie cellulaire et moléculaire ont permis d'élucider la structure des fibrillines et de commencer à appréhender leurs relations avec les autres constituants de la matrice extra-cellulaire. Mais, c'est la description de leur altération dans différentes maladies du tissu conjonctif, dont le syndrome de Marfan, qui a révélé leur importance.

Parmi les différents constituants de la matrice extra-cellulaire (MEC), les fibres élastiques comme leur nom l'indique confèrent au tissu conjonctif ses propriétés élastiques. Ces fibres présentent des assemblages supra-moléculaires constitués de deux éléments : i) un composant très abondant et amorphe : l'élastine, et ii) un composant microfibrillaire de 10-12 nm localisé à la périphérie de l'élastine, le réseau microfibrillaire (figure 1). Le terme de microfibrilles a été initialement utilisé pour identifier des agrégats de la matrice extra-cellulaire morphologiquement similaires et n'ayant pas l'aspect périodique en bandes des fibres interstitielles de collagène [1]. Cette définition grossière a été ensuite restreinte aux microfibrilles de 10 nm de diamètre qui peuvent s'associer ou non aux fibres élastiques [2]. L'inventaire complet des constituants macromoléculaires des microfibrilles est actuellement inconnu, en grande partie à cause de leur nature insoluble. Des techniques biochimique et immunochimique ont cependant permis, ces dernières années, d'identifier plusieurs macromolécules constitutives des microfibrilles dont les fibrillines.

Les fibrillines sont les constituants majeurs du réseau microfibrillaire. Ce sont de grosses glycoprotéines riches en cystéine retrouvées tant en association avec l'élastine que dans des structures dépourvues d'élastine comme la zonule ciliaire. Deux types de fibrilline sont actuellement identifiés : la fibrilline de type 1 et la fibrilline de type 2 . Des mutations dans leurs gènes sont associées non seulement au syndrome de Marfan (MFS), prototype des maladies du tissu conjonctif, mais également à toute une série de pathologies apparentées au MFS, constituant un nouveau groupe de maladies du tissu conjonctif : les fibrillinopathies.

I. Les fibrillines.

Gène de la fibrilline-1 et structure primaire déduite de la protéine : La fibrilline-1 est codée par un grand gène d'environ 110 kb, le gène FBN1 [3, 4]. L'organisation génomique de FBN1 (limites intron/exon) a été élucidée en 1993 par l'équipe de Pereira [5]. Elle a révélé un gène très morcelé (65 exons) puisque chaque module est en général codé par un exon. L'ADNc (10 kb environ) a été cloné en deux étapes :

tout d'abord sa partie 3' par deux équipes en 1991 [6, 7] puis sa partie 5' en 1993 par l'équipe de L. Sakai [8]. La structure protéique primaire déduite montre que le gène de la fibrilline code pour une protéine complexe de 2 871 acides aminés [5] comprenant de nombreux modules répétés (voir figure 2). La protéine présente des domaines sans homologie avec d'autres protéines : il s'agit des extrémités N terminale et C terminale, et de la région riche en proline. Le domaine central de la protéine est formé par la répétition de plusieurs modules. L'analyse comparative a révélé de fortes homologies entre 47 de ces modules présentant 6 cystéines avec des modules du précurseur de l'epidermal growth factor (EGF) [9]. Ces modules "EGF-like" sont caractérisés par une organisation conservée de 6 cystéines qui forment des ponts disulfures intra-chaînes donnant une conformation en feuillet β antiparallèle. Quarante trois de ces 47 modules contiennent, de plus, la séquence consensus conservée Asp-Asn\Asn-Glu\Gln-Asp*\Asn*-Tyr-Phe (où * indique un résidu β hydroxylé) qui est nécessaire à la liaison du calcium (module "cb EGF-like", cb pour calcium binding). La fibrilline est la première protéine du tissu conjonctif dans laquelle des modules cb EGF-like ont été identifiés. En effet, ce module n'avait jusqu'alors été retrouvé que dans des protéines plasmatiques vitamine k-dépendantes (facteurs IX et X de la coagulation, protéines C et S) et dans les protéines Notch, Delta et crumbs de la drosophile [10]. Un deuxième module composé de 8 cystéines, répété 7 fois dans la protéine, est fortement homologue à des modules décrits dans la protéine liant le transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1 BP). Dans la fibrilline-1 comme dans TGF- β 1 BP, ces modules "8 cystéines" s'intercalent avec les modules EGF-like. Enfin, un troisième module est retrouvé 2 fois intercalé dans les répétitions EGF-like et TGF- β 1 BP. Ces modules, dits "hybrides", présentent des caractéristiques des deux types de modules précédemment décrits (figure 2). Enfin, deux études fonctionnelles [11, 12] ont révélé l'existence d'une pro-fibrilline d'une taille supérieure d'environ 30 kD. Le site de clivage du propeptide est encore inconnu mais certainement localisé dans la partie C terminale dans la région E [11].

Gène de la fibrilline-2 et comparaison des structures primaires déduites des deux

gènes : La possibilité d'un deuxième gène codant pour une fibrilline a été mise en évidence lors des étapes du clonage du gène FBN1. En effet, un clone (MF23) bien que très semblable était localisé sur le chromosome 5 en 5q23 [7]. L'ADNc de ce gène a été caractérisé et, de par sa similitude avec le gène FBN1, a été appelé FBN2 et la protéine pour laquelle il code fibrilline-2. La comparaison des deux fibrillines (figure 2) montre une très forte homologie dans la région D (81%), avec une même organisation de 41 modules EGF-like liant le calcium espacés par des modules TGF- β 1 BP. Tous les sites de N-glycosylation potentiels, sauf un, sont conservés. Deux séquences potentielles de liaison cellulaire RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) sont retrouvées, dont l'une est identique à la séquence unique localisée dans la fibrilline-1. La région B est également très similaire (87% d'homologie). La région E (50%) diffère par la présence de deux séquences polylysine. Dans la région A (19% d'homologie), une nouvelle séquence riche en proline est présente juste après le site potentiel de clivage du peptide signal. Malgré cette différence, la région est également basique. La région C est la plus divergente : très riche en proline dans la fibrilline-1 et en glycine dans la fibrilline-2 [13, 14].

Assemblage des monomères de fibrilline : La microscopie électronique après ombrage rotatif de microfibrilles contenant de la fibrilline isolées de cultures cellulaires à confluence révèle un aspect en collier de perles foncées, avec une périodicité d'une perle tous les 50-55 nm, séparées par des régions plus claires (figure 3). La base moléculaire de cette périodicité régulière de perles n'est pas connue. Les premières données immuno-histochimiques [4] favorisaient l'hypothèse d'un assemblage en tandem des monomères de fibrilline de façon répétitive le long de la microfibrille mais l'organisation exacte ainsi que les interactions moléculaires restaient indéterminées. La potentialité de la fibrilline à lier le calcium, fortement suggérée par la présence en abondance des modules EGF-like possédant des séquences consensus de liaison au calcium (cb EGF-like), a récemment été démontrée [8]. L'identification chez des patients atteints d'un syndrome de Marfan de mutations dans le gène de la fibrilline dans ce type de domaine, prédisant une anomalie de liaison du calcium, souligne l'importance potentielle de la liaison du

calcium en terme d'intégrité microfibrillaire et de fonction. Des expériences d'adjonction ou de chélation de calcium [15, 16] ont montré un impact majeur sur l'organisation des régions entre les perles alors que de façon surprenante l'intégrité des perles, leur périodicité ainsi que la longueur des microfibrilles ne semblent pas affectées. Ces observations indiquent que la région riche en modules cb EGF-like constitue l'élément structural majeur des régions inter-perles. Le rôle du calcium serait d'induire un changement structural local de regroupement latéral et d'alignement des monomères de fibrilline adjacents au niveau des domaines inter-perles. Le fait que le calcium soit en position relativement interne dans la structure, suggère que sa liaison au module EGF-like aurait plutôt un rôle stabilisateur au niveau de chaque monomère de fibrilline plutôt que dans des liaisons reliant des monomères de fibrilline entre eux [17].

Des expériences récentes de cristallographie en phase liquide de modules cb EGF-like appartenant à différentes protéines [10, 17] ont montré que la succession de modules EGF-like au sein de chaque monomère génère un arrangement hélicoïdal qui serait stabilisé par le calcium. En se basant sur ce modèle, Handford et al. en 1995 [17] ont proposé un modèle d'interaction entre plusieurs monomères de fibrilline : une première étape serait la dimérisation de deux molécules de fibrilline dans une orientation antiparallèle suivie de l'association des deux dimères pour former un corps de 4 hélices (figure 4). L'étape à franchir maintenant est la validation de ce modèle ainsi que l'élucidation des interactions de la fibrilline avec les autres composants du réseau microfibrillaire. Ces interactions pourraient se situer au niveau des perles et expliquer leur stabilité vis à vis des variations (adjonction et chélation) de calcium.

Interaction de la fibrilline avec les autres constituant du réseau microfibrillaire, la matrice extra-cellulaire, et l'élastine : L'inventaire complet des constituants des microfibrilles est actuellement inconnu. Plusieurs macromolécules constitutives des microfibrilles, autres que les fibrillines, ont cependant pu être identifiées : les 4 MFAP (Microfibril-associated protein), la lysyl oxydase, l'émiline ou gp115 (glycoprotéine 115kDa), et la gp36 (glycoprotéine 36kDa). Les fonctions de ces

différentes protéines au sein de ce réseau ainsi que les relations entre ses différents constituants ne sont pas à l'heure actuelle élucidées. Les interrelations entre les fibrillines et les autres protéines composant la MEC restent encore obscures. Le réseau microfibrillaire semble cependant jouer un rôle crucial dans l'élastogénèse, servant d'échafaudage sur lequel se déposerait l'élastine. En effet, l'hypothèse que les molécules de tropoélastine sont simplement sécrétées puis diffusent sur la surface de fibres en croissance sur lesquelles elles se lieraient et seraient reliées entre elles ne permet pas d'expliquer l'efficacité du processus d'assemblage ainsi que l'existence d'une variété de formes des fibres élastiques dans différents tissus. Il semble évident que la sécrétion de tropoélastine ainsi que son assemblage nécessitent l'aide d'autres protéines aussi bien à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur. Les fibrillines constituent de très bons candidats. La fibrillogénèse de l'élastine s'effectue en effet près de la membrane. Les microfibrilles sont le premier composant visible des fibres élastiques, apparaissant sous formes de petits amas près de la membrane plasmique. Lors du développement des fibres élastiques, l'élastine apparaît comme un matériel amorphe, au sein des amas microfibrillaires. Progressivement, ces régions amorphes s'assemblent pour former le coeur central d'élastine. Les microfibrilles sont alors majoritairement et progressivement déplacées tout autour de la fibre, position qu'elles conservent dans les tissus matures. Le fait que les agrégats de microfibrilles prennent la forme et l'orientation des futures fibres élastiques suggère que ce réseau permettrait d'aligner les molécules de tropoélastine de façon à juxtaposer les sites de liaison entre ces molécules avant oxydation par la lysyl oxydase [18].

Expression des gènes de fibrillines au cours de l'embryogenèse et localisation chez l'adulte : L'expression des gènes de fibrillines durant le développement a été étudié chez la souris et montre un profil caractéristique en deux temps avec une transcription de FBN2 apparaissant plus précocement par rapport à FBN1. Hormis le système cardiovasculaire où l'activité du gène FBN1 est plus précoce et toujours plus élevée que celle de FBN2, il semble exister dans les autres systèmes une corrélation entre le moment de l'expression de chaque gène de fibrilline et les différents stades

de la morphogénèse. En effet, l'accumulation des transcrits de FBN2 atteint un plateau juste avant la différenciation tissulaire effective et décroît rapidement après, voire même disparaît. Au contraire, la quantité de transcrits FBN1 s'accroît de façon graduelle tout au long de la morphogénèse [14].

Le gène FBN2 est exprimé principalement durant l'embryogénèse dans une grande variété de tissus et de cellules, comprenant le mésenchyme, l'épithélium, les chondrocytes ainsi que les cellules vasculaires, squelettiques et myocardiques. Ce profil mésodermique d'expression contraste avec le fait que ce gène n'a été découvert que durant l'étape de clonage du gène FBN1. Il semble maintenant fort probable que l'âge des tissus utilisés alors aient été la principale cause de l'ignorance de l'existence d'une deuxième fibrilline [14].

Chez l'adulte, des anticorps anti-fibrilline révèlent une distribution étendue des fibrillines dans la matrice extra-cellulaire tant en association avec l'élastine (peau, poumons, reins, vaisseaux, cartilages, tendons, muscles) que dans des tissus ne contenant aucune fibre d'élastine comme la zonule ciliaire. L'identification d'une région protéique très divergente entre les deux fibrillines, la région C (figure 2), a permis la réalisation d'anticorps spécifiques pour chacune des protéines. L'utilisation de ces anticorps spécifiques révèle une distribution très semblable avec une localisation préférentielle de la fibrilline-2 pour les matrices extra-cellulaires riches en fibres élastiques [14]. Certaines différences ont pu cependant être notées. Au niveau de la peau, la fibrilline-1 est révélée sous forme de filaments discrets reliant le derme à la jonction épidermale tandis que la fibrilline-2, bien qu'ayant la même localisation, présente un marquage plus fort dans le derme particulièrement autour des follicules pileux et des glandes sudoripares [13].

Fonction des fibrillines dans le réseau microfibrillaire : Sur la base des profils spatio-temporels de l'expression des deux gènes de fibrilline, il est fort possible que les deux protéines puissent jouer des rôles différents. La protéine fibrilline-2 est préférentiellement trouvée dans les tissus riches en élastine comme le cartilage, la média de l'aorte et le long de l'arbre bronchique. Durant l'embryogénèse,

l'expression de la fibrilline-2 est plus précoce que celle de la fibrilline-1 et est apparemment majoritaire pendant une courte période de temps précédant l'élastogénèse. Il est donc possible qu'une des fonctions majeures de la fibrilline-2 durant la morphogénèse précoce est de participer à l'orientation de l'élastine lors de l'assemblage des fibres élastiques. En effet, la région riche en glycine de la fibrilline-2, hautement hydrophobe, montre des homologies avec de nombreux fragments de l'élastine [18]. Comme eux, cette région peut donc théoriquement former des feuillets β et des coudes β facilitant l'agrégation protéique par des interdigitations des parties hydrophobes des chaînes [19]. Il est donc possible que cette région de la fibrilline-2 médie des interactions décisives avec l'élastine durant l'assemblage précoce des fibres élastiques.

Inversement, l'expression plus tardive de FBN1 au cours du développement et la prédominance de la fibrilline-1 dans les structures responsables de la résistance à la charge et à la tension (comme l'adventice de l'aorte, les ligaments suspenseurs du cristallin, la peau) suggère que cette glycoprotéine est principalement responsable de la fonction structurale des microfibrilles.

II. Les fibrillinopathies :

Très rapidement après le clonage des gènes FBN1 et FBN2, de nombreux travaux ont montré que des altérations de ces gènes étaient associées à différentes maladies du tissu conjonctif. Ces maladies, longtemps considérées comme des collagénopathies, constituent le nouveau groupe des fibrillinopathies.

Fibrillinopathies de type 1 ou maladies de la fibrilline du chromosome 15 (FBN1) : A ce jour 76 mutations du gène FBN1 ont été décrites (voir pour revue [20] et figure 5). Leur analyse révèle une absence totale de gros réarrangement dans le gène. Ces mutations sont réparties sur toute la longueur du gène et sont dans leur grande majorité privées (seulement 7 cas de mutations récurrentes sont décrits). Il s'agit surtout de mutations faux-sens (50/76 soit 65%) touchant préférentiellement des cystéines (26/50 soit 52%). Seules 6 mutations non-sens (8%) ont été décrites. Les

décalages du cadre de lecture ne sont associés qu'à 27% des mutations (21/76) avec une égalité de répartition entre les mutations de sites d'épissage (9/76) et les délétions (10/76), les mutations de type insertion étant minoritaires (2/76). Dans 72,7% (56/76), elles sont localisées dans un module cb-EGF-like. Ceci n'est pas surprenant puisque ces modules représentent plus des 3/4 de la protéine. Les autres mutations sont retrouvées dans tous les autres domaines sauf le domaine riche en proline (dans lequel aucune mutation n'a été identifiée à ce jour). Les mutations du gène FBN1 sont associées tant au syndrome de Marfan (MFS), prototype des maladies du tissu conjonctif, qu'à un ensemble de pathologies présentant soit de façon isolée certains symptômes du MFS (ectopie du cristallin, signes squelettiques ou forme familiale d'anévrisme), soit des symptômes n'appartenant pas au spectre du MFS (formes néonatales de MFS, syndrome de Shprintzen-Golberg, syndrome de Weill-Marchesani).

Marfan classique (OMIM#154700) et formes incomplètes du Marfan : Le syndrome de Marfan (MFS) est une maladie autosomique dominante qui atteint dans sa forme classique trois systèmes : **squelettique** (déformations du thorax, dolichosténomélie, arachnodactylie, déformations rachidiennes, grande taille, déformations de la voûte palatine, vice architectural de hanche et mobilité articulaire anormale), **oculaire** (dislocation du cristallin, décollement de la rétine, myopie) et **cardiovasculaire** (dilatation aortique, anévrisme, dissection aortique, prolapsus valvulaire mitral). Il existe des formes incomplètes où l'un de ces trois systèmes est exempt d'anomalies. L'expressivité intra-familiale ou inter-familiale est en outre très variable. On estime actuellement que le MFS touche 1 personne sur 10.000 individus. Cependant, la haute variabilité phénotypique, l'absence d'un test diagnostique sensible et spécifique, génétique ou biochimique, ainsi qu'un fort taux de cas sporadiques suggèrent que l'incidence du MFS est en réalité beaucoup plus élevée. Le MFS est la deuxième maladie la plus fréquente du tissu conjonctif après l'ostéogenèse imparfaite.

A ce jour, 52 mutations dans le gène FBN1 responsables de MFS classique ont été décrites. Elles sont majoritairement localisées dans des domaines EGF-like liant

le calcium (38/52 soit 73%), les autres types de domaines étant peu atteints (5 dans des modules "8-cystéines", 2 dans des modules EGF-like, 2 dans des modules "hybride", 1 dans la région N terminale unique, et 4 dans la région C terminale unique). Des tests effectués sur des fibroblastes de ces patients ont révélé 4 classes fonctionnelles de défauts (figure 6) [21]. Néanmoins très peu d'auteurs ont recherché simultanément le défaut moléculaire et son effet sur le métabolisme de la fibrilline-1. Il est donc impossible actuellement de prévoir la classe de défaut fonctionnel à laquelle rattacher une mutation donnée.

Plusieurs mutations ont été rapportées pour des patients présentant des formes incomplètes de MFS : 1) **MFS sans signes cardiaques** pour R122C (EGF-like #2) [22] et R2680C (cb EGF-like#43) [23] alors que des mutations dans ces mêmes domaines provoquent dans les autres cas une atteinte cardiaque. 2) **MFS sans signes oculaires** pour N2144S (cb EGF-like#32) [24], D2127E (cb EGF-like#32) [25], et 3464del17 (cb EGF-like#14) [26]. 3) enfin les mutations R2726W (région C terminale unique) [27] et R1170H (cb EGF-like#14) [28] ont été identifiées chez des proposants présentant de façon isolée les **signes squelettiques** caractéristiques du MFS.

Enfin, il est à noter que les défauts du gène FBN1 ne rendent pas compte de toutes les formes de MFS. En effet, par l'étude d'une grande famille française présentant une forme incomplète de MFS nous avons démontré l'existence d'une hétérogénéité génétique. Dans cette famille, la maladie n'est pas liée à une mutation du gène FBN1 [29] mais à une mutation au locus MFS2 en 3p24.2-p25 [30]. Le gène MFS2 est actuellement inconnu : il ne correspond à aucune des fibrillines déjà identifiées, ni à l'un des composants du réseau microfibrillaire actuellement connus. Il est hautement probable que MFS2 code soit pour un constituant du réseau microfibrillaire, soit pour une protéine interagissant avec celle-ci. L'identification de MFS2 est actuellement en cours par une approche de clonage positionnel.

Marfan néonatal ou infantile : il s'agit d'une forme plus précoce et plus sévère de MFS impliquant des pertes de mobilité des articulations comme celles retrouvées

dans l'arachnodactylie contracturante congénitale (CCA) (ou syndrome de Beals-Hecht, lié à FBN2), un faciès anormal, des maladies pluri-valvulaires et une mort précoce généralement due à une insuffisance cardiaque et non à un anévrisme aortique, cause la plus fréquente de décès dans le MFS. L'association de signes du MFS et du CCA a longtemps fait supposer qu'il ne s'agissait pas d'une anomalie du gène FBN1. En 1994, l'équipe de L. Peltonen a donné, par la description de plusieurs mutations, la preuve de l'implication de ce gène dans cette forme particulière de MFS [25]. Depuis 15 mutations ont été rapportées (figure 5), localisées dans 14 cas sur 15 dans les exons 24 à 32 de la protéine (11 mutations dans les modules cb EGF-like#11 à 18 et 3 dans le module "8-cystéines"#3). Cette région est liée également à des formes sévères de MFS caractérisées par des faciès anormaux et une absence de perte de mobilité des articulations [31].

Ectopies du cristallin (OMIM#129600) : Des cas familiaux de dislocation du cristallin avec une transmission autosomique dominante ont été rapportés avec ou sans anomalies squelettiques modérées mais sans anomalies cardio-vasculaires. Une seule mutation, E2447K, a été décrite dans une de ces familles impliquant le module cb EGF-like#38 [25, 32]. Il s'agit de la seule mutation décrite à ce jour dans ce domaine.

Formes familiales d'anévrisme : une seule variation (G1127S) dans le motif cb EGF-like#13 a été rapportée jusqu'à présent [33]. Elle a été décrite dans une famille présentant une transmission autosomique dominante d'anévrismes sans aucun autre symptôme du MFS. Néanmoins, la nature délétère de cette variation n'a pas été formellement démontrée puisque l'un des sujets atteints ne la possédait pas. Ceci suggérerait qu'il s'agirait plutôt d'un facteur de risque. Cette hypothèse est étayée par les données de l'équipe de L. Peltonen qui par analyse familiale a exclu l'implication du gène FBN1 dans différentes familles scandinaves (L. Peltonen, communication personnelle).

Enfin, très récemment, l'implication du gène FBN1 a été démontrée dans deux

maladies très rares : le syndrome de Shprintzen-Goldberg et le syndrome de Weill-Marchesani.

Syndrome de Shprintzen-Goldberg (OMIM#182212) : ce syndrome peut associer différentes manifestations du MFS en association avec une craniosynostose ou d'autres anomalies cranio-faciales telles que l'hypoplasie malaire ou les orbites peu profondes, une laxité de l'oropharynx, une hypotonie infantile, un retard de développement et un retard mental. Tous les cas rapportés sont sporadiques. Une mutation a été décrite chez un patient de 7 ans dans le module cb EGF-like#15, C1223Y [34]. De façon surprenante, cette même mutation avait déjà été rapportée dans un cas de MFS classique [35]. Ceci laisserait supposer que ce syndrome représenterait un cas de digénisme dont une mutation dans le gène FBN1 ne serait que l'une des composantes.

Syndrome de Weill-Marchesani (OMIM#227600) : ce syndrome comprend des anomalies squelettiques telles que petite taille, lordose, perte de mobilité au niveau des mains, anomalies oculaires telles que ectopie du cristallin et myopie. Dans une famille comprenant trois générations et présentant une transmission autosomique dominante de ce syndrome, des anomalies de la fibrilline ont été mise en évidence *in vitro* sur des cultures de fibroblastes. La mutation exacte du gène FBN1 n'a pas encore été identifiée [36].

Actuellement, aucune corrélation entre la localisation d'une mutation dans le gène FBN1 et un (ou des) signe(s) clinique(s) particulier(s) n'a pu être mise en évidence. La seule exception concerne les mutations situées dans les exons 24 à 32 qui semblent impliquées non seulement dans les formes néonatales de MFS mais également dans des formes sévères particulières de MFS caractérisées par des faciès anormaux et une absence de contracture. La diversité et la gravité variable des signes cliniques associés aux mutations du gène FBN1 restent mal expliquées. Elle sont certainement le reflet non seulement de la répartition ubiquitaire de la fibrilline-1, mais aussi d'une hétérogénéité des structures microfibrillaires vraisemblablement liée à une spécificité tissulaire et fonctionnelle.

Fibrillinopathies de type 2 ou maladies de la fibrilline du chromosome 5 (FBN2) : A l'inverse de la diversité des maladies liées à la fibrilline de type 1, les altérations du gène FBN2 ne sont actuellement associées qu'à des pathologies très rares :

L'arachnodactylie contracturante congénitale (CCA) ou syndrome de Beals-Hecht (OMIM# 121050) : Ce syndrome comprend les signes squelettiques du MFS tels que l'arachnodactylie, la dolichosténomélie et les déformations rachidiennes comme la scoliose, associés à des contractures congénitales et des anomalies de l'oreille externe. Aucun des signes oculaires et cardio-vasculaires caractéristiques du MFS n'est présent. Jusqu'à ce jour, seules deux mutations du gène FBN2 ont été décrites E390K [37] et C1252 [38]. Anecdotiquement, il est intéressant de noter que la maladie initialement décrite par Marfan en 1896 aurait plutôt été atteinte de CCA que d'un véritable MFS [39].

Un nouveau syndrome à transmission autosomique dominante : l'équipe de D. Milewicz a rapporté dans une famille de 15 membres (dont 8 sont atteints) la ségrégation d'un nouveau phénotype de transmission autosomique dominante comprenant arachnodactylie, grande taille, scoliose, hypertélorisme, front saillant, profil facial plat, pertes momentanées de flexion des extrémités des doigts mais hypermobilité des articulations telles que poignets, hanches ou épaules, et perte d'audition. Une analyse familiale avec des marqueurs intragéniques a permis d'impliquer le gène FBN2 dans cette nouvelle pathologie [40].

Il semble donc que les mutations du gène FBN2 soient responsables d'un spectre clinique plus étroit associé à un tropisme squelettique et articulaire, sans atteinte cardiaque ni oculaire.

En conclusion, les travaux de biologie cellulaire puis moléculaires de ces dernières années ont permis de commencer à dresser l'inventaire des composants du réseau microfibrillaire. Parallèlement, l'implication des altérations des fibrillines dans différentes maladies humaines a révélé le rôle structural majeur de ces protéines et a ouvert un nouveau champ d'investigation de leurs fonctions grâce à la

disponibilité de nombreux mutants naturels. Parmi ceux-ci, les mutants des domaines cb EGF-like devraient permettre de mieux comprendre le rôle, tant structural que fonctionnel, de ce type de module dans une protéine du tissu conjonctif. Le défi à relever maintenant est double : achever l'inventaire des composants du réseau microfibrillaire et comprendre comment ils s'assemblent et interagissent. La diversité des altérations tissulaires observées dans les fibrillinopathies laisse déjà supposer l'existence d'une hétérogénéité structurale du réseau associée vraisemblablement à une spécificité fonctionnelle. Il est donc fortement probable que dans les années à venir les fibrillinopathies ne représenteront qu'un groupe de pathologies dans un ensemble plus large de "maladies du réseau microfibrillaire".

Références :

1. Low, FN. Microfibrils: fine filamentous components of the tissue space. *Anat Rec* 1962 ; 142 : 131-137.
2. Cleary, EG & Gibson, MA. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. *Int Rev Connect Tiss Res* 1983 ; 10 : 97-209.
3. Sakai, L, Keene, DR & Engvall, E. Fibrillin, a new 350-kd glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 1986 ; 103 : 2499-2509.
4. Sakai, LY, Keene, DR, Glanville, RW & Bächinger, HP. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 14763-14770.
5. 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 : 961-968.
6. Malsen, CL, Corson, GM, Maddox, BK, Glanville, RW & Sakai, L. Partial sequence of a candidate gene for the Marfan syndrome. *Nature* 1991 ; 352 : 334-337.
7. Lee, B, Godfrey, M, Vitale, E, Hori, H, Mattei, M-G, Sarfarazi, M, Tsiouras, P, Ramirez, F & Hollister, D. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature* 1991 ; 352 : 330-334.
8. Corson, GM, Chalberg, SC, Dietz, HC, Charbonneau, NL & Sakai, LS. Fibrillin binds calcium and is coded by cDNAs that reveal a multidomain structure and alternatively spliced exons at the 5' end. *Genomics* 1993 ; 17 : 476-484.
9. Giry-Lozingue, C, Kleman, J-P & van der Rest, M. Modules et interactions moléculaires au sein des matrices extracellulaires. *médecine/sciences* 1994 ; 12 : 1234-1243.
10. Rao, Z, Handford, P, Mayhew, M, Knott, V, Brownlee, GG & Stuart, D. The structure of a Ca²⁺-binding epidermal growth factor-like domain: Its role in protein-protein interactions. *Cell* 1995 ; 82 : 131-141.
11. Raghunath, M, Kielty, CM & Steinmann, B. Truncated profibrillin of Marfan patient is of apparent similar size as fibrillin: Intracellular retention leads to over-N-glycosylation. *J Mol Biol* 1995 ; 248 : 901-909.
12. Milewicz, DM, Grossfield, J, Cao, S-N, Kielty, C, Covitz, W & Jewett, T. A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the Marfan syndrome. *Journal of Clinical Investigations* 1995 ; 95 : 2373-2378.
13. 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.
14. Zhang, H, Hu, W & Ramirez, F. Developmental expression of fibrillin genes

suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 1995 ; 129 : 1165-1176.

15. Kielty, CM & Shuttleworth, CA. The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils. *FEBS Lett* 1993 ; 336 : 323-326.

16. Kielty, CM, Berry, L, Whittaker, SP, Grant, ME & Shuttleworth, CA. Microfibrillar assemblies of foetal bovine skin. *Matrix* 1993 ; 13 : 103-112.

17. Handford, P, Downing, AK, Rao, Z & Hewett, DR. The calcium binding properties and molecular organization of epidermal growth factor-like domains in human fibrillin-1. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 6751-6756.

18. Rosenbloom, J, Abrams, WR & Mecham, RP. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J* 1993 ; 7 :

19. Robson, P, Wright, GM, Sitarz, E, Maiti, A, Rawat, M, Younson, JH & Keeley, FW. Characterization of lamprin, an unusual matrix protein from lamprey cartilage. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 1440-1447.

20. Collod, G, Bérout, C, Soussi, T, Junien, C & Boileau, C. Software and database for the analysis of mutations in the human FBN1 gene. *Nucleic Acids Res* , 23 : 137-141.

21. McGookey-Milewicz, D, Pyeritz, RE, Crawford, ES & Byers, P. Marfan syndrome: defective synthesis, secretion, and extracellular matrix, formation of fibrillin by cultured dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 1992 ; 89 : 79-86.

22. Stahl-Hallengren, C, Ukkonen, T, Kainulainen, K, Kristofersson, U, Saxne, T, Tornqvist, K & Peltonen, L. An extra cysteine in one of the non-calcium-binding -epidermal growth factor-like motifs of the FBN1 polypeptide is connected to a novel variant of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 1994 ; 94 : 709-713.

23. Grossfield, J, Cao, S & Milewicz, DM. Mutations in the carboxy terminus of FBN1 suggest a potential genotype/phenotype correlation in the Marfan syndrome. *Am J Hum Genet* 1993 ; 53 : Abstract 1167.

24. Hewett, D, Lynch, J & Sykes, B. A novel fibrillin mutation in the Marfan syndrome which could disrupt calcium binding of the epidermal growth factor-like module. *Hum Mol Genet* 1993 ; 2 : 475-477.

25. Kainulainen, K, Karttunen, L, Puhakka, L, Sakai, L & Peltonen, L. Mutations in the Fibrillin Gene Responsible for Dominant Ectopia Lentis and Neonatal Marfan Syndrome. *Nat Genet* 1994 ; 6 : 64-69.

26. Tynan, K, Comeau, K, Pearson, M, Wilgenbus, P, Levitt, D, Gasner, C, Berg, M, Miller, D & Francke, U. Mutation screening of complete fibrillin-1 coding sequence: report of five new mutations, including two in 8-cysteine domains. *Hum Mol Genet* 1993 ; 2 : 1813-1821.

27. Milewicz, DM, Grossfield, J, Cao, S-N, Kielty, C, Covitz, W & Jewett, T. A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the Marfan syndrome. *J Clin Invest* 1995 ; 95 : 2373-2378.

28. Hayward, C, Porteous, MEM & Brock, DJH. A novel mutation in the fibrillin gene (FBN1) in familial arachnodactyly. *Mol Cell Probe* 1994 ; 8 : 325-327.
29. Boileau, C, Jondeau, G, Babron, M-C, Coulon, M, Alexandre, J-A, Sakai, L, Melki, J, Delorme, G, Dubourg, O, Bonaïti-Pellié, C, Bourdarias, J-P & Junien, C. Autosomal dominant Marfan-like connective-tissue disorder with aortic dilation and skeletal anomalies not linked to the fibrillin genes. *Am J Hum Genet* 1993 ; 53 : 46-54.
30. Collod, G, Babron, M-C, Jondeau, G, Coulon, M, Weissenbach, J, Dubourg, O, Bourdarias, J-P, Bonaïti-Pellié, C, Junien, C, and Boileau, C. A second locus for Marfan syndrome maps to chromosome 3p24.2-p25. *Nature Genet.* 1994, 8: 264-268.
31. Milewicz, DM, Cho, M, Zinn, AB, Towbin, JA, Byers, PH & Putnam, EA. Delineation of the Marfan phenotype associated with mutations in exons 23. *Am J Hum Genet* 1995 ; 57 : A53, abstract 277.
32. Lonngqvist, L, Child, A, Kainulainen, K, Davidson, R, Puhakka, L & Peltonen, L. A Novel Mutation of the Fibrillin Gene Causing Ectopia Lentis. *Genomics* 1994 ; 19 : 573-576.
33. Francke, U, Berg, MA, Tynan, K, Brenn, T, Liu, W, Aoyama, T, Gasner, C, Miller, DG & Furthmayr, H. A Gly1127Ser mutation in an EGF-like domain of the fibrillin-1 gene is a risk factor for ascending aortic aneurysm and dissection. *Am J Hum Genet* 1995 ; 56 : 1287-1296.
34. Sood, S, Eldadah, ZA, Krause, W, McIntosh, I & Dietz, H. Mutation in fibrillin-1 and the Marfanoid-craniosynostosis (Shprintzen-Goldberg) syndrome. *Nature Genet* 1996 ; 12 : 209-211.
35. Hewett, DR, Lynch, JR, Child, A & Sykes, BC. A New Missense Mutation of Fibrillin in a Patient with Marfan Syndrome. *J Med Genet* 1994 ; 31 : 338-339.
36. Cisler, J, Mathews, K, Wang, M, Zolezzi, F, Seemayer, TA, Pigatti, PF, Gorlin, RJ & Godfrey, M. Fibrilline in the Weill-Marchesani syndrome. *Am J Hum Genet* 1995 ; 57 : Abstract 1210.
37. Wang, M, Tsipouras, P & Godfrey, M. Fibrillin-2 (FBN2) mutation in congenital contractural arachnodactyly. *Am J Hum Genet* 1995 ; 57 : abstract 1339.
38. Putnam, EA, Zhang, H, Ramirez, F & Milewicz, DM. Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nature Genet* 1995 ; 11 : 456-458.
39. Marfan, A. (1896). Un cas de déformation congénitale des quatres membres, plus prononcé aux extrémités, caractérisé par l'allongement des os avec un certain degré d'amincissement. *Société médicale des Hôpitaux, Paris*, 13 : 220-227.
40. Bay, C, Mikesell, H, Ankerman, L, McCullough, C, Burke, L, Pyeritz, R, Putnam, E & Milewicz, D. A new autosomal dominant syndrome linked to FBN2 gene. *Am J Hum Genet* 1995 ; 57 : Abstract 276.

Figure 1 : Microscopie électronique après ombrage rotatif représentant le réseau microfibrillaire (Photo aimablement fournie par S. Peyrol, Unité de Pathologie des Fibroses, Institut Pasteur, Lyon).

Figure 2 : Représentation schématique de la structure protéique primaire déduite de la séquence de l'ADNc de chaque gène de fibrilline. **Régions A-B :** extrémité N terminale; **Région C :** région riche en proline pour la fibrilline-1 et en glycine pour la fibrilline-2; **Région D :** domaine central formé par la répétition de plusieurs modules : "EGF-like" (présentant des homologies avec le Epidermal Growth Factor), "cb EGF-like" (EGF-like liant le calcium), "8-cystéines" (présentant des homologies avec la protéine liant le Transforming Growth Factor- β) et "hybride" (présentant des homologie avec les deux premiers modules); **Région E :** extrémité C terminale.

Figure 3 : Microscopie électronique après ombrage rotatif de microfibrilles contenant de la fibrilline montrant un aspect en collier de perles foncées, avec une périodicité d'une perle tous les 50-55 nm (Photo aimablement fournie par S. Peyrol, Unité de Pathologie des Fibroses, Institut Pasteur, Lyon).

Figure 4 : Modèle de polymérisation des monomères de fibrilline. A : dans une première étape dimérisation par association tête à queue, B : puis association de deux dimères pour former un corps à 4 hélices (d'après Handford et coll. [17]).

Figure 5 : Représentation schématique des 76 mutations du gène FBN1 rapportées en fonction de leur répartition dans les différents types de modules de la protéine.

Figure 6 : Différentes classes fonctionnelles de défaut de la fibrilline-1 : L'analyse du métabolisme de la fibrilline-1 chez différents sujets atteints d'une forme classique du syndrome de Marfan révèle 4 classes fonctionnelles différentes de défaut. **Classe I :** altération quantitative de la synthèse : la quantité de fibrilline produite est de 50 % par rapport aux cellules témoins. L'allèle sauvage est donc normalement synthétisé tandis que l'allèle muté soit ne donne aucun produit soit donne un produit tronqué qui n'est pas sécrété ou qui est présent en très faible quantité (diminution de la stabilité du transcrit, sécrétion inefficace ou dégradation intracellulaire du produit muté). **Classe II :** altération de la sécrétion de fibrilline. Dans ces cellules, la quantité de fibrilline produite est normale mais sa sécrétion dans le milieu de culture est très retardée par rapport aux contrôles et son incorporation dans la matrice extra-cellulaire est médiocre. Dans ce groupe fonctionnel, les molécules mutantes semblent bloquer par un mécanisme "dominant-négatif" la polymérisation car la quantité de matériel déposé est plus faible que dans la classe I. **Classe III :** la synthèse et la sécrétion de fibrilline sont normales mais il y a une forte diminution d'incorporation dans la matrice extra-cellulaire. Les

mécanismes moléculaires sous-jacents sont probablement hétérogènes. Enfin, **dans le dernier groupe (IV)** aucune anomalie de synthèse, de sécrétion ou d'incorporation à la MEC n'a pu être mise en évidence chez ces patients MFS, argument en faveur de l'hétérogénéité génétique du MFS (démontrée par une approche génétique [30]).