



HAL
open science

Complications cardiovasculaires des élastinopathies : caractérisation d'un nouveau modèle expérimental et évaluation d'une stratégie thérapeutique innovante

Marie Hoareau

► **To cite this version:**

Marie Hoareau. Complications cardiovasculaires des élastinopathies : caractérisation d'un nouveau modèle expérimental et évaluation d'une stratégie thérapeutique innovante. Santé. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10074 . tel-04622272

HAL Id: tel-04622272

<https://theses.hal.science/tel-04622272>

Submitted on 24 Jun 2024

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

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



**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

École Doctorale N° ED 205

**Spécialité de doctorat :
Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie**

Soutenue publiquement le 30/05/2023, par :
Marie Hoareau

**Complications cardiovasculaires des
élastinopathies : caractérisation d'un
nouveau modèle expérimental et évaluation
d'une stratégie thérapeutique innovante**

Devant le jury composé de :

ANGRAND, Pierre-Olivier, PU, Université de Lille
BRASSART-PASCO, Sylvie, CR CNRS, Université de Reims
GERMAIN, Stéphane, DR Inserm, Collège de France

BELAIDI, Elise, PU, Université Claude Bernard Lyon 1
BRIANCON-MARJOLLET, Anne, MCU, Université Grenoble Alpes

DEBRET, Romain, CR CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1
LAMBERT, Elise, MCU, Université Claude Bernard Lyon 1
AVRIL, Stéphane, PU, Mines Saint-Etienne
FAURY, Gilles, PU, Université Grenoble Alpes

Rapporteur
Rapporteuse
Rapporteur ;
Président du Jury
Examinatrice
Examinatrice

Directeur de thèse
Co-directrice de thèse
Co-directeur de thèse
Invité

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mes trois directeurs de thèse, **Romain Debret**, **Elise Lambert** et **Stéphane Avril**, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse et pour m'avoir encadrée ces trois dernières années. Vos conseils m'ont permis d'avancer et d'affiner mes idées au fur et à mesure et je suis également reconnaissante de la grande liberté que vous m'avez laissée.

Romain, merci d'avoir tout fait pour que je puisse rester en thèse dans l'équipe, même si ça n'a pas été facile. Merci beaucoup d'avoir cru en moi et de m'avoir donné ma chance 😊.

Elise, merci pour tes conseils et ton aide tout au long de ma thèse, et pour ton soutien moral, surtout sur la fin 😊. Merci pour tes commentaires rassurants, même si parfois tu surestimes beaucoup trop mes capacités !

Stéphane, merci pour tes conseils et suggestions toujours très intéressantes, qui m'ont permis d'élargir mon champ de vision plusieurs fois.

J'aimerais également remercier **Dominique Sigaudou Roussel**, **Bernard Verrier** et **Claire Monge** de m'avoir accueillie dans leurs équipes respectives, ainsi qu'au sein du LGBTI.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi individuel pour leurs conseils et leur aide tout au long de ma thèse, merci à **Emmanuelle Planus** et à **Muriel Lafargue**, et merci particulièrement à **Dominique Baas** pour ses conseils précieux depuis le master et pour son soutien.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail, merci au **Pr Pierre-Olivier Angrand** et aux **Drs Stéphane Germain** et **Sylvie Brassard Pasco** d'avoir accepté d'être rapporteur.e.s de mon travail de thèse. Merci également aux **Pr Elise Belaidi** et **Dr Anne Briançon Marjollet** d'avoir participé à ma soutenance en tant qu'examinatrices, et merci au **Pr Gilles Faury** d'être venu assister à ma présentation en tant qu'invité.

J'en profite également pour remercier tous les collaborateurs du projet Arterylastic, qui ont contribué à l'avancement de mon projet de thèse par leurs commentaires et suggestions lors des réunions communes de l'ANR. Merci particulièrement à **Anne** et **Gilles**, déjà cités précédemment, et également à **Ming Lo** pour ses réflexions très intéressantes et son aide tout au long de ma thèse.

Je remercie également **Laure Bernard** et **Robert Renard** qui font un travail incroyable au niveau de la plateforme zebrafish du PRECI. Merci pour votre aide et votre gentillesse pendant les 5 années où j'ai eu le plaisir de travailler avec vous.

Merci également à **Naïma El Kholti** pour son énorme travail sur le projet, et à **Bruno Chapuis**, qui a été d'une grande aide également lors des acquisitions d'images au CIQLE !

Je voulais aussi remercier les membres de la team Matripath pour leur accueil, surtout au moment où je n'avais plus vraiment de labo. Merci particulièrement à **Laura**, **Sophie** et **Alex** avec qui j'ai passé de super moments que je n'oublierai pas 😊. Laura, je pense que mes années en thèse auraient été bien différentes si je ne t'avais pas rencontrée et je suis vraiment contente que ça n'ait pas été le cas ! Tu as été une super collègue, super voisine et surtout une super amie, et tu vas me manquer (et Ribouille aussi 😊). Merci également à **Perrine** et **Ulrich** pour leur aide quand j'étais de passage !

Je voudrais aussi remercier tout le groupe de Rockefeller, qui est sans aucun doute la meilleure équipe de l'IBCP 😊. Merci **Danielle**, **Jean-Paul**, **Loïs**, **Jérôme** et **Aurore** pour tous ces moments partagés, que

ce soit au labo ou pendant nos sorties d'équipe et soirées afterwork ! Vous avez été une équipe géniale !

Un merci particulier aux doctorant/doctorantes de Rockefeller, avec qui j'ai passé le plus de temps : **Sarah, Kardelen, Chloé** et **Lucas** (et bientôt **Magaly** !). Qu'auraient été mes journées au labo sans vous ? Je préfère ne même pas imaginer la tristesse !! Vous êtes incroyables les filles (et Lucas aussi évidemment 😊) *cœur avec les mains*.

Merci aussi à toute la team Doc du LBTI : **Camille, Benjamine, Fanny, Valentine, Justine, Manon, Marie, Lucille, Emma, Lisa** et **Cloé**. Je pense qu'on a créé une super dynamique dans ce groupe de doctorant(E)s et je suis contente de vous avoir rencontrées. On a passé de super moments, avec nos sorties à Walibi ou à Koezio, ainsi que toutes les soirées ou apéro après le labo, ou aussi les séances de sport avec le groupe fitness 😊. Ces dernières années n'auraient pas été les mêmes sans vous !

Pour finir, merci aux personnes qui m'ont entourées hors du laboratoire et sans qui je n'aurais peut-être pas tenu 3 ans en thèse.

Merci à **Thomas**, mon mentor depuis le M1 😊. Merci pour ton aide et tes conseils, même si tu penses que je ne t'écoute jamais (ce qui est totalement faux...). Merci beaucoup =)

Merci aussi à **Johanna** et **David**, pour tous les bons souvenirs que je garderai de mes années à Lyon grâce à vous 😊.

Merci également à **Joey** ! Merci pour tes conseils, pour m'avoir fait répéter mes premières présentations et pour avoir essayé de me rassurer quand je perdais confiance. Merci également de me montrer la voie depuis un bon moment, peut-être un peu trop efficacement puisque je viens carrément te rejoindre à Yale 😊. Merci beaucoup Joey pour ton aide !

Un grand merci aussi à mes ami.e.s de Genève, particulièrement à **Clara, Marie, Lara, Achille, Alex, Léo, Chri, Laura, Levon** et **Mandarine** =) Désolée, au final je vais partir encore plus loin pour les prochaines années... Ce sera moins facile d'organiser des weekends ensemble, mais je suis sûre qu'on gardera le contact ! Vous êtes les meilleurs ♥ !

Finalement, merci à **mes parents** et à **ma sœur**. Merci d'être venus me voir régulièrement à Lyon, surtout quand j'étais ensevelie sous le travail et ne pouvais pas rentrer moi. Vraiment merci de m'avoir soutenue pendant ce long parcours d'études, qui n'a pas toujours été facile. Je suis maintenant docteure et c'est en grande partie grâce à vous ♥♥♥. (Et merci aussi de m'avoir ramené des stocks de chocolat suisse et de bretzels au fromage, qui ont sans aucun doute joué un rôle non négligeable dans l'accomplissement de ce travail 😊).

Résumé

L'élasticité est une propriété nécessaire au bon fonctionnement de nombreux tissus du corps humain et particulièrement des grandes artères telles que l'aorte. Les fibres élastiques, composées principalement d'élastine et de fibrilline, sont en grande partie responsables de fournir cette élasticité. Les déficiences en élastine engendrent des maladies telles que le syndrome de Williams Beuren, les sténoses aortiques supra-avalvulaires non syndromiques, et la forme autosomique dominante de la cutis laxa. Ces maladies génétiques, appelées élastinopathies, sont associées à de nombreuses complications cardiovasculaires, certaines pouvant mener à des issues fatales.

Il n'existe aujourd'hui aucun traitement capable de prévenir, réduire ou réparer les défauts des fibres élastiques de manière satisfaisante à l'âge adulte. Il est donc nécessaire de trouver des solutions thérapeutiques pour alléger les conséquences du manque d'élastine, et particulièrement celles qui concernent le système cardiovasculaire qui sont souvent les plus délétères.

Ce travail de thèse a été divisé en deux grands axes, chacun apportant une alternative dans le contexte de la recherche actuelle.

Premièrement, nous avons entrepris de caractériser un nouveau modèle d'élastinopathie chez le poisson-zèbre. En effet, la vaste majorité des études concernant ce type de pathologies se fait actuellement sur des modèles rongeurs, tels que la souris ou le rat. La mise en place d'un modèle chez le poisson-zèbre pourrait ouvrir de nouvelles voies, notamment en facilitant les tests de molécules thérapeutiques à grande échelle.

Nous avons donc réalisé une revue de la littérature pour rassembler les données déjà connues concernant les fibres élastiques du poisson-zèbre et leur implication dans la fonction cardiovasculaire de celui-ci. Le poisson-zèbre possède deux élastines (a et b) et nous avons mis en évidence que, malgré quelques particularités, celles-ci semblaient avoir un comportement globalement similaire à ce qui est décrit chez les mammifères. Des études histologiques des vaisseaux nous ont également permis de montrer une organisation de l'élastine en lamelles concentriques dans la paroi des aortes ventrale et dorsale, et dont le nombre diminuait à mesure de l'éloignement du cœur.

Le mutant *elna*^{sa12235}, qui produit une élastine a tronquée et non-fonctionnelle, a ensuite été étudié pour mieux comprendre l'impact de cette mutation sur le système cardiovasculaire. En plus d'une espérance de vie diminuée, les poissons porteurs de l'allèle *elna*^{sa12235}, que ce soit à l'état homozygote ou hétérozygote, développent fréquemment des complications qui semblent survenir des suites d'une insuffisance cardiaque (œdèmes généralisés, hypertrophie du ventricule). Leurs valves cardiaques ont également un aspect désorganisé qui pourrait affecter leur fonction. La population est cependant très hétérogène et tous les poissons mutants ne développent pas de signes pathologiques.

Le deuxième axe sur lequel a porté ce travail de thèse a été l'évaluation du potentiel thérapeutique d'une protéine élastique synthétique (SEP) pour application vasculaire dans le contexte des élastinopathies. La SEP est une protéine inspirée de la tropoélastine humaine, qui pourrait la remplacer lorsqu'elle est manquante en venant renforcer les fibres élastiques de la paroi vasculaire *in situ*, agissant comme une prothèse moléculaire.

Des étapes de validation ont d'abord été réalisées pour assurer l'innocuité de la protéine *in vitro* sur des cellules vasculaires humaines (cellules endothéliales et musculaires lisses) puis *in vivo* sur le poisson-zèbre (tests de toxicité et d'inflammation). Nous avons aussi montré que la SEP était capable d'être intégrée dans les fibres riches en fibrilline produites par les cellules, par un processus actif nécessitant l'action d'enzymes de réticulation (lysyl-oxydases). Pour atteindre la média depuis la

circulation sanguine, la SEP doit traverser la première couche de la paroi vasculaire formée de l'endothélium. À l'aide d'un modèle *in vitro* de coculture, nous avons pu montrer que la SEP traverse l'endothélium pour rejoindre les cellules musculaires lisses et former des fibres. Des injections intravasculaires sur larves de poisson-zèbre ont également mis en évidence une rétention vasculaire de la SEP sur plusieurs jours, suggérant qu'elle parvient bien à intégrer les parois des vaisseaux.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en avant deux stratégies alternatives dans l'étude des complications vasculaires survenant lors d'élastinopathies : l'une proposant un nouveau modèle d'étude avec l'utilisation du poisson-zèbre et l'autre évaluant la faisabilité d'une voie thérapeutique innovante, par l'utilisation d'une protéine synthétique inspirée de la tropoélastine humaine.

Mots clés : élastine, élastinopathies, complications vasculaires, *elastin-like recombinamer*, poisson-zèbre

Summary

Elasticity is necessary for the proper function of several tissues in the body, and particularly for large arteries such as the aorta. The main responsible for this elasticity are elastic fibers. They are mainly composed of two proteins: elastin and fibrillins. Elastin deficiencies are known to cause pathologies, namely Williams Beuren syndrome, non-syndromic supravalvular aortic stenosis and autosomal dominant cutis laxa. These elastinopathies are associated with a wide range of complications, and the ones affecting the cardiovascular system are often the most severe.

As of today, there is no satisfactory treatment to prevent, reduce or repair elastic fibers' defects. Therapeutic solutions are to be found to improve the quality of life of these patients and to alleviate the consequences resulting from the lack of elastin, more importantly concerning the cardiovascular outcomes.

The objective of this thesis work is divided in two axes, both aiming for the development of alternative research strategies in the current context.

First, the characterization of a new model to study elastinopathies was proposed, based on the use of the zebrafish. A large majority of studies has been focusing on rodent models so far, with great progress achieved in the understanding of molecular mechanisms underlying elastinopathies. The zebrafish model could be interesting to facilitate some research approaches with, for example, the possibility to perform high throughput screenings of therapeutic molecules.

A review of the literature was conducted to evaluate the relevance of the zebrafish model in the study of elastic fibers and associated cardiovascular complications. Zebrafish has two elastins: elastin a and elastin b. These behave in a globally similar way than elastins from mammals. Histological studies highlighted a concentric organization of elastin-rich lamellae in the vascular wall of the ventral and dorsal aortas, with a decreasing number of these lamellae when moving further from the heart.

Thereafter, the *elna*^{sa12235} zebrafish mutant was investigated for cardiovascular outcomes associated with elastin a deficiency. *elna*^{+/-} and *elna*^{-/-} zebrafish both had shorter life expectancies and frequently developed complications potentially arising from heart failure (systemic edemas, ventricle hypertrophy). Mutant cardiac valves were also showing a particular disorganized aspect that could affect their function. Mutant populations were however highly heterogenous, and some mutant fish did not develop any pathological sign until an advanced age.

The second axis concerns the evaluation of an innovative therapeutic strategy based on a synthetic elastic protein (SEP) for vascular applications in the context of elastinopathies. SEP is inspired from human tropoelastin, and it could be used to reinforce deficient vascular elastic fibers directly in the vascular wall, acting as a molecular prosthesis.

The innocuity of SEP was first validated *in vitro* and *in vivo*, using human vascular cells and zebrafish larvae respectively. Then, the ability of SEP to be integrated into fibrillin-rich fibers was assessed, showing that it could form fibers in an enzyme-dependent manner, involving lysyl oxidase activity. The transendothelial passage of SEP was also tested in a coculture *in vitro* model of the endothelium. SEP was found to cross the endothelial layer and to be subsequently processed by smooth muscle cells to form fibers. The intravascular injection of SEP was also tested on zebrafish larvae and showed a strong retention of the protein in the vessels for several days, suggesting that it had been incorporated into the vascular wall.

In conclusion, this thesis work highlighted two alternative strategies to further study vascular complications arising from elastin deficiencies. The first one proposes the use of the zebrafish model and describe the first pathological model of elastinopathy in the zebrafish. The second one evaluates the potential of a synthetic elastic protein to be used as an innovative therapeutic molecule to repair vascular elastic fibers.

Keywords: elastin, elastinopathies, vascular complications, *elastin-like recombinamer*, zebrafish model

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	5
Summary	7
Liste des Figures	11
Liste des Tableaux	12
Liste des Abréviations.....	13
Glossaire des termes médicaux.....	15
Introduction.....	16
I. Le système cardiovasculaire.....	16
Evolution, structure et fonctions.....	16
Le cœur.....	17
Les valves cardiaques	19
Les vaisseaux	19
II. L'aorte et les artères élastiques	24
Les cellules musculaires lisses	25
La MEC artérielle	28
Les principaux composants de la MEC vasculaire	29
L'élastine et les fibres élastiques.....	32
Les composants des fibres élastiques	33
Synthèse des fibres élastiques	37
Régulation de l'expression de la tropoélastine	41
Altérations des fibres élastiques et de l'élastine.....	44
Matrikines et EDP	50
Rôle de l'élastine et des EDP dans la signalisation	52
III. Les pathologies associées aux fibres élastiques.....	55
Les maladies de l'élastine	56
Le syndrome de Williams-Beuren	57
La duplication Williams Beuren	58
La sténose aortique supra- valvulaire non-syndromique.....	59
La cutis laxa	59
Traitements et chirurgie.....	60
Maladies acquises et vieillissement	61
Candidats thérapeutiques actuels pour réparer les fibres élastiques	62
IV. Les elastin-like polypeptides	63

La SEP : protéine élastique synthétique	66
Objectifs de la thèse	67
AXE 1 Utilisation du poisson-zèbre comme modèle pour l'étude des complications cardiovasculaires survenant lors d'élastinopathies	69
Résumé de la revue	70
Zebrafish as a Model to Study Vascular Elastic Fibers and Associated Pathologies	72
Conclusions et points importants.....	98
Résumé de l'article	99
Characterization of the Zebrafish <i>Elastin a</i> (<i>elna</i> ^{sa12235}) Mutant: A New Model of Elastinopathy Leading to Heart Valve Defects	102
Conclusions et points importants.....	128
AXE 2 Evaluation du potentiel thérapeutique de la protéine élastique synthétique (SEP)	129
Résumé de l'article	129
A synthetic elastic protein as molecular prosthetic candidate to strengthen vascular wall elasticity	132
Conclusions et points importants.....	170
Discussion et Perspectives	171
Le poisson-zèbre pour l'étude des élastinopathies.....	171
Les avantages du modèle poisson-zèbre.....	171
Etude de l'élastine cardiovasculaire.....	172
Le modèle <i>elna</i> ^{sa12235} pour l'étude des élastinopathies.....	174
Adaptabilité du modèle pour évaluer la SEP.....	176
Evaluation des effets de la SEP <i>in vitro</i>	180
Toxicité et prolifération.....	180
Intégration dans les fibres élastiques.....	180
Effets sur les CML	182
Passage transendothélial.....	184
Annexes	188
Communications orales.....	188
Communication par affiche.....	188
Evènements de vulgarisation scientifique.....	188
Activité d'encadrement.....	188
Références.....	190

Liste des Figures

Figure 1. Évolution du système cardiovasculaire chez les Vertébrés.....	16
Figure 2. Anatomie du cœur humain.....	17
Figure 3. La paroi cardiaque.....	18
Figure 4. Arbre artériel représentant les artères les plus importantes du corps humain.....	20
Figure 5. Les 3 couches de la paroi vasculaire.....	22
Figure 6. Artères élastiques et pression artérielle.....	24
Figure 7. Différentes forces subies par la cellule musculaire lisse au sein du vaisseau	25
Figure 8. Organisation de l'unité lamellaire de la média	27
Figure 9. Les CML et leurs phénotypes	28
Figure 10. Organisation des domaines de la tropoélastine humaine	34
Figure 11. Formation des microfibrilles riches en fibrilline	38
Figure 12. Assemblage du cœur d'élastine dans les fibres élastiques	39
Figure 13. Régulation de l'expression de la tropoélastine	42
Figure 14. Accumulation de défauts sur les fibres élastiques	45
Figure 15. Signalisation du complexe récepteur de l'élastine (ERC) par les élastokines	53
Figure 16. Continuum des maladies cardiovasculaires et du vieillissement	62
Figure 17. Méthode de purification des ELP par cycle de transition inverse (ITC).....	65
Figure 18. Séquence et organisation des domaines formant la SEP	66
Figure 19. Le modèle du poisson-zèbre : entre complexité et potentiel haut débit	171
Figure 20. Suivi de la SEP après injection intravasculaire chez la larve de poisson-zèbre.....	178
Figure 21. Essai de transparençation de poisson-zèbre adulte.....	178
Figure 22. La SEP n'a pas d'effet sur l'expression de l' α -SMA	183
Figure 23. La SEP est internalisée dans les cellules endothéliales	185

Liste des Tableaux

Tableau 1 - Taille et composition des principaux types de vaisseaux chez l'humain.....	21
Tableau 2 - Les tissus élastiques.....	32
Tableau 3 - Protéinases à activité élastolytique.....	47
Tableau 4 - Séquences bioactives présentes dans la TE.....	51
Tableau 5 - Pathologies liées aux fibres élastiques.	55
Tableau 6 - Les différentes pathologies du syndrome Cutis Laxa.	59
Tableau 7 - Séquences bioactives présentes dans la SEP.....	182

Liste des Abréviations

3R WGD	<i>Third-round whole genome duplication</i>	EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
ADAMTS	<i>A disintegrin and Metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ADCL	<i>Autosomal dominant cutis laxa</i>	EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>	ELP	<i>Elastin-like polypeptide</i>
AGE	<i>Advanced glycation end-product</i>	ELR	<i>Elastin-like recombinamer</i>
AKT	Protéine kinase B	EMILIN	<i>Elastin microfibril interface located proteins</i>
ALE	<i>Advanced lipid peroxidation end products</i>	ENU	<i>N-nitroso-N-éthyl urée</i>
AoSMC	<i>Aortic smooth muscle cells</i>	ERC	<i>Elastin receptor complex</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>	ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ARN	Acide ribonucléique	FA	Adhésions focales
ARNm	Acide ribonucléique messager	GAG	Glycosaminoglycane
BA	Bulbe artériel	GWAS	<i>Genome wide association study</i>
b-FGF	<i>Basic fibroblast growth Factor</i>	HB-EGF	<i>Heparin-binding Epidermal growth factor</i>
BMP(-1)	<i>Bone morphogenetic protein(-1)</i>	HET	Hétérozygote (Elna ^{+/-})
bpm	Battements par minute	hpi	Heures post fertilisation
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique	HPLC	Chromatographie en phase liquide haute performance
CML	Cellule musculaire lisse	hTE	Tropoélastine humaine
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>	HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	IF	Immunofluorescence
CVD	<i>Cardiovascular diseases</i>	IFN	Interféron
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>	IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>
CXCR	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i>	IL	Interleukine
dpf	<i>Days post fertilization</i>	ITC	<i>Inverse transition cycling</i>
EBP	<i>Elastin binding protein</i>	KO	<i>Knock out</i>
EDP	<i>Elastin derived peptide</i>	LAMP-1	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 1</i>

Liste des abréviations

LAP	<i>Latency associated peptide</i>	PPCA	<i>Protective protein/cathepsin A</i>
LLC	<i>Large latent complex</i>	PVAT	Tissu adipeux périvasculaire
LOX	Lysyl oxydase	PWV	<i>Pulse wave velocity</i>
LOXL	<i>Lysyl oxidase-like</i>	ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
LPS	Lipopolysaccharide	RT qPCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
LTBP	<i>Latent TGF-B binding protein</i>	SEP	Protéine élastique synthétique
LTQ	Lysyl tyrosylquinone	siARN	<i>small interfering ARN</i>
MAGP	<i>Microfibrils associated glycoprotein</i>	SLC	<i>Small latent complex</i>
MEC	Matrice extracellulaire	SP-1	<i>Specific protein 1</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>	SVAS	<i>Supravalvular aortic stenosis</i>
MET	Microscopie électronique à transmission	TE	Tropoélastine
MFF	Microfibrilles riches en fibrilline	TFM	<i>Traction force microscopy</i>
miARN	micro ARN	TG2	Transglutaminase tissulaire
miR	micro ARN	TGF-(α ou β)	<i>Transforming growth factor (alpha ou beta)</i>
MLU	Unité lamellaire de la média	TIMP	<i>Tissue inhibitors of matrix proteinases</i>
MMP	Métalloprotéinase matricielle	TLR	<i>Toll-like receptor</i>
mpf	Mois post fertilisation	UV	Ultraviolet
MT-MMP	MMP membranaires	Valve AV	Auriculoventriculaire (humain) ou atrioventriculaire (poisson)
MUT	Mutant (Elna ^{-/-})	Valve VB	Ventriculobulbaire
Neu-1	Neuraminidase-1	VE-	<i>Vascular endothelial cadherin</i>
NF-1	<i>Nuclear factor 1</i>	cadhérines	
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>	vWF	Facteur von Willebrand
NO	Monoxyde d'azote	WBS	Syndrome de Williams Beuren
PG	Protéoglycanes	WT	<i>Wild type</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	α -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
piARN	<i>Piwi-interacting ARN</i>		
PKA	Protéine kinase A		

Glossaire des termes médicaux

Termes médicaux	Définition
Anévrisme	Dilatation anormale et localisée de la paroi vasculaire. L'anévrisme est dit « vrai » si la paroi vasculaire n'est pas rompue
Athérosclérose	Maladie cardiovasculaire caractérisée par un dépôt de lipides (majoritairement) sur la paroi vasculaire, particulièrement au niveau des artères, qui forme une plaque qu'on appelle athérome. De nombreuses complications peuvent en découler, comme la lésion de la paroi (sclérose), le rétrécissement de la lumière du vaisseau (sténose, thrombose), le détachement d'une partie de la plaque (embolie), ou le déchirement de la paroi, menant à la dissection du vaisseau
Cardiomégalie	Augmentation de la taille du cœur, qui peut être due à un épaississement de la paroi (hypertrophie) ou à un élargissement des cavités (dilatation)
Dissection aortique	Rupture de la paroi vasculaire (intima), qui provoque l'entrée de sang dans celle-ci et crée un « faux <i>lumen</i> » ou « faux chenal »
<i>Ductus arteriosus</i>	Vaisseau fœtal qui relie l'aorte et l'artère pulmonaire avant la naissance, et qui se referme par la suite
Hypertrichose	Augmentation de la quantité de poils sur une zone du corps, sans lien avec un excès d'hormones androgènes
Insuffisance cardiaque (congestive)	Dysfonction de la pompe myocardique qui entraîne une circulation sanguine inadaptée (et la formation d'œdèmes par congestion, souvent au niveau des poumons, des jambes et des organes digestifs)
Œdème	Effusion de liquide dans les espaces extravasculaires
Prolapsus de la valve mitrale	Dysfonctionnement de la valve mitrale qui affecte la fermeture des valves et peut engendrer une régurgitation
Sténose	Rétrécissement localisé de la lumière du vaisseau
Tachycardie	Modification du rythme cardiaque qui entraîne une accélération de la fréquence cardiaque
Thrombus et thrombose	Caillot de sang (thrombus) qui peut obstruer un vaisseau là où il se forme (thrombose) ou se détacher et obstruer un vaisseau plus loin (embolie)

Introduction

I. Le système cardiovasculaire

Évolution, structure et fonctions

Le système cardiovasculaire est un des éléments majeurs permettant l'existence des organismes complexes chez les Métazoaires. Il a été développé au cours de l'évolution chez les animaux triploblastiques (3 feuilletts embryonnaires) pour répondre à un besoin vital : permettre l'approvisionnement nécessaire des tissus en oxygène et nutriments, tout en éliminant les déchets produits par l'organisme (dioxyde de carbone). Ces échanges étaient d'abord assurés par diffusion chez les espèces diploblastiques toutes aquatiques (Porifères, Cnidaires, Cténophores et Placozoaires), mais l'augmentation de la taille des organismes et la diversification de leur mode de vie a rendu cette voie insuffisante (Monahan-Earley et al., 2013).

Les premiers circuits cardiovasculaires à avoir été développés sont des systèmes dits « ouverts », qu'on retrouve notamment chez les Invertébrés tels que les Arthropodes et les mollusques non-Céphalopodes. Le sang n'y est pas totalement séparé des fluides extracellulaires et on parle donc plutôt d'hémolymphe. Un cœur rudimentaire pompe cette hémolymphe dans des vaisseaux de distribution à travers le corps, puis celle-ci est libérée dans des cavités appelées « espaces hémaux » (*haemal spaces*) où les organes y ont directement accès. Des circuits « fermés » ont ensuite évolué et sont aujourd'hui retrouvés chez tous les Vertébrés ainsi que chez certains Invertébrés comme les Annélides et les Céphalopodes. Dans cette configuration, le sang n'est jamais mélangé aux autres fluides interstitiels et reste confiné dans ses vaisseaux (Michel, 2020; Monahan-Earley et al., 2013).

Bien que l'organisation globale du système cardiovasculaire des Vertébrés (des Agnathes jusqu'aux humains) repose sur le même modèle, puisqu'hérité d'un ancêtre commun (Grimes 2009), certaines adaptations spécifiques se sont mises en place pour correspondre au mode de vie de chacun.

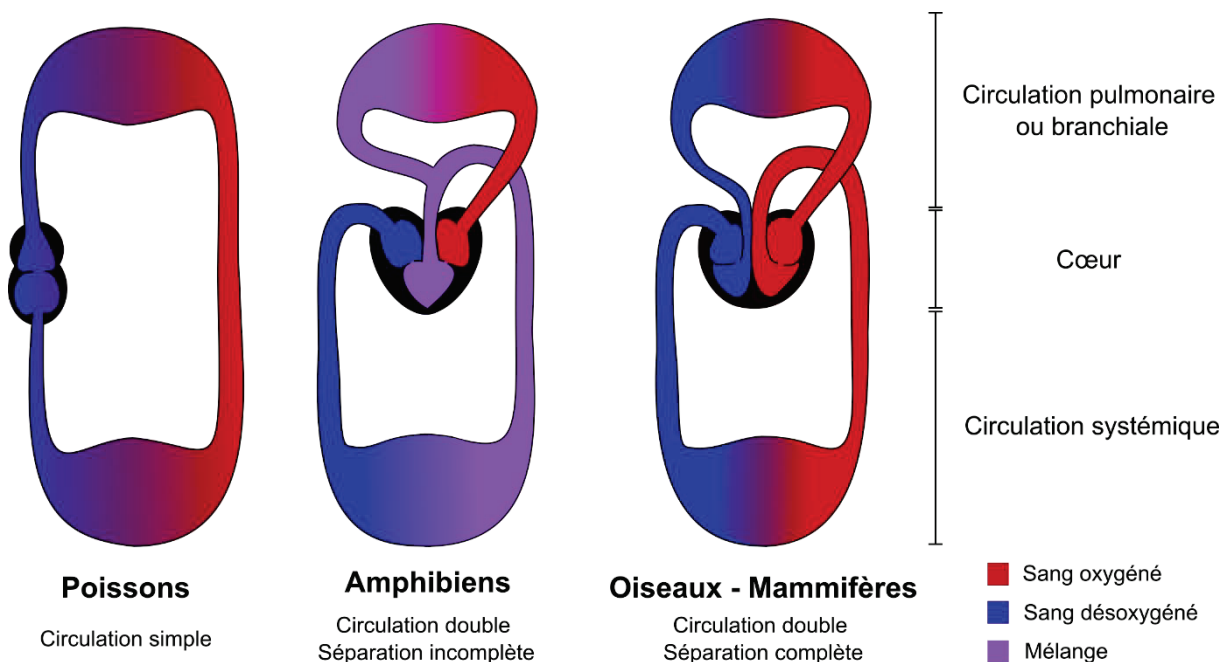


Figure 1. Évolution du système cardiovasculaire chez les Vertébrés.

Sont ainsi apparus des organismes avec une circulation double, comprenant une partie systémique et une autre pulmonaire, qui se retrouve aujourd’hui chez les Vertébrés terrestres, bien que le sang oxygéné et non-oxygéné soit toujours mélangé chez les Amphibiens, avec un seul ventricule cardiaque. Ainsi, de nombreux paramètres varient entre Poissons, Amphibiens, Oiseaux et Mammifères, comme illustré Figure 1. Chez les Testudinés (tortues) et les Squamates (serpents et lézards), un début de séparation des deux circulations se fait au niveau du cœur. Cependant, la séparation complète des ventricules n’apparaît que chez les Oiseaux et les Mammifères, ainsi que chez les crocodiles (Michel, 2020).

Chez les mammifères, le système cardiovasculaire a trois rôles physiologiques majeurs : 1) le transport des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules, ainsi que celui des déchets métaboliques dont il doit débarrasser les tissus ; 2) la communication entre les différents organes du corps (transfert de signaux ou d’effecteurs immunitaires) ; et 3) la régulation thermique corporelle, qui peut être modulée par l’envoi du flux sanguin vers la peau ou inversement (Pocock et al., 2019).

Pour remplir ces fonctions, le système cardiovasculaire est organisé en réseau : le cœur sert de pompe et assure la circulation du sang dans les vaisseaux sanguins, irrigant chaque partie de l’organisme. La double circulation permet d’oxygéner le sang en le faisant passer par les poumons puis de nouveau jusqu’au cœur, c’est la circulation pulmonaire ; il est ensuite envoyé dans tout le corps pour permettre les échanges nécessaires au bon fonctionnement des tissus, puis revient désoxygéné au cœur, c’est la circulation systémique. Dans ces deux circulations, le mouvement du sang repose sur les différences de pression entre les points du circuit. En effet, la pression provient de la contraction du ventricule. Elle reste donc très élevée dans les artères, puis diminue le long de l’arbre vasculaire (ou dans les poumons), avec des valeurs faibles dans les veines et quasiment nulles dans l’atrium.

Le cœur

Le cœur est lui aussi divisé en deux parties, correspondant aux deux circulations. D’un côté, l’atrium droit reçoit le sang désoxygéné provenant de l’ensemble du corps et acheminé par les veines caves, puis le déverse dans le ventricule droit, qui l’expulse à son tour vers les poumons par le tronc pulmonaire. De l’autre côté, l’atrium gauche reçoit le sang oxygéné au niveau des poumons par les veines pulmonaires et le dirige vers le ventricule gauche, qui est à son tour chargé de l’envoyer dans tout le corps par l’aorte (Figure 2).

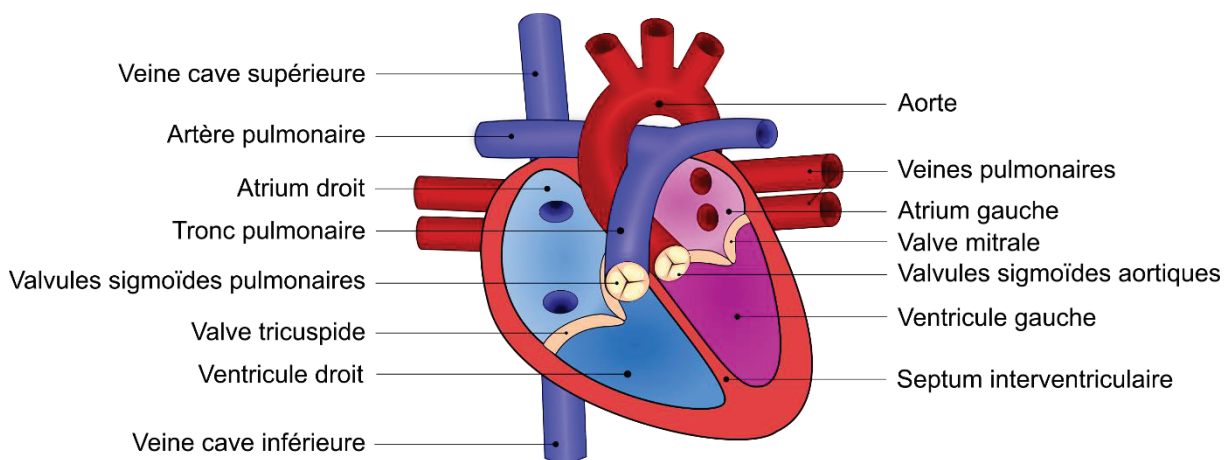


Figure 2. Anatomie du cœur humain.

Le cœur est situé dans le médiastin, entre les poumons dans la cage thoracique. Il est majoritairement constitué de cardiomyocytes et de tissu conjonctif, mais sa paroi peut être divisée

plus précisément en 3 couches distinctes : l'endocarde, le myocarde et l'épicarde (Figure 3). Le tissu cardiaque est innervé et lui-même vascularisé par les vaisseaux coronaires. L'ensemble du cœur est protégé par le péricarde.

- 1) L'**endocarde** est la couche interne du cœur, qui est en contact avec le sang. Il est composé de cellules endothéliales qui forment un tapis continu avec l'endothélium des vaisseaux parvenant jusqu'au cœur. On peut également observer une couche sous-endothéliale qui contient de la matrice extracellulaire, particulièrement des fibres de collagène et du tissu élastique lâche (Arackal & Alsayouri, 2022; Pocock et al., 2019).
- 2) Le **myocarde** est la couche intermédiaire et la plus épaisse. Il est constitué de cellules musculaires cardiaques (ou myocytes cardiaques), qui ont la particularité d'être liées entre elles par des disques intercalaires, leur permettant de synchroniser leurs contractions sur le rythme du battement cardiaque ainsi que de rester fortement attachées, malgré les contractions répétées. Les cellules musculaires cardiaques sont striées, mais contrairement à celles du muscle squelettique, elles sont mononucléées et contiennent sensiblement plus de mitochondries (Arackal & Alsayouri, 2022). Le myocarde est constitué des cardiomyocytes et de fibroblastes mais également de cellules endothéliales, de péricytes et de cellules immunitaires résidentes telles que des macrophages et quelques lymphocytes T et B (qui ont en tout cas été décrits chez la souris) (Bönner et al., 2012; Gray et al., 2018; Lafuse et al., 2021). La paroi du ventricule gauche est la plus épaisse des parois cardiaques. Celles des atria sont les plus fines, du fait des différentes pressions auxquelles ces chambres sont confrontées (Pocock et al., 2019).
- 3) La dernière couche formant la paroi cardiaque est l'**épicarde**. Il est séparé du myocarde par du tissu adipeux, des nerfs et la vascularisation coronaire. L'épicarde fait partie du **péricarde** qui entoure et protège le cœur. Le péricarde est un sac très résistant formé d'une couche externe, le **péricarde fibreux** et d'une couche interne, le **péricarde séreux** constitué lui-même de deux membranes, l'une viscérale qu'est l'épicarde, l'autre pariétale, collée au péricarde fibreux (Figure 3). L'espace entre les deux feuillets du péricarde séreux est rempli de liquide péricardique, servant à diminuer les frictions associées aux battements du cœur. Le péricarde est attaché au diaphragme, ce qui maintient le cœur en place malgré ses contractions continues. La contraction des ventricules crée donc un étirement des atria, ce qui aide à remplir ces derniers. Le péricarde entoure également la racine des vaisseaux sortant du cœur. Il est composé de cellules mésothéliales, responsables entre autres de la production du liquide péricardique.

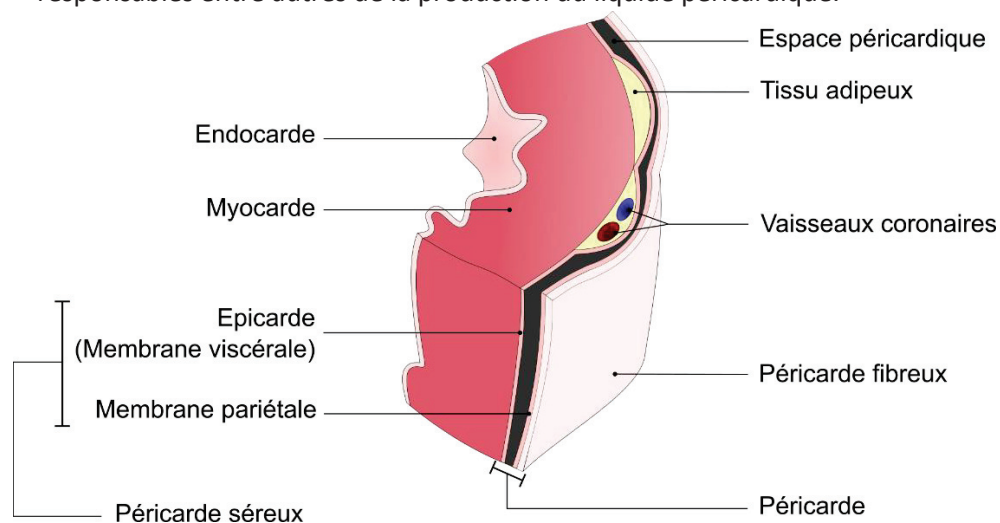


Figure 3. La paroi cardiaque.

Les quatre chambres du cœur sont séparées par des parois que l'on appelle septa. Le septum atrial sépare les deux atria et est majoritairement fibreux, tandis que le septum interventriculaire sépare les deux ventricules et est plus épais et constitué de tissu musculaire ainsi que d'une partie fibreuse (Pocock et al., 2019).

Les valves cardiaques

La première fonction des valves cardiaques est d'assurer une circulation unidirectionnelle du flux sanguin en l'empêchant de faire marche arrière. Un reflux de sang lors des contractions cardiaques, appelé aussi régurgitation, épuiserait le cœur et mènerait progressivement à une insuffisance cardiaque, dont l'issue est souvent fatale. On distingue deux types de valves dans le cœur : les valves auriculoventriculaires (AV) et les valves sigmoïdes. Les valves auriculoventriculaires séparent les ventricules des atria à gauche avec la **valve mitrale** et à droite avec la **valve tricuspide**. Les valves sigmoïdes séparent le ventricule gauche de l'aorte pour la **valve aortique** et le ventricule droit de l'artère pulmonaire pour la **valve pulmonaire** (Figure 2). Leur organisation n'est pas tout à fait similaire puisque les valves auriculoventriculaires sont formées par des feuillets membraneux qu'on appelle cuspidés, dont l'extrémité libre est reliée aux muscles papillaires (ou piliers) du ventricule par des tendons (cordes tendineuses ou cordages). La valve mitrale n'est composée que de deux cuspidés alors que la valve tricuspide, comme son nom l'indique, en possède trois. Les valves sigmoïdes sont constituées de trois cuspidés (ou valvules) en forme de demi-lune. Toutes les valves sont positionnées sur un anneau fibreux qui achève la séparation entre les différents compartiments et qu'on appelle *annulus* (Pocock et al., 2019).

Les valves sont elles aussi composées de 3 couches différenciées : la *fibrosa*, la *spongiosa* et la *ventricularis*. Chacune est associée à la présence majoritaire d'une protéine de la matrice. Le collagène est ainsi prédominant dans la *fibrosa*, qui est la couche qui se trouve du côté « receveur ». La *spongiosa* est la couche centrale et contient de nombreux protéoglycanes et glycosaminoglycanes. La *ventricularis* (parfois *atrialis* pour les valves AV) est composée d'une grande quantité d'élastine et fait face au côté « donneur ». C'est cette couche qui est chargée de redonner sa forme initiale à la valve après chaque ouverture. Les valves sont tapissées sur leur surface extérieure par des cellules endothéliales valvulaires. Les cellules valvulaires interstitielles sont présentes dans les 3 couches internes et sont responsables de réguler la matrice environnante en jouant sur la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (MEC), de protéases et d'inhibiteurs de protéases. D'autres cellules sont présentes dans les valves, notamment des cellules musculaires lisses (CML), des fibroblastes, et des cellules nerveuses (Kodigepalli et al., 2020; Rippel et al., 2012).

Les vaisseaux

Les premiers vaisseaux qui prennent en charge le sang à sa sortie du cœur sont l'aorte et l'artère pulmonaire. Ce sont des artères dites **élastiques**, parfois également appelées artères de conductance. Les premières ramifications de l'aorte sont aussi considérées comme des artères élastiques, avec par exemple l'artère brachiocéphalique, les artères carotides communes et l'artère iliaque commune (Figure 4). Il n'existe cependant pas de délimitation claire : il s'agit plutôt d'un continuum où l'élasticité et le diamètre du vaisseau diminuent à mesure que l'on s'éloigne du cœur (voir Tableau 1). Le rôle des artères élastiques est de lisser le flux sanguin pour transformer le flux pulsatile du cœur en un flux continu en périphérie. Pour cela, elles possèdent des propriétés mécaniques particulières, dont l'importance sera étudiée plus en détail dans le chapitre suivant (Ch. II - L'aorte et les artères élastiques).

Viennent ensuite les artères **musculaires**, dont le diamètre est plus petit, et qui comprennent par exemple les artères mésentériques et fémorales (Figure 4). Ce sont des vaisseaux de distribution qui ne nécessitent pas de capacité particulière de déformation et qui présentent des propriétés moins élastiques. Elles jouent un rôle important dans le maintien de la pression artérielle, puisqu'elles peuvent l'influencer en jouant sur la vasomotricité, ainsi que dans la régulation de la distribution sanguine. Les artères musculaires possèdent donc plus de muscle lisse et moins de tissu élastique (Tableau 1). L'épaisseur plus importante de leur paroi (par rapport au diamètre total) permet également de maintenir leur forme lors de mouvement, particulièrement au niveau des articulations où elles pourraient s'écraser.

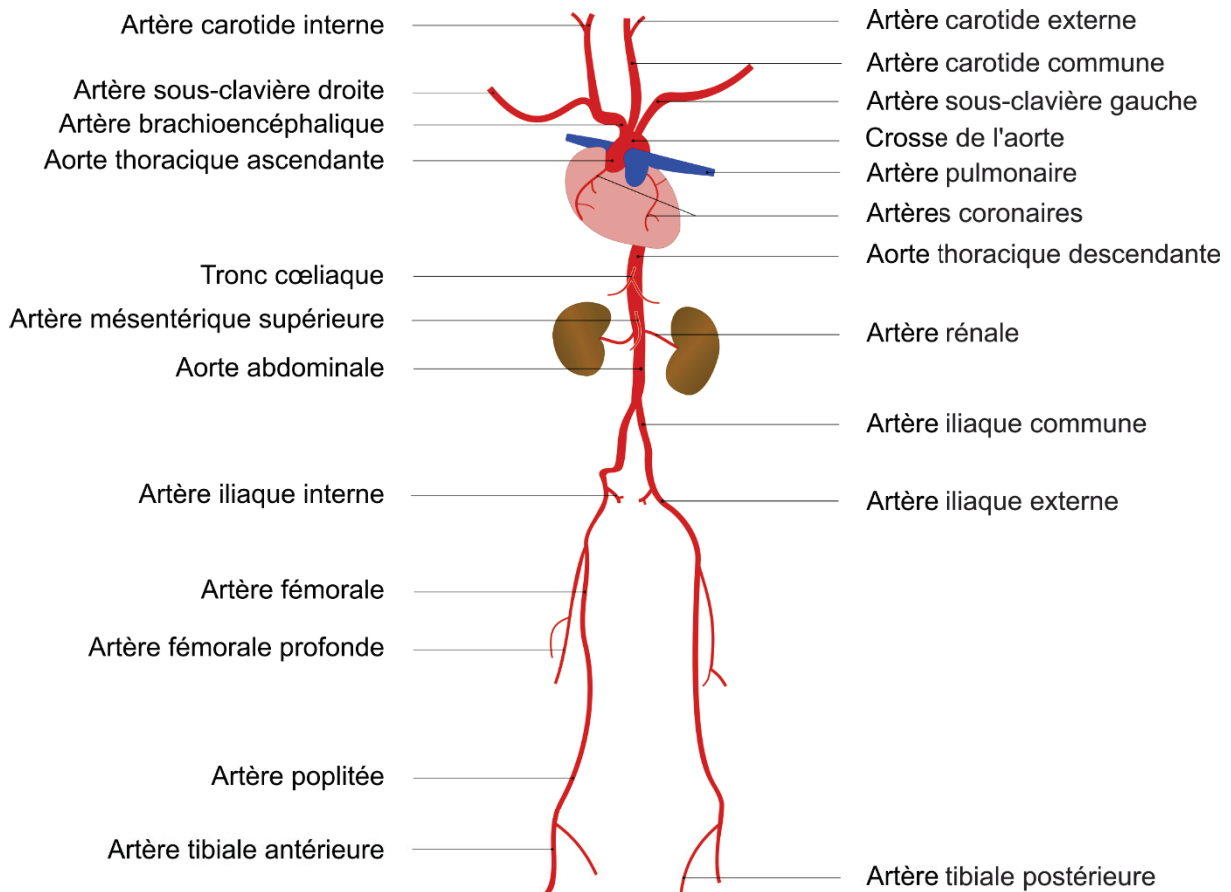


Figure 4. Arbre artériel représentant les artères les plus importantes du corps humain.

On trouve ensuite les **artérioles**, qui sont sensiblement similaires aux artères musculaires si ce n'est que leur diamètre est plus petit. Les artérioles se divisent ensuite plusieurs fois pour finalement former les **capillaires**, responsables de la majorité des échanges entre le sang et le tissu. Leur paroi est très fine, ce qui permet une diffusion facilitée entre les deux compartiments (Eble & Niland, 2009). Les capillaires ne possèdent pas de muscle lisse, mais sont en partie bordés de cellules contractiles appelées péricytes. Il existe différents types de capillaires selon la perméabilité du vaisseau avec des capillaires dits continus, fenestrés ou discontinus. Les capillaires fusionnent ensuite pour former des **veinules** un peu plus larges, puis des **veines** encore plus larges.

Le circuit veineux sert à ramener le sang vers le cœur. Sa paroi ne possède pas de tissu élastique mais bien plus de collagène, ce qui rend les vaisseaux plus résistants à l'étirement et déformables. Leur paroi apparaît d'ailleurs moins ronde sur les coupes histologiques. Certaines petites et moyennes veines, particulièrement dans les membres, possèdent des valves pour éviter les reflux

de sang, la pression y étant moindre. Ces valves sont des petites protubérances provenant de la paroi vasculaire, contenant un peu de tissu élastique.

Tableau 1 - Taille et composition des principaux types de vaisseaux chez l'humain.

	Artères		Artériole	Capillaire	Veinule	Veine
	Elastique	Musculaire				
Diamètre	1-2,5 cm	0,3 – 1 cm	10-300 µm	5-10 µm	50-200µm	0,5-3 cm
Épaisseur de la paroi	1-2 mm	1 mm	20 - 2 µm	0,5-1 µm	2 µm	0,5-1,5 mm
Endothélium	5%	10%	10%	95%	20%	5%
Muscle lisse	25%	40%	60% *	0%	20%	30%
Tissu élastique	40%	10%	10% *	0%	0%	0% **
Collagène	30%	25%	20%	5%	60%	65%

* Les artérioles dites terminales (10 µm – 30 µm) ont un contenu en muscle lisse plus important et moins de tissu élastique.

** Un tissu élastique est présent mais peu visible, surtout dans les grosses veines.

D'après Physiologie humaine et physiopathologie, les fondements de la médecine de Gilian Pocock, 5e édition, 2019 et Berne & Levy Physiology, 6e édition, 2008.

La paroi vasculaire est organisée en 3 couches ou « tuniques » que sont l'intima, la media et l'adventice, et qui possèdent chacune leurs particularités (Figure 5).

- 1) L'**intima** est formée d'un endothélium et d'une couche de tissu conjonctif appelée lame basale. L'endothélium est en contact direct avec le sang et est responsable du passage de certaines molécules au travers de sa structure. Les cellules endothéliales sont liées entre elles par des jonctions serrées (claudines, occludines, JAM) et des jonctions adhérentes (cadhérines, nectines) pour assurer leur rôle de barrière (Duong & Vestweber, 2020). La perméabilité vasculaire peut être modifiée en fonction des besoins de manière transitoire. Par exemple, en cas d'inflammation, l'endothélium devient plus perméable pour permettre le passage des cellules immunitaires sur le site concerné, mais revient à sa configuration initiale une fois l'inflammation résolue. De nombreuses pathologies affectent durablement la perméabilité intimale et entraînent une rupture de la fonction barrière de l'endothélium (Dejana et al., 2009), comme lors d'inflammation chronique où l'intima subit un remodelage important et persistant (Claesson-Welsh et al., 2021). L'endothélium est également impliqué dans l'hémostase, avec une action antithrombotique (Verhamme & Hoylaerts, 2006), et dans la régulation du tonus vasculaire puisqu'il est capable de synthétiser et de relarguer de nombreuses molécules vasoactives (monoxyde d'azote (NO), prostaglandines) (Godo & Shimokawa, 2017). L'intima est séparée de la média par la limitante élastique interne (Pocock et al., 2019).
- 2) La **média** comprend des couches successives de CML et de lamelles élastiques, qui constituent ensemble l'unité fonctionnelle sur laquelle repose la capacité du vaisseau à gérer le flux sanguin, surtout au niveau des artères. Son épaisseur et sa composition

varient en fonction de la pression à laquelle le vaisseau est soumis. Les lamelles élastiques sont organisées de manière concentrique dans les artères pour permettre une répartition uniforme des forces sur la paroi vasculaire. Plus la pression augmente, plus le nombre de lamelles élastiques sera important (Faury, 2001). Près de 80 lamelles sont ainsi retrouvées dans l'aorte ascendante d'un adulte sain (Fritze et al., 2012), entre 65 et 55 dans l'aorte thoracique descendante (Wolinsky & Glagov, 1967) et finalement 3 ou moins dans les artères plus périphériques (Cocciolone et al., 2018). Entre ces lamelles se trouvent des cellules musculaires ainsi que des fibrilles de collagène, d'autres fibres élastiques dites inter-lamellaires et des protéoglycanes (O'Connell et al., 2008).

La média est la couche dans laquelle la matrice extracellulaire varie le plus en fonction du type de vaisseau (Eble & Niland, 2009). Elle est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe dans les artères.

- 3) L'**adventice** est la couche la plus externe et est majoritairement composée de tissu conjonctif fibro-élastique, contenant surtout des fibroblastes et du collagène. Le collagène a un rôle complémentaire aux fibres élastiques et permet au vaisseau de ne pas rompre si la pression devient trop forte. Les fibrilles de collagène de l'adventice sont engagées après le dépassement d'un niveau de contrainte, prenant le relais des fibrilles de collagène de la média, qui elles observent un plateau à l'atteinte de cette contrainte (M.-J. Chow et al., 2014). L'adventice abrite également des cellules immunitaires résidentes et des cellules progénitrices capables de se différencier en CML si nécessaire. De plus, l'adventice pourrait

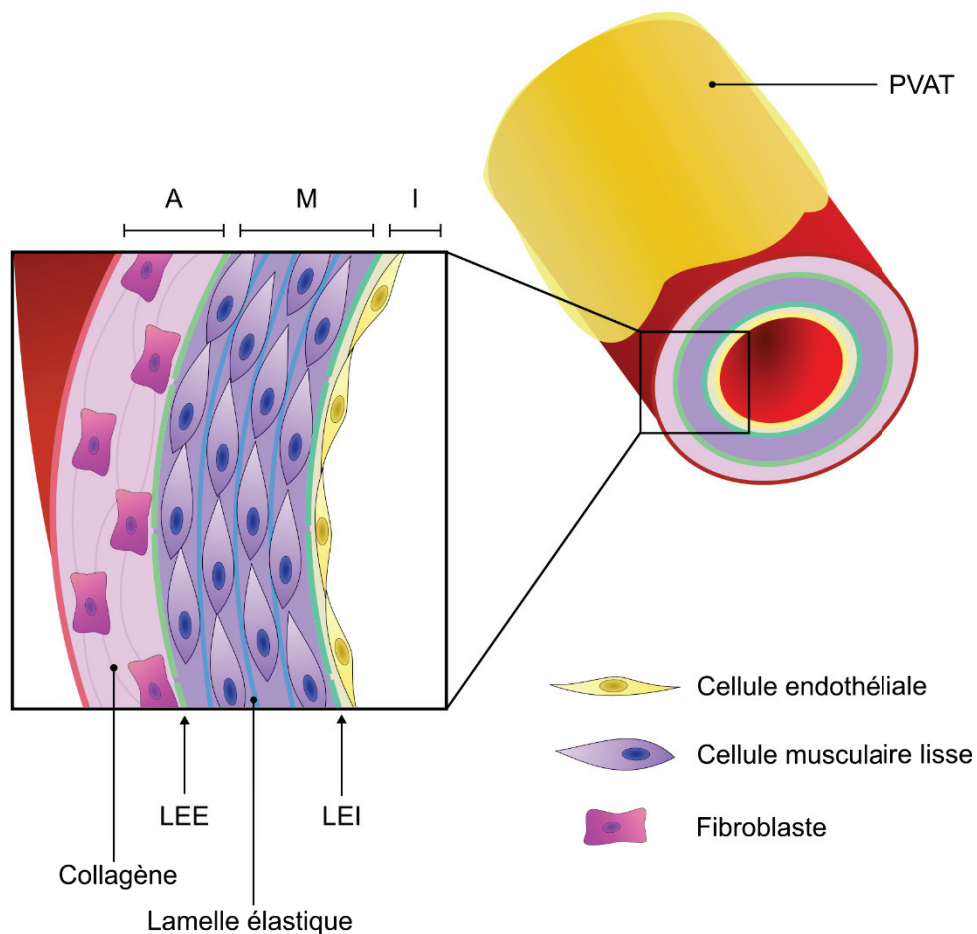


Figure 5. Les 3 couches de la paroi vasculaire. A = adventice ; M = média ; I = intima ; LEE = limitante élastique externe ; LEI = limitante élastique interne ; PVAT = tissu adipeux périvasculaire.

servir de « tour de guet » pour repérer rapidement les signes précurseurs d'une lésion ou d'un stress important. En effet, les fibroblastes sont capables de s'activer en réponse à certains changements (hypoxie, étirement, infection) et d'adapter leur comportement pour répondre à la situation. Ils peuvent par exemple produire des protéines de la matrice, relarguer des cytokines et facteurs de croissance et retenir des cellules inflammatoires circulantes. Des changements de la structure et des fonctions vasculaires sont ainsi initiés. Les cellules dendritiques résidentes de l'adventice participent également à la surveillance et à l'activation des fibroblastes si nécessaire (Stenmark et al., 2011).

L'organisation de la paroi vasculaire est globalement similaire entre les différents types de vaisseaux, mais l'importance relative des trois couches ainsi que leur composition peuvent fortement varier, comme déjà mentionné dans le [Tableau 1](#). Les capillaires sont un peu particuliers puisqu'ils n'ont pas de média. Ils sont constitués d'une couche de cellules endothéliales, de quelques péricytes et d'une fine adventice qui contient un peu de collagène. Leur paroi est très fine (environ 0,5 µm d'épaisseur).

Le tissu adipeux périvasculaire (PVAT ; *perivascular adipose tissue*) est parfois identifié comme la quatrième couche de la paroi vasculaire ([Figure 5](#)) pour signifier son importance, mise en évidence dans les dernières décennies. Formé par des dépôts adipeux autour de l'adventice (qui peuvent être blancs, bruns ou beiges), il contient aussi quelques cellules immunitaires résidentes, notamment des macrophages et des lymphocytes T. Le PVAT est aujourd'hui reconnu comme métaboliquement actif et son rôle dans la fonction vasculaire est démontré (Britton & Fox, 2011; Cheng et al., 2018). Il est impliqué dans la régulation de la rigidité artérielle et dans le remodelage vasculaire et peut avoir un rôle aussi bien protecteur qu'aggravant suivant les situations (Fernández-Alfonso et al., 2013; Takaoka et al., 2009; Villacorta & Chang, 2015). En effet, il est la source de substances vasoactives qu'on appelle **adipokines** qui peuvent avoir de nombreux effets. En conditions physiologiques, les adipokines sécrétées sont surtout vasorelaxantes (NO, adiponectine) et sont bénéfiques pour le vaisseau. Cependant, en conditions pathologiques le PVAT peut aussi relarguer des vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II et avoir un effet nuisible. Le PVAT pourrait également contribuer aux fonctions vasculaires d'un point de vue structural (Watts et al., 2020).

La plupart des vaisseaux sanguins sont innervés par le système nerveux autonome sympathique. Les fibres nerveuses se répandent dans l'adventice jusque dans la média. Les nerfs adrénergiques permettent la fonction vasoconstrictrice, qui est le principal régulateur du tonus vasculaire et donc de la résistance périphérique totale. Ils peuvent aussi induire une vasodilatation, en activant les récepteurs β_2 qui sont exprimés notamment dans les vaisseaux alimentant les muscles squelettiques. Les vaisseaux sanguins possèdent aussi des fibres afférentes qui leur permettent de répondre à certains stimuli externes mécaniques (étirement) ou chimiques (composition du sang) (Pocock et al., 2019).

Les artères élastiques ont également la particularité d'être elles-mêmes vascularisées, leur paroi étant trop épaisse pour que la simple diffusion qui permet les échanges dans les autres vaisseaux se fasse correctement et sur l'ensemble de la paroi. Les *vasa vasorum* (les vaisseaux des vaisseaux) permettent donc d'alimenter correctement les artères élastiques et on retrouve de ce fait des vaisseaux sanguins dans l'adventice et jusque dans la média pour les artères de plus gros calibre (Phillippi, 2022). Les artères de petits mammifères ne semblent pas disposer de ce type de vascularisation des gros vaisseaux, et il a été estimé que seules les artères possédant plus de 29 lamelles élastiques étaient concernées. Il est d'ailleurs intéressant de constater que les branches des *vasa vasorum* qui pénètrent la média n'atteignent jamais ces 29 lamelles sous-intimales (Wagenseil & Mecham, 2009).

II. L'aorte et les artères élastiques

Comme décrit précédemment, le rôle des artères élastiques est de garantir une perfusion optimale des organes et tissus périphériques à partir du flux sanguin discontinu qu'elles reçoivent à chaque battement cardiaque. En effet, le sang est éjecté du cœur dans les artères à chaque systole, ce qui correspond au pic de pression artérielle (Figure 6), puis la pression diminue pendant la diastole, qui correspond au remplissage du ventricule. Les artères de gros calibre, du fait de leurs propriétés élastiques, sont capables d'absorber le flux sanguin en s'étirant lors de la systole, puis elles restituent l'énergie emmagasinée et reprennent leur forme initiale pendant la diastole, ce qui poursuit l'éjection du sang vers la périphérie (Figure 6). La capacité de déformation réversible des artères repose sur la présence des lamelles élastiques dans la média et plus particulièrement sur l'élastine. Ce phénomène

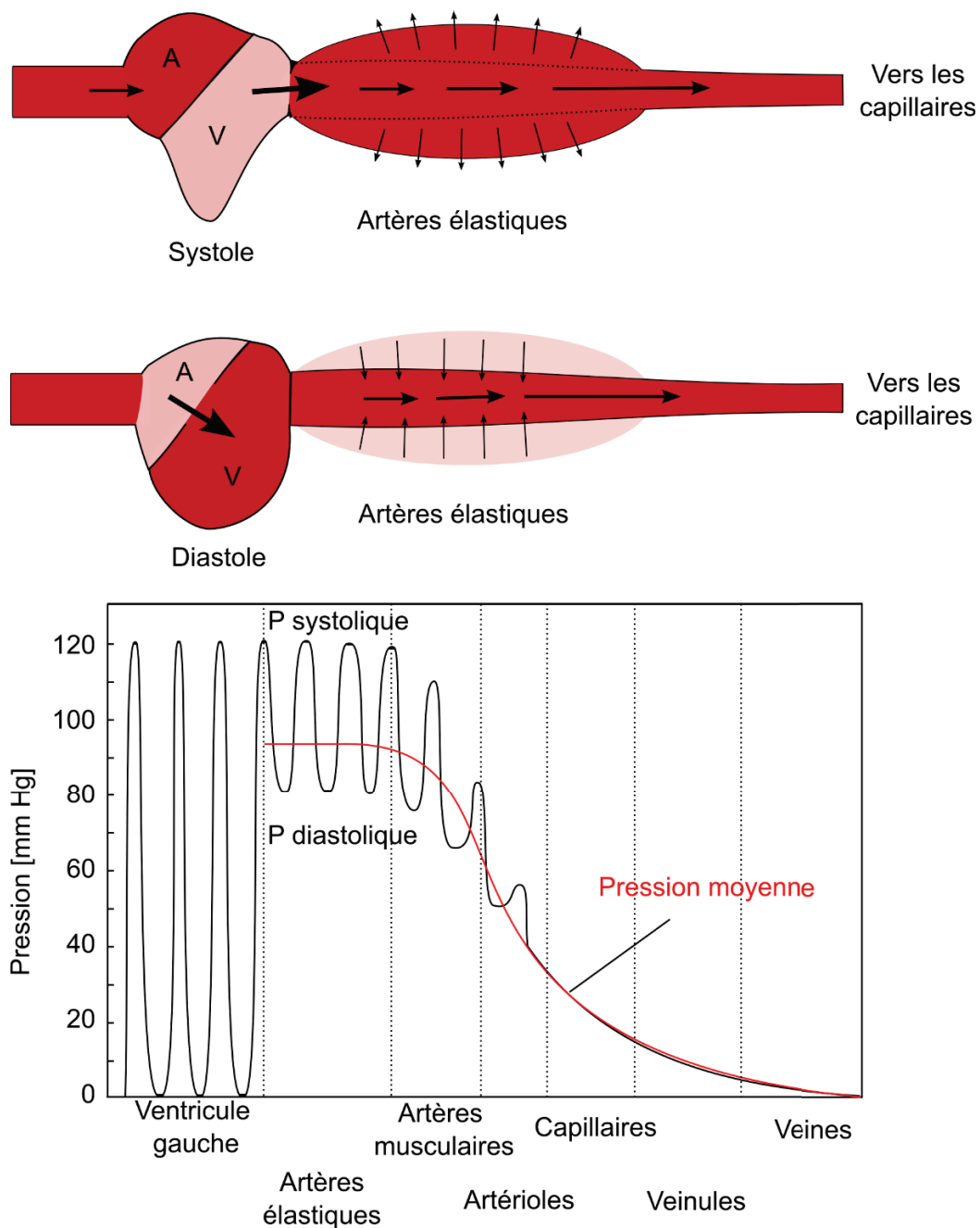


Figure 6. Artères élastiques et pression artérielle.

de « lissage » du flux pulsatile cardiaque est appelé **effet Windkessel**, en référence à un procédé utilisé par les pompiers au XVIII^e siècle et qui permettait d'obtenir un débit constant d'eau à partir d'une pompe à l'aide d'une chambre à air (*Windkessel* en allemand) (Cocciolone et al., 2018). Les pics associés aux pulsations du cœur sont donc de moins en moins perceptibles, et quasiment inexistantes au niveau des plus petits vaisseaux et des capillaires, ce qui permet également de les préserver puisque leur fine paroi ne permettrait pas de résister à des changements de pression trop importants. Le flux est continu au niveau des organes qui sont ainsi perfusés sans interruption.

Deux éléments majeurs participent au bon fonctionnement des artères élastiques et leur permettent de jouer leur rôle correctement : les CML et la MEC de la paroi vasculaire, en particulier les fibres élastiques de la média. Ces acteurs essentiels seront détaillés dans les deux prochaines sections.

Les cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses sont les cellules majoritaires de la média vasculaire. Elles sont responsables de la contraction des vaisseaux, mais également de la production de la matrice extracellulaire qui compose leur environnement, principalement des fibres élastiques et du collagène (Wagenseil & Mecham, 2009).

Les CML sont soumises à de nombreuses forces mécaniques, particulièrement au niveau de l'aorte. L'amplitude de ces forces dépend de la pression sanguine, mais également de l'environnement dans lequel se trouvent les cellules, c'est-à-dire la MEC, dont la rigidité est un facteur clé dans la capacité de réponse des CML (Figure 7) (Johnson et al., 2021). Toutes les couches de la paroi participent à la réponse mécanique du vaisseau, mais la média est la seule à le faire activement, au moyen des CML (Petit et al., 2019). Les CML sont en effet capables de moduler leur forme et leur comportement en réponse aux changements de pression. Cette propension de la paroi vasculaire à se distendre quand la pression augmente est appelée « **compliance artérielle** », et c'est une caractéristique essentielle au bon fonctionnement des artères élastiques (Wagenseil & Mecham, 2012). La compliance artérielle est réduite dans de nombreuses pathologies chroniques, comme le diabète, et baisse également au cours de la vie, ce qui marque le vieillissement des vaisseaux et finit par impacter leur performance (Ahmed & Warren, 2018; Romney & Lewanczuk, 2001).

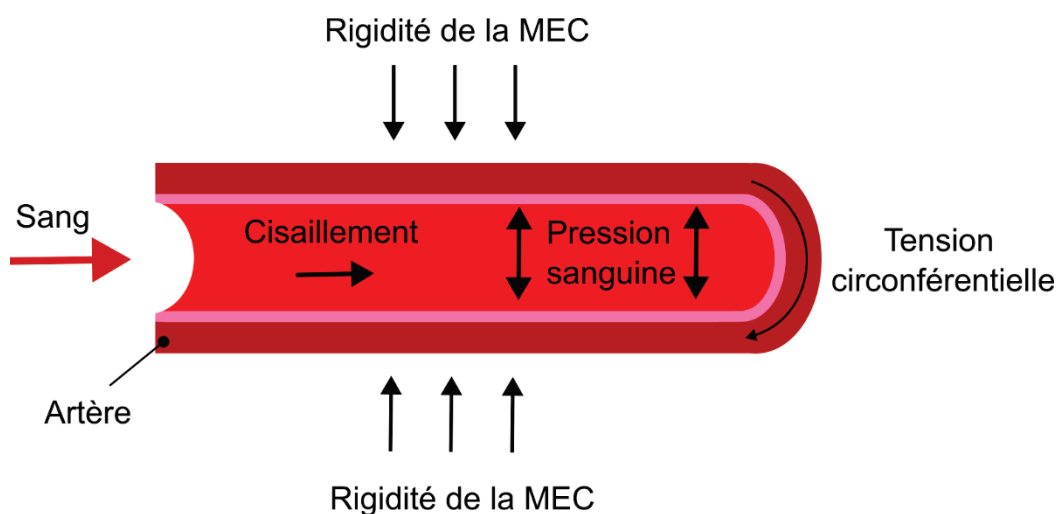


Figure 7. Différentes forces subies par la cellule musculaire lisse au sein du vaisseau. MEC = matrice extracellulaire. Adapté de Johnson et al. 2021.

Pour pouvoir répondre aux différents stress mécaniques, la cellule doit être capable de les discerner et de les convertir en signaux biologiques intracellulaires, on parle de **mécanotransduction**. Les voies de mécanotransduction qui permettent cette réponse modulable interviennent de plusieurs façons. La conductance de la membrane plasmique peut changer du fait de l'ouverture de canaux ioniques dont l'activation dépend de l'étirement (Hisada et al., 1991); une réorganisation du cytosquelette peut également être enclenchée par le biais des intégrines qui assurent le lien entre MEC et cytosquelette au niveau des adhésions focales (Burrige, 2017) ; enfin, des voies de signalisation peuvent être activées par des récepteurs membranaires sensibles à l'étirement (G. Liu et al., 2011). Ces modifications stress-dépendantes finissent par entraîner un changement du tonus vasculaire global et apportent donc une réponse adaptée à la situation (Ye et al., 2014).

Le cytosquelette est très important dans la réponse mécanique des CML aux stimuli externes, et son architecture peut être modulée drastiquement en fonction des besoins. Le cytosquelette comprend les microtubules, qui forment un réseau particulièrement résistant à la compression, ainsi que les filaments d'actine et filaments intermédiaires, qui fournissent l'architecture de la cellule et participent à la transduction des signaux mécaniques (Ye et al., 2014). Les filaments d'actine sont les plus étudiés dans le contexte des CML, du fait qu'ils sont aussi directement responsables de leur capacité de contraction. En effet, et comme pour les autres muscles, l'appareil contractile (*contractile apparatus*) des CML est formé d'actine et de myosine. Les filaments d'actine et de myosine sillonnent tout le corps cellulaire, mais ils ne sont pas arrangés en sarcomères comme c'est le cas pour les muscles striés (Yamin & Morgan, 2012). Ils se lient à la partie intracellulaire des intégrines en réponse à leur activation, à l'aide d'un pont de taline. Un étirement subi par la cellule induit la polymérisation des filaments d'actine et augmente également le recrutement des composants des adhésions focales (FA ; *focal adhesion*). La liaison des filaments d'actine aux intégrines est renforcée par la vinculine lors de fortes tensions, alors qu'elle se défait spontanément lorsque les tensions sont basses. La formation de ces structures influence le comportement cellulaire, mais également l'organisation de la MEC environnante (Johnson et al., 2021).

Les contractions sont involontaires et peuvent être initiées par plusieurs facteurs (stimuli neuronaux, étirement, composés chimiques, hormones...), permettant une modulation précise (Touyz et al., 2018). Les CML communiquent entre elles par des jonctions serrées communicantes (*GAP junctions*) qui permettent de synchroniser leurs contractions (Figueroa & Duling, 2009).

En plus de la capacité individuelle des cellules à répondre aux changements de pression, l'organisation du tissu joue également un rôle très important, surtout au niveau des artères élastiques. Dans la média artérielle, les CML sont superposées en couches successives, chacune entre deux lamelles élastiques. Chaque couche de cellules/lamelle élastique forme une **unité lamellaire** de la média aortique (MLU ; *Aortic medial lamellar unit*) (O'Connell et al., 2008; Wolinsky & Glagov, 1967) (**Figure 8**). Les CML sont organisées dans une orientation concentrique au sein de la paroi vasculaire, pour répondre le plus efficacement possible à la principale contrainte mécanique, c'est-à-dire l'étirement du vaisseau dû à la pression du sang (Petit et al., 2019). Des fibrilles de collagène, des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes sont aussi présents entre les lamelles, ainsi que des fibres élastiques inter-lamellaires, qui forment un réseau complexe (Humphrey et al., 2015; Jana et al., 2019). Les CML sont accrochées à leurs lamelles élastiques par des fibres de type oxytalan, qui sont une forme particulière de fibres élastiques moins réticulées, ainsi que par les plaques d'ancrage (zones d'ancrage des microfilaments d'actine) correspondant aux adhésions focales (Lacolley et al., 2017)

(Figure 8). Cette liaison entre le cytosquelette d'actine et les lamelles élastiques forme une **unité contractile-élastique** (Humphrey et al., 2015).

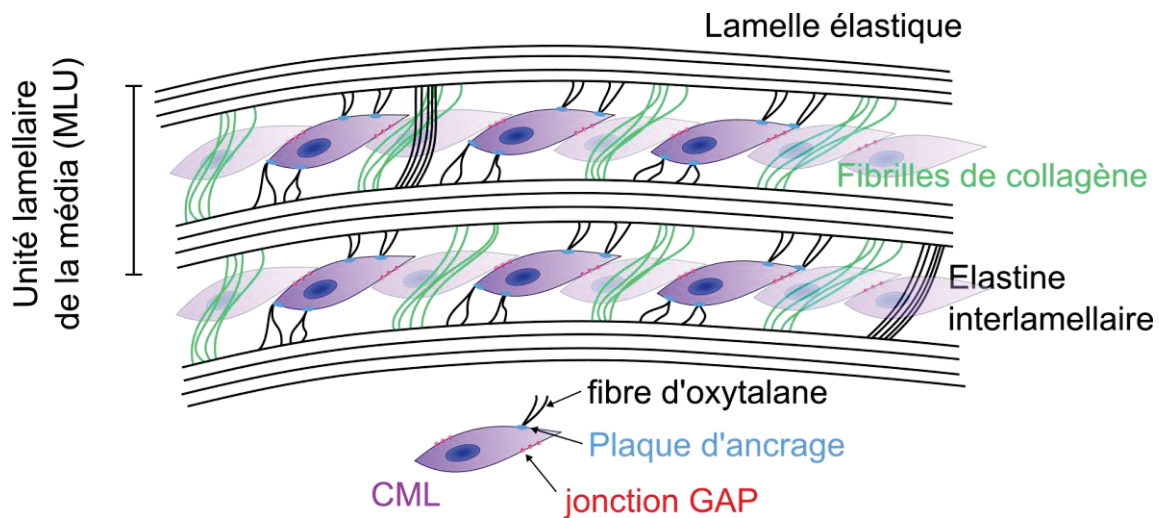


Figure 8. Organisation de l'unité lamellaire de la média (MLU). CML = cellule musculaire lisse ; jonction GAP = jonction serrée communicante.

Depuis plusieurs années, il est admis que les modifications de la paroi vasculaire associées à certaines pathologies ou au vieillissement ne reposent pas uniquement sur le collagène et l'élastine, ou sur leur contenu relatif. En effet, des changements importants ont également lieu au niveau des CML, particulièrement concernant les voies de mécanotransduction, les phénomènes inflammatoires et l'architecture globale du cytosquelette (Bochaton-Piallat & Bäck, 2018). Les CML sont des cellules qui possèdent une très grande plasticité, et des phénotypes pathologiques sont souvent sur-représentés dans les maladies cardiovasculaires. Il s'agit parfois de réponses aux changements résultants de la pathologie, mais ce changement phénotypique peut également contribuer activement au développement de celle-ci. Les caractéristiques acquises par la cellule dans son nouveau phénotype lui donnent souvent la possibilité de remodeler profondément le tissu vasculaire, notamment la MEC, et d'engendrer des changements importants sur le long terme.

Le phénotype le plus commun des CML vasculaires est celui dit **contractile**, qui correspond à une CML différenciée, qui ne prolifère plus (dite quiescente) et dont le rôle est de réguler le tonus vasculaire (Campbell & Campbell, 2012; Sorokin et al., 2020). En conditions physiologiques, il concerne la majorité des cellules de la média artérielle. Il est caractérisé par la présence de marqueurs particuliers comme l' α -SMA (α -Smooth muscle actin), qui constitue 60% de l'actine totale dans les CML (Ye et al., 2014), mais également la chaîne lourde de la myosine 11 (MYH11), la protéine SM22 α et la smootheline (SMTN) (Sorokin et al., 2020; van der Loop et al., 1996). La morphologie associée au phénotype contractile est celle de la cellule typique fusiforme, allongée et plutôt fine.

Le phénotype « **synthétique** » est également relativement fréquent. La CML se différencie (perte des marqueurs CML) et retrouve ses capacités de prolifération et de migration. Elle produit de la MEC, dont beaucoup de collagène, et exprime plus de protéases de type métalloprotéinase matricielle (MMP). Les cellules sont plus petites et prennent la forme de pavés (« *cobblestone* »), décrite aussi comme « épithélioïde ». Ce phénotype est souvent considéré comme pathologique, bien qu'un certain nombre de CML synthétiques soient tout de même présentes en conditions physiologiques. Les deux phénotypes ne sont d'ailleurs pas des états totalement distincts l'un de l'autre, et un continuum avec des cellules plus ou moins contractiles ou synthétiques est souvent

observé (Figure 9). L'augmentation de la présence du phénotype synthétique par rapport au contractile est cependant anormale. Des stimuli pathologiques sont suffisants pour engendrer le changement phénotypique. Par exemple, il a été montré que les CML synthétiques étaient plus nombreux chez des rats hypertensifs que chez les rats normotensifs (M. Liu & Gomez, 2019), ainsi que dans les cas d'athérosclérose. Cette sur-représentation du phénotype synthétique est également remarquée lors du vieillissement des vaisseaux (Cao et al., 2022).

De nombreux autres phénotypes ont été observés chez les CML, surtout dans le contexte de l'athérosclérose, et les plus importants sont également illustrés Figure 9. Parmi eux se trouvent les CML macrophage-like ; les « mesenchymal-like » ; les CML ostéogéniques ; les « fibroblast-like » ; et les CML « spumeuses » (*foam cells*) qui sont remplies de lipides (Dobnikar et al., 2018; Grootaert & Bennett, 2021). Des cellules sénescents ou apoptotiques sont aussi retrouvées plus fréquemment dans les pathologies vasculaires, particulièrement dans le cœur nécrotique des plaques d'athérome (Sorokin et al., 2020). La présence de marqueurs spécifiques à ces phénotypes est aussi investiguée pour parvenir à une caractérisation globale des différents états que la CML peut prendre. La présence de CML de chacun de ces phénotypes entraîne des conséquences spécifiques qui peuvent influencer la pathologie, par un effet protecteur ou aggravant (Cao et al., 2022; Frismantiene et al., 2018; Sorokin et al., 2020).

Des changements phénotypiques des CML ont été décrits, en plus de l'athérosclérose, dans des pathologies comme les anévrismes, les resténoses, l'hypertension artérielle ou pulmonaire, et plus généralement dans les processus de rigidification artérielle et de vieillissement des vaisseaux (Bochaton-Piallat & Bäck, 2018).

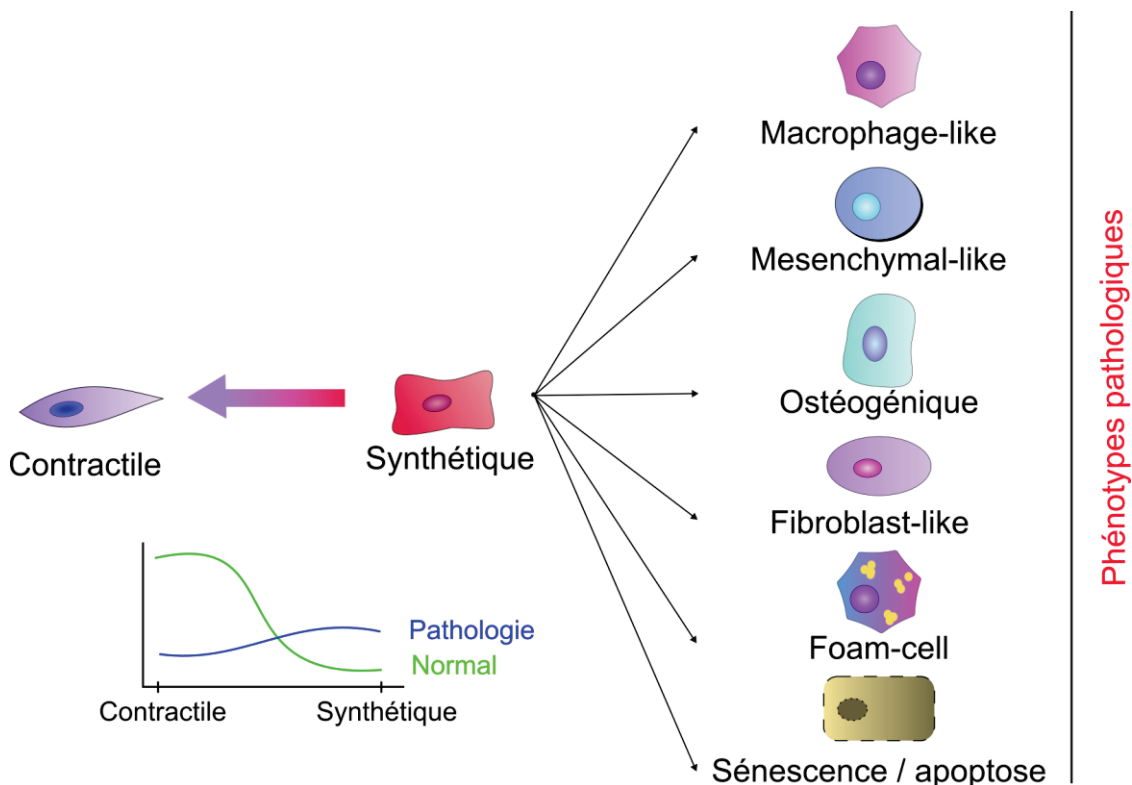


Figure 9. Les CML et leurs phénotypes.

La MEC artérielle

La MEC est un réseau dynamique modulable constitué de macromolécules sécrétées, qui fournit un support tri-dimensionnel organisé aux cellules et aux tissus de l'organisme. Elle a un rôle

prépondérant dans la régulation du comportement cellulaire et influence de nombreux processus tels que l'adhérence, la prolifération, la migration, la différenciation et même la survie, ce qui impacte directement le fonctionnement du tissu (Karamanos et al., 2021).

La MEC a longtemps été cantonnée à sa simple fonction architecturale, mais cette vision a énormément changé dans les dernières années. On sait aujourd'hui que la MEC est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, que ce soit de manière directe ou indirecte, et qu'elle est garante de l'homéostasie du tissu. En effet, des modifications importantes de la MEC sont souvent au cœur du développement et de la progression des pathologies.

La MEC est aussi le principal médiateur qui permet la communication entre l'extérieur et l'intérieur des cellules, par le biais de signaux bidirectionnels dits « *inside-out* » et « *outside-in* » (Theocharis et al., 2012). Ceux-ci sont souvent associés à l'action des intégrines, protéines transmembranaires dont de nombreux protagonistes de la MEC sont des ligands (Karamanos et al., 2021).

Chaque tissu et organe possède donc une matrice extracellulaire spécifique qui est adaptée à sa fonction et à ses besoins. Cette section a pour objet de détailler les principales protéines impliquées dans la physiologie vasculaire et particulièrement artérielle. Un focus sur les fibres élastiques sera fait par la suite (voir [L'élastine et les fibres élastiques](#)).

Les principaux composants de la MEC vasculaire

La MEC vasculaire est un réseau riche qui contient de nombreuses protéines et autres macromolécules, telles que les glycosaminoglycanes (GAG). Seules les plus importantes seront présentées dans ce chapitre, ainsi que certains des rôles qui leur sont attribués dans la fonction vasculaire ou en lien avec des pathologies cardiovasculaires.

Les collagènes

Les collagènes sont des glycoprotéines très abondantes et représentent autour de 30% des protéines totales chez les mammifères (Ricard-Blum, 2011). Ils sont codés par 43 gènes chez l'homme et divisés en 28 types chez les Vertébrés (Chan et al., 2008; Exposito et al., 2010). La caractéristique commune qui les relie est la présence au sein de leur structure de 3 hélices α comprenant un motif tripeptidique Gly-X-Y dans lequel le X est le plus souvent une proline et le Y une 4-hydroxyproline (Ricard-Blum, 2011). Parmi ces collagènes, certains sont dits « fibrillaires », c'est-à-dire qu'ils peuvent être polymérisés en fibrilles. C'est le cas notamment des collagènes de types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII (Bella & Hulmes, 2017; Ricard-Blum, 2011).

Les collagènes jouent un rôle structural très important et fournissent une résistance mécanique aux organes qui subissent de fortes contraintes, comme c'est le cas pour les artères élastiques. En effet, les fibres de collagène de type I sont presque 10^3 fois plus rigides que les fibres élastiques (Lasheras, 2007), leurs rôles sont donc complémentaires. Lorsque la pression subie devient trop importante, le collagène de l'adventice prend le relai sur la média élastique pour la décharger et éviter une trop grande sollicitation qui risquerait de mener à la rupture de la paroi vasculaire (Humphrey et al., 2015; Wagenseil & Mecham, 2009).

La proportion de collagène par rapport à celle de l'élastine est un paramètre important puisqu'il impacte grandement les propriétés mécaniques du tissu. Ce paramètre évolue tout au long de l'arbre vasculaire pour correspondre aux besoins spécifiques du vaisseau localement (Sokolis et al., 2012; Wittig & Szulcek, 2021) (cf. [Tableau 1](#)). Le ratio élastine/collagène de la paroi vasculaire est d'ailleurs souvent modifié en faveur du collagène dans les pathologies vasculaires comme c'est le cas

par exemple pour l'hypertension (Arribas et al., 2006), ou pour les anévrismes aortiques abdominaux (Carmo et al., 2002) et thoraciques (Iliopoulos et al., 2009; Sokolis et al., 2012).

Au niveau des artères, le collagène est très présent dans l'adventice, sous forme de larges faisceaux principalement constitués de collagène de type I. Il est également présent en grande quantité dans la média, où l'on trouve environ 30% de collagène de type I pour 70% de collagène de type III (M.-J. Chow et al., 2014; Eble & Niland, 2009). Il est principalement sécrété par les fibroblastes et les CML.

D'autres types de collagènes interviennent dans la composition de la MEC de la paroi vasculaire. Le collagène de type IV est très présent dans la lame basale de l'intima et joue également un rôle dans la morphogenèse des vaisseaux. Le collagène de type XVIII, qui peut interagir avec le collagène de type IV et avec les fibrillines, a été décrit comme un bon candidat qui pourrait se charger de relier la lame basale sous-endothéliale aux fibres élastiques de la média (Eble & Niland, 2009). D'autres collagènes non-fibrillaires, les collagènes de type VI et VIII, sont aussi présents entre la lame basale et la limitante élastique interne. Le collagène de type VIII pourrait également être impliqué dans l'athérogenèse en s'accumulant dès les stades précoces au niveau sous-endothélial, et pourrait ainsi participer à la stabilisation des plaques d'athérome (Plenz et al., 2003).

Le collagène a un faible taux de synthèse qui décroît avec l'âge, mais il reste renouvelé tout au long de la vie, contrairement à l'élastine (Horn, 2016). Sa demi-vie dans les vaisseaux est estimée à 60 – 70 jours (Martufi & Gasser, 2012; Varani et al., 2006).

La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine de 230 à 270 kDa. En effet, bien qu'il n'y ait qu'un seul gène codant pour la fibronectine chez l'homme, au moins 20 variants ont été décrits. La fibronectine s'organise souvent sous la forme d'un dimère. Elle est ubiquitaire et régit de nombreuses interactions entre MEC et cellules. Elle joue un rôle très important dans la mise en place globale de la MEC, puisqu'elle participe à l'assemblage de plusieurs de ses éléments, dont les fibrilles de collagène (Dalton & Lemmon, 2021). Elle pourrait également intervenir dans la formation des microfibrilles riches en fibrilline (MFF), qui font partie intégrante des fibres élastiques, puisqu'elle semble guider leur dépôt. Cependant, la fibronectine ne semble pas essentielle puisqu'elle est apparue plus tard dans l'évolution, ce qui fait que de nombreux métazoaires ne possédant pas de fibronectine ont quand même des MFF fonctionnelles (Baldwin et al., 2013). Son rôle serait donc d'améliorer et de faciliter la fibrillogenèse des MFF, sans être indispensable. Elle est par contre impliquée dans l'accrochage de protéines liant le TGF- β inactif (*transforming growth factor β*) sur les microfibrilles, comme les LTBP (*latent TGF- β binding protein*) et participe donc à la régulation du TGF- β (Dallas et al., 2005).

La fibronectine a également été associée à des pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose où elle a été identifiée comme un acteur complexe. Elle permet en effet de solidifier la capsule fibreuse (*fibrous cap*) qui empêche l'athérome de se répandre dans la circulation et donc réduit le risque d'embolie ; mais sa présence promeut également la rétention de lipoprotéines dites « athérogéniques », c'est-à-dire qu'elles favorisent la formation de plaques (Moore & Fisher, 2012). Des modifications liées au vieillissement ont également été décrites au niveau de la structure de la fibronectine. Ses motifs NGR (asparagine, glycine, arginine) se transforment en isoDGR (iso acide aspartique, glycine, arginine) par déamination spontanée de l'asparagine. Les motifs isoDGR ont ensuite la capacité d'activer les monocytes et les cellules endothéliales, ce qui favorise davantage le développement et la progression de l'athérosclérose (Park et al., 2021).

Les protéoglycanes et leurs glycosaminoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont des protéines qui forment une structure de base qui est ensuite décorée par des chaînes de glucides négativement chargées : les glycosaminoglycanes (GAG). Ces chaînes glucidiques linéaires sont souvent sulfatées. On peut citer par exemple l'héparane sulfate ou le chondroïtine sulfate (Karamanos et al., 2018).

Il existe 4 types différents de PG, établis en fonction des homologies de séquence et surtout de leur localisation : les PG sécrétés, les PG péricellulaires, les PG de surface, et les PG intracellulaires (qui finissent quand même par être sécrétés) (Iozzo & Schaefer, 2015). Ils ont un rôle aussi bien structurel que biologique, puisqu'ils sont connus pour séquestrer de nombreux facteurs de croissance dans la MEC (Karamanos et al., 2021). Quelques-uns de ces PG / GAG seront détaillés par la suite.

Les PG / GAG sont également impliqués dans la formation du **glycocalyx**. Le glycocalyx correspond à une couche de matrice/glycanes qui enrobe les cellules (Van Teeffelen et al., 2007; Villalba et al., 2021). Il a un rôle particulièrement important au niveau des cellules endothéliales de l'intima, puisqu'il intervient dans la régulation de la perméabilité vasculaire et protège les cellules de l'inflammation. Il est souvent dégradé et modifié dans les maladies cardiovasculaires et dans les cancers, durant lesquels ses propriétés acquises promeuvent un changement de comportement des cellules qui participe souvent à la pathologie (Tarbell & Cancel, 2016). Le glycocalyx endothélial intervient aussi dans la mécanotransduction. La force de cisaillement subie par la paroi vasculaire du fait du flux sanguin est un paramètre important dans le maintien de l'homéostasie et sa détection repose sur le glycocalyx, qui transmet ensuite le signal correspondant aux cellules endothéliales, pour qu'elles adaptent leur réponse en conséquence (Lupu et al., 2020). Par exemple, un flux sanguin perturbé ou turbulent promeut l'athérogenèse, tandis que le flux laminaire physiologique est protecteur (Baeyens et al., 2016; Pan, 2009).

- *Le versican*

Le versican est un protéoglycane à chaînes de chondroïtine sulfate et dermatane sulfate, appartenant à la famille des agrécanes/lectinane et qui a un rôle structurel particulièrement important dans le cerveau et les vaisseaux de large calibre. Il peut être exprimé fortement dans certaines conditions pathologiques, par exemple lors d'inflammation et dans certains cancers (Islam & Watanabe, 2020). Trois variants (V0, V1 et V3) sont exprimés dans les vaisseaux sanguins, principalement dans l'adventice pour les artères musculaires, mais pas uniquement (Eble & Niland, 2009). Comme les autres protéoglycanes, il a la caractéristique de gonfler en milieu aqueux, ce qui forme un gel hydraté qui fournit à la paroi vasculaire une résistance à la compression (Varki et al., 1999). Le versican est aussi capable de lier les microfibrilles au niveau de la fibrilline, mais son rôle n'est pas encore clair (Isogai et al., 2002).

Du fait de l'affinité entre les lipoprotéines et les chaînes chondroïtine sulfate du versican, il peut avoir un effet aggravant en conditions pathologiques et exacerber la progression des lésions d'athérosclérose (Wight & Merrilees, 2004). Il est aussi surexprimé dans les lésions de resténose qui surviennent parfois après une angioplastie avec pose d'endoprothèse (stent), ce qui pourrait contribuer à l'épaississement local du vaisseau (I.-M. Chung et al., 2002; Wight et al., 1997).

- *Les syndecans*

Les syndecans sont des protéoglycanes transmembranaires impliqués dans l'adhésion cellulaire, qui ont aussi le rôle de corécepteurs dans les voies de signalisation de plusieurs facteurs de croissance, cytokines ou autres protéines de la matrice (Alexopoulou et al., 2007). Les syndecans-1, 2 et 4 ont également un rôle dans l'angiogenèse (Eble & Niland, 2009).

- *L'hyaluronane*

L'hyaluronane, ou acide hyaluronique, est un glycosaminoglycane non sulfaté qui peut être sécrété sans chaîne protéique (Karamanos et al., 2021). Il a été décrit dans la média des veines, entre les CML chez le rat, mais semble très peu présent dans la média des artères, sauf pendant la période post-natale. Il est par contre présent dans l'adventice des vaisseaux, que ce soit des artères ou des veines (Hellström et al., 2003).

- *Les héparanes sulfates*

Les héparanes sulfates sont des glycosaminoglycanes ubiquitaires exprimés sur la membrane plasmique des cellules et dans l'espace extracellulaire. Ils peuvent interagir avec un grand nombre de protéines, ce qui leur confère de nombreux rôles biologiques. Parmi ces protéines se trouvent les fibrillines et la tropoélastine (TE), supposant une implication dans la formation des MFF, bien que leur action précise ne soit pas encore comprise. Ils pourraient également réguler le dépôt d'élastine sur les microfibrilles, sa polymérisation, ainsi que son interaction avec les CML, ce qui peut faire basculer la cellule d'un phénotype à un autre (Baldwin et al., 2013; Meneghetti et al., 2015; Tiedemann et al., 2001).

L'élastine et les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont le principal fournisseur d'élasticité des tissus biologiques. Elles sont présentes dans de nombreux organes tels que la peau, les vaisseaux, les cartilages élastiques, les tendons et ligaments et les poumons (voir le [Tableau 2](#) pour plus de détails). Les fibres élastiques sont principalement composées de deux protéines : la fibrilline et l'élastine. La fibrilline forme des microfibrilles qui s'organisent de sorte à créer une charpente dans laquelle vient s'insérer le cœur d'élastine, qui représente environ 90% de la fibre finale. L'organisation des fibres les unes par rapport aux autres influence les propriétés mécaniques effectives de celles-ci et dépend donc grandement du tissu. On trouve par exemple des structures en nid d'abeille dans le cartilage (auriculaire), des fibres très peu épaisses et ramifiées dans les poumons, et des lames concentriques fenestrées dans les artères (Mithieux & Weiss, 2005; Schmelzer & Duca, 2022) ([Tableau 2](#)). Le contenu en élastine de ces différents tissus est également très variable, allant de 2% pour les disques intervertébraux à 75% dans les ligaments élastiques (Schmelzer & Duca, 2022). Aussi, il existe des MFF qui ne sont pas associées à de l'élastine, comme c'est le cas dans la zonule ciliaire de l'œil, qui relie le corps ciliaire au cristallin (Thomson et al., 2019), et dans le stroma de la cornée (Bruns et al., 1987).

Tableau 2 - Les tissus élastiques.

Tissu	Contenu en élastine (% poids sec)	Organisation
Artères	~57% (aorte)	Lamelles concentriques fenestrées
Cartilage élastique	19% (test sur bovin)	Structures en nid d'abeilles
Ligaments élastiques	< 75%	Fibres en corde
Disque intervertébral	2%	Dense, orientation aléatoire (Anneau fibreux)
		Réseau de fibres radiales (Nucleus pulposus)
Poumons	< 30% (parenchyme)	Feuillets lamellaires
	< 5% (muqueuse)	Lamelles ondulées
Peau	< 5%	Fibres en corde
Tendons	4%	Faisceaux de longues fibres

Vessie	Faible	Fibres en cordes entremêlées
Paroi vaginale	?	Fibrilles clairsemées
Paroi utérine et cervix	1,4% (augmente de 4 à 5x lors de grossesse)	Fibrilles et fins feuillets fenestrés en structure spongieuse (" <i>sponge-like</i> ")

Complété à partir de Schmelzer & Duca, 2022. (Vessie : Murakumo et al., 1995; Paroi vaginale : Karam et al., 2007 ; Paroi utérine et cervix : Leppert & Yu, 1991; Metaxa-Mariatou et al., 2002).

Les fibres élastiques confèrent un comportement élastique aux tissus en leur procurant des propriétés mécaniques uniques. Elles ont un module d'élasticité (ou module de Young, reflétant la rigidité d'un matériau) situé entre 300 et 600 kPa. Pour comparaison, celui des fibrilles de collagène est plus proche de 10^6 kPa (Mithieux & Weiss, 2005). De plus, les fibres élastiques peuvent être étirées jusqu'à 140-150% sans subir de déformation permanente (Kielty et al., 2002; Schmelzer & Duca, 2022). L'élastine doit sûrement ses propriétés élastiques à la force entropique, puisqu'une diminution de l'entropie du système accompagne l'étirement du polymère, ce qui promeut donc un retour spontané à l'état initial (Mithieux & Weiss, 2005).

Au niveau des vaisseaux, la déformation subie par la paroi est associée à une faible perte d'énergie (15-20%), qui est due aux autres composants présents, dont les CML et les protéoglycanes (Cocciolone et al., 2018).

De nombreuses protéines prennent part à la formation et à la maturation des fibres élastiques, avec plus d'une trentaine d'acteurs recensés (Kielty et al., 2002), dont les principaux seront présentés.

Les composants des fibres élastiques

Élastine et tropoélastine

La TE est apparue relativement tard dans l'évolution, n'étant pas présente chez les premiers chordés (Sage & Gray, 1977), contrairement aux fibrillines. Elle est retrouvée chez tous les Vertébrés à mâchoires (les Gnathostomes), ce qui placerait son apparition il y a environ 400 millions d'années (Brazeau & Friedman, 2015; Schmelzer & Duca, 2022). Son origine n'est pas encore connue mais une théorie récente stipule qu'elle pourrait avoir dérivé à partir de l'ancêtre de la fibrilline (Rodriguez-Pascual, 2021).

La TE est le monomère qui permet de former l'élastine lors de la maturation de la fibre élastique. Chez l'humain, le gène codant pour la TE (*ELN*) se trouve sur le chromosome 7 et comprend 34 exons, tous sur le même cadre de lecture (*in frame exons*). Au moins 30 isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit ont été identifiées à l'heure actuelle, 5 d'entre elles représentent les variants majoritaires retrouvés dans l'aorte (Procknow & Kozel, 2022). Les caractéristiques ou rôles distincts que pourraient avoir ces variants ne sont pas encore vraiment décrits. Il semble cependant que leur expression change au cours du développement, et qu'elle soit également tissu-dépendante. Les propriétés biomécaniques des différentes isoformes de la TE, ainsi que leur dynamique d'assemblage, pourraient être légèrement modifiées et permettre de ce fait d'adapter le comportement des fibres élastiques aux besoins spécifiques de certains tissus (Miao et al., 2017; Reichheld et al., 2019).

La TE est très conservée dans l'évolution et les différents orthologues trouvés dans le règne animal sont relativement similaires, surtout au niveau du domaine C-terminal (Chung et al., 2006). Le domaine C-terminal de la TE, ou domaine 36 (Figure 10) intervient dans des processus biologiques tels

que l'adhésion cellulaire, médiée par sa liaison aux intégrines avec le motif GRKRR, ou la formation facilitée de fibres élastiques qui repose sur le pont disulfure formé par deux cystéines du domaine (Bax et al., 2009; Kozel et al., 2003). La TE fait approximativement 60 kDa après le clivage de son peptide signal dans le réticulum endoplasmique granuleux (Wise & Weiss, 2009).

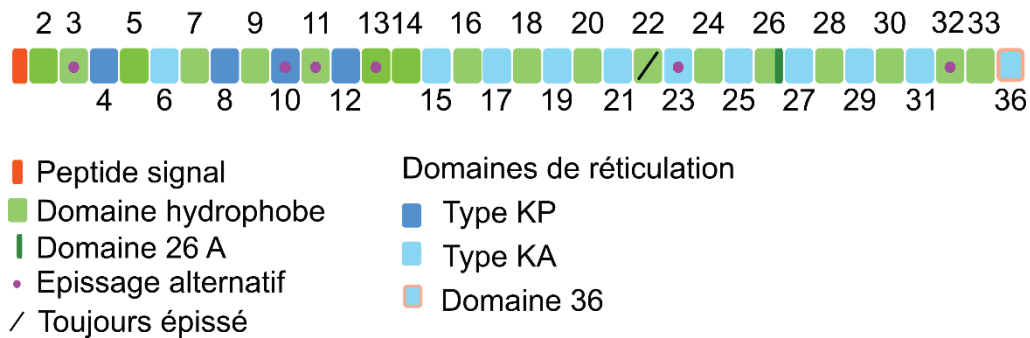


Figure 10. Organisation des domaines de la tropoélastine humaine.

La séquence protéique primaire de la TE est très répétitive et 78% consiste en 4 acides aminés : la glycine, l'alanine, la valine et la proline (Schmelzer & Duca, 2022). Elle est constituée d'une alternance de domaines hydrophobes et de domaines de réticulation, qui ont la particularité de correspondre aux différents exons (Figure 10). La TE humaine ne contient pas les exons 34 et 35 qui ont été perdus au cours de l'évolution, pendant la spéciation des primates qui eux les possèdent encore (Szabó et al., 1999). L'exon 22 est quant à lui toujours épissé, ou du moins il n'est présent sur aucune isoforme exprimée connue de la protéine. Le domaine 26A est spécifique de la TE humaine. Il s'agit d'un domaine un peu particulier, car il contient de nombreux résidus chargés et polaires (S. A. Jensen et al., 2000). De plus, il est quasiment systématiquement épissé, sauf dans le cas d'expositions importantes aux UV, à la suite desquelles des isoformes contenant le domaine 26A sont retrouvées dans la peau. Contrairement au domaine 26, il ne semble pas impliqué dans la coacervation de la TE (S. A. Jensen et al., 2000), mais pourrait donc avoir des effets pathologiques dans les tissus où il est exprimé (Chen et al., 2009). Les domaines hydrophobes sont caractérisés par de nombreuses répétitions de motifs contenant des glycines, prolines et valines, dont le motif consensus VPGXG sert de séquence polypeptidique basique pour la production d'*elastin-like polypeptides* (ELP), que nous verrons ultérieurement. Ils correspondent à environ 82% de la séquence protéique primaire (Wise, 2014), et sont impliqués dans la capacité de coacervation (agrégation réversible) de la protéine (Miao et al., 2003). Les domaines de réticulation sont quant à eux riches en alanines ou prolines et en lysines. Ils sont impliqués, comme leur nom l'indique, dans l'assemblage des monomères de TE entre eux ou avec le réseau microfibrillaire, qui se produit par la réticulation de quatre lysines pour former une desmosine ou isodesmosine suite à l'action des lysyl oxydases.

Les cellules capables de sécréter la TE sont dites élastogéniques. Elles comprennent entre autres les CML, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les chondrocytes, les cellules mésothéliales et les kératinocytes (Mithieux & Weiss, 2005; Schmelzer & Duca, 2022).

Les microfibrilles

Évolutivement, les MFF sont apparues avant la TE et sont déjà présentes chez les Invertébrés, dont la circulation dépend essentiellement (Faury, 2001). C'est d'ailleurs une des plus anciennes structures de macromolécules appartenant à la MEC, puisqu'elle aurait émergé il y a plus de 600 millions d'années (Schmelzer & Duca, 2022).

Les microfibrilles jouent un rôle important dans la séquestration du TGF- β . En effet, elles recrutent de nombreuses protéines qui en sont des régulateurs. Les MFF sont d'ailleurs considérées

comme une niche renfermant de nombreux facteurs de croissance, en plus du TGF- β , comme les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) (Sengle & Sakai, 2015; Thomson et al., 2019). Leur dégradation entraîne la libération de ces facteurs de manière incontrôlée et peut déclencher un changement de comportement cellulaire, qui est souvent pathologique (Kaartinen & Warburton, 2003).

Les fibrillines sont les protéines majoritaires qui forment les microfibrilles. Cependant, de nombreuses autres protéines interagissent avec les MFF et participent à leur assemblage et leur bon fonctionnement. Les protéines les plus importantes seront décrites dans les prochains paragraphes, ainsi que leurs rôles connus dans le système cardiovasculaire. Leur implication précise dans l'élastogénèse sera plus amplement détaillée dans la section [Synthèse des fibres élastiques](#).

Les fibrillines

Les fibrillines sont des glycoprotéines, dont il existe trois gènes chez l'homme, codant pour les fibrillines-1, 2 et 3. Les fibrillines-2 et 3 sont majoritairement exprimées pendant le développement embryonnaire et fœtal, tandis que la fibrilline-1 continue à être exprimée chez l'adulte sain (Baldwin et al., 2013; Kiely et al., 2005). Les fibrillines font environ 350 kDa et sont composées de répétitions de domaines tels que les domaines EGF-like (*epidermal growth factor*), ainsi que des domaines de liaison au TGF- β (domaines TB). Elles contiennent une grande quantité de cystéines (Schmelzer & Duca, 2022).

Les fibrillines ont un réseau d'interactions très vaste, regroupant majoritairement des acteurs impliqués dans l'assemblage ou la régulation des fibres élastiques, mais également des facteurs de croissance comme les BMP ou le TGF- β et des récepteurs transmembranaires comme les syndecans ou les intégrines ($\alpha V\beta 6$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$) (Baldwin et al., 2013; Thomson et al., 2019). Les déficiences en fibrilline impactent grandement le système cardiovasculaire, comme c'est le cas dans le syndrome de Marfan, ce qui illustre son importance. Cependant, les liens directs entre mutations et effets phénotypiques ne sont pas encore très bien élucidés (Kiely et al., 2005).

Les fibulines

Les fibulines sont un groupe de glycoprotéines de l'ordre de 50 à 200 kDa. Il en existe 8 chez l'humain (Tsuda, 2018). Elles sont impliquées dans l'assemblage, le maintien et le remodelage des tissus élastiques (fibuline-2, mais surtout fibulines-4 et 5), de la matrice en général (fibulines-1 et 2), ainsi que dans l'adhésion cellulaire et la motilité (fibulines-1 et 5) (Cangemi et al., 2014). La fibuline-4 est impliquée dans la réticulation des fibres élastiques par la lysyl oxydase et les fibulines-4 et 5 aident le dépôt de la TE sur les MFF. Les fibulines participent également à la régulation de la biodisponibilité du TGF- β (Tsuda, 2018).

Au niveau cardiovasculaire, des rôles importants ont été mis en évidence pour les fibulines-1, 2, 4 et 5. L'expression de la fibuline-1 se trouve par exemple augmentée dans les CML de tissu artériel minéralisé (Mikhaylova et al., 2007), ainsi que dans les lésions précoces d'athérosclérose où elle colocalise avec le fibrinogène (Argraves et al., 2009). Il a également été montré chez l'homme que le taux d'expression de la fibuline-1 était augmenté dans les aortes de patients dont la rigidité artérielle est plus élevée (Durier et al., 2003). Cependant, l'absence ou le manque de fibuline-1 a également des conséquences négatives puisqu'ils sont associés à des dissections aortiques plus fréquentes, ce qui est également le cas pour toutes les fibulines vasculaires (Cangemi et al., 2014). La fibuline-2 est impliquée dans la réparation tissulaire lors de lésions vasculaires en promouvant la migration des CML, en tout cas chez la souris (Ström et al., 2006). Concernant la fibuline-4, son absence est associée à de graves complications vasculaires, telles que des anévrismes, dissections, tortuosités artérielles, sténoses, et dérégulations de la voie TGF- β dont le signal se retrouve augmenté (Cangemi et al., 2014). Quant à la

fibuline-5, elle est également impliquée dans la migration et la prolifération des CML, mais contrairement à la fibuline-2, son action est inhibitrice (Spencer et al., 2005).

Les MAGP

Les MAGP (*Microfibrils Associated Glycoproteins*) sont une famille de protéines non-structurelles regroupant 2 membres : MAGP-1 et 2. Les deux protéines sont capables de lier des facteurs de signalisation importants tels que les facteurs de croissance de la famille TGF- β , Notch et les ligands de Notch : Jagged et Delta. Cependant, MAGP-2 n'est pas exprimée dans la média de l'aorte, mais plutôt dans la peau et dans les reins. MAGP-1 interagit également avec d'autres protéines des fibres élastiques, notamment avec la TE. Pour autant, elle n'est pas nécessaire à l'assemblage des fibres élastiques (Mecham & Gibson, 2015).

Les EMILIN

Les EMILIN (*Elastin Microfibril interface located proteins*) sont une famille de 4 glycoprotéines. L'EMILIN-1 est la mieux décrite. Elle intervient dans l'assemblage des fibres élastiques en organisant les agrégats d'élastine avant leur fusion. Elle est aussi importante à la fonction vasculaire puisqu'elle participe à la cohésion entre CML et fibres élastiques. L'EMILIN-1 est aussi impliquée dans la régulation du TGF- β , puisqu'elle a la capacité de bloquer le clivage du complexe inactif TGF- β – LAP (*latency-associated peptide*) et empêche ainsi la libération de la forme active du facteur de croissance (Randell & Daneshtalab, 2017).

Les LTBP

Les LTBP (*Latent TGF- β binding proteins*) font partie de la superfamille des fibrilline-LTBP (Unsöld et al., 2001). Il existe 4 LTBP, toutes capables de se lier à la fibrilline. Elles font partie du complexe LLC (*large latent complex*) du TGF- β , qui empêche ce dernier de s'activer, le LLC étant constitué du TGF- β lié à son LAP (*latency associated peptide*) dans sa forme inactive (ce qui forme le *small latent complex* ou SLC), le tout accroché à une LTBP. En plus de leur rôle dans la régulation du TGF- β , les LTBP sont aussi impliquées dans la régulation de l'assemblage des fibres élastiques et dans leur stabilisation (Rifkin et al., 2018; Robertson et al., 2015).

Les ADAMTS

Les ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*) sont une famille de 19 protéases impliquées dans la régulation de la composition de la MEC, agissant sur sa structure et sur sa fonction. Il existe également 7 protéines ADAMTS-like qui n'ont pas d'activité protéolytique mais plutôt un rôle de régulateur sur les ADAMTS et sur l'assemblage de certaines molécules de la MEC (Mead & Apte, 2018).

Les ADAMTS sont nombreuses à être plus ou moins impliquées dans la physiologie cardiovasculaire (Santamaria & de Groot, 2020). Un grand nombre d'ADAMTS sont capables de cliver les protéoglycanes et peuvent donc influencer la MEC vasculaire en régulant leur présence (Karoulias et al., 2020). Par exemple, au niveau des valves cardiaques, leur absence entraîne une désorganisation de la matrice avec une accumulation de PG et une augmentation de l'épaisseur des valves (Wünnemann et al., 2020). Les ADAMTS-6, 7, 10 et 17 aident de plus à l'assemblage de la fibrilline sur les microfibrilles, et interviennent dans la régulation de leurs protéines associées, par exemple les LTBP (Karoulias et al., 2020). Certaines ADAMTS comme les ADAMTS-13 et 16 sont circulantes. ADAMTS-13 est un régulateur de l'hémostase, par son action sur le facteur von Willebrand (vWF) (Plaimauer et al., 2002), et ADAMTS-16 est impliquée dans la régulation de la pression artérielle, sûrement par son action sur la structure de la paroi vasculaire (Gopalakrishnan et al., 2012).

Enzymes importantes pour la formation des fibres élastiques

La transglutaminase et les lysyl oxydases ne font pas à proprement parler partie des fibres élastiques, mais elles sont essentielles à leur formation.

La transglutaminase tissulaire

La transglutaminase tissulaire (TG2) est une enzyme dépendante du calcium qui forme des ponts entre les résidus Lysine et Glutamine. Elle régule le remodelage de la MEC et a été associée à de nombreuses pathologies pour lesquelles elle pourrait servir de cible thérapeutique, notamment des cancers et des fibroses (Collighan & Griffin, 2009). Concernant les fibres élastiques, le TG2 est impliquée dans l'assemblage des MFF au niveau de la réticulation des fibrillines entre elles, mais aussi entre la fibrilline et la TE (Lockhart-Cairns et al., 2020; Thomson et al., 2019). Elle permet également d'augmenter l'incorporation des LTBP-1 sur les microfibrilles, participant ainsi à la régulation de la voie TGF- β (Lockhart-Cairns et al., 2022; Verderio et al., 1999).

Les lysyl oxydases

La famille des lysyl oxydases (LOX) compte 5 membres, une LOX et 4 protéines LOX-like (LOXL1-4). Ce sont des enzymes dont l'activité est dépendante du cuivre. Elles sont sécrétées sous forme de proenzymes inactives puis subissent un clivage protéolytique qui permet leur activation, et plus particulièrement par la protéase BMP-1 (*bone morphogenetic protein-1*; également nommée procollagène-C protéinase) (Szauter et al., 2005). Les LOX catalysent la formation d'aldéhydes réactifs à partir des chaînes latérales de lysines. Cette étape permet ensuite la liaison de plusieurs de ces aldéhydes pour former des réticulations entre plusieurs molécules de la MEC. Ce processus est notamment nécessaire pour la stabilisation des fibres de collagène et pour la maturation des fibres élastiques (Vallet & Ricard-Blum, 2019). Des dérégulations de son expression ont été rapportées dans plusieurs pathologies cardiaques, surtout concernant des fibroses (Al-U'datt et al., 2019).

Synthèse des fibres élastiques

La synthèse des fibres élastiques commence par l'assemblage des microfibrilles de fibrilline, qui serviront ensuite de structure d'ancrage sur laquelle se déposeront les molécules de TE. Celles-ci coalescent pour finalement former le cœur insoluble et amorphe d'élastine. La maturation de ces nouvelles fibres donnera ensuite des fibres élastiques fonctionnelles et résistantes (Jacob, 2003). Le processus d'assemblage et de maturation des fibres élastiques est appelé **élastogénèse** (Kozel & Mecham, 2019).

Formation des microfibrilles

Les microfibrilles sont organisées en tube et ont un diamètre situé entre 10 et 12 nm (Kielty et al., 2005). Des structures en « perles » reviennent tous les 56 nm environ, reliées par des « fils » (« *beads on a string* ») (Sherratt et al., 2001). La formation de ces perles résulte d'un repliement des monomères de fibrilline, et de la superposition de domaines N et C-terminaux (Baldock et al., 2006). Cette organisation est caractéristique des MFF, mais la morphologie précise des « perles » varie d'un tissu à l'autre (Eckersley et al., 2018).

La formation des microfibrilles a lieu au niveau de la surface cellulaire externe et est indépendante de la TE. Les pro-fibrillines sont protégées par des chaperonnes jusqu'à leur sécrétion pour éviter qu'elles s'assemblent dans la cellule. Une fois à l'extérieur, les pro-fibrillines sont clivées par des convertases telles que la furine (parfois nommée PACE pour *Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme*), ce qui libère leurs extrémités N et C-terminales. Cette étape permet la formation de multimères de fibrillines, toujours au niveau péricellulaire.

Des protéoglycane à héparane sulfate interviennent à ce moment pour favoriser les interactions entre les extrémités N-terminales et former des liaisons homotypiques entre monomères de fibrilline (Tiedemann et al., 2001). Les interactions C-terminales pourraient être à l'origine de la formation des « perles ». Les monomères de fibrilline sont ainsi alignés et assemblés les uns aux autres et sont réticulés par l'action de la transglutaminase.

Les microfibrilles naissantes sont maintenues dans un réseau de fibronectine qui semble faciliter leur formation. La fibronectine permet également la liaison des LTBP sur les MFF, comme mentionné précédemment (Dallas et al., 2005). D'autres protéines s'associent aux MFF, telles que les MAGP. Les étapes importantes de la formation des MFF sont illustrées Figure 11.

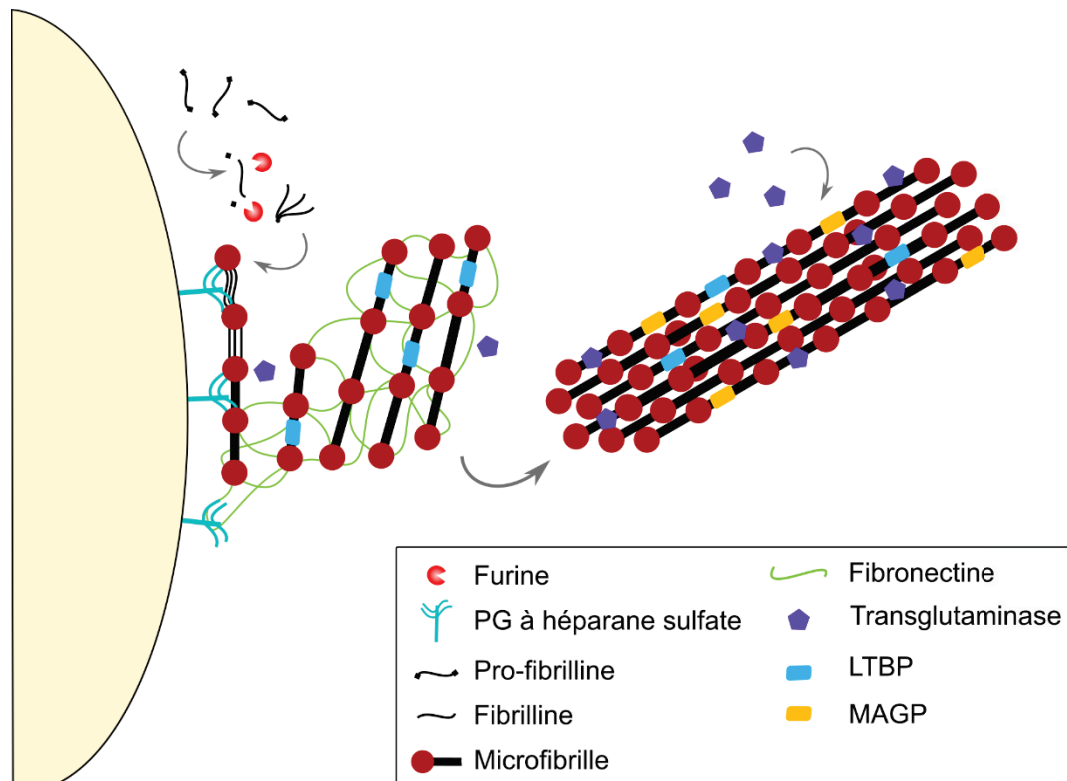


Figure 11. Formation des microfibrilles riches en fibrilline. PG = protéoglycane ; LTBP = Protéine liant le TGF- β latent ; MAGP = Glycoprotéine associée aux microfibrilles. D'après Heinz et al. 2021.

Les propriétés élastiques des MFF sont bien moins remarquables que celles des fibres élastiques matures, puisque les microfibrilles seules sont quasiment 100 fois plus rigides (Kielty et al., 2005). Le cœur d'élastine est donc ajouté par la suite, pour permettre à la fibre élastique d'atteindre ses paramètres mécaniques optimaux.

Assemblage de l'élastine

L'assemblage de l'élastine est un processus séquentiel et comprend différentes phases que sont : 1) la synthèse de la TE ; 2) sa coacervation ; 3) sa réticulation et 4) son dépôt sur les microfibrilles (voir Figure 12).

La traduction de l'ARNm de la TE a lieu dans le réticulum endoplasmique rugueux. La protéine résultante est ensuite envoyée sur la voie de sécrétion par le Golgi, puis jusqu'à la membrane plasmique. Pendant ce trajet, une petite proportion de ses résidus prolines est hydroxylée, pour une raison qui n'est pas encore bien comprise (Schmelzer & Duca, 2022). Cela pourrait avoir un impact sur la résistance de la TE aux attaques enzymatiques et/ou permettre une modulation plus fine de ses propriétés mécaniques suivant le tissu où elle est exprimée (Bochicchio et al., 2013). Cependant, une hydroxylation trop importante peut avoir des effets négatifs sur la synthèse d'élastine (Vrhovski & Weiss, 1998).

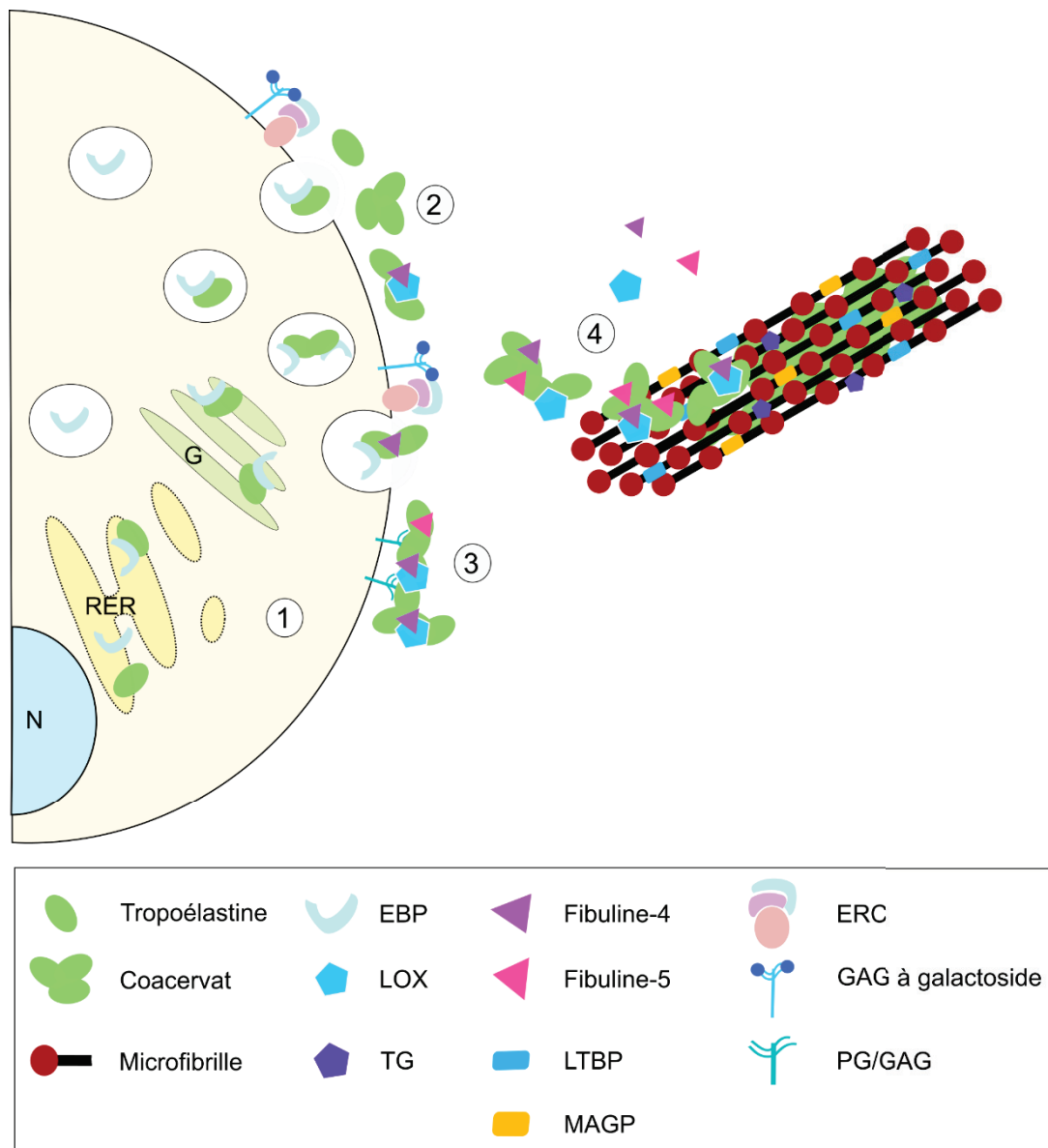


Figure 12. Assemblage du cœur d'élastine dans les fibres élastiques. N = Noyau ; RER = Réticulum endoplasmique rugueux ; G = Golgi ; EBP = Protéine liant l'élastine ; LOX = Lysyl oxydase ; TG = Transglutaminase ; PG = Protéoglycanes ; GAG = Glycosaminoglycanes ; LTBP = Protéine liant le TGF- β latent ; MAGP = Glycoprotéine associée aux microfibrilles ; ERC = Complexe récepteur de l'élastine. Inspiré de Heinz et al. 2021.

Contrairement à de nombreuses autres protéines, comme par exemple le collagène ou la fibrilline, la TE n'a pas de propeptide pour empêcher son autoassemblage intracellulaire. C'est l'EBP (*Elastin Binding Protein*) qui joue le rôle de chaperonne lors de ce trajet, la protégeant de la

dégradation et l'empêchant de coacerver de manière trop importante (Kozel & Mecham, 2019). L'EBP est un variant de la β -galactosidase d'environ 67 kDa (Schmelzer & Duca, 2022). Elle est très importante pour le transport de la TE à la surface de la cellule. La voie de sécrétion qu'emprunte la TE n'est pas la voie conventionnelle, puisqu'elle fait appel à des compartiments acides, qui ressemblent à des endosomes/lysosomes sans toutefois en être (Davis & Mecham, 1998; Kozel & Mecham, 2019). Une fois dans l'espace extracellulaire, l'EBP peut se lier à deux protéines : la neuraminidase-1 (Neu-1) et la PPCA (*protective protein/cathepsin A*). Les 3 protéines forment le complexe récepteur à l'élastine (ERC ; *Elastin Receptor Complex*), dont le rôle sera détaillé par la suite (Tembely et al., 2022). La TE est ensuite libérée de l'EBP, sûrement du fait de la liaison d'un GAG sur le site galactosidase de l'EBP, qui agirait donc comme un antagoniste. La présence de GAG à galactoside pourrait être due à la désialylation de molécules de la MEC par la neuraminidase-1 du complexe ERC, activé par la liaison de l'EBP. Il a aussi été proposé que ces galactosides puissent être présentés directement depuis les microfibrilles de fibrilline (Hinek et al., 2006). L'EBP, libérée de la TE, est ensuite recyclée par des endosomes, qui lui permettent de se lier à nouveau avec un monomère de TE et de recommencer le cycle (Schmelzer & Duca, 2022).

Les monomères de TE ainsi libérés coacervent pour former de petits agrégats sphériques, ou « globules », toujours en contact avec la surface cellulaire (Schmelzer & Duca, 2022). La coacervation constitue un processus d'autoassemblage puisqu'elle peut avoir lieu sans intervention externe. Cette étape est appelée « micro-assemblage » et pourrait faciliter l'action subséquente de la LOX en alignant les lysines de la TE (Kozel & Mecham, 2019). Des petits agrégats de TE pourraient déjà se former pendant le transport intracellulaire, comme cela a été suggéré par Kozel et al. (2006).

Les globules de TE ainsi formés coalescent les uns avec les autres pour en former de plus grands. Les étapes précises de la formation de l'élastine mature ne sont pas entièrement élucidées, mais les domaines 30 et 36 sont importants puisque leur absence impacte fortement l'élastogénèse (Kozel et al., 2003). Certains GAG, dont l'héparine, pourraient améliorer la transition entre petits coacervats et plus gros agrégats en accélérant le processus, jouant sur la concentration critique qui régit la vitesse de coacervation de la TE (Tu & Weiss, 2008). La fibuline-4 joue aussi un rôle important, comme mentionné précédemment, puisqu'elle assure l'alignement correct qui sera nécessaire pour l'action de la LOX. La fibuline-4 participe aussi à l'activation de l'enzyme, comme montré récemment par Noda et al. (2020) puisqu'elle est nécessaire à la formation correcte du LTQ (lysyl tyrosylquinone) permettant la fixation du cofacteur Cu^{2+} et l'activité catalytique de la LOX. Les protéines LOX, LOXL-1 et LOXL-2 participent à l'élastogénèse (surtout LOX et LOXL-1), mais les LOXL-3 et LOXL-4 n'ont pas encore été décrites dans ce contexte (Hornstra et al., 2003; X. Liu et al., 2004; Schmelzer et al., 2019; Schmelzer & Duca, 2022). La réticulation des TE se fait au niveau des motifs KA et KP des domaines de réticulation. Les LOX modifient ainsi les lysines, pour en faire des allysines, qui par association pourront ensuite créer des liens de réticulation entre molécules sous la forme de desmosines et isodesmosines, qui sont spécifiques à l'élastine (Schmelzer & Duca, 2022). L'élongation continue jusqu'à former des structures fibrillaires qui se détachent ensuite de la membrane cellulaire (Kozel & Mecham, 2019).

Le dépôt de ces agrégats réticulés sur la charpente de microfibrilles est assuré par les fibulines-4 et 5. En effet, la fibuline-5 peut se lier à la fibrilline-1, ce qui favorise par la suite la liaison des agrégats de TE sur cette même fibrilline. LTBP-4 intervient pour assurer l'orientation correcte des dépôts sur les microfibrilles. De plus en plus d'agrégats de TE s'accumulent sur la microfibrille, ce qui finit par donner un polymère amorphe et insoluble d'élastine. Le rôle précis des microfibrilles de fibrilline n'est pas encore totalement compris, mais elles semblent diriger l'assemblage de l'élastine et regrouper les agrégats au même endroit dans l'espace extracellulaire (Kozel & Mecham, 2019). La fibre doit ensuite

maturer, sous l'action des LOX qui continuent de réticuler ses composants, stabilisant ainsi la structure jusqu'à l'obtention d'une fibre mature (Schmelzer & Duca, 2022).

Les étapes importantes de l'élastogénèse sont illustrées [Figure 12](#).

La formation des fibres élastiques est un processus qui requiert la présence de nombreux acteurs pour obtenir des fibres fonctionnelles, mais il faut aussi noter que l'expression de la TE est fortement régulée, ce qui en fait un facteur limitant majeur pour l'élastogénèse.

Régulation de l'expression de la tropoélastine

Contrairement à la fibrilline-1, l'expression de la TE n'est pas maintenue tout au long de la vie. La majeure partie de l'élastine composant les fibres élastiques est synthétisée dans la période périnatale (Myers et al., 1983; Ozsvar et al., 2021). Les fibres élastiques sont synthétisées à partir du 4^e mois de gestation, et de manière plus importante lors du dernier trimestre (Wagenseil et al., 2010). Il y a ensuite une chute brutale de la production de TE, qui continue son déclin jusqu'à la fin de l'adolescence. Les cellules adultes ont une capacité fortement réduite à produire de l'élastine (Mecham, 2008; Sivaraman et al., 2012), à part peut-être certaines cellules musculaires lisses de la vessie (Wognum et al., 2009), de la paroi vaginale (Rahn et al., 2008), ainsi que de l'utérus dont le contenu en élastine augmente de 4 à 5 fois pendant la grossesse, puis revient à son état initial post-partum (Metaxa-Mariatou et al., 2002; Zong et al., 2010). Les fibres ajoutées durant cette période sont cependant moins réticulées (Metaxa-Mariatou et al., 2002).

Du fait de cette chute d'expression de la TE, et d'autres composés comme LOX et LOXL-1 (Cenizo et al., 2006; Debret et al., 2010; Moulin et al., 2017), le remplacement des fibres élastiques pendant l'âge adulte est très restreint. Cependant, la durée de vie de l'élastine est particulièrement élevée, avec une demi vie estimée à 70 ans (S. D. Shapiro et al., 1991), ce qui lui permet d'assurer ses fonctions tout au long de la vie. Il arrive parfois que la TE soit réexprimée à l'âge adulte, mais il s'agit souvent de conditions pathologiques en réponse à une lésion, comme cela a été décrit par exemple lors d'élastose solaire ou dans des cas sévères de bronchopneumopathie chronique obstructive (COPD ; *chronic obstructive pulmonary disease*), mais les fibres résultantes ne sont pas totalement fonctionnelles (Schmelzer, 2021). L'expression de la TE peut également être réactivée dans les athéromes, mais elle ne parvient cependant pas à former de fibres, et s'accumule dans le tissu (Phinikaridou et al., 2018).

La régulation de l'expression de l'élastine est contrôlée de manière spatio-temporelle et se fait sur plusieurs niveaux (Procknow & Kozel, 2022) (voir [Figure 13](#)). De nombreuses molécules ont été identifiées comme stimulant ou inhibant son expression (Sproul & Argraves, 2013), attestant d'un contrôle complexe. On peut noter des mécanismes de régulation **transcriptionnels** et **post transcriptionnels**. De nombreuses protéases sont également actives dans la régulation au niveau protéique et impacte de ce fait la formation et la stabilité des fibres. Aucun mécanisme de régulation intervenant dans la voie de sécrétion n'a été décrit. Cependant, des études sur le syndrome de Costello ont montré qu'une déficience secondaire en EBP pouvait avoir un impact sur le dépôt d'élastine sur les microfibrilles et donc engendrer des fibres élastiques anormales (Hinek et al., 2000). Les cellules issues de « patients Costello » n'ont en effet pas de problème pour exprimer la TE, mais la présence diminuée d'EBP entraîne une prise en charge incorrecte de la TE qui n'arrive pas jusqu'aux fibres. Il est postulé par les auteurs que la perte d'EBP dans ce syndrome est due à une présence trop importante de GAG contenant des chaînes galactosidase, qui peuvent donc lier l'EBP sur son site galactolectine (Hinek et al., 2000). La présence plus ou moins forte de certains couples PG/GAG pourrait donc également entrer en jeu dans la régulation de la disponibilité de la TE. La MEC est en effet un réseau complexe et la moindre dérégulation dans sa composition peut avoir de nombreuses conséquences.

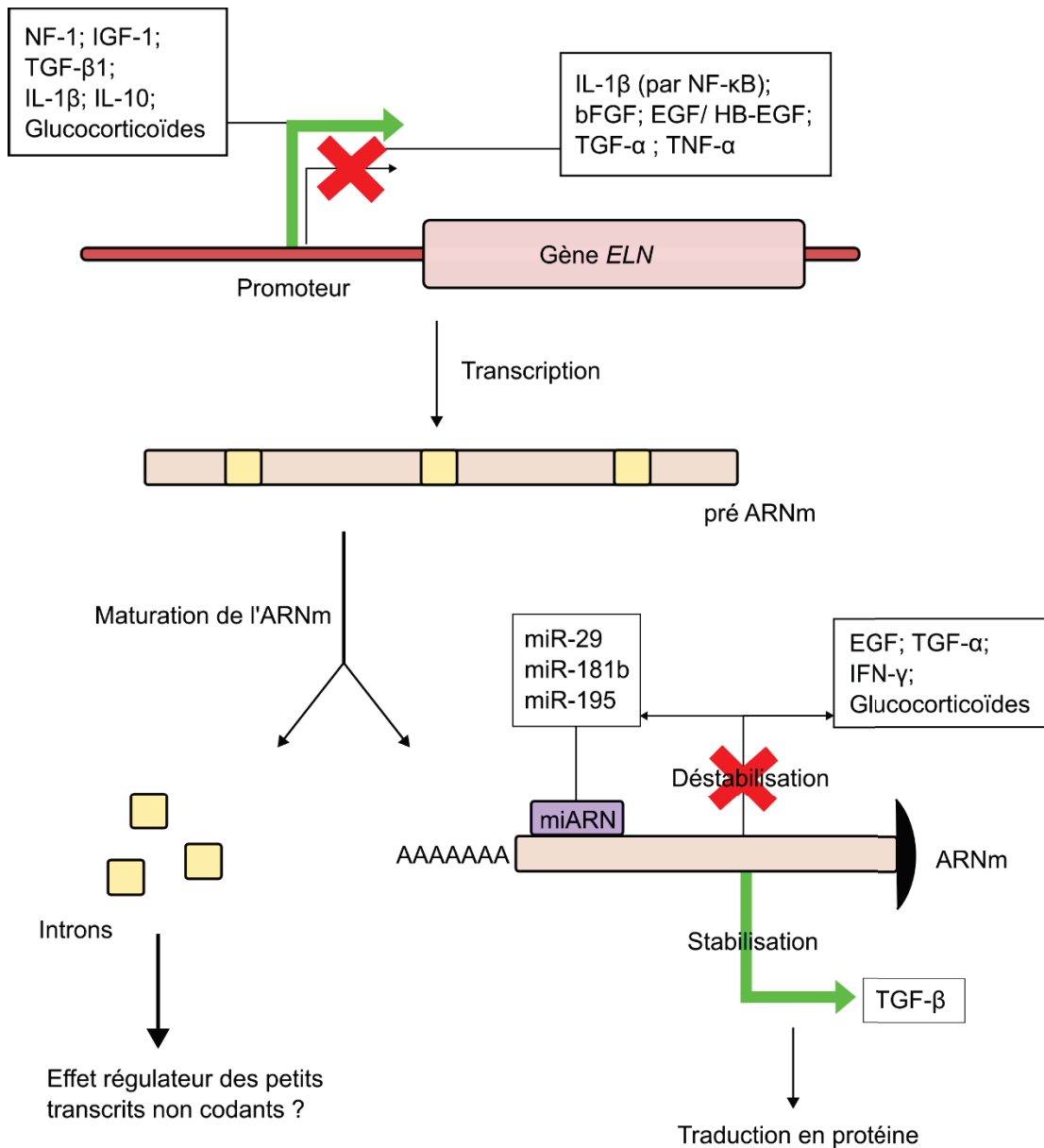


Figure 13. Régulation de l'expression de la tropoélastine.

NF-1 = nuclear factor-1 ; IGF-1 = insulin-like growth factor-1 ; TGF = transforming growth factor ; IL = interleukine ; NF- κ B = nuclear factor kappa B ; bFGF = basic fibroblast growth factor ; EGF/HB-EGF = HB : Heparin-binding ; EGF : epidermal growth factor-like growth factor ; TNF- α = tumor necrosis factor alpha ; ELN = gène de l'élastine ; ARNm = ARN messenger ; miR et miARN = micro ARN ; IFN- γ = interferon gamma.

Régulations transcriptionnelles de *ELN*

Les fibres élastiques sont synthétisées sur une fenêtre temporelle relativement courte qui se situe sur la période périnatale. Des régulations sont ensuite mises en place pour éteindre la production de la TE. La régulation de son expression semble se faire majoritairement post-transcription puisque le niveau de pré-ARNm (ARN avant épissage et modifications de maturation de l'ARNm) ne baisse pas drastiquement entre le stade fœtal/post natal et l'âge adulte (Cocciolone et al., 2018; Swee et al., 1995). Cependant la mise en place de l'élastogenèse fœtale est régulée par un mécanisme transcriptionnel puisque la quantité de pré-ARNm augmente fortement entre la période fœtale pré-

élastogénique et le stade néonatal, où l'élastogénèse est la plus élevée (Swee et al., 1995) (expériences faites chez le rat). Cette mise en place de l'élastogénèse dans les premiers stades de vie est également régulée par des facteurs hémodynamiques (Bendeck & Langille, 1991; Sherratt, 2009).

L'étude de la région 5' se trouvant en amont du gène de l'élastine a permis de caractériser certaines propriétés de sa région promotrice. Le promoteur de l'élastine contient des îlots riches en GC, pas de TATA box, et plusieurs éléments Cis potentiellement utilisables pour la liaison de régulateurs de facteurs de transcription (e.g. SP-1, *specific protein 1* ; AP1, *activator protein 1* ; glucocorticoïdes), ce qui est en faveur d'une initiation multisite (Kähäri et al., 1990; Rosenbloom et al., 1991). Des données plus récentes proposent également d'autres facteurs de transcription qui seraient capables de lier la région promotrice d'*ELN*, tels que WT1 (Procknow & Kozel, 2022). Les caractéristiques du promoteur de l'élastine sont souvent associées aux promoteurs de gènes constitutivement exprimés. Cependant, sa régulation par des facteurs ubiquitaires dont l'activité est propre à chaque type de cellules pourrait permettre une régulation très précise et cellule-spécifique, ce qui a également été montré pour d'autres gènes (Degterev & Foster, 1999).

Plusieurs facteurs ont été décrits comme ayant une activité régulatrice sur la transcription du gène *ELN*. Parmi les facteurs dont l'influence est positive et augmente la transcription, se trouvent : les membres de la famille NF-1 (*Nuclear Factor-1*) (Degterev & Foster, 1999), l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) ((D. E. Jensen et al., 1995; Shi et al., 2012), le TGF- β 1 (Kuang et al., 2007) et les interleukines-1 β (IL-1 β) (Mauviel et al., 1993) et 10 (IL-10) (Reitamo et al., 1994). L'IL-1 β a cependant un effet inverse dans certains modèles, où elle diminue la transcription d'*ELN* en activant la voie NF κ B (*Nuclear factor kappa B*) (Kuang et al., 2002). Les molécules dont l'action diminue la transcription du gène *ELN* regroupent quant à elles le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) (Carreras et al., 2002), le EGF/HB-EGF (HB : *Heparin-binding* ; EGF : *Epidermal growth factor-like growth factor*), le TGF- α , ainsi que le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) (Kähäri et al., 1992).

Certains glucocorticoïdes ont un effet positif sur la transcription de *ELN*, agissant sur les éléments de réponse aux glucocorticoïdes présents sur son promoteur (Del Monaco et al., 1997). Cependant, les glucocorticoïdes ont un effet inverse au niveau post-transcriptionnel, ce qui contrebalance leur effet sur la production finale d'élastine (Kähäri, 1994). Les traitements topiques par glucocorticoïdes sont d'ailleurs plutôt associés à une perte d'élasticité tissulaire (Niculet et al., 2020).

Régulations post-transcriptionnelles de *ELN*

Plusieurs facteurs ont également été décrits pour leur effet régulateur post-transcriptionnel sur la TE. Par exemple, le TGF- β a un rôle positif sur l'expression de la TE et semble stabiliser son ARNm en augmentant sa demi-vie (McGowan et al., 1997). Il est en effet capable de diminuer la liaison d'un facteur cytosolique négatif qui cible normalement une séquence sur l'exon 30 d'*ELN*, ce qui augmente donc la stabilité de l'ARNm (J. M. Liu & Davidson, 1988; M. Zhang et al., 1999). Le TGF- β aurait donc une action régulatrice au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, étant de plus impliqué dans la régulation de certaines protéases capables de dégrader l'élastine mature, ce qui en fait un acteur majeur (W. Wang et al., 2021). Les facteurs de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*) et TGF- α (*Transforming Growth Factor α*), tous deux ligands du récepteur à l'EGF (EGFR), ont aussi un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de *ELN*, diminuant son expression. Leur action passe par la voie EGFR/MEK/ERK (*epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase*), qui entrave l'action positive du TGF- β et déstabilise donc l'ARNm de l'élastine, comme démontré dans une lignée de fibroblastes pulmonaires fœtaux de rat (DiCamillo et al., 2006).

Enfin, l'interféron γ (IFN γ) a aussi un impact négatif sur l'expression de l'élastine au niveau post-transcriptionnel, mais son mode d'action n'est pas connu (Kähäri et al., 1992).

Un autre acteur important de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la TE est le système des micro ARN (miRNA, dont les membres sont nommés miR-numéro). Les micro-ARN font partie des ARN dits « non-codants », comme les siARN (*small interfering*) et les piARN (*Piwi-interacting*), qui ont longtemps été considérés comme inutiles. Ils sont de plus en plus étudiés et de nombreux rôles leur ont été découverts pendant ces dernières années. Les micro-ARN font autour de 20 nucléotides et agissent sur l'ARNm en influençant sa stabilité et donc sa propension à être traduit en protéine. Ils sont associés à l'extinction génique (*silencing*), et peuvent agir de plusieurs manières, soit en empêchant physiquement la traduction de l'ARNm par le ribosome qui ne peut pas passer sur la partie hybridée au miRNA, soit en provoquant la dégradation de l'ARNm (Budakoti et al., 2021).

Concernant l'élastine, les miR-29a, 29b, 181b et 195 ont une activité régulatrice post-transcriptionnelle négative. L'inhibition du miR-29 parvient à augmenter l'expression d'élastine dans des cellules de patients souffrant d'haploinsuffisance pour *ELN* (P. Zhang et al., 2012), ce qui ouvre potentiellement de nouveaux axes thérapeutiques. Cependant, les miARN peuvent avoir plusieurs cibles, et plusieurs des miARN impliqués dans la régulation de l'élastine agissent également sur la régulation des MMP et de leurs inhibiteurs les TIMP (*tissue inhibitors of matrix proteinases*) (W. Wang et al., 2021). Les conséquences de leur action sont donc plus complexes qu'il n'y paraît. Par exemple, l'inhibition du miR-195 n'aura pas forcément d'effet positif sur l'élastine tissulaire, car elle réactive également l'expression de la MMP-2 et de la MMP-9 (Zampetaki et al., 2014). Des études ont également mis en évidence la surexpression de miR-181b dans les athéromes symptomatiques et dans les anévrismes aortiques abdominaux. Deux de ses cibles ont été identifiées, en lien avec ces pathologies : l'élastine et le TIMP-3 (Di Gregoli et al., 2017). De nombreux autres miRNA sont impliqués dans la régulation des MMP et TIMP et agissent donc de manière indirecte sur l'élastine (Kowara et al., 2017; W. Wang et al., 2021).

Il est suggéré depuis plusieurs années que les petits ARN non-codants issus de l'épissage alternatif ont un effet sur la régulation de l'expression génique (Baralle & Giudice, 2017; Chabot & Shkreta, 2016). Ce processus pourrait également être présent pour la TE. En effet, certains de ses « petits transcrits » (*short splice isoforms*) sont retrouvés abondamment dans les cellules et pourraient y avoir une utilité régulatrice (Procknow & Kozel, 2022). Cette hypothèse reste à être vérifiée.

Altérations des fibres élastiques et de l'élastine

Du fait de son renouvellement quasi inexistant, l'élastine subit des détériorations aussi bien **physiques, chimiques qu'enzymatiques** qui s'accumulent avec le temps. Il n'est donc pas étonnant que celles-ci finissent par compromettre sa fonction et son comportement élastique au sein des fibres et donc des tissus (Figure 14). La rigidification progressive de la paroi artérielle et le remodelage globale qu'elle subit sont appelés **artériosclérose**. C'est une des conséquences principales associées au vieillissement artériel (Izzo & Shykoff, 2001).

Fatigue mécanique

Les fibres élastiques vasculaires sont sans arrêt soumises à un cycle d'étirement – relâchement, dû aux battements cardiaques, ce qui correspond à environ 30 millions de cycles par an et donc, pour la durée de vie moyenne d'un homme, à plusieurs milliards de répétitions au total (Kielty et al., 2002). Certaines « fractures mécaniques » dues à ce stress constant peuvent donc survenir au cours du temps. Il semblerait que l'interface élastine-microfibrille soit un point faible de la structure de la fibre, et que sa fragilité augmente avec l'âge, la rendant plus susceptible aux « cassures » (Lillie & Gosline, 2007;

Sherratt, 2009). De plus, l'hypertension et un rythme cardiaque élevé participent grandement à l'aggravation des effets de l'âge sur la fatigue mécanique (Ashor et al., 2014; Boutouyrie et al., 2021; Millasseau et al., 2005).

Modifications chimiques

Les modifications chimiques altèrent les caractéristiques mécaniques des fibres élastiques puisqu'elles en changent la composition. Elles sont dues à des dépôts de certaines espèces chimiques ou molécules sur les fibres élastiques auxquelles elles finissent par se lier de manière covalente, mais non-enzymatique. Les protéines ou structures protéiques telles que les fibres élastiques ou les fibrilles de collagène sont particulièrement concernées par ces modifications du fait de leur longévité, ce qui permet leur accumulation et donc des effets plus prononcés sur leurs propriétés (Duca et al., 2016; Gorisse et al., 2016).

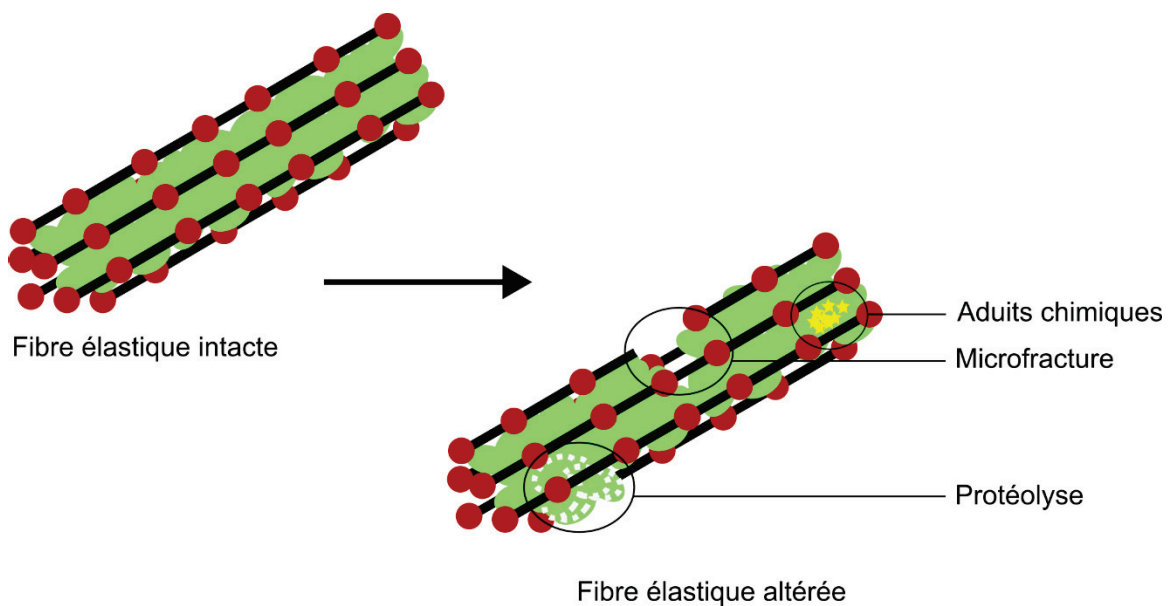


Figure 14. Accumulation de défauts physiques, chimiques et enzymatiques sur les fibres élastiques.

i) Oxydation

L'oxydation est un phénomène qui est délétère pour de nombreux tissus. Elle est causée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS ; *reactive oxygen species*) qui sont des sous-produits du métabolisme, ou qui résultent de facteurs externes, comme par exemple l'exposition aux UV (Sherratt, 2009). Parmi les ROS les plus communs se trouvent O_2^- , H_2O_2 , 1O_2 et $\cdot OH$.

Les ROS peuvent impacter les liaisons de réticulation entre les composants des fibres élastiques. En effet, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) était capable d'attaquer les liaisons desmosines et isodesmosines présentes dans l'élastine mature (Umeda et al., 2001). Cette modification rend également la fibre élastique plus facilement accessible aux enzymes protéolytiques (Sherratt, 2009).

ii) Glycation

Le glucose, le fructose et leurs dérivés métaboliques peuvent se lier sur les protéines de manière covalente. Ces ajouts sont peu à peu modifiés, menant à la formation de produits avancés de glycation ou AGE (*advanced glycation end-products*). Ils peuvent créer de nouveaux liens de réticulation entre des acides aminés qui n'étaient jusque-là pas liés, ou activer des voies de signalisation en se liant à certains récepteurs cellulaires. Ces modifications impactent les propriétés mécaniques des tissus et les rendent plus rigides (Sims et al., 1996), ce qui est également le cas pour

les artères (Soldatos & Cooper, 2006). La glycation des protéines augmente avec l'âge et est logiquement plus importante chez les personnes qui souffrent d'hyperglycémie chronique, comme c'est le cas des diabétiques par exemple (Mikulíková et al., 2008). Elle s'ajoute également aux facteurs de risques qui promeuvent le développement d'athérosclérose, du fait que les AGE ont une multitude d'impacts sur la fonction vasculaire, notamment par la modification de lipoprotéines, l'interférence avec la voie du NO qui engendre une dysfonction endothéliale, ainsi que le recrutement et l'activation des macrophages (Soldatos & Cooper, 2006).

La glycation du collagène a été beaucoup étudiée, rapportant des effets tels qu'une inhibition de son autoassemblage, une capacité réduite à se lier aux cellules, affectant leur adhérence, leur différenciation et leur prolifération, en plus de la rigidification globale du tissu (Gill et al., 2019; Haitoglou et al., 1992). Cependant, les effets des AGE sur l'élastine ou les fibres élastiques n'ont pas été amplement étudiés. Une accumulation âge-dépendante des AGE dans l'élastine aortique de patients humains « normo-glycémiques » a été décrites (Konova et al., 2004), cependant Shapiro et al., (2008) ont émis l'hypothèse que les AGE auraient finalement plus d'effet au niveau des cellules musculaires lisses de la média artérielle que sur la partie matricielle de la paroi vasculaire.

iii) *Calcification*

Le dépôt de calcium dans la paroi vasculaire et particulièrement dans la média a également été associé à la rigidification des artères (Blacher et al., 1998; Parashar et al., 2021). Ce processus est appelé élastocalcinose (Truter et al., 1996). Le calcium se lie facilement aux microfibrilles mais peut également atteindre le cœur d'élastine, surtout lorsque celui-ci a été pré-dégradé (Andrault et al., 2019). En effet, l'élastine possède de nombreux sites de nucléation qui permettent le dépôt de minéraux tels que l'apatite (Duca et al., 2016).

L'élastocalcinose artérielle est augmentée par le stress oxydant, les AGE et les épisodes inflammatoires. Elle est modulée activement par les CML qui peuvent acquérir la capacité de sécréter des régulateurs de calcification, normalement exprimés dans des processus d'ostéogenèse (Dao et al., 2005; Shanahan et al., 1999). La présence de calcium dans les fibres élastiques augmente aussi la rétention de lipides dans la paroi vasculaire (Robert et al., 2008), ce qui favorise encore une fois l'athérogenèse.

iv) *Accumulation de lipides et peroxydation*

De la même manière que les AGE, des sous-produits du métabolisme des lipides polyinsaturés (ALE ; *Advanced lipid peroxidation end products*) peuvent se lier à certaines protéines et former des ponts entre résidus, impactant leur fonctionnalité. Ces ALE sont également augmentés avec l'âge dans toutes les couches de la paroi vasculaire (Zarkovic et al., 2014), et sont une des caractéristiques principales retrouvées dans l'athérosclérose. Contrairement à ce qui a été montré pour l'élastine de la peau (Tanaka et al., 2001), l'élastine vasculaire ne semble que peu impactée par la présence d'ALE lors du vieillissement (Zarkovic et al., 2014). Les patients atteints de complications rénales importantes (*end stage renal disease*) ont par contre un fort taux de peroxydation de leurs lipides (accompagnée de glycosylation importante des protéines) au niveau de l'élastine aortique, avec une contribution probable dans le développement de complications vasculaires (Yamamoto et al., 2002).

v) *Carbamylation*

La carbamylation est une autre modification chimique qui correspond à la fixation d'acide isocyanique sur les groupements amine de certains acides aminés. Les lysines sont particulièrement ciblées et sont modifiées en homocitrulline. L'acide isocyanique est une forme réactive d'un dérivé de l'urée (le cyanate) qui se forme spontanément (Kraus & Kraus, 2001). Sa présence semble augmentée chez les fumeurs (Z. Wang et al., 2007).

La carbamylation des protéines est une modification dont l'impact sur le système cardiovasculaire est déjà décrit au niveau du développement de l'athérosclérose où elle est un facteur aggravant. En effet, la carbamylation des lipoprotéines leur donne une activité pro-athérogénique (Verbrugge et al., 2015; Z. Wang et al., 2007). Un dosage élevé de l'acide isocyanique dans le sang est également associé à des risques accrus de complications cardiovasculaires et de mortalité (Jaisson et al., 2015; Koeth et al., 2013). La carbamylation des protéines est présente dans de nombreux tissus et est un signe de vieillissement. Elle a d'abord été décrite au niveau des fibres élastiques de la peau, avec une augmentation âge-dépendante chez l'homme (Gorisse et al., 2016), puis dans les fibres élastiques vasculaires où sa présence a été associée à une rigidification des fibres (Doué et al., 2021).

vi) *Racémisation d'acides aminés*

Les acides aminés utilisés pour produire des protéines sont normalement de forme -L (énantiomère lévogyre). Dans les tissus qui connaissent peu de renouvellement, il a été observé que certains acides aminés se convertissaient dans leur forme -D (énantiomère dextrogyre), en particulier l'acide aspartique. On parle de racémisation des acides aminés. Le taux de racémisation est donc proportionnel à « l'âge » de la protéine. Elle peut entraîner, comme les autres modifications chimiques déjà mentionnées, une perte de fonction de la protéine ou augmenter son ciblage par les protéases. Bien que présente dans tous tissus âgés, la racémisation est augmentée dans certaines pathologies associées au vieillissement, comme l'athérosclérose, l'emphysème pulmonaire, la cataracte ou les maladies dégénératives du cartilage et du cerveau (Ritz-Timme & Collins, 2002). Le rôle précis de ce changement moléculaire n'est pas encore bien compris.

La racémisation de l'acide aspartique dans les fibres élastiques se produit également au fil du temps, aussi bien au niveau de la fibrilline que de l'élastine (Bailey, 2001; S. D. Shapiro et al., 1991). Cependant son impact sur les propriétés mécaniques et surtout élastiques de la fibre n'a pas été caractérisé (Duca et al., 2016).

Dégradations enzymatiques

Enfin, concernant la dégradation enzymatique des fibres élastiques et plus particulièrement de l'élastine, les principales responsables sont les **métalloprotéinases** (MMP), les **protéinases à cystéine** et les **protéinases à sérine**. Les membres de ces familles ayant une activité protéolytique sur l'élastine ont été listés [Tableau 3](#). L'élastine est particulièrement résistante aux attaques enzymatiques, du fait de son organisation très dense et réticulée (Schmelzer & Duca, 2022). Cependant, l'accumulation des défauts mentionnés dans les sections précédentes finissent par la rendre plus vulnérable aux protéinases.

Tableau 3 - Protéinases à activité élastolytique.

Type d'enzymes	Enzymes	Sources principales
MMP	MMP-2	Cardiomyocytes, fibroblastes, myoblastes
	MMP-7	Principalement les cellules épithéliales
	MMP-9	Neutrophiles et macrophages
	MMP-12	Macrophages
	MMP-14	Muscle, ligaments, articulations nouvellement formées ; cellules tumorales

Protéinases à sérine	Élastase du neutrophile (HLE)	Neutrophiles
	Protéinase 3	Neutrophiles
	Cathepsine G	Neutrophiles
	Élastase chymotrypsin-like 1	Épithélium pulmonaire, macrophages
	Élastase pancréatique	Pancréas
Protéinases à cystéine	Cathepsine K	Ostéoclastes, cellules épithéliales, macrophages
	Cathepsine L	Ubiquitaire
	Cathepsine V	Thymus, testis, épithélium de la cornée
	Cathepsine S	Rate, tissus lymphatiques

Adapté à partir de Heinz, 2020 et Miekus et al., 2019.

Les études portant sur la capacité de certaines protéinases à dégrader l'élastine ont parfois été faites sur des élastines isolées de manière dommageable (lyse alcaline ou *Starcher method*) et il est donc difficile de savoir si la protéase aurait pu s'attaquer au cœur dense d'élastine *in vivo*, ou si son action nécessite que l'élastine soit déjà fortement abîmée. De plus, toutes les méthodes, même les plus douces, ne permettent pas de garder la charpente de microfibrilles, ce qui encore une fois, facilite l'accès des protéinases à certains sites qui auraient peut-être été protégés *in vivo* (Daamen et al., 2001, 2005; Heinz et al., 2012).

Les MMP

La famille des MMP regroupe 23 protéinases, chacune avec un éventail de cibles qui lui est propre (X. Wang & Khalil, 2018). Les MMP sont des endopeptidases dont l'activité catalytique est dépendante du zinc. Elles sont sécrétées par plusieurs types de cellules, dont les cellules musculaires lisses vasculaires, les fibroblastes et les leucocytes. Elles sont souvent séparées en plusieurs classes, basées sur leurs substrats ainsi que sur l'organisation de leurs domaines. On retrouve les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MMP membranaires (MT-MMP) et un dernier groupe avec toutes les autres, qui n'entrent pas dans les catégories précédemment citées.

Les MMP sont sécrétées sous une forme inactive appelée « zymogène ». Pour être activées, elles doivent être libérées de leur propeptide. Leur régulation peut donc se faire sur plusieurs niveaux : une régulation transcriptionnelle, le contrôle de leur activation par clivage protéolytique, et également la présence plus ou moins élevée de leurs inhibiteurs endogènes, les TIMP (Hadler-Olsen et al., 2011; Nagase et al., 2006). Le ratio entre MMP et TIMP est très important et un déséquilibre peut entraîner des conséquences sévères. Leur expression est souvent dérégulée en conditions pathologiques, notamment pendant les réponses inflammatoires, ce qui peut causer un effet « boule de neige » en engendrant un remodelage important de la matrice. De plus, les effets de l'activité protéolytique ne sont pas simplement liés à la dégradation des composants matriciels. En effet, la complexité du réseau implique des conséquences indirectes. Par exemple, des interactions cellulaires peuvent être perturbées ou certains facteurs de croissance jusqu'alors séquestrés sont relargués. Les MMP ont été associées à plusieurs pathologies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose (Janssens & Lijnen, 2006), l'hypertension, et la formation d'anévrisme (X. Wang & Khalil, 2018).

En tant qu'acteur clé du remodelage tissulaire, les MMP sont également nécessaires dans plusieurs événements cardiovasculaires au niveau de l'embryogenèse, de l'angiogenèse et de la cicatrisation. Elles sont de plus en plus étudiées comme potentiels biomarqueurs (e.g. cancer, inflammation) ou comme cibles thérapeutiques (X. Wang & Khalil, 2018).

Les MMP capables de dégrader l'élastine et son précurseur la TE, sont les gélatinases **MMP-2** et **MMP-9** ; la matrilysine **MMP-7** ; la **MMP-14** (MT1-MMP) et la **MMP-12** qui est aussi appelée « *macrophage metalloelastase* » (Rabkin, 2017). La fibrilline est quant à elle dégradée par les MMP-2, 3, 9, 12 et 13 (Ashworth et al., 1999; Sherratt, 2009; Tsuruga et al., 2007). La MMP-14 est également impliquée dans la libération du TGF- β des LTBP-1 (Tatti et al., 2008).

Les fragments de microfibrilles et d'élastine ont la capacité de provoquer la hausse de l'expression de certaines MMP et sont donc responsables d'une boucle de rétrocontrôle positif qui augmente leur dégradation (Booms et al., 2005; Heinz, 2020). Les MMP ont aussi la capacité de s'activer entre elles, et possèdent des cibles qui ne font pas partie de la MEC, comme certains facteurs de croissance, ou même certaines cytokines. Tout déséquilibre peut donc rapidement avoir des effets néfastes en entraînant un emballement de la situation (Hadler-Olsen et al., 2011).

Les protéinases à sérine

La famille des protéinases à sérine regroupe des protéines dont l'activité enzymatique repose sur une triade catalytique contenant un résidu sérine, comme par exemple la trypsine. Comme les MMP, elles sont sécrétées sous forme inactive et nécessitent un clivage pour être activées. Les protéinases à sérine dont le rôle élastolytique a été décrit sont l'**élastase du neutrophile** (*Neutrophil Elastase*, NE ou Ela-2 ; *human leucocyte elastase*, HLE), la **cathepsine G** et la **protéinase 3** (également appelée myéloblastine) (Heinz et al., 2012). Elles sont majoritairement produites par les cellules immunitaires et particulièrement par les neutrophiles. Elles sont stockées dans leurs granules azurophiles et participent à la résolution des événements immunitaires soit en étant sécrétées lors de l'activation du neutrophile, soit en digérant le contenu des phagolysosomes (Korkmaz et al., 2010). Elles peuvent aussi être produites par les cellules musculaires lisses (Duca et al., 2016).

La HLE a aussi la capacité de relarguer des ligands de l'EGFR, qui comme vu précédemment ont ensuite un effet négatif sur la régulation de l'expression de *ELN* (DiCamillo et al., 2006).

Les protéinases à cystéine

Cette famille de protéinases doit également son nom à la présence de la cystéine dans la triade catalytique à laquelle elles doivent leur activité enzymatique. En font notamment partie les caspases, dont le rôle biologique est très important pour l'apoptose et dans certains processus de l'inflammation (Van Opdenbosch, 2019). On y trouve aussi les cathepsines, certaines ayant la capacité de dégrader l'élastine : les **cathepsines K, L, S et V** (J. Liu et al., 2006; Yasuda et al., 2004).

Les cathepsines sont des protéinases lysosomales dont on a d'abord pensé que l'activité était uniquement intracellulaire et nécessitait une baisse de pH importante. Il a cependant été montré pour plusieurs de ces protéinases que leur activité était compatible avec une plage de pH plutôt large, et que certaines des cathepsines avaient un rôle extracellulaire (Mohamed & Sloane, 2006; Zhao et al., 2009).

La **cathepsine L** est exprimée de manière ubiquitaire dans tous les tissus humains (Lecaille et al., 2022). Son expression est augmentée dans les lésions associées aux anévrismes de l'aorte abdominale et dans les athéromes, aussi bien au niveau des cellules musculaires lisses que des cellules endothéliales, ainsi que des macrophages. Elle est également présente en plus grande quantité dans les sérums de patients souffrant de maladie coronaire (Y. Liu et al., 2009).

L'expression des autres cathepsines élastolytiques est plus régulée. La **cathepsine V** ressemble beaucoup à la cathepsine L et est d'ailleurs parfois nommée cathepsine L2. Elle dégrade l'élastine au niveau intracellulaire, tandis que les **cathepsine S** et **K** la dégrade plutôt à l'extérieur de la cellule. La cathepsine V est souvent surexprimée dans les cas d'athérosclérose, d'anévrisme aortique et d'hypertension (Lecaille et al., 2022). La cathepsine K peut également dégrader la fibrilline. Elle a été décrite dans le contexte de l'élastose solaire, où elle joue un rôle important dans la dégradation de l'élastine (Codriansky et al., 2009), et pourrait également servir de biomarqueur pour repérer les patients en insuffisance rénale (*end-stage kidney diseases*) devant subir des hémodialyses les plus à risque de complications cardiovasculaires (Bolignano et al., 2021).

Tout comme les modifications chimiques et la fatigue mécanique dont les effets sur les fibres élastiques s'intensifient avec l'âge, la dégradation protéolytique de l'élastine et des microfibrilles prend de l'importance lors du vieillissement, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'accumulation des fractures et des adduits (*adducts*) chimiques accentuent le ciblage par les protéinases, augmentant peu à peu la vulnérabilité des fibres. Deuxièmement, la plupart des protéinases décrites dans ce chapitre sont régulées par des signaux inflammatoires et le vieillissement est souvent associé à une inflammation chronique dite « de bas grade », un concept décrit sous le terme d'«*inflammaging*» (Franceschi et al., 2000). Tous ces éléments agissent donc dans un cercle vicieux dont les effets entraînent progressivement une perte de fonction du tissu. On a en effet une fibre fragilisée et des protéinases plus nombreuses et plus actives.

Les peptides résultants de cette dégradation enzymatique de l'élastine sont appelés peptides dérivés de l'élastine (EDP ; *Elastin-derived peptide*) et certains d'entre eux ont des activités biologiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent servir de messagers et enclencher des voies de signalisation qui pourront modifier le comportement des cellules. On parle d'**élastokines**, et plus globalement concernant les fragments de protéine de la matrice, de **matrikines** (Duca et al., 2004).

Matrikines et EDP

En plus de son rôle dans la signalisation cellulaire par son interaction avec les récepteurs ou sa régulation de la biodisponibilité de certains facteurs de croissance, la MEC joue également à un autre niveau, puisque certains fragments de ses protéines sont également bioactifs. Ce concept a donné le terme de « **matrikines** », pour désigner tout peptide issu de la dégradation protéolytique de macromolécules de la matrice ayant un rôle sur la régulation de l'activité cellulaire (Maquart et al., 1999, 2004).

Des matrikines ont été décrites pour un grand nombre de composants de la MEC, tels que les collagènes, la fibronectine, les laminines ou les syndecans (Ricard-Blum & Salza, 2014). Des rôles importants dans la pathogenèse de plusieurs maladies ont été mis en évidence, particulièrement dans le contexte du cancer et de la progression tumorale qui est souvent associée à un remodelage de la matrice important (Jariwala et al., 2022). Les matrikines ne sont pas toujours associées à une amplification négative, mais peuvent également tenter de limiter les dégâts, comme par exemple l'endostatine, issue de la dégradation du collagène de type XVIII, qui inhibe l'angiogenèse et participe donc au confinement de la tumeur dans le contexte de l'hémangio-endothéliome (cancer vasculaire) (O'Reilly et al., 1997).

Les peptides provenant spécifiquement de la dégradation de l'élastine sont regroupés sous le terme **EDP**, et ceux d'entre eux qui ont une activité biologique sont appelés « **élastokines** » (Antonicelli et al., 2007). Le motif le plus commun aux élastokines, et le mieux étudié, est le VGVAPG ou plus globalement le (X)GXXPG (X étant n'importe quel acide aminé sauf la proline). Son activité est en grande partie liée à sa capacité à lier l'ERC, dont le rôle et la structure seront détaillés par la suite

(Duca et al., 2016). Les élastokines issues de la dégradation de la TE humaine (isoforme 2) par les MMP (-7, -9 et -12) ont été identifiées en 2010 par Andrea Heinz et al., ainsi que les séquences bioactives et les effets biologiques qui leur sont connus (Heinz et al., 2010) (Tableau 4). Les EDP ont une action locale importante, mais certains d'entre eux sont également capables de rejoindre la circulation sanguine (Schmelzer & Duca, 2022).

La présence d'élastokines a également été associée à la progression négative de plusieurs pathologies (Schmelzer & Duca, 2022). Elles sont souvent responsables de boucle d'amplification dans les processus de dégradations protéolytiques et inflammatoires, ce qui peut avoir des conséquences délétères et mener à un emballement au niveau du remodelage tissulaire, ainsi qu'à un état d'inflammation chronique (Antonicelli et al., 2007; Heinz, 2020; W. Wang et al., 2021). Au niveau cardiovasculaire, les élastokines sont par exemple impliquées à plusieurs niveaux dans l'athérosclérose (Gayral et al., 2014; Kawecki et al., 2019).

Les élastokines n'ont cependant pas que des effets néfastes. Elles ont par exemple la capacité de réguler l'agrégation plaquettaire (Kawecki et al., 2014) et ont un effet protecteur sur le cœur lors de lésions dues à une ischémie/reperfusion du fait de leur capacité à provoquer un relargage de NO et l'activation de kinases importantes pour éviter des dégâts trop importants sur le myocarde (Robinet et al., 2007).

Les EDP peuvent également servir de biomarqueurs pour évaluer la gravité de certaines conditions en les dosant dans des échantillons biologiques issus de patients. Plusieurs techniques de dosages ont été décrites, basées sur des méthodes colorimétriques, immunologiques, ou plus récemment sur de l'HPLC (Chromatographie en phase liquide haute performance) couplée à de la spectrométrie de masse (Duca et al., 2016).

Pour s'assurer que le peptide dosé correspond bien à de l'élastine mature dégradée, ce sont souvent les motifs de réticulation qui sont recherchés : la desmosine et l'isodesmosine. Leur concentration est augmentée par exemple dans les urines ou le plasma de patients atteints de COPD, du fait de l'augmentation de la dégradation d'élastine pulmonaire associée à la pathologie (Luisetti et al., 2008). Leur dosage et la transposition des résultats d'études individuelles à une application générale sont encore en développement, aucune méthode « standard » n'étant pour l'instant reconnue (Duca et al., 2016), mais ils représentent de bons candidats pour servir de biomarqueurs pour la surveillance des interventions thérapeutiques (Luisetti et al., 2008).

Tableau 4 - Séquences bioactives présentes dans la TE

Séquence	Domaines TE	Activités biologiques décrites
PGAIPG	2, 16	Chimioattractant pour les neutrophiles ; induit l'expression de pro MMP-1
GGVPG	2,7,20 (2x)	-
VPGVG	7, 8, 9, 18, 20, 24, 30	Prolifération cellulaire ; autorégulation de l'expression d'élastine
VVPQ	8	Mitogène (fibroblastes dermiques)
GVKPG	8	-
GKVPG	8, 9	-
GVYPG	9	Stimule la sécrétion de pro MMP1
GVLPG	9, 10, 16	Stimule la sécrétion de pro MMP1
GPQPG	12	-
GYGPG	14	Stimule la sécrétion de pro MMP2

GFGPG	18	Stimule la sécrétion de pro MMP1
VGVP	18 (2x), 26	Chimioattractant pour les monocytes
GLVPG	18, 24	Chimioattractant pour les monocytes ; stimule la sécrétion de pro MMP1
GARPG	20	Stimule la sécrétion de pro MMP2
GGFPG	20	-
GGIPG	20	-
YGVG	20, 21	Chimioattractant pour les monocytes
FGVG	20	Chimioattractant pour les monocytes
VGVP	24 (6x)	Stimule l'expression de pro MMP1, MMP2 et MMP3 et MT1-MMP et de TIMP-2 et 3 (niveau ARNm) ;
VGVP	24 (3x)	Chimioattractant pour les fibroblastes, monocytes, cellules endothéliales ; Prolifération des fibroblastes et CML ; promeut un phénotype ostéogénique sur les CML ; stimule la production des cytokines pro TH1 ; Vasorelaxant ; Réduit l'expression d' <i>ELN</i> dans les fibroblastes
GVAPG	24 (6x)	
GVAPG	24 (5x)	
PGVGVA	24 (6x)	Augmente la présence d'élastases
GLAPG	24	-
GIGPG	24	-
GLGVGAGVP	26 (2x)	Chimioattractant pour les cellules endothéliales
AGVPGLGVG	26	Chimioattractant pour les macrophages
GAVPG	26, 27	Stimule la sécrétion de pro-MMP2

D'après Heinz, 2020.

Rôle de l'élastine et des EDP dans la signalisation

La TE et ses peptides dérivés peuvent interagir avec plusieurs récepteurs cellulaires pour influencer le comportement de la cellule. Ces récepteurs sont l'**ERC**, les **intégrines $\alpha_v\beta_3$** et **$\alpha_v\beta_5$** et la **galectine-3** parfois nommée ELR (*Elastin-laminin receptor*) (Toupance et al., 2012). Certains EDP en nonapeptides (composés de 9 acides aminés) pourraient également interagir avec un récepteur insensible au lactose (*lactose-insensitive receptor*), dont la nature exacte n'est pour l'instant pas connue, et promouvoir la migration des macrophages (Maeda et al., 2007) ainsi que l'activité des MMP-2 dans certaines lignées cancéreuses (Toupance et al., 2012).

Le complexe récepteur de l'élastine

L'ERC est sûrement le récepteur qui a été le plus étudié dans le contexte de la bioactivité de l'élastine et il semble responsable de la majorité des signaux transduits attribués aux élastokines (Duca et al., 2016). Comme mentionné précédemment, l'ERC est composé de la Neu-1, le PPCA et l'EBP (Figure 15). La **Neu-1** est une sialidase exoglycosidase, ce qui signifie qu'elle clive les acides sialiques terminaux des macromolécules dans les lysosomes ou au niveau de la membrane plasmique en ce qui concerne son rôle dans l'ERC. La désialylation est une modification qui influence souvent l'activation des protéines, notamment de récepteurs membranaires tels que certaines intégrines, récepteurs à tyrosine kinase ou Toll-like récepteurs. Au niveau de l'ERC, Neu-1 possède l'activité catalytique et joue donc un rôle central dans la transduction du signal. **PPCA** est une protéinase à sérine (carboxypeptidase) qui possède une activité enzymatique à pH acide. Cependant son rôle catalytique ne semble pas être utilisé dans l'ERC, où son action n'est pas encore clairement établie. Elle pourrait

protéger la neuraminidase-1 et l'EBP et stabiliser le complexe. PPCA joue en effet un rôle de chaperonne pour Neu-1 dans les lysosomes et pourrait donc faire de même dans l'ERC. Pour finir, le rôle de l'EBP a déjà été mentionné plus tôt, pour son implication dans la sécrétion de la TE. L'EBP est un variant tronqué de la β -galactosidase lysosomale qui ne possède pas d'activité catalytique. L'EBP lie la TE, ainsi que ses EDP qui possèdent la séquence XGXXPG. Sa capacité à lier les galactoses est maintenue, et ceux-ci sont de bons antagonistes des EDP, la liaison du premier empêchant celle du second. Seule la Neu-1 est transmembranaire.

Les effets engendrés par l'initiation du signal ERC varient énormément d'un type cellulaire à l'autre. La liaison d'une élastokine sur le récepteur enclenche son activation. Neu-1 catalyse ensuite la conversion de gangliosides GM₃ (qui sont des glycosphingolipides présents sur la membrane plasmique) en lactosylcéramides, étape critique pour la suite de la transduction du signal (Duca et al., 2016; Rusciani et al., 2010). Une protéine G α i entre ensuite en jeu dans la cascade, puis plusieurs voies ont été décrites (Figure 15), dont l'activation des voies ERK1/2 ou AKT (ou protéine kinase B) par l'intermédiaire de PI3K (phosphoinositide 3-kinase), ou chez les fibroblastes, la voie MEK/ERK peut être

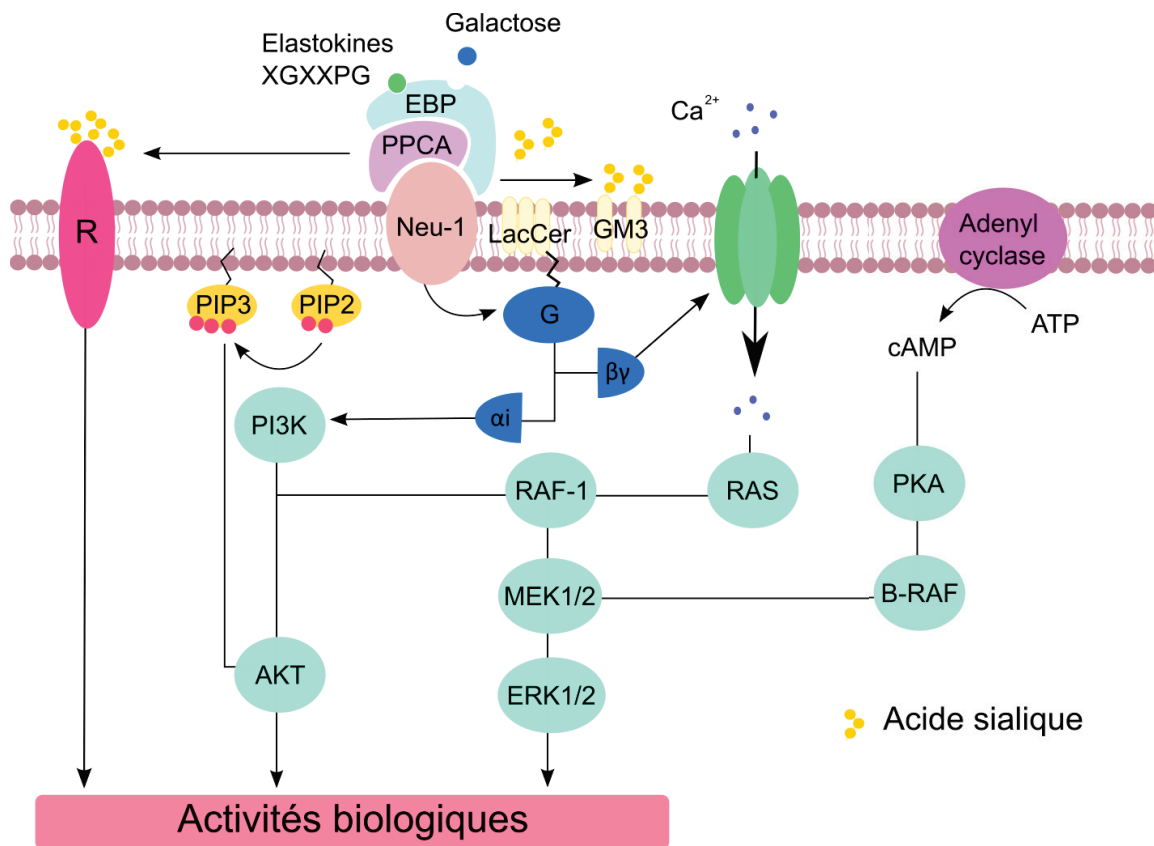


Figure 15. Signalisation du complexe récepteur de l'élastine (ERC) par les élastokines. L'ERC est formé par l'EBP = Protéine liant l'élastine ; la PPCA = Protéine protectrice/Cathepsine A ; et la Neu-1 = Neuraminidase-1. R = Récepteur ; PIP3 = phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate ; PIP2 = phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate ; PI3K = phosphoinositide 3-kinase ; AKT = protéine kinase B ; LacCer = lactosylcéramide ; GM3 = monosialodihexosylganglioside ; G (α i / β γ) = Protéine G et sous-unités α i et β γ ; RAF-1 = « Rapidly Accelerated Fibrosarcoma 1 », qui est une Serine/Threonine Kinase ; MEK1/2 = mitogen-activated protein kinase kinase ; ERK 1/2 = extracellular signal-regulated kinase ; RAS = « Rat sarcoma virus », qui est une GTPase ; cAMP = adénosine monophosphate cyclique ; ATP = adénosine triphosphate ; PKA = protéine kinase A ; B-RAF = membre de la famille des Serine/Threonine Kinase de type RAF.

activée par la conversion d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) puis de la protéine kinase A (PKA). Dans les cellules musculaires lisses, l'activation de l'ERC peut être couplée à l'ouverture de canaux calciques qui participent à la suite de la transduction du signal, comme c'est notamment le cas pour les signaux visant à augmenter la prolifération (Duca et al., 2016). La neuraminidase activée du récepteur peut également modifier la sialylation de récepteurs membranaires avoisinants et engendrer d'autres types de modifications biologiques (Tembely et al., 2022).

Parmi les processus biologiques régulés par l'ERC, on trouve la prolifération et la migration cellulaires, la réorganisation du cytosquelette, ainsi que la synthèse de protéases (Heinz, 2020; Tembely et al., 2022). Comme mentionné précédemment, les élastokines sont également impliquées dans la régulation des processus inflammatoires, souvent par le biais de l'ERC. Son rôle a pu être mis en évidence dans plusieurs pathologies métaboliques et cardiovasculaires. Par exemple, l'activation de l'ERC par les EDP peut influencer la résistance à l'insuline, en jouant sur la glycémie par des modifications apportées au récepteur de l'insuline par la neuraminidase-1 (Blaise et al., 2013; Guillot et al., 2016). Il pourrait également jouer un rôle dans la stéatose hépatique non-alcoolique (Romier et al., 2018). Concernant les maladies cardiovasculaires, l'activation de l'ERC par les EDP a été décrite dans l'athérosclérose, avec un effet pro-inflammatoire dû à l'augmentation du recrutement de monocytes, de la production de ROS et de la rétention de lipides (Wahart et al., 2019).

Les intégrines

La TE et certains EDP peuvent également interagir avec des intégrines telles que les intégrines $\alpha v \beta_3$ et $\alpha v \beta_5$ par l'intermédiaire de leur motif GRKRK, présent sur la partie C-terminale de la protéine (Bax et al., 2009).

La liaison de la TE et d'EDP aux intégrines dont elles sont ligands peut donc influencer l'adhésion et l'étalement cellulaire (Bax et al., 2009), mais également leur migration, comme cela a été montré sur des cellules cancéreuses (mélanomes) sur lesquelles un traitement avec des EDP engendre une augmentation de l'expression du couple CXCR-4/CXCL-12 (*C-X-C motif chemokine receptor 4/ C-X-C motif chemokine ligand 12*) de manière intégrine-dépendante (ainsi que galectine-3 dépendante), ces deux protéines étant impliquées dans la progression des métastases (Pocza et al., 2008).

La Galectine-3

Enfin, l'élastine et les EDP sont capables de se lier au récepteur galectine-3, qui est aussi appelé « élastine-laminine récepteur » bien qu'il puisse en fait lier plusieurs autres protéines de la MEC (collagène de type IV, fibronectine, vitronectine) (Ochieng et al., 2002). La galectine-3 est un membre de la famille des lectines et possède une multitude de fonctions biologiques, notamment dans l'angiogenèse, l'endocytose, le développement des reins et l'adhésion cellulaire (Ochieng et al., 2002; Schmelzer & Duca, 2022).

En tant que récepteur de l'élastine, la galectine-3 a été décrite pour son rôle dans la réponse à l'étirement des cellules. En effet, des cellules musculaires lisses vasculaires soumises à un étirement cyclique et cultivées sur une matrice d'élastine ont montré une prolifération abaissée et une diminution de l'expression du facteur de transcription c-fos, tandis que ces réponses n'ont pas été observées si les cellules étaient cultivées sur du collagène (Spofford & Chilian, 2001). La galectine-3 est aussi décrite pour son rôle dans l'adhésion de cellules cancéreuses sur l'élastine (Ochieng et al., 1999), et plus généralement, elle est associée à la progression tumorale, comme mentionné dans le paragraphe précédent (Pocza et al., 2008; Y. Wang et al., 2009).

III. Les pathologies associées aux fibres élastiques

Les déficiences génétiques portant atteinte aux protéines des fibres élastiques peuvent entraîner des pathologies sévères. Le **Tableau 5** répertorie les principales maladies associées aux fibres élastiques, les protéines impliquées dans la pathologie, l'effet sur les fibres élastiques et leurs conséquences au niveau vasculaire. Les maladies qui impliquent directement le gène de l'élastine, ou élastinopathies, seront détaillées plus amplement dans la section suivante.

Tableau 5 - Pathologies liées aux fibres élastiques.

PATHOLOGIE	PROTÉINE(S) AFFECTÉE(S)	MODIFICATIONS BIOLOGIQUES AFFECTANT LES FIBRES ÉLASTIQUES	COMPLICATIONS VASCULAIRES
ADCL	Élastine	Dépôt d'élastine perturbé par une élastine anormale ; défauts structurels des fibres résultantes	Anévrisme, dilatation, sténose, tortuosité
ARCL TYPE IB	Fibuline-4	Problèmes d'assemblage des fibres, fibres fragmentées	Tortuosité, anévrisme et sténose aortique
ARCL TYPE II	ATP6V0 ou V1 ; PYCR1	Accumulation de l'élastine dans le Golgi due à une anomalie sur la voie de sécrétion	Pas de symptôme particulier
ARCL TYPE III	PYCR1 ; ALDH18A1	Anomalie de l'élastine et du collagène due à un défaut dans la synthèse des prolines	Tortuosité intracrânienne
COSTELLO	HRAS	Sécrétion d'élastine perturbée par une mauvaise association avec l'EBP	Cardiomyopathie hypertrophique avec défauts coronariens précoces et hypertension
CUTIS LAXA AR (ARCL) TYPE IA	Fibuline-5	Problèmes d'assemblage des fibres, fibres fragmentées	Sténose
MACS	RIN2	Expression de la fibuline-5 diminuée ; RIN2 est impliquée dans le trafic endocytaire mais le lien direct avec la fibuline-5 n'est pas clair	Pas de symptôme particulier
MARFAN DE TYPE I	Fibrilline-1	Défauts structurels des fibres élastiques ; susceptibilité à la dégradation augmentée ; voie TGF- β dérégulée (\nearrow)	Anévrismes et dissections aortiques
MARFAN DE TYPE II OU LOEYS-DIETZ	TGF- β récepteur II	Déficit d'élastogénèse ; dérégulation de la voie TGF- β \nearrow	Anévrismes et dissections aortiques
PXE	ABCC6 ; XYLT1 et 2	Minéralisation et fragmentation des fibres élastiques	Artériosclérose précoce ; insuffisance cardiaque

SVAS	Élastine	Lamelles élastiques désorganisées et affinées	Aorte étroite et épaissie ; SVAS ; peut entraîner des insuffisances cardiaques congestives
SYNDROME DE BEAL	Fibrilline-2	Défaut d'assemblage des fibres élastiques	Élargissement aortique
SYNDROME DE TORTUOSITÉ ARTÉRIELLE (ATS)	GLUT10	Métabolismes du collagène et de l'élastine aberrants	Tortuosité et anévrisme
SYNDROME DE URBAN RIFKIN DAVIS OU ARCL TYPE IC	LTBP-4	Assemblage des fibres élastiques anormal ; TGF- β \nearrow	Sténose
WBS	Élastine (+ 25-27 gènes)	Lamelles élastiques désorganisées et affinées	Aorte étroite et épaissie ; SVAS ; peut entraîner des insuffisances cardiaques congestives
WEILL-MARCHESANI (WMS) AD	Fibrilline-1	Réduit la liaison de la fibrilline-1 à ses protéines associées ; défauts structurels des fibres ; Voie TGF- β \nearrow	Sténoses de l'aorte et des artères pulmonaires ; persistance du <i>ductus arteriosus</i> ; prolapsus de la valve mitrale ; anévrismes et dissections
WMS AR	ADAMTS-10	Formation des MFF affectée	Sténoses de l'aorte et des artères pulmonaires ; persistance du <i>ductus arteriosus</i> ; prolapsus de la valve mitrale
WMS 3 (AR)	LTBP-2	Perturbation du réseau des MFF	Similaires à WMS AR
WEILL-MARCHESANI LIKE SYNDROME (AR)	ADAMTS-17	Formation des MFF affectée	Similaires à WMS AR
XLCL, MENKES	ATP7A	Déficiences en cuivre qui empêchent le fonctionnement normal des LOX et donc la formation des fibres élastiques	Tortuosité intracrânienne

AD = autosomique dominant ; AR = autosomique récessif ; MFF = microfibrilles riches en fibrilline ; MACS = macrocéphalie-alopecie-cutis laxa-scoliose ; SVAS = sténose aortique supra-avalvulaire ; WBS = syndrome de Williams Beuren ; PXE = pseudoxanthoma elasticum. Complété à partir de Baldwin et al., 2013; Kretz et al., 2011; Marzin et al., 1993.

Les maladies de l'élastine

Les pathologies attribuées directement à une déficience en élastine ne sont pas courantes. Elles peuvent être dues à la perte totale d'un des allèles *ELN*, comme c'est le cas pour le **syndrome de Williams Beuren** (WBS) ; ou elles peuvent découler d'une mutation affectant la protéine finale, comme

la **cutis laxa autosomique dominante** (ADCL) et les cas de sténoses aortiques supra-avalvulaires ou **SVAS** (*supravalvular aortic stenosis*) non-syndromiques (ou isolées).

Les mutations impactant le gène de l'élastine peuvent affecter la quantité et/ou la qualité de la protéine résultante. Une perte de la protéine, soit par délétion du gène entier, soit par l'expression d'une protéine tronquée, donnera un phénotype d'haploinsuffisance, où la quantité d'élastine produite par un seul allèle ne suffit pas au bon fonctionnement de l'organisme. Ce cas de figure est généralement associé au WBS et aux SVAS isolées. Les mutations donnant une protéine exprimée mais anormale peuvent engendrer un phénotype négatif dominant, avec la protéine mutée qui altère les fibres élastiques synthétisées, ce qui est plutôt associé à l'ADCL. Cependant, cette catégorisation est une vision simplifiée qui ne reflète pas entièrement la réalité du lien génotype/phénotype (Graul-Neumann et al., 2008; Velandia-Piedrahita et al., 2020).

Des mutations dont l'effet est plus bénin ont également été repérées lors d'études d'association pangénomique (GWAS ; *Genome wide association study*), dont certaines ont été reliées à des différences vasculaires sans toutefois être impactantes sur la qualité de vie des porteurs (Benjamins et al., 2022; Procknow & Kozel, 2022).

Le syndrome de Williams-Beuren

Le syndrome de Williams-Beuren (WBS, parfois syndrome de Williams) est une maladie génétique causée par la microdélétion d'une partie du chromosome 7 (locus 7q11.23). Entre 25 et 28 gènes sont ainsi manquants, dont celui de la TE. Les chiffres de sa prévalence dépendent des sources mais se situent aux alentours de 1 cas pour 7500 individus (Kozel et al., 2021). Le syndrome est associé à un retard mental, accompagné d'une dysmorphie faciale typique et de comportements spécifiques (Baldwin et al., 2013). Plusieurs anomalies du tissu conjonctif sont également présentes, ainsi que des dérégulations métaboliques et endocriniennes qui augmentent les risques d'obésité, de diabète et d'ostéoporose. Au niveau cardiovasculaire, des sténoses sont souvent retrouvées dans les grandes et moyennes artères. Les SVAS sont très fréquentes, avec 70% des patients concernés. Les artères pulmonaires sont aussi souvent atteintes, et des sténoses des artères coronaires, carotides, rénales et cérébrales ont également été décrites (Baldwin et al., 2013; Cha et al., 2019). Le SVAS est particulièrement problématique puisqu'il peut conduire à de sévères complications, comme une hypertrophie du ventricule gauche, qui peut finir par engendrer une insuffisance cardiaque (Baldwin et al., 2013). La survenue de ces complications est très variable. Environ 30% des patients atteints de WBS nécessitent une intervention chirurgicale liée à une sténose, tandis que 20% n'en déclareront aucune. Des dégénérescences des valves aortiques et mitrales sont également relativement fréquentes. L'hypertension est particulièrement présente (50%), ce qui augmente les risques de développer d'autres pathologies par la suite. Le risque de mort subite est aussi bien plus haut chez les patients WBS, puisqu'il est entre 25 et 100 fois plus élevé que dans la population globale (Wessel et al., 2004), surtout suite à une anesthésie (Gupta, 2010), ce qui semble être lié aux modifications vasculaires présentes chez ces patients (Procknow & Kozel, 2022).

Le WBS étant caractérisé par la perte de nombreux gènes, les complications retrouvées dans ce syndrome ne sont pas toutes imputables à la déficience en élastine. Cependant, des cas de SVAS isolées (non syndromiques) ont pu être reliés à des mutations ponctuelles du gène de l'élastine, et attestent donc du fait que la perte de la protéine est suffisante pour engendrer de telles complications (Duque Lasio & Kozel, 2018).

L'insuffisance en élastine provoquée par la perte d'un des allèles correspond à une expression à 50% de l'ARNm, mais l'élastine effectivement déposée dans les fibres est bien plus affectée puisque les cellules de patients WBS n'ont que 15% de l'élastine fibrillaire retrouvée normalement dans les

cellules non pathologiques (Urbán et al., 2002). Au niveau des artères élastiques, le nombre de lamelles élastiques est augmenté, mais le contenu en élastine de chacune est diminué. De plus, les lamelles élastiques sont plus fines et fragmentées. Les CML sont également impactées puisqu'elles perdent leur orientation préférentielle (Dridi et al., 2005). La paroi vasculaire est plus épaisse, avec une lumière plus étroite et un comportement mécanique moins élastique (Duque Lasio & Kozel, 2018).

L'apparition de sténose chez les patients WBS a longtemps été attribuée à une hyperplasie des CML due à la réduction du contenu en élastine de la paroi vasculaire. En effet, il a été décrit dans plusieurs études que l'élastine avait une action inhibitrice sur la prolifération des CML (Li et al., 2013; Urbán et al., 2002). Une déficience en élastine provoque donc une prolifération plus importante des CML. Plus récemment, il a cependant été rapporté que le manque d'élastine vasculaire impactait également la croissance circonférentielle du vaisseau et que c'est en fait ce paramètre qui est la cause principale de la formation subséquente de sténoses (Jiao et al., 2017).

Des modèles de souris ont été développés pour étudier les effets d'une déficience en élastine. Cependant, les souris *Eln*^{-/-} expriment ~50% de l'élastine du niveau WT, et présentent un phénotype moins sévère au niveau cardiovasculaire. La paroi vasculaire est de plus affinée, et non épaissie comme chez les patients humains (Faury et al., 2003; Wagenseil et al., 2005). Cependant, la paroi est un peu rigidifiée, la lumière plus étroite et la pression systolique des souris est plus élevée (Duque Lasio & Kozel, 2018), même s'il a été décrit récemment que cette augmentation de pression n'était en fait pas totalement liée à l'élastine (Brengele et al., 2023).

Les individus homozygotes *Eln*^{-/-} meurent quelques jours après la naissance, à cause d'une occlusion au niveau de l'arc aortique (coarctation de l'aorte), ce qui est également observé lorsque la mutation *Eln*^{-/-} est restreinte aux CML, bien que les souris en question vivent quelques jours de plus (~18 jours) (Kozel et al., 2021; C.-J. Lin et al., 2019). Le taux d'élastine déposée est plus bas que les *Eln*^{+/-}, avec ~30% de ce qui est observé chez les WT, et les problèmes cardiovasculaires sont plus importants, reflétant mieux les complications humaines avec un rétrécissement du diamètre de l'aorte, une rigidification des vaisseaux et un épaississement de la média aortique (Hirano et al., 2007).

Aucun de ces modèles ne permet cependant de récapituler la sténose aortique supra-avalvulaire, bien que des sténoses locales soient parfois observées à d'autres endroits de l'aorte (Duque Lasio & Kozel, 2018).

La duplication Williams Beuren

Des cas de duplication de la région associée au syndrome de Williams Beuren (*7q11.23 duplication syndrome*) ont également été rapportés, menant donc à la présence de trois copies du gène de l'élastine. La prévalence de ce syndrome n'est pas connue mais est estimée à 1 naissance sur 7 500 – 12 000. La microduplication de la région WBS est souvent moins grave que sa délétion, et les enfants porteurs ne sont donc pas systématiquement identifiés. Les symptômes les plus fréquents sont d'ordres cognitifs et comportementaux, avec des troubles importants du langage, des troubles anxieux et des déficits de l'attention. Au niveau cardiovasculaire, les patients présentent des dilatations de l'aorte principalement sur la partie ascendante qui peuvent être d'une gravité légère à modérée. Certains cas de persistance du *ductus arteriosus* (15-30%), qui est un vaisseau qui relie l'aorte et le tronc pulmonaire chez le fœtus et qui disparaît normalement à la naissance, ont également été rapportés. Le lien entre la fermeture du *ductus arteriosus* et certains événements de migration et prolifération des CML est connu et il serait donc théoriquement cohérent de penser que l'élastine puisse être la cause de cette non-fermeture (Mervis et al., 1993). Cependant d'autres gènes de la région WBS dupliquée pourraient aussi être responsables, et le lien direct avec l'élastine n'a pas été démontré (Duque Lasio & Kozel, 2018).

La sténose aortique supra- valvulaire non-syndromique

La SVAS non-syndromique résulte d'une mutation de l'*ELN* qui conduit à une haploinsuffisance, comme pour le WBS. Elle se produit environ pour une naissance sur 20 000 (Baldwin et al., 2013). Les symptômes vasculaires sont similaires à ceux décrits dans la section WBS.

La cutis laxa

La cutis laxa est une maladie du tissu conjonctif dont la caractéristique la plus manifeste est une peau ridée qui pend (laxe ou lâche) du fait qu'elle n'est pas élastique, ce qui lui vaut son nom. C'est une maladie très rare qui touche environ une naissance sur 2 millions (~ 400 familles avec des cas rapportés à ce jour (data Cutislaxa.pitt.edu)). Le terme cutis laxa regroupe en fait un grand nombre de pathologies de causes diverses et dont les complications diffèrent. Une fragmentation des fibres élastiques et leur présence réduite sont tout de même des points communs à toutes les formes. Beaucoup de mutations de composants des fibres élastiques peuvent être associées à une forme de la cutis laxa, bien que des protéines impliquées dans la biologie des fibres élastiques de manière plus indirecte soient également représentées. Les différents types de cutis laxa sont présentés [Tableau 6](#).

Tableau 6 - Les différentes pathologies du syndrome Cutis Laxa.

Transmission	Type	Gènes	Complications vasculaires
ADCL		<i>ELN</i>	Anévrisme, dilatation, sténose, tortuosité
	Progéroïde	<i>ALDH18A1</i>	Tortuosité intracrânienne
	1a/c	<i>FBLN5</i> ; <i>LTBP4</i>	Sténose
	1b	<i>FBLN4</i>	Tortuosité, anévrisme et sténose aortique
ARCL	2a/b	<i>ATP6VOA2</i> ; <i>PYCR1</i>	Pas de symptôme particulier
	2c/d	<i>ATP6V1E1</i> ; <i>ATP6V1A</i>	Pas de symptôme particulier
	3a/b	<i>PYCR1</i> ; <i>ALDH18A1</i>	Tortuosité intracrânienne
Liée à l'X		<i>ATP7A</i>	Tortuosité intracrânienne
Pathologies associées	Syndrome de tortuosité artérielle (ATS)	<i>SLC2A10</i> (<i>GLUT10</i>)	Tortuosité et anévrisme
	Gérodermie ostéodysplasique	<i>SCYL1BP1</i>	Pas de symptôme particulier
	Macrocéphalie-alopécie-cutis laxa-scoliose (Syndrome MACS)	<i>RIN2</i>	Pas de symptôme particulier
Suite du syndrome de Sweet	Syndrome de Marshall (CL acquise)		Anévrisme, occlusion des artères coronaires, dilatation de l'aorte

Forme acquise

Dilatation vasculaire

En couleur, les protéines directement impliquées dans la formation des fibres élastiques. Complété à partir de Baldwin et al., 2013; Beyens et al., 2021; Hu et al., 2006; Timmer-DE Mik et al., 2009.

La cutis laxa autosomique dominante (ADCL) est causée par une mutation dans le gène de l'élastine qui engendre une protéine stable, exprimée et sécrétée. La protéine est le plus souvent modifiée au niveau de sa partie C-terminale, ce qui impacte grandement la formation des fibres élastiques (Beyens et al., 2021; Duque Lasio & Kozel, 2018). Le dépôt de TE normale est également affecté, avec un contenu en élastine encore plus diminué que dans le WBS ou le SVAS. De plus, les fibres élastiques sont fragmentées et leur réticulation n'est pas normale. La voie TGF- β peut être impactée pour certains variants mutés, avec un signal augmenté. Il est aussi possible que la protéine mutée, du fait d'une conformation anormale, induise un stress du réticulum endoplasmique et la mort subséquente des cellules qui la produisent (Callewaert et al., 2011).

L'ADCL a longtemps été associée uniquement à des problèmes de peau, sans que le reste des organes ne soient vraiment considérés comme affectés. Il est aujourd'hui clair que de nombreux autres organes sont impactés, que ce soit au niveau du squelette, des articulations, des poumons ou des vaisseaux sanguins. Plusieurs cas d'aortopathies, de valvulopathies et de pathologies pulmonaires ont ainsi été rapportés (Beyens et al., 2021). Les problèmes aortiques sont souvent dus à des dilatations de la paroi vasculaire (30-50% des patients ADCL ont une dilatation de la racine de l'aorte), qui aboutissent parfois à des anévrismes plus ou moins sévères avec risque de rupture et de dissection (Callewaert et al., 2011; Duque Lasio & Kozel, 2018).

Il est possible que la TE mutée n'ait pas le même impact sur tous les organes du fait d'épissages alternatifs tissu-dépendants (Duque Lasio & Kozel, 2018; Sugitani et al., 2012). Des modèles de souris ont été développés, exprimant une TE humaine mutée (décrite chez des patients ADCL) en plus de leur propre élastine (souris mELN^{+/+} exprimant en plus hELN^{ADCL} (m = mouse ; h = human)) et une accumulation de la protéine humaine dans la peau a pu être observée, changeant ses propriétés mécaniques, alors que sa présence dans les artères était moindre et n'affectait pas la compliance vasculaire (Sugitani et al., 2012).

Traitements et chirurgie

A l'heure actuelle, seuls des traitements symptomatiques sont disponibles et aucune réparation ou compensation de la déficience en élastine n'est possible. Les patients atteints de WBS sont donc suivis régulièrement pour repérer d'éventuelles pathologies (sténose, hypertension) et les prendre en charge rapidement avant qu'elles ne mènent à de plus graves conséquences, les complications vasculaires étant la cause principale de mortalité précoce dans ce syndrome.

Les patients ADCL sont suivis tout au long de leur vie pour repérer de potentielles complications, notamment aux niveaux cardiaque, pulmonaire et urinaire. Des chirurgies plastiques sont envisageables pour améliorer l'apparence de la peau (Duque Lasio & Kozel, 2018).

Si des complications vasculaires surviennent, elles sont donc traitées en tant que symptômes. Les hypertensions sont traitées par la prescription d'anti-hypertenseurs. Les anévrismes ou les risques de dissection aortique de type A (partie ascendante) nécessitent une intervention chirurgicale avec pose d'endoprothèse. La prise en charge des sténoses importantes se fait généralement par aortoplastie, soit par dilatation du vaisseau à l'aide de cathéter, soit par réparation chirurgicale dans les cas de SVAS (Duque Lasio & Kozel, 2018), pour lequel trois techniques ont été décrites, avec un taux de réussite similaire (Roemers et al., 2018). Néanmoins, une réintervention est souvent nécessaire dans le cas des sténoses artérielles (Min et al., 2020), et les patients atteints de SVAS ont une mortalité qui reste élevée post opératoire, par rapport à la population normale (SVAS isolés et WBS confondus) (Roemers et al., 2018).

Maladies acquises et vieillissement

Des maladies non génétiques peuvent également toucher les fibres élastiques. Ces maladies acquises peuvent survenir à la suite d'expositions trop importantes à des facteurs environnementaux dont l'impact est négatif, tels que la fumée de cigarette ou les rayons UV. Des facteurs secondaires résultant de pathologies peuvent aussi entrer en jeu, comme une hyperglycémie chronique, chez les personnes diabétiques ou lors d'inflammations chroniques (Duca et al., 2016; Procknow & Kozel, 2022). Ces maladies se développent surtout à l'âge adulte. Les fibres élastiques finissent par perdre leur fonctionnalité, ce qui entraîne des complications de type emphysème pulmonaire, hernies ou dilatations des vaisseaux. Des enfants peuvent également souffrir de pathologies dites « acquises » mais qui sont en fait secondaires à une autre pathologie, notamment dans le syndrome de Sweet. Le syndrome de Sweet est caractérisé par une dermatose aiguë neutrophilique qui installe un contexte inflammatoire qui peut avoir un impact négatif sur les fibres élastiques et entraîner une deuxième pathologie appelée syndrome de Marshall, considérée comme une cutis laxa acquise (voir [Tableau 6](#)) (Timmer-DE Mik et al., 2009).

Finalement, le vieillissement est également facteur d'une perte de fonctionnalité des tissus élastiques (peau, vaisseaux, poumons) qui peut être plus ou moins importante, et favoriser la progression rapide de pathologies préexistantes. Il est connu depuis longtemps que les vaisseaux sanguins ont tendance à devenir plus rigides avec l'âge, et l'artériosclérose est d'autant plus grave au niveau des artères élastiques puisque la perte de leur élasticité aura des impacts sur tout le reste de l'arbre vasculaire, mais aussi sur les organes périphériques, qui ne seront plus protégés du flux pulsatile cardiaque. La rigidification des artères élastiques a également des conséquences sur le cœur puisqu'elle le fatigue d'avantage sur chaque cycle, et augmente les risques d'insuffisance cardiaque.

Le concept du continuum des maladies cardiovasculaires (continuum CVD) théorise l'engrenage qui se met en place dès que la fonction vasculaire est compromise. Les facteurs de risque communément admis sont l'obésité, l'hypertension, le diabète de type 2 et le fait de fumer (Chrysant 2011). Certains chercheurs, dont O'Rourke et al., 2010 ont donc proposé de compléter le continuum CVD par l'ajout d'un versant propre au vieillissement vasculaire (Campana, 2020) ([Figure 16](#)). En effet, il a été montré que la rigidité artérielle est un facteur de risque pertinent pour prédire les risques cardiovasculaires. La mesure de vitesse d'onde de pouls (PWV ; *pulse wave velocity*), qui est un marqueur de la rigidité vasculaire, s'est avérée utile pour la prise en charge clinique de certains patients souffrant déjà d'hypertension (Ben-Shlomo et al., 2014). La rigidification de la paroi artérielle est une conséquence naturelle du vieillissement, cependant plusieurs facteurs peuvent induire sa survenue précoce (cigarettes, alimentation, sédentarité) (Tsamis et al., 2013).

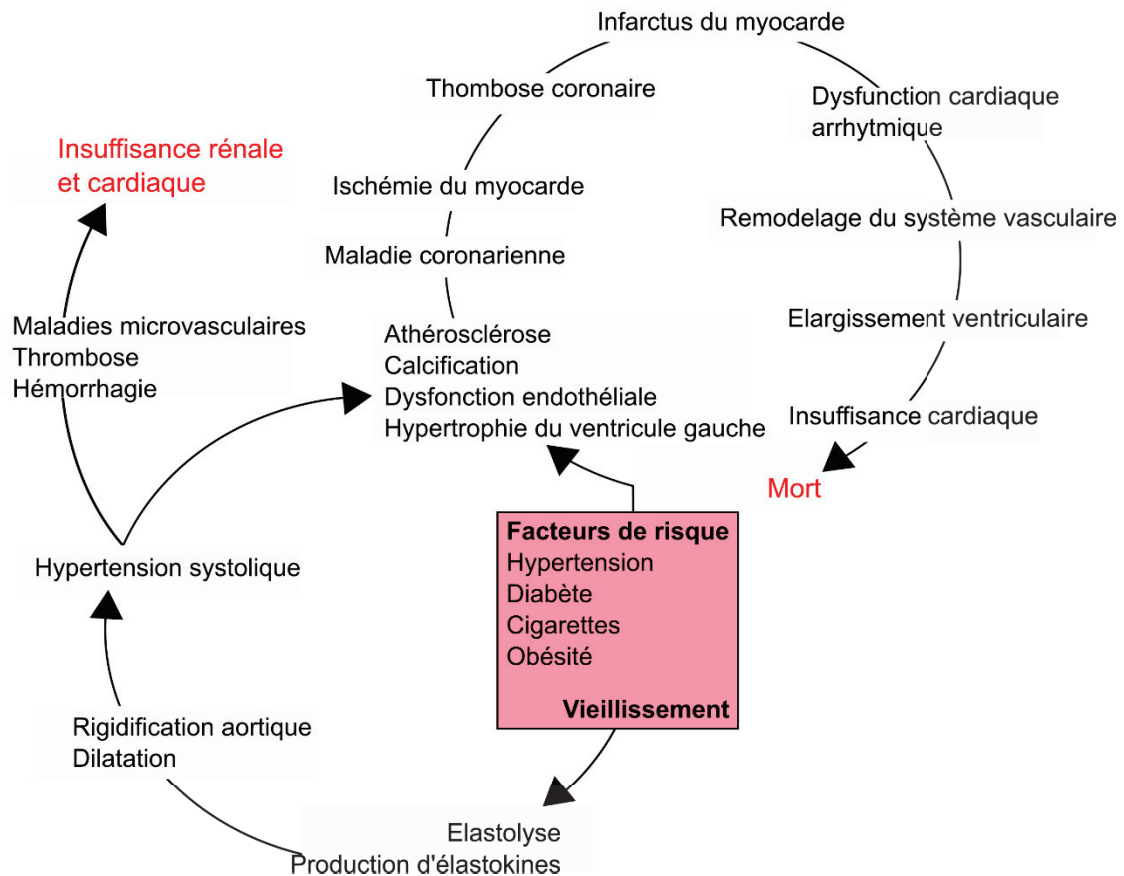


Figure 16. Continuum des maladies cardiovasculaires et du vieillissement.
Inspiré de Wahart et al. 2019 et Gonçalves Campana et al. 2020.

Candidats thérapeutiques actuels pour réparer les fibres élastiques

Malgré l'absence de traitement disponible pour remédier aux causes primaires des déficiences en élastine ou en fibres élastiques, quelques molécules ont tout de même été décrites comme de potentiels candidats thérapeutiques. Les solutions les plus étudiées sont la synthèse *de novo* de fibres élastiques ou **néoélastogenèse**, et la prévention voire l'inhibition de la dégradation des fibres. Les molécules décrites à ce jour qui pourraient avoir ces effets *in vivo* sont le **minoxidil**, le **cortistatine** et le **losartan**.

Le **minoxidil** est un ouvreur des canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}), connu pour ses effets de vasodilatation périphérique. Il peut être utilisé dans des cas d'hypertension artérielle permanente et réfractaire (ou résistante), c'est-à-dire pour lesquels il est impossible d'abaisser la tension avec les traitements habituels (Girardin & Pechère-Bertschi, 2005; Haschke, 2018). Les traitements au minoxidil sont cependant associés à des effets secondaires importants comme la cardiomégalie, la formation d'œdèmes et l'hypertrichose (Duque Lasio & Kozel, 2018) ainsi qu'à une tachycardie et une rétention sévère de liquide, qui sont directement contrebalancées par l'association systématique d'un diurétique et d'un bêta-bloquant au traitement (Girardin & Pechère-Bertschi, 2005; « Médicaments pour traiter l'hypertension », 2017).

Il a été montré que le minoxidil était capable d'augmenter le dépôt d'élastine dans les fibres élastiques, et de normaliser le PWV sur modèles murins, sans effet sur le collagène. D'autres ouvreurs de K_{ATP} ont été testés comme le diazoxide et le pinacidil, avec des effets similaires. Ces traitements sont intéressants mais pourraient être améliorés par un ciblage plus précis. De plus, les fibres

néoformées diffèrent des fibres originelles par leur arrangement et leur orientation (Fhayli, Boyer, et al., 2019).

Deux autres molécules ont été décrites comme ayant un effet protecteur contre la dégradation des fibres élastiques : la **cortistatine** (un neuropeptide) et le **losartan** (antagoniste du récepteur à l'angiotensine II), qui est également utilisé dans le traitement des hypertensions artérielles. Le losartan a un effet protecteur sur les fibres élastiques puisqu'il empêche l'activation des MMP dans un contexte d'hypertension chez le rat (Martins-Oliveira et al., 2013). La cortistatine joue aussi un rôle protecteur en bloquant la voie ERK1/2, ce qui diminue l'expression des MMP-2 et 9, la formation de ROS et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale chez la souris (Chai et al., 2018).

Il a aussi été rapporté que les extraits d'**aneth** avaient des effets proélastogéniques sur les fibroblastes dermiques humains (Cenizo et al., 2006), ainsi qu'*in vivo* dans les aortes de souris âgées (Fhayli et al., 2020). La surexpression du **versican** (plus particulièrement du variant V3), pourrait également favoriser le dépôt de l'élastine et la néosynthèse de fibres *in vitro* et *in vivo* après lésion vasculaire (Hinek et al., 2004; Merrilees et al., 2002; Wight et al., 2014).

Comme vu précédemment, la régulation de l'expression de l'élastine est très complexe, et jouer sur l'activation ou l'inhibition des facteurs impliqués entraîne des effets indirects qui réduisent les bénéfices potentiels du traitement par l'activation concomitante de MMP, ou la dérégulation d'autres voies. Cet axe de recherche est néanmoins très intéressant, car étant donné la durée de vie particulièrement longue des fibres élastiques, un traitement stimulant la néosynthèse de fibres pourrait être efficace après une intervention unique. Des stratégies thérapeutiques autour de l'utilisation de miRNA ont par exemple été proposées, mais elles nécessitent de développer une plus grande spécificité au niveau des cibles du système et pourquoi pas également des adressages spécifiques à un tissu ou un site particulier pour éviter les effets secondaires (Duque Lasio & Kozel, 2018).

Une autre approche consisterait à réduire au maximum la dégradation des fibres en diminuant par exemple l'inflammation de bas grade, la glycation et toute autre modification capable de favoriser la destruction des fibres (Sherratt, 2009).

IV. Les elastin-like polypeptides

Les *elastin-like polypeptides* (ELP) sont des biopolymères inspirés de la tropoélastine. Comme mentionné précédemment, ils sont caractérisés par la présence de répétitions de motifs contenant le pentapeptide **VPGXG** (avec X = tout acide aminé excepté la proline), qui est très présent dans les domaines hydrophobes de la TE (Varanko et al., 2020). Cependant, d'autres motifs présents dans les domaines hydrophobes sont parfois utilisés (Ciofani et al., 2013; Flamia et al., 2004; Martino & Tamburro, 2001). Comme la TE, les ELP sont des polypeptides intrinsèquement désordonnés, c'est-à-dire que leur structure tridimensionnelle n'est pas fixe et qu'ils ne forment pas de structures secondaires stables (Roberts et al., 2015). Cette caractéristique leur confère un comportement physicochimique unique qui leur permet de « répondre » à certains stimuli de manière totalement réversible, et en fait donc des polymères intelligents (ou *smart polymers*) très intéressants pour des applications biotechnologiques et biomédicales (Amiram et al., 2011; MacEwan & Chilkoti, 2010).

Le terme *elastin-like recombinamer* (ELR) peut également être utilisé. Les deux termes désignent des polypeptides inspirés de la TE, mais les ELR sont souvent des recombinaisons chimériques qui peuvent incorporer des motifs n'appartenant pas à la TE. Les ELP sont en général

uniquement basés sur les motifs hydrophobes de la TE. Le terme ELR souligne également un mode de production basé sur l'expression de protéine recombinante (*recombinamer*) par un système hétérologue (Rodríguez-Cabello et al., 2022). Cependant, dans les faits, les ELP sont également produits de cette manière (Varanko et al., 2020).

L'utilisation des ELP/ELR pour des applications biomédicales est avantageuse pour plusieurs raisons :

- (i) Premièrement, les ELP étant des peptides, ils ne sont pas dangereux et sont dégradables par l'organisme sans formation de produit toxique. Il en va de même concernant les risques de réponse inflammatoire liés à l'administration de la molécule, qui sont fortement réduits. Les ELP partent donc avec un avantage considérable au niveau de la biocompatibilité et de l'immunogénicité, comparés par exemple aux polymères synthétiques non-biologiques (Nair & Laurencin, 2006).
- (ii) La séquence des ELP peut être modulée facilement pour adapter le comportement physicochimique de la protéine finale (séquence et taille importantes), ou pour y incorporer des séquences précises, des groupes fonctionnels ou des parties d'autres protéines (ou protéines entières) (Hassouneh et al., 2012). Des molécules thérapeutiques ou des peptides d'adressage pour cibler la prise en charge de l'ELP peuvent y être liés, ou des *cell penetrating peptides* pour que l'ELP soit internalisé dans la cellule (Milligan et al., 2022).
- (iii) La production des ELP est également aisée puisqu'on peut les produire comme des protéines recombinantes, et plusieurs systèmes ont été rapportés. En plus des bactéries usuelles utilisées pour l'expression de protéines recombinantes (*E. coli*), d'autres systèmes tels que des levures, ou autres champignons ont été décrits, ainsi que des cellules végétales (Despanie et al., 2016). De plus, et contrairement à la TE humaine, les ELP peuvent être produits en relativement grandes quantités.
- (iv) Le fait que les ELP soient codés génétiquement permet aussi d'obtenir des polymères qui sont tous semblables et qui forment donc une population monodisperse, ce qui est un point fort comparé à d'autres polymères synthétiques souvent « contaminés » par des intermédiaires de synthèse. De nombreux paramètres sont régis par la taille des molécules, comme la biodistribution de la molécule, sa demi-vie plasmatique et son taux de clairance. Celle des ELP est directement contrôlée lors du design de la séquence et peut donc être modulée facilement suivant l'application qu'on envisage (Kuna, Waller, et al., 2018).
- (v) Les ELP possèdent des caractéristiques physico-chimiques intéressantes, similaires à ce qui a été décrit pour la TE. Ce sont des molécules sensibles à la température, celle-ci déclenchant des changements de comportement importants. En effet, les ELP sont capables, comme la TE, de coacerver lorsque soumis à certaines conditions, les motifs VPGXG étant suffisants pour conférer cette thermo-sensibilité (Rapaka & Urry, 1978). Entrent en jeu également le pH, la concentration du polypeptide et la force ionique de la solution (Meyer & Chilkoti, 2004). De plus, ces conditions sont compatibles avec des applications biologiques puisque les températures de transition peuvent être proches de 37° C. Cette propriété d'autoassemblage réversible et contrôlé par des paramètres environnementaux permet plusieurs applications, comme par exemple la purification par cycle de transition inverse (ITC), illustrée Figure 17. (Meyer & Chilkoti, 1999). Cette méthode permet de purifier facilement les ELP (ou les protéines fusionnées aux ELP), sans ajout de produits supplémentaires, ce qui réduit également les risques de contamination du produit final (Fletcher et al., 2019). Les coûts sont également très faibles.

Toutes ces caractéristiques font des ELP des candidats particulièrement attractifs pour la recherche biomédicale et de nombreuses applications ont déjà été décrites, utilisant des ELP sous diverses formes (gel réticulé ou non, peptides libres solubles, organisés ou non) (Varanko et al., 2020).

Ils sont par exemple grandement étudiés pour la délivrance ciblée de molécules thérapeutiques et particulièrement pour le ciblage des cancers (Milligan et al., 2022; Peddi et al., 2020). De nombreuses stratégies ont été développées au cours des dernières années visant des applications dans divers domaines tels que le diabète, la médecine régénérative, la thérapie génique ou les maladies respiratoires (Despanie et al., 2016; Varanko et al., 2020). Cependant, aucun ELP n'a pour l'instant été validé pour la mise sur le marché.

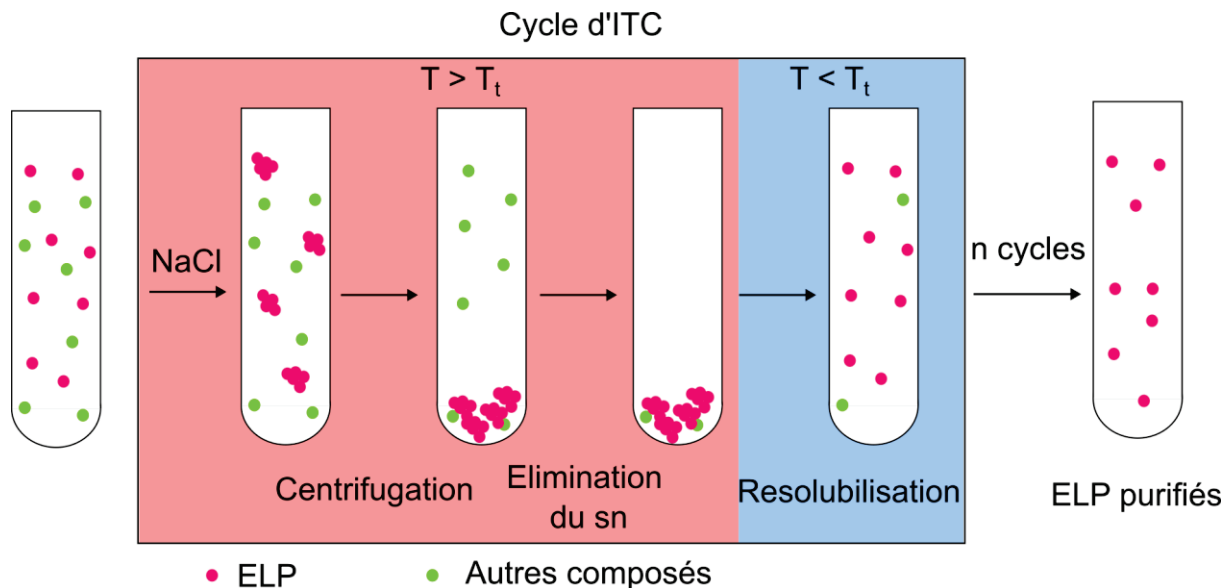


Figure 17. Méthode de purification des ELP par cycle de transition inverse (ITC).
 T_t = température de transition ; sn = surnageant ; ELP = elastin-like polypeptides.

Au niveau du système cardiovasculaire, des ELP ont été étudiés pour améliorer les dispositifs d'endoprothèse vasculaire ou *stent*. L'endoprothèse, qui consiste en une sorte d'échafaudage en métal de forme cylindrique, serait inclus dans un hydrogel qui contient des ELP avant sa pose dans le vaisseau. Gonzalez de Torre et al. (2015) ont montré que les stents recouverts d'ELP étaient totalement biocompatibles et non-thrombogéniques, qu'ils étaient stables lorsque soumis à un flux important et qu'ils permettaient une endothélialisation complète en moins de 2 semaines. Ces premières expériences ont cependant été réalisées *in vitro* et un test sur organisme vivant reste nécessaire pour valider les bénéfices apportés par les ELP.

Plus récemment, González-Pérez et al. (2022) ont décrit des valves veineuses fabriquées en partie d'ELP, qui pourraient servir lors d'insuffisance veineuse chronique. Ils ont pu démontrer une endothélialisation efficace, ainsi que la faible adhésion des plaquettes sur le matériau et ont également validé les performances hémodynamiques de la valve, sur des expériences *in vitro*.

D'autres applications cardiovasculaires sont également en cours d'investigation et ont été décrites en détail par Gonzalez de Torre et al., (2020).

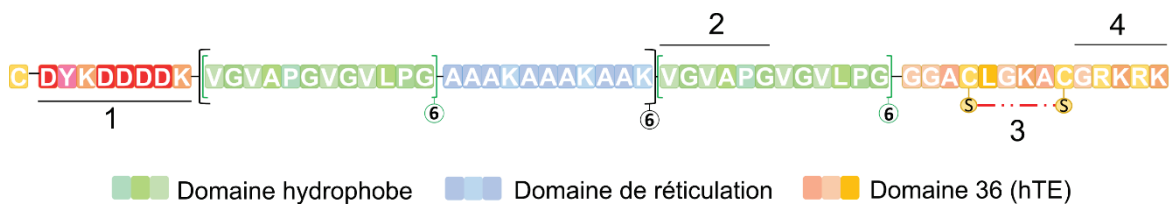
La SEP : protéine élastique synthétique

Face au constat du manque de propositions thérapeutiques auquel sont confrontées toutes les personnes atteintes de déficience en élastine, le développement de nouvelles stratégies pour améliorer leurs conditions de vie est nécessaire.

C'est dans ce contexte que se positionne le projet *Arterylastic* (n° ANR-18-CE18-0001) en proposant l'utilisation d'un ELR, nommé **protéine élastique synthétique** ou **SEP**, comme prothèse moléculaire capable de réparer les fibres élastiques défectueuses *in situ*, au niveau des vaisseaux sanguins. Le projet *Arterylastic* implique trois laboratoires de recherche : le LBTI à Lyon (UMR5305), HP2 à Grenoble (Inserm U1300) et SAINBIOSE à Saint-Etienne (U1059) et la SEP a été brevetée en 2016 (Brevet #WO2017194761, (Debret et al. 2017)).

La SEP est composée d'une alternance de domaines de réticulation et de domaines hydrophobes dont la séquence a été simplifiée comparée à la TE humaine (hTE). Les domaines hydrophobes contiennent les motifs VGVAPG et VGVLPG, capables d'activer l'ERC. La SEP possède aussi un domaine C-terminal avec le pont disulfure et le motif GRKRK spécifiques au domaine 36 de la hTE. Ce domaine est important pour la formation des fibres élastiques, ainsi que pour l'interaction de la SEP avec certaines intégrines (voir [Figure 18](#)). Un tag FLAG a aussi été ajouté au niveau N-terminal pour pouvoir suivre la protéine plus facilement et la différencier de la hTE.

La SEP conserve les caractéristiques physicochimiques de la hTE. Elle sera présentée plus en détail dans la partie Résultats – Axe 2.



	Motif / Domain	Rôle ou interactions connues	Références
1	Tag FLAG	Suivi de la protéine	
2	(X)GXXPG	Signal ERC	Duca et al. 2016
3	Pont disulfure	Formation des fibres élastiques	Nonaka et al. 2014
4	GRKRK	Interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	Bax et al. 2009

Figure 18. Séquence et organisation des domaines formant la SEP.

hTE = tropoélastine humaine ; *ERC* = complexe récepteur de l'élastine.

Objectifs de la thèse

Les maladies génétiques liées à une déficience en élastine sont appelées élastinopathies et comprennent le syndrome de Williams-Beuren, la cutis laxa autosomique dominante et les cas de sténose aortique supra-avalvulaire isolée. Dans ces pathologies, tous les tissus élastiques sont plus ou moins impactés. Cependant, les modifications survenant au niveau du système cardiovasculaire sont les plus sévères et peuvent être fatales. L'étude des élastinopathies et des complications vasculaires qui leur sont associées est réalisée dans la grande majorité des cas sur des modèles rongeurs (rats, souris). La compréhension des mécanismes entraînant la pathogenèse avance peu à peu, mais aucune solution thérapeutique n'a pu être développée à ce jour. En effet, la recherche de traitement pour réenclencher la production de fibres ou pour réduire au maximum leur dégradation n'a pour l'instant donné aucune solution satisfaisante pour éviter une évolution défavorable de la situation des patients atteints. Dans ce contexte, mon projet de thèse vise à fournir des alternatives, dans le but de diversifier les stratégies de recherche actuelles, et se décline en deux axes principaux :

- **Axe 1** : proposer un modèle alternatif pour l'étude des élastinopathies et plus particulièrement des atteintes cardiovasculaires qu'elles entraînent, avec l'utilisation du poisson-zèbre (*Danio rerio*) ;
- **Axe 2** : évaluer le potentiel thérapeutique d'une protéine élastique synthétique (SEP) développée dans le laboratoire (Brevet #WO2017194761, (Debret et al. 2017)) et inspirée de la tropoélastine humaine, en validant les premiers points identifiés comme indispensables pour la suite du projet.

Axe 1

Dans un premier temps, le rôle de l'élastine et son expression dans le système cardiovasculaire du poisson-zèbre adulte ont été étudiés pour déterminer précisément la pertinence du modèle, ainsi que les similitudes et différences entre humains et poissons.

Ce travail a donné lieu à la publication d'une **revue** dans *IJMS* en février 2022.

Une lignée de poissons-zèbres mutants, déficients en élastine a ensuite été caractérisée pour mieux comprendre le rôle de la protéine dans le système cardiovasculaire du poisson, mais surtout pour évaluer si le modèle serait utilisable pour récapituler les symptômes retrouvés dans les déficiences humaines en élastine au niveau cardiovasculaire.

Ces travaux ont également abouti à la publication d'un **article** dans *Cells* en mai 2023.

Axe 2

La deuxième partie du projet se concentre sur l'évaluation du potentiel de la SEP à être utilisée dans un but thérapeutique, en tant que prothèse moléculaire pour la réparation ou la formation *de novo* de fibres élastiques *in situ* au niveau de la paroi vasculaire.

En théorie, une fois injectée par voie intravasculaire, la SEP rejoindrait la média et s'intégrerait aux fibres élastiques pour leur rendre leur fonctionnalité. Ainsi, la SEP pourrait « réparer » les fibres dysfonctionnelles, ce qui permettrait d'éviter les complications graves pouvant survenir aux suites de déficiences importantes en élastine.

Les objectifs fixés pour ce travail de thèse se concentrent sur la validation de premières étapes du projet, pour s'assurer de la faisabilité de cette stratégie.

Les caractéristiques indispensables de la molécule pour son évolution vers la clinique sont : (i) son innocuité ; (ii) sa capacité à traverser la barrière endothéliale pour atteindre les cellules de la média et (iii) sa propension à être prise en charge par les CML et à former des fibres. Pour cela, des modèles *in vitro* sur cellules primaires humaines et *in vivo* sur embryons et larves de poissons-zèbres ont été utilisés. Tous ces points ne sont évidemment pas suffisants pour confirmer le potentiel thérapeutique de la SEP, mais constituent un premier pallier de validation.

Les résultats obtenus seront également soumis prochainement dans un article de recherche (article à soumettre).

De plus, ce travail fait partie d'un plus grand projet : le projet ANR *Arterylastic* (n° ANR-18-CE18-0001), qui implique trois laboratoires, tous focalisés sur des aspects différents et complémentaires.

Les résultats obtenus pendant ce travail de thèse seront présentés sous forme d'articles, avec un résumé en français du contexte et des principaux résultats pour chacune des publications. La discussion de ces résultats et les perspectives de recherche qui en découlent seront traitées ensemble, dans la dernière partie du manuscrit.

AXE 1

Utilisation du poisson-zèbre comme modèle pour l'étude des complications cardiovasculaires survenant lors d'élastinopathies

Le poisson-zèbre est un modèle en plein essor qui prend de plus en plus d'importance dans de nombreux domaines de la recherche biomédicale. Il permet d'obtenir un compromis avantageux entre la complexité d'une espèce vertébrée et la possibilité de réaliser des expériences dites « à haut débit », c'est-à-dire que de nombreux individus peuvent facilement être inclus dans l'expérience, ce qui augmente la puissance de ce que l'on peut tester (González-Rosa, 2022).

De ce fait, l'utilisation du poisson-zèbre dans les démarches de criblages est particulièrement intéressante, et ses avantages dépassent largement ceux du modèle murin.

Des approches de génétique classique et inverse permettent la mise en évidence et la validation de l'implication de nouveaux gènes candidats dans des phénotypes dommageables (Fitzgerald et al., 2015; Sassen & Köster, 2015). Des projets de grande envergure ont été mis en place comme par exemple le *Zebrafish Mutation Project*, qui a exploité la mutagenèse aléatoire par l'agent mutagène ENU (N-nitroso-N-éthyl urée) pour générer des mutants de 60% des gènes codants du poisson-zèbre, dans le but d'analyser ensuite leur phénotype (Kettleborough et al., 2013). De plus, les outils d'édition du génome se sont grandement affinés au cours des dernières années, avec l'optimisation du système CRISPR/Cas (*Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) sur le poisson-zèbre, qui permet maintenant de nombreuses modifications plus complexes telles que les knock-in ou les knock-out conditionnels (de Vrieze et al., 2021; Hwang et al., 2013; Li et al., 2019; Prykhodzij et al., 2018).

Le criblage de molécules, que ce soit pour déterminer leur toxicité ou au contraire pour mettre en évidence de potentiels effets bénéfiques ou thérapeutiques sur certains mutants, est également un domaine où l'utilisation du poisson-zèbre est très profitable (Bauer et al., 2021; Glaberman et al., 2017; Zon & Peterson, 2005). En effet, les œufs de poisson-zèbre peuvent être directement immergés dans une dilution du produit à tester (s'il est soluble), et les effets sont observés tout au long du développement.

Concernant l'étude des fibres élastiques, et particulièrement de celles qui se trouvent dans la paroi vasculaire, aucun modèle n'a pour l'instant été décrit chez le poisson-zèbre. Il serait donc intéressant d'en développer un pour apporter une alternative aux modèles souris ou rongeurs en général.

Pour cela nous avons d'abord estimé qu'il était nécessaire de faire un point sur ce qui était déjà connu et décrit dans la littérature concernant l'élastine du poisson-zèbre, sa présence dans le système cardiovasculaire du poisson, et les potentiels modèles pathologiques existants impliquant les protéines des fibres élastiques.

Cette partie du travail a donné lieu à la publication d'une revue dans *International Journal of Molecular Sciences* en février 2022, intitulée : *Zebrafish as a Model to Study Vascular Elastic Fibers and Associated Pathologies*.

Résumé de la revue

La tropoélastine est une protéine très conservée dans l'évolution et est présente chez tous les Vertébrés, à l'exception des Agnathes (poissons vertébrés sans mâchoires). Chez le poisson-zèbre, il en existe deux : l'élastine a et l'élastine b (ou parfois Eln1 et Eln2). En effet, de nombreux gènes ont plus d'un orthologue chez le poisson-zèbre, du fait d'une duplication complète de leur génome (*3rd round whole genome duplication* ; 3R WGD) ayant eu lieu chez un ancêtre de tous les poissons téléostéens, il y a environ 350 millions d'années.

L'alignement des séquences protéiques provenant des tropoélastines humaine, murine et de celles du poisson-zèbre a été réalisé pour permettre leur comparaison. L'élastine a du poisson-zèbre possède ainsi 36.6% d'identité avec la tropoélastine humaine (hTE), contre 64.2 % entre celles humaine et murine. L'élastine b est un peu plus éloignée, avec seulement 17.7% d'identité, et elle est d'ailleurs plus différente de l'élastine a que ne le sont la hTE et l'élastine a (33.5% identité entre Elna et Elnb et 36.6% entre Elna et hTE). L'organisation des domaines des élastines de poisson-zèbre est également construite sur une alternance entre domaines hydrophobes et de réticulation. Cependant, les fréquences d'occurrence de certains motifs sont différentes selon les espèces. C'est par exemple le cas au niveau des motifs de réticulation qui ont majoritairement la forme de KAAAK ou KAAK chez les mammifères et qui n'existent quasiment pas chez le poisson-zèbre. Des motifs KxxK sont bien présents dans ces espèces, mais prennent plutôt une forme où au moins l'un des x est une proline, voire les deux. Ces motifs de type KP existent aussi chez l'homme mais sont moins fréquents. Cette différence pourrait entraîner des liaisons de réticulation différentes, car ce type de motif ne promeut pas la formation des desmosines et isodesmosines retrouvées en grande quantité dans les fibres élastiques matures des mammifères. Le domaine C-terminal, important pour les interactions cellulaires de la TE et impliqué également dans la synthèse des fibres élastiques, est très conservé dans l'évolution et ses éléments principaux, à savoir un motif tétrabasique (composé de 4 acides aminés basiques) et un pont disulfure, sont également présents dans les élastines a et b du poisson-zèbre.

L'expression des élastines a et b atteint son maximum entre 6 et 8 jours post fertilisation, et diminue ensuite jusqu'à 23 jours, où elle atteint son niveau d'expression basale. Les organes et structures qui contiennent de l'élastine chez le poisson-zèbre sont le cartilage squelettique de la tête, la vessie natatoire, et au niveau du système cardiovasculaire, la paroi vasculaire, le bulbe artériel (BA) et les valves cardiaques. Les élastines sont souvent exprimées toutes les deux, avec cependant une forte prépondérance de l'Elnb au niveau du BA.

Une hypothèse propose que la duplication du gène de l'élastine aurait permis la néofonctionnalisation du gène de l'*elnb* et serait de ce fait à l'origine du BA, un organe très élastique qui se trouve à la sortie du cœur des poissons-zèbres. Les caractéristiques du BA sont d'avantage semblables à celles d'un vaisseau qu'à celles d'une chambre cardiaque.

En effet, le BA est constitué de cellules musculaires lisses et non de muscle cardiaque, et ce n'est pas une chambre contractile, comme l'atrium ou le ventricule. Le BA a été décrit comme un organe de « Windkessel », en référence à l'effet Windkessel, décrit dans les artères élastiques mammifères. Cependant, l'organisation de l'élastine dans cet organe ne semble pas similaire aux lamelles élastiques des grandes artères. On y retrouve plutôt des « fibrilles d'élastine », différentes des fibres élastiques au niveau de leur composition et de leurs propriétés mécaniques et leur organisation ne prend pas la forme des lamelles élastiques traditionnellement décrites dans la paroi des vaisseaux mammifères. Ces lamelles sont cependant présentes, en couches concentriques et alternant avec des cellules musculaires lisses, au niveau des aortes ventrale et dorsale.

Chez le poisson-zèbre, le lissage du flux sanguin a surtout pour but de protéger les vaisseaux des branchies, qui se situent juste après le cœur. En effet, l'organisation du système cardiovasculaire est sensiblement différente entre poissons et mammifères, comme abordé dans l'introduction. Le BA se situe à la sortie du cœur, après le ventricule, et donne ensuite naissance à l'aorte ventrale, qui achemine le sang jusque dans les branchies, où celui-ci est oxygéné. La circulation continue ensuite pour approvisionner la périphérie et revient dans le cœur par le sinus veineux, qui collecte le sang des veines principales.

La pression sanguine du poisson-zèbre est bien plus faible que celle des mammifères avec un pic à 2.51 mmHg au niveau du ventricule pendant la systole, alors qu'il est de 120 mmHg chez l'humain. Un gradient de pression est cependant présent le long de l'arbre vasculaire avec une chute importante au niveau des branchies, ce qui peut être attribué au travail du BA et de l'aorte ventrale.

Nous montrons dans cette revue, par des coupes histologiques, que l'élastine forme bien des lamelles dans la paroi vasculaire du poisson-zèbre, au niveau de son aorte ventrale et de son aorte dorsale. Des marquages à l'orcéine, permettant de mettre en évidence l'élastine, ou des immunohistochimies ciblant l'élastine, nous ont permis de mettre en évidence la présence d'élastine dans le BA, dans les valves cardiaques ainsi que dans les vaisseaux, de manière plus importante lorsqu'on est proche du cœur. On peut ainsi compter 8-10 lamelles à la sortie du BA, entre 4 et 5 plus loin dans l'aorte ventrale, et plus que deux dans l'aorte dorsale. Cependant la discrimination précise entre Elna et b n'a pas pu être faite, faute de méthode de marquage spécifique.

La dernière partie de la revue présente quelques modèles pathologiques mis en place chez le poisson-zèbre utilisés dans l'étude de maladies associées aux fibres élastiques. La plupart des composants des fibres élastiques humaines sont retrouvés chez le poisson-zèbre, de nouveau avec des copies surnuméraires dans la plupart des cas. On peut citer notamment : les fibrillines ; les MAGP ; les LTBP ; les ADAMTS ; les fibulines ; les EMILIN et les LOX. D'autres protéines impliquées indirectement dans des pathologies impactant les fibres élastiques ont aussi été étudiées, avec par exemple des modèles pathologiques de pseudoxanthome élastique, une pathologie caractérisée par une calcification ectopique des tissus, impactant particulièrement les fibres élastiques. Aucun modèle n'a pour l'instant été décrit concernant la mutation de l'élastine, que ce soit pour *elna* ou *elnb*.



Review

Zebrafish as a Model to Study Vascular Elastic Fibers and Associated Pathologies

Marie Hoareau *, Naïma El Kholti, Romain Debret and Elise Lambert *

Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR CNRS 5305, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université Lyon 1, 7, Passage du Vercors, CEDEX 07, F-69367 Lyon, France; naima.elkholti@ibcp.fr (N.E.K.); romain.debret@ibcp.fr (R.D.)

* Correspondence: marie.hoareau@ibcp.fr (M.H.); elise.lambert@ibcp.fr (E.L.)

Abstract: Many extensible tissues such as skin, lungs, and blood vessels require elasticity to function properly. The recoil of elastic energy stored during a stretching phase is provided by elastic fibers, which are mostly composed of elastin and fibrillin-rich microfibrils. In arteries, the lack of elastic fibers leads to a weakening of the vessel wall with an increased risk to develop cardiovascular defects such as stenosis, aneurysms, and dissections. The development of new therapeutic molecules involves preliminary tests in animal models that recapitulate the disease and whose response to drugs should be as close as possible to that of humans. Due to its superior *in vivo* imaging possibilities and the broad tool kit for forward and reverse genetics, the zebrafish has become an important model organism to study human pathologies. Moreover, it is particularly adapted to large scale studies, making it an attractive model in particular for the first steps of investigations. In this review, we discuss the relevance of the zebrafish model for the study of elastic fiber-related vascular pathologies. We evidence zebrafish as a compelling alternative to conventional mouse models.

Citation: Hoareau, M.; El Kholti, N.; Debret, R.; Lambert, E. Zebrafish as a Model to Study Vascular Elastic Fibers and Associated Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2102. <https://doi.org/10.3390/ijms23042102>

Academic Editor(s): Gilles Faury

Received: 30 December 2021

Accepted: 12 February 2022

Published: 14 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: zebrafish; elastic fibers; tropoelastin; elastinopathies; fibrillinopathies; cardiovascular diseases

1. Introduction

Elasticity is important for the proper function of multiple organs, such as skin, lungs, blood vessels, tendons, and elastic cartilages [1]. Concerning the cardiovascular system, elasticity is mostly important in elastic arteries to smooth the pulsatile blood flow coming from the heart into a continuous flow in order to protect the organs and provide an optimal and continuous perfusion of peripheral tissues. Indeed, elastic arteries store elastic energy during systole and are able to deliver this energy back during diastole. This is known as the Windkessel effect. It is the elastic component of the vessel wall that endows it with such mechanical behavior [2].

Elasticity is mainly provided by elastic fibers in tissues. Elastic arteries are therefore fitted with a high content of elastic fibers to allow them to fulfill their role and cope with high cardiac blood pressure [2]. In contrast, muscular arteries do not need as much elasticity, as they serve rather to distribute the blood around the whole body and regulate hemodynamics by vasomotion of smooth muscle cells [3]. Elastic fibers are composed mainly of elastin (ELN), a highly hydrophobic cross-linked polymer,

surrounded by fibrillin-rich microfibrils [4]. Elastin arises from the assembly of its monomeric protein precursor, tropoelastin, which is cross-linked during elastogenesis to form mature elastic fibers [4,5].

The study of vascular elastic fibers is important as several pathologies are linked to vascular deficiencies in elasticity, either from genetical or acquired causes. These pathologies are characterized by a loss of elastic fibers either regarding their quantity and/or their quality [6,7]. The term *fibrillinopathy* is used whenever the pathology affects the microfibrillar part of the elastic fibers, whereas the term *elastinopathy* is restricted to diseases directly affecting elastin. The major symptoms that arise from the lack of elasticity in vessels are due to the rigidification of the vessel wall, a condition that is also referred to as arteriosclerosis [8]. The vessel gets stiffer and weaker, leading to typical cardiovascular outcomes such as hypertension, aneurysm, dissection, or stenosis [6,7].

The zebrafish (*Danio rerio*) is a model organism widely used in biological research. It is a fresh water fish, part of the Cyprinids family in the ray-finned fish class [9]. Zebrafish and human genomes share around 70% homology. Moreover, 82% of morbidity-associated genes in human have been linked to at least one ortholog in the zebrafish [10]. These similarities support the relevance of the model, but the advantages of zebrafish are also practical. First, the zebrafish is a small organism and requires less infrastructure and nursing than mammalian models such as rodents. Their generation time is longer, approximately three to four months compared to 1.5 months for mice, but the descendants are far more numerous, with hundreds of eggs by clutch spawn every two or three days [9]. From a biological point of view, the zebrafish also offers the possibility to easily observe embryogenesis processes as embryos develop ex utero and are transparent during the first period of their life.

Zebrafish are also well adapted for genetic manipulations, with thousands of transgenic mutated strains or fluorescent reporter lines available. Numerous techniques have been developed, such as morpholino oligonucleotides, which allow the knockdown of targeted genes [11], but also genome-editing approaches based on zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) [12] and more recently, the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR/Cas9) system [13,14]. The CRISPR technique has also been developed to perform knockins and conditional knockouts in the zebrafish [15,16]. These modifications can be helpful to implement models with relevant characteristics of human diseases, such as specific variants associated with pathologies [17], restriction of genetic modifications to a precise time period and/or location [18], and also to avoid the compensations that are often associated with knockout experiments [19].

A chemical mutagenesis approach based on 1-ethyl-1-nitrosourea (ENU)-induced random mutations has also been smartly exploited by the Zebrafish Mutation Project [20] to generate knockout (KO) alleles of all protein-coding genes and analyze their phenotype [21]. All these techniques are efficient tools to analyze gene function in zebrafish. However, most of the zebrafish genes are present in more than one copy because of a whole genome duplication that occurred during teleost evolution history [22]. This is not a problem per se, but the investigation of potential paralogs is necessary.

Zebrafish are also highly suitable for large scale testing. For example, the model is widely used in toxicity tests [23–25] and in drug or therapeutic molecule discovery [26,27].

The use of animal models to study vascular fibrillinopathies and elastinopathies implies two prerequisites: the presence of comparable vascular elastic fibers in the model and the similarity of the cardiovascular system, which should react, at least to some extent, in the same way than in human when missing elastic fibers and/or elastin. To evaluate the relevance of the zebrafish model regarding this concern, we discuss in this review the basic differences between zebrafish and human tropoelastins, with respect to their protein sequences and the duplication event that conferred two tropoelastin genes to the zebrafish. We then describe the cardiovascular system of the zebrafish, with a particular emphasis on its composition in elastic fibers, even if only a few studies have approached this subject. We also present histological sections of adult zebrafish heart and vessels, showing their elastin content and organization in cardiovascular tissues. Lastly, we give an overview of already existing zebrafish models of vascular pathologies involving elastic fibers, and discuss the model relevance in this physiopathological field.

2. Tropoelastin in the Zebrafish

Tropoelastin is found in all vertebrates except for Agnathans, the superclass of jawless fish [28], and does not seem to exist in invertebrates as all tested specimens were devoid of it [29]. Due to a whole genome duplication (WGD), also called teleost-specific “TS” or 3rd round “3R” WGD that occurred approximately 350 million years ago and gave rise to the teleost branch, most of human genes have more than one ortholog in the zebrafish [30,31]. Therefore, zebrafish and teleost in general, have two different elastin genes named *elna* and *elnb* (or sometimes *eln1* and *eln2*) coding for two distinct tropoelastin proteins: Elna and Elnb, respectively (Figure 1).

2.1. Sequences

General characteristics of both tropoelastin genes and proteins in zebrafish are summarized and compared with their mouse and human orthologs in Figure 1A. The *elna* and *elnb* zebrafish paralogs are located on different chromosomes (chr), chr 15 and chr 21, respectively, but they share conserved synteny among them and with their human and mouse orthologs as demonstrated by the proximity with *LIM domain kinase 1* (*limk1*) genes in all species [36].

Protein sizes differ a lot between mammals and zebrafish. Elna and Elnb are respectively 101 kilodaltons (kDa) with 57 exons and 173kDa with 59 exons, compared with human, whose tropoelastin is around 68 kDa and composed of 34 exons. There was no obvious sign of alternative splicing reported for these zebrafish tropoelastins, so we can consider that they are indeed much bigger than their mammal counterparts. Alignments of protein sequences with EMBOSS-Needle (EMBL-EBI) revealed that Elna was closer to human tropoelastin (ELN) than Elnb. They share approximately 37% identity and 41% similarity, whereas for Elnb, around 18% identity and 21% similarity were calculated. The difference between Elna and Elnb is also very important, being even less close between each other than Elna and tropoelastins from both human and mouse (Figure 1B).

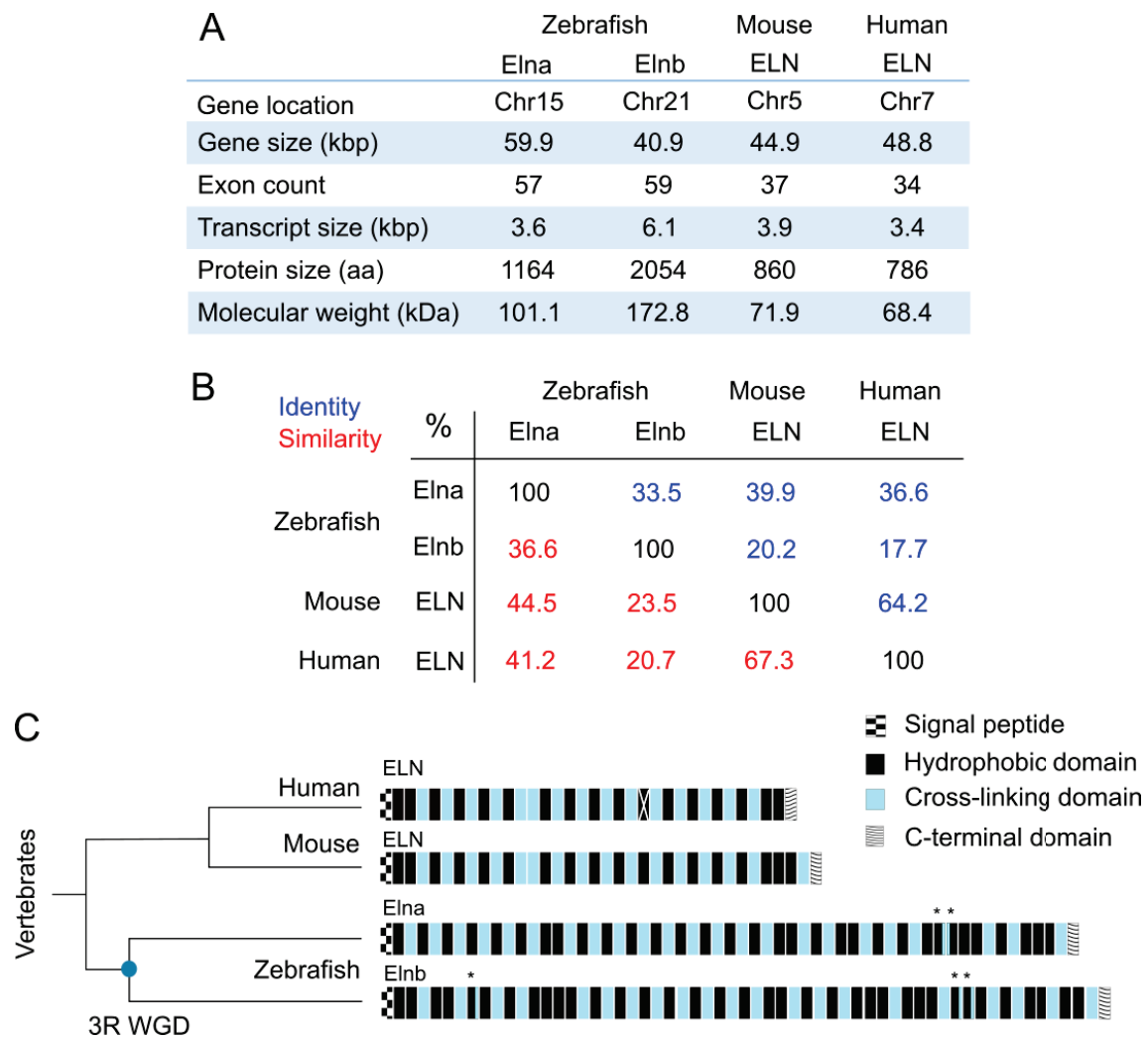


Figure 1. Comparison of tropoelastin sequences from zebrafish (*Danio rerio*), mouse (*Mus musculus*) and human (*Homo sapiens*). (A) Main characteristics of the four tropoelastins previously mentioned; kbp = kilobase pairs; kDa = kilodalton; aa = amino acid; Chr = chromosome; Data from GenBank, RefSeq NCBI and UniProt; (B) matrix table of the identity and similarity percentages resulting from the alignment of tropoelastin protein sequences from zebrafish (Elna TR|Q0Q5Z1|Q0Q5Z1_DANRE, Elnb TR|Q0Q5Z0|Q0Q5Z0_DANRE), mouse (ELN SP|P54320|ELN_MOUSE) and human (ELN SP|P15502|ELN_HUMAN) from UniProt, with the EMBOSS-Needle tool from EMBL-EBI; (C) representation of tropoelastin domains in human (ELN), mouse (ELN), and zebrafish (Elna and Elnb). Zebrafish have two tropoelastins due to a duplication event, the 3rd round whole genome duplication (3R WGD), which is symbolized by a blue round on the schematic phylogenetic tree chart. Each rectangle represents a domain, the white cross on human ELN exon 22 represents the fact that it is spliced in all transcripts; * indicates domains with both hydrophobic and cross-linking characteristics; exons 13 and 14 in human ELN are not always attributed this way [32–35].

Zebrafish tropoelastin amino acid sequences share some particularities in their organization with other tropoelastin sequences from vertebrates. They are all composed of alternating hydrophobic domains and cross-linking domains (Figure 1C) [1,34]. This structure is probably important for the capacity of the protein to self-assemble and also for its elastomeric mechanical properties [4]. The C-terminal domain of the protein is highly conserved among vertebrate species. It contains a tetrabasic motif that intervenes in tropoelastin interactions with other proteins such as integrins, and is therefore important for cell adhesion [37]. There are also two cysteines that form a disulfide bond, which was

shown to facilitate elastic fiber assembly [38]. These characteristics found in all described tropoelastins are likely to be the “fundamental” requirements to obtain a functional protein. However, although the presence and arrangement of hydrophobic domains are globally well conserved, the nature of these domains are very different from one species to another. It surely means that the global characteristics of domains are far more important than their precise sequences. Most of the domains in tropoelastins are encoded by specific exons. However, in zebrafish tropoelastins and particularly in *Elnb*, some otherwise hydrophobic domains contain cross-linking-specific motifs, resulting in “hybrid” domains, indicated by asterisks on Figure 1C. In addition, hydrophobic domains of *Elnb* are larger on average than those of other tropoelastins, but both zebrafish tropoelastins are less hydrophobic than mammal ones (as per the Kyte-Doolittle scale that measures hydrophathy [39]), most likely due to an increase in the glycine content compared to valine and alanine [40]. Concerning the cross-linking motifs, some divergence between on one side Mammals and Aves compared to on the other side Amphibians and Fish can be noted. Whereas the most common motifs are KAAAK or KAAK in Mammals and Aves, KAAAK is not found in Amphibians and Fish and KAAK is only rare. They rather take the form of KxxK motifs with at least one of the x being a proline, a sequence rather rare in other tropoelastins (3 occurrences in human, 4 in mouse vs. 10 occurrences in *Elna* and 13 in *Elnb*, as reported by Chung et al. [34]). These KP-type motifs could also lead to different cross-links as they do not promote the formation of usual desmosine and isodesmosine cross-links [41], which were as a matter of fact reported to be less present in teleost and amphibian elastins [42].

2.2. Spatio-Temporal Expression

The expression of both *elna* and *elnb* mRNA peaks at six to seven days post-fertilization (dpf) and decreases at eight dpf to reach a basal level of expression at 23 dpf, which corresponds to the end of the metamorphosis stage and almost the start of the juvenile stage in zebrafish life cycle [43]. This kinetic of expression is comparable to mammals, in which the elastin gene is particularly active during the last third of fetal development and during the perinatal period. After this peak, mRNA levels decrease to reach a low constitutive level at the end of growth period [44,45].

When two similar genes coexist, one of them can progressively disappear or mutate enough to give a protein with new functions. If the mutation is advantageous, it is more likely to persist and become the dominant version with time. The duplicated gene has three main possible fates: (i) pseudogenization or non-functionalization: one of the copies is silenced; (ii) subfunctionalization: both copies take over some roles that were already given to the ancient protein, or sometimes the pattern of expression is distributed within both orthologs so that each one specializes in different regions; (iii) neofunctionalization: one of the copies acquires a new function [30,46]. In the case of zebrafish tropoelastins, both proteins are expressed and were detected, as expected, in elastic tissues: early in skeletal cartilage structures of the head, in the outer and inner wall of the swim bladder and in the cardiovascular system with some disparities depending on the elastin gene [43]. *elnb* was predominantly expressed in the bulbus arteriosus (BA), even if also present in vessels and in the swim bladder [43]. Specificities regarding its function still remain to be determined. However, a potential new role for *Elnb* has been

described in favor of neofunctionalization, and will be detailed in Section 3.1.5.

To further understand Elna and Elnb deposition in cardiovascular elastic tissues, we hereafter detail the anatomy and function of zebrafish cardiovascular system.

3. Zebrafish Cardiovascular System and Its Elastic Components

Vertebrates, from jawless fish to human, all share a basic organization of their cardiovascular systems, inherited from a common ancestor [47,48]. A simplified illustration of the zebrafish circulatory system is given in Figure 2A. Major constituents will now be described.

3.1. The Heart

In contrast to humans and their double circulation, zebrafish and fish in general have a simple circulation. In a double system, the systemic circulation is in parallel with the pulmonary circulation, and both oxygenated and unoxygenated blood goes through the heart, each in its dedicated side (left atrium and ventricle for the systemic circulation and right atrium and ventricle for the pulmonary circulation). In fish simple circulation, the unoxygenated blood is pumped by the heart and is led to gills, which are in series with the heart (Figure 2A) [49,50]. A fish heart is composed of two pumping chambers instead of four as in mammals: a single atrium that receives blood and a single ventricle that expulses it out. Nevertheless, the zebrafish heart is sometimes described as four-chambered. Indeed, we can distinguish four structures forming the heart: besides the atrium and the ventricle are the sinus venosus, which collects the blood from veins before pouring it in the atrium, and the bulbus arteriosus, right at the exit of the ventricle, that leads the blood from the heart to the ventral aorta (Figure 2B). These four parts of the zebrafish heart will be described in details in the next subsections, but the distinction should be made that only the atrium and the ventricle are contractile and with closing valves at both entry and exit, as chambers found in mammals are, so the other two should not be considered as “chambers” per se [47,49,50].

The heart of adult zebrafish is approximately 1.5 mm (height) × 1 mm (width), whereas an adult human heart is around 12 cm (length) × 8.5 cm (width) × 6 cm (thickness) [51,52]. Both organs are made of three layers: the endocardium, composed of endothelial cells that line heart cavities; the myocardium with all muscle cells or cardiomyocytes; and the epicardium, which is the surface of the heart, made mostly of epithelial cells and connective tissue [49]. As in other vertebrates, an acellular layer of extracellular matrix known as the cardiac jelly is present between the endocardium and the myocardium in zebrafish embryonic heart [53,54]. It is involved in heart development, playing a role in heart septation [55] and valve formation [56], not only by structural means, but also by influencing signaling pathways [57].

The blood pressure of zebrafish peaks at ~2.51 mmHg in the ventricle during systole, whereas it reaches around 120 mmHg in human. The minimum and maximum mean blood pressures in human aorta are 80 mmHg and 120 mmHg, respectively. In the zebrafish ventral aorta, the blood pressure varies from 0.8 mmHg to a little more than 2 mmHg [58]. Even if the values are far from one another, a pressure gradient along the arterial tree still exists: the highest point is in the ventricle and an important drop of pressure occurs across gills [50].

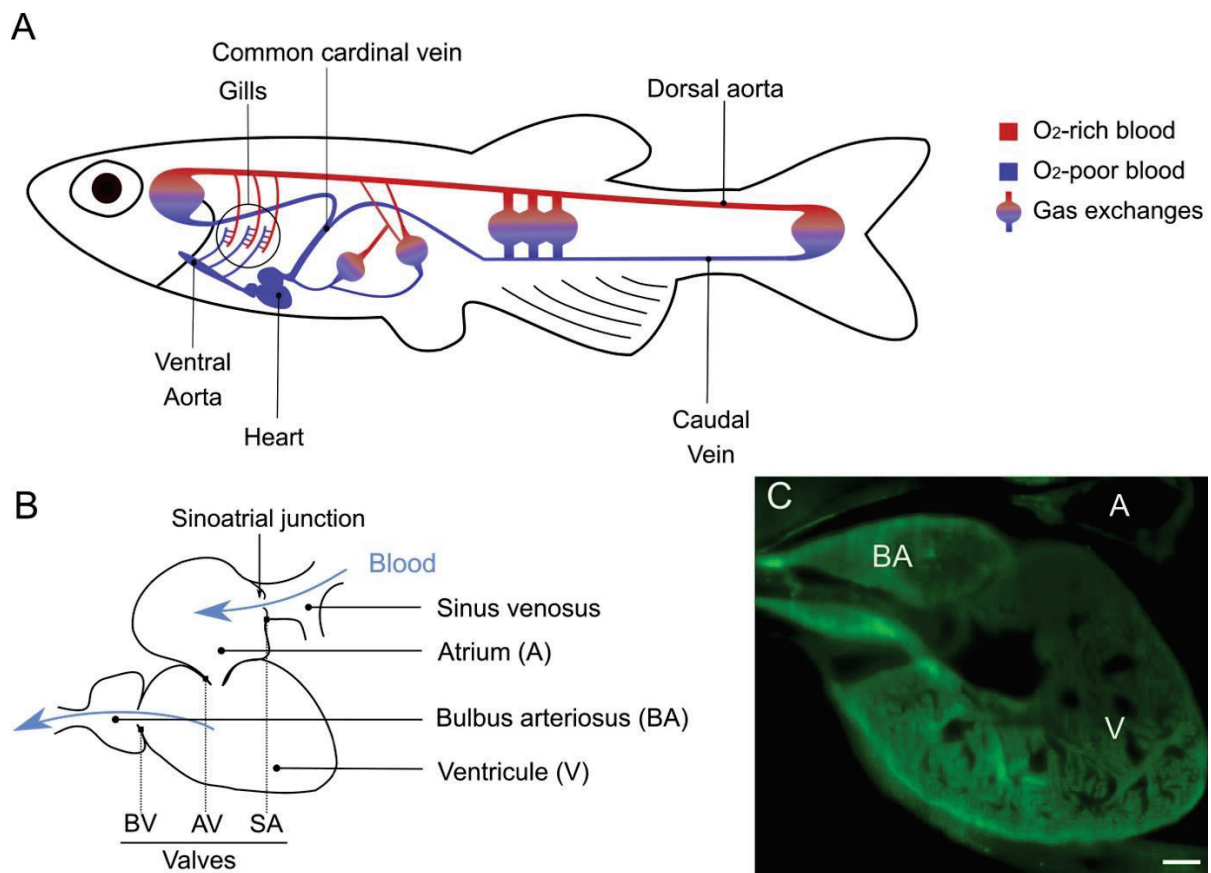


Figure 2. Zebrafish cardiovascular system. (A) Simplified illustration of the cardiovascular system of an adult zebrafish. The heart pumps deoxygenated blood to the ventral aorta, which distributes it to afferent branchial arteries, leading to gills (encircled). Once oxygenated, the blood is drained into efferent branchial arteries, to then be collected in the dorsal artery, which supplies the anterior and posterior parts of the fish. Exchanges are made in capillary beds and deoxygenated blood is returned to the heart for a new cycle. (B) Illustration of a zebrafish heart with its four cavities, the direction of blood is indicated by blue arrows; Valves are pointed with dotted lines; BV = bulboventricular; AV = atrioventricular; SA = Sinoatrial. (C) Image of an adult zebrafish heart obtained by light sheet microscopy (autofluorescence); the trabecular structure of the ventricle can be seen; Scale bar = 100 μm .

Cardiac electrophysiology is also studied a lot in zebrafish as it resembles human cardiac electrophysiology. Electrocardiogram patterns are comparable between the two species [58] and the zebrafish model shares some parameters that are closer to the human model than the mouse model. For example, their heart beats are closer (fish: 120–180 beats per minute (bpm); human: 60–100 bpm; mouse: 300–600 bpm), their cardiac phases timing is also more resembling, and the nature of ion channels involved in the process is different in mice, whereas the zebrafish shares more similarities, being therefore more relevant in this regard [59].

3.1.1. The Sinus Venosus

The sinus venosus (Figure 2B) collects all the unoxygenated blood that comes from the periphery by the common cardinal vein and the hepatic portal vein to send it to the atrium [58]. The sinus venosus has the thinnest wall of heart cavities [49], with almost no myocardium in the zebrafish, unlike in other fish [47]. The sinus venosus is a persistent structure in fish heart but it has a transitory equivalent in the human embryonic heart that merges with the right atrium to give the sinus

venarum, the part of the atrium between the inferior and the superior vena cava [60].

The sinus venosus is also important because it contains pacemaker cells and some conductive tissue, responsible for the rhythmic contractions of the heart. More precisely, these cells were found at the sinoatrial junction (Figure 2B), corresponding to the sinoatrial node in mammals. The specialized fibers (His bundle and Purkinje fibers) that are responsible for transmitting the action potentials throughout mammalian heart tissues do not seem to be present in the zebrafish [61,62]. It was suggested that the ventricular trabeculae, visible in Figure 2C, are responsible for the conduction of the impulse instead [59,63].

3.1.2. The Atrium

The atrium is mostly composed of cardiac muscle, with some extracellular collagen and elastin as well as interstitial cells. Unlike mammals, zebrafish cardiomyocytes form trabeculae, which are sorts of bundles. Mammalian myocytes are roughly rectangular whereas fish myocytes are smaller and more spindle-shaped [50,64].

3.1.3. The Ventricle

The ventricle is the principal contributor to the generation of blood pressure, the atrium being less involved. The ventricle has a pyramidal shape [58] and has two distinct layers, a trabecular one of higher density than in the atrium and a compact one (Figure 2C) [49]. It is, as the atrium, mainly composed of cardiac muscle (Figure 3A–C) with a thicker wall than the atrium. The compact layer is vascularized by coronary arteries and capillaries, coming from the efferent branchial arteries [49,58]. Some coronary vessels have also been found in the trabecular layer more recently [65]. As mammalian myocytes, zebrafish myocytes are connected by gap junctions with desmosomes, allowing the synchronization of all cells to cardiac rhythm [58]. There is however no t-tubule system in the zebrafish as those found in mammals. Also, contrarily to other vertebrates that rather adjust their heart rate to modulate their blood pressure, fish can change their stroke volume to obtain the same result [50].

3.1.4. Cardiac Valves

In zebrafish heart, valves are present between the sinus venosus and atrium (sinoatrial valve) [60], between the atrium and the ventricle (atrioventricular valve) and between the ventricle and the bulbus arteriosus (bulboventricular valve) (Figure 2B) [66]. They prevent the blood flow from going backwards. There are differences in the morphology and organization of valves between mammals and fish, such as (i) the absence of papillary muscle and the connection of chordae tendinae to the atrioventricular valve of the zebrafish heart; (ii) the bulboventricular valve of zebrafish, equivalent to mammal aortic valve, has only two leaflets instead of three; and (iii) as for many organs in zebrafish, its valves are capable of regeneration through the activation of transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathway [59,66–68]. Nevertheless, the zebrafish has been proven useful to understand valve development and physiopathology with the help of mutants that display valvular defects [59,69]. Orcein staining and elastin immunohistochemistry enable to highlight the presence of elastin in atrioventricular and bulboventricular valves of the zebrafish heart (Figure 3D–F).

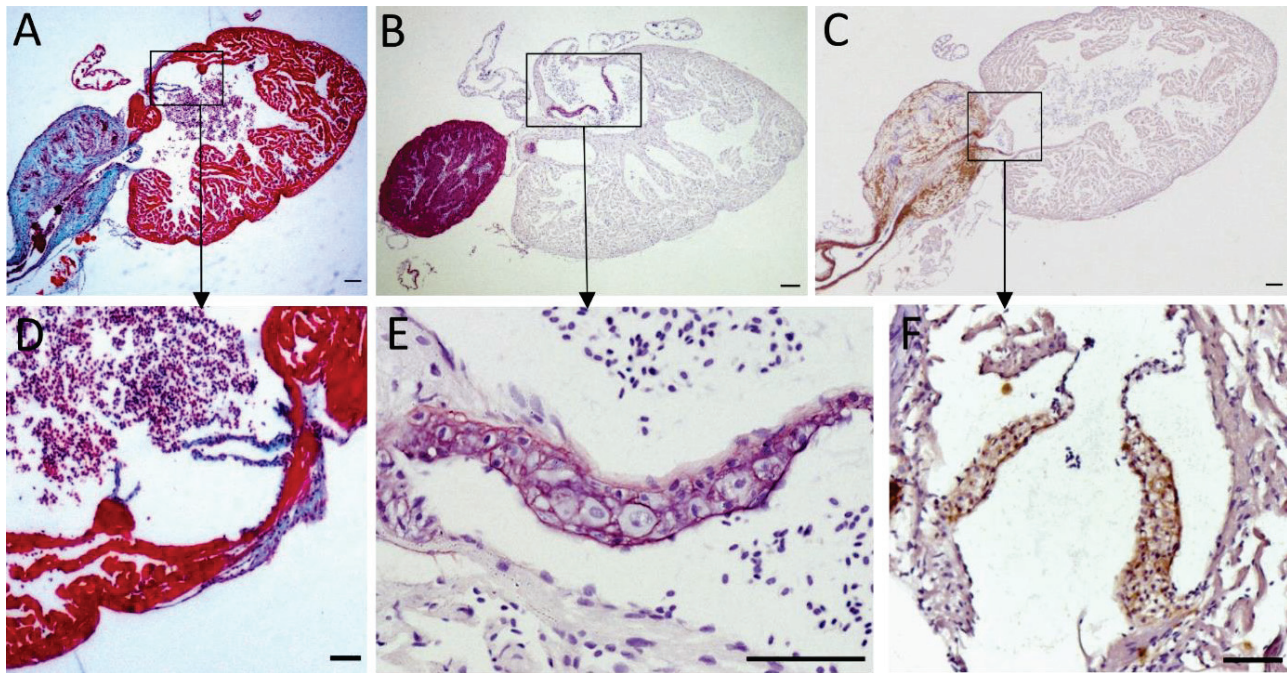


Figure 3. Elastin content of the zebrafish heart. Histological sections of adult zebrafish entire hearts (A–C) and cardiac valves (D–F). Sections were stained following different protocols: Masson-Goldner trichrome staining (A,D) makes muscle fibers appear in red, collagen in blue, and erythrocytes in pinkish violet; orcein (B,E) stains elastin in pink and nuclei appear in violet due to hematoxylin staining; immunohistochemistry against elastin (C,F) with elastin signal appearing in brown; (D,E) are atrioventricular valves, (F) shows the bulboventricular valve. Scale bars: 100 μ m (A–C); 50 μ m (D–F). Magnification: 40x (A–C); 200x (D,F); 400x (E).

3.1.5. The Bulbus Arteriosus

The bulbus arteriosus (BA) is a specialized outflow tract found in teleost fish derived from the conus arteriosus present in more “primitive” fish. It is located right at the exit of the heart, after the ventricle, forming a supplementary “pseudo-chamber” that is not found in humans or mammals. It is a pear-shaped organ, and although being inside the pericardium so that it is considered to be part of the heart, it has mostly vascular characteristics regarding histology and function [58]. Indeed, zebrafish BA contains smooth muscle cells, as do vessels, and no cardiac muscle [70]. This is a difference compared to the conus arteriosus where cardiomyocytes are found [47]. In addition, it is organized in the three characteristic layers of vessels, namely the intima, the media, and the adventitia. Unfortunately, the precise arrangement of elastic fibers and other extracellular matrix proteins in zebrafish BA is poorly described in the literature [58]. It was however described in the Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), which is also a teleost fish [71]. It is important to note that tunas are “high performance fish”, as they need to migrate, whereas zebrafish do not. Thus, BA description in tuna might not be transposable to zebrafish since they do not share the same way of life. In tuna BA, the intima is classically composed of a unique layer of endothelial cells. The media is mainly composed of smooth muscle cells and elastin. It is the thickest layer of the BA, representing around 90 to 95% of the organ. Real differences were noted between the organization of the vascular wall in the bulbus arteriosus compared to the ventral aorta. The ventral aorta has a traditional organization with elastin lamellae forming concentric layers, alternating with smooth muscle cells parallel to the others, as in mammal arteries. Conversely, no lamella was observed in the BA, but rather elastin

“fibrils” that do not correspond to mature elastic fibers, neither in their composition, nor in their mechanical properties. A lower hydrophobic index and a lower elastic modulus of these fibrils were reported compared to fibers in the ventral aorta [71].

As explained previously, elastic arteries in mammals smooth the blood flow. They distend as they receive blood from the heart during systole, and due to their elastic properties, they can give back the energy of the deformation to compensate the drop of pressure during diastole. In the end, the pulsatile flow becomes continuous in the periphery. In the zebrafish, this role is played by the bulbus arteriosus, which acts as a Windkessel organ. Its major utility is to protect downstream organs, in particular gills that are very close to the heart (Figure 2A) [47,59,70]. Similar to elastic arteries, the bulbus arteriosus contains high amounts of elastin (Figure 3B,C) and is therefore able to act as an elastic energy reservoir [58,59]. Collagen fibrils also participate in the organization and properties of the tissue (Figure 3A). In addition, the BA can stock all of the stroke volume [72] and it was described in some fish as 30 times more compliant than aorta in mammals [71]. This high capacity of deformation is linked to a high elastin/collagen ratio, which can be about 10 times higher in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) BA than in mammals' aorta [71]. It goes without saying that these observations, made on other teleost fish, need to be confirmed in the particular case of the zebrafish.

As it was discussed in the first section, teleost fish have two genes encoding for two distinct tropoelastin proteins: Elastin a, the closest to human ELN and Elastin b, less resembling. It has been shown that the most expressed form in the BA was the Elnb paralog. This is coherent with the hypothesis of neofunctionalization proposed by Moriyama et al. [36], suggesting that Elnb could have evolved to fulfill a new role, being also responsible for the emergence of the bulbus arteriosus in teleost fish. Indeed, Elnb is necessary for BA cells to differentiate from cardiac precursor cells to smooth muscle cells during development. Its down-regulation leads to the apparition of ectopic cardiomyocytes in the BA and its complete absence can cause severe hypoplasia of the BA. By contrast, Elna down-regulation or absence has no real impact on the bulbus arteriosus. The particularity of the sequence of Elnb could also explain the unconventional organization of elastin in the BA and its unique mechanical properties [71]. Elnb would therefore have novel structural and signaling capacities compared to Elna, which gave rise to the teleost-specific Windkessel organ that is the bulbus arteriosus [36].

Quite interestingly, we were able to recognize zebrafish elastin in atrioventricular and bulboventricular valves and in the BA (Figure 3C,F) using an anti-elastin antibody directed against the N-terminal portion of mouse tropoelastin (#ab21600 from Abcam, Cambridge, UK). This result first highlights a broad recognition of tropoelastin among various species but we could also note that elastin signal in the BA was lower by immunohistochemistry detection than with orcein staining, a coloration enabling the visualization of elastic fibers (Figure 3B,C). This might be explained either by a lower efficiency of the antibodies for zebrafish elastin or by the recognition of only one zebrafish elastin paralog.

3.2. Arteries and Vessel Wall Organization

In adult zebrafish, the major arteries are the ventral aorta and the dorsal aorta. The ventral aorta has the particularity to be a dead end in zebrafish (Figure 2A), as its ramifications diverge from the side of the

vessel. There are four pairs of afferent branchial arteries that lead the blood to the gill filaments, where it is oxygenated and then sent to efferent branchial arteries, which merge to give the dorsal aorta [58]. The dorsal aorta of adult zebrafish has been described in details by Miano et al. [73], giving a solid basis to understand the organization of the vascular wall in zebrafish arteries in general.

As mentioned previously, the vascular wall of zebrafish follows the same organization as vessels in other vertebrates [50]. They are usually structured in three layers: the tunica intima, media and adventitia or externa, from lumen to periphery. These layers are more evident in large vessels and are not found in capillaries and venules. The global behavior of the vessel depends on the organization of the vascular wall and its exact composition varies sensibly between vessels and can change with time.

The intima is composed of endothelial cells and a layer of extracellular matrix that forms a basement membrane. Endothelial cells are attached together by tight junctions. They serve as a barrier between blood and tissues. Some electron-dense bodies have been reported in zebrafish endothelial cells one month post-fertilization (mpf), but their function remains unknown. These organelles could also have been observed in the BA but identified as lipids at the time [58,73]. They could correspond to mammalian Weibel-Palade bodies, which contain factors important for coagulation, even if they do not present the same structure. A tunica elastica or internal elastic lamina can be seen between the intima and the media, composed mainly of elastic fibers and collagen [50,73].

The media contains vascular smooth muscle cells. The content in elastin/elastic fibers decreases the further we move from the heart as observed in mammals, with the highest content being in the BA (Figures 3B,C and 4B–E). Generally, elastic fibers in arteries are oriented in concentric lamellae to distribute the stressing forces uniformly across the vessel wall. These lamellae alternate with a layer of smooth muscle cells, forming a functional unit that can handle pressure as long as it is in a physiological range or under [74]. In mammals, the thickness of the vessel wall varies according to blood pressure. In humans, the number of lamellae can be very high, with around 80 lamellae in the ascending aorta [75]. The ventral aorta and the bulbus arteriosus are right between the ventricle and gills, so they have to deal with the high-pressured blood flow coming from the former to protect the latter. They consequently have globally the same role as elastic arteries in mammals, even if the pressures at stake are far less important. We can count 8 to 10 lamellae at the exit of the BA (Figure 4B) and 4 to 5 lamellae further in the ventral aorta (Figure 4C). In the dorsal aorta, only one to two lamellae are visible (Figure 4D–F), which is coherent with the one or two layers of smooth muscle cells reported by Miano et al. [73].

Lastly, the adventitia is mostly made of fibroblasts and collagen, as in mammals. Collagen is important in large arteries, as it prevents the vessel from breaking under high pressure [76].

Some particularities of zebrafish arteries should also be mentioned, such as arterial valves that were found in the dorsal aorta, most likely helping to maintain unidirectional flow under low systolic pressure. In addition, the presence of melanocytes in the surrounding of vessels was observed [73].

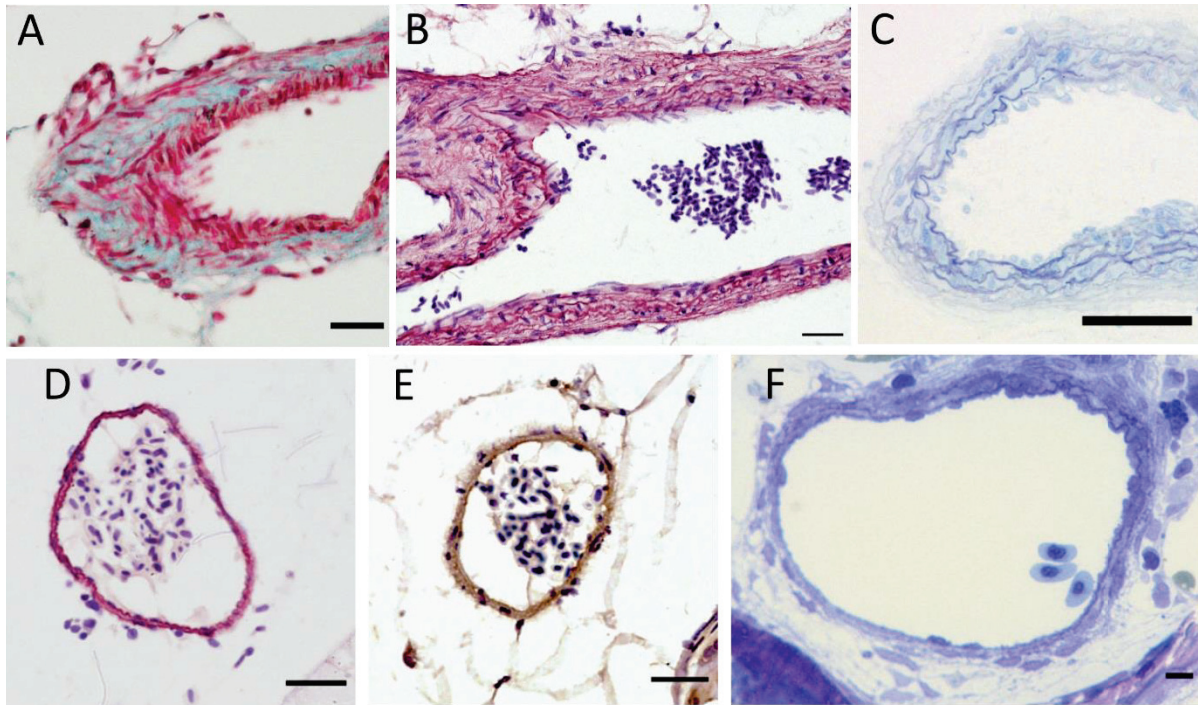


Figure 4. Elastin content of zebrafish major arteries. (A–C) Ventral aorta sections stained with Masson-Goldner trichrome (A), orcein (B) or by toluidine blue on a semi-thin section (C); scale bar = 10 μ m; (D–F) dorsal aorta sections stained with orcein (D), by immunohistochemistry using anti-elastin antibodies (E) or by toluidine blue on a semi-thin section (F); scale bar = 10 μ m (A, B); 5 μ m (C–F). Magnification: 400 \times (A–E); 1000 \times (F).

4. Vascular Elastic Fiber Pathologies and Associated Zebrafish Models

The zebrafish model has already been widely used in cardiovascular research, with substantial progress made in cardiovascular development [77–79], angiogenesis [80], and cardiac regeneration [81–83]. It is also increasingly used to model human diseases in general [84–86] and some reviews already presented zebrafish interests for the study of cardiovascular pathologies [87–90].

Elastic fibers are composed of an elastin core interwoven in a scaffold of fibrillin-rich microfibrils. Other proteins help to assemble the fibers and participate in its structure and biological roles, such as the microfibril-associated glycoproteins (MAGP), the latent TGF- β -binding proteins (LTBP), the A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS), fibulins and elastin microfibril interface-located proteins (EMILINs) [91]. Most of the proteins involved in the formation and maintenance of elastic fibers are conserved throughout vertebrates [74]. Genetic alterations of these proteins can lead to defective fibers, most of the time making the vessel wall weaker and more prone to develop cardiovascular complications. Interestingly, some of these elastic fiber-associated pathologies are studied in the zebrafish and will be presented in the next paragraphs.

4.1. Elastin

Elastin is the major component of elastic fibers, accounting for about 90% of the mature fiber content. Some diseases are directly linked to a mutation in the *ELN* gene in human, such as Williams Beuren syndrome (WBS, also called Williams syndrome), non-syndromic supravalvular

aortic stenosis (SVAS), or the autosomal dominant cutis laxa (ADCL) [6]. Associated cardiovascular symptoms can be more or less severe depending on the considered genetic defect [6,92].

As mentioned earlier in this review, knockdown (KD) experiments performed on zebrafish have highlighted the role of *Elnb* in the BA formation, but the exact role of both paralogs on vascular system has not been precisely deciphered yet. Using a combination of ENU-mutagenesis, whole exome enrichment and Illumina sequencing, in addition to a targeted CRISPR/Cas9 approach, the Zebrafish Mutation Project (ZMP) has generated a mutant archive of over 40,000 alleles, covering 60% of zebrafish protein-coding genes. In this archive, seven mutants for *elna* have been identified, among which four are currently available and two mutants for *elnb* are commercially available. However, none of these mutants have been described yet and the effects on zebrafish cardiovascular system remain to be investigated.

4.2. Fibrillins

The type-1 Marfan syndrome (MFS) is an autosomal dominant fibrillinopathy linked to a mutation in the *fibrillin-1* (*FBN1*) gene. It results in poorly functional elastic fibers and a disturbed regulation of TGF- β signaling pathway, as microfibrils are involved in the bio-availability of mature TGF- β . A misregulation of TGF- β signaling can lead to severe pathologies in vessels, acting on collagen and elastin metabolism as well as on the proliferation of smooth muscle cells [93,94]. MFS is a systemic condition, so that patients develop a wide variety of symptoms such as skeletal and ocular defects and, in the case of vascular defects, MFS patients exhibit a progressive dilation of the aorta with higher risk of aneurysms and dissections. Valvular leaks are also common [95].

There are four fibrillins in the zebrafish instead of the three found in humans [96]. Fibrillin-1 sequence is highly conserved in vertebrates, including the zebrafish [97]. Down-regulation of fibrillin-1 in the zebrafish using morpholino antisense oligomers was found to affect the zebrafish cardiovascular system through dilation of the caudal vein and of vessels in the head and eyes of zebrafish embryos [98]. Additionally, the mutation of the fibrillin-1 ortholog in the zebrafish by CRISPR/Cas9 technique was described recently by Yin et al. [97], with the report of interesting cardiovascular outcomes. Heterozygous *fbn1* zebrafish mutants were found to have an abnormal blood flow between the atrium and the ventricle, being also slower and less abundant compared to wild-type zebrafish. These first observations, conducted until 40 dpf, support the potential of this model for MFS research.

4.3. MAGPs

MAGP are also well conserved in mammalian and teleost fish. They are not structural proteins but are rather important for TGF- β signaling and are involved in a lesser extent in the Notch pathway [99]. In humans, MAGP mutations have also been associated with pathologies. MAGP-2 (*MFAP5*) haploinsufficiency has been linked to thoracic aortic aneurysms and dissections, most likely due to a dysregulation in TGF- β signaling [100]. MAGP-1 is mostly associated with obesity and metabolic syndrome, as is MAGP-2, but was not directly linked to vascular issues [99]. Different results were obtained in mice, where only double MAGP-1 and 2 homozygous mutants were showing vascular defects (aortic dilation) after four to six months of life [99]. In the zebrafish, the silencing of *mfap2*

(coding for Magp-1) during embryogenesis, with a morpholino-based approach, led to vascular defects with an abnormal organization of the vessel wall, containing less elastin and some detaching cells [98]. Aortic dilations were also observed, as in the *fbn1* morphant mentioned previously. Some vascular defects were also reported by Alvarez et al. [101] in the context of retinal vasculature, with ineffective patterning of vessels, also based on an *mfap2* (Magp-1) morpholino knockdown.

4.4. LTBP_s

LTBP_s are also important contributors to TGF- β bioavailability. Moreover, LTBP-2 and 4 have been shown to play a part in the regulation of elastic fiber assembly [102]. The mutation of LTBP-2 has been linked to a form of Weill Marchesani syndrome (WMS), associated with cardiovascular defects in some patients [103]. However, most of the time, symptoms are restricted to the eye region, suggesting a compensation by the unaffected LTBP_s in the other tissues [104]. Mutations in the *LTBP-4* gene have been associated with autosomal recessive cutis laxa type IC, in which cardiovascular symptoms are not predominant and reportedly restricted to peripheral pulmonary artery stenosis [105,106]. LTBP-3 and LTBP-4 losses were studied in mice models and caused cardiovascular defaults such as aortic dilations and dissections for the former and cardiomyopathies for the latter. In zebrafish, *ltbp-1* and 3 mutants have been described. The lack of *Ltbp3* affected the development of the heart in zebrafish embryos, surprisingly by a decrease in TGF- β signaling [107]. A *ltbp-1* mutant was recently described and could result in a “cutis laxa-like pathology”, but no cardiovascular observations were reported so far, with mostly skin and bone symptoms [108].

4.5. GLUT10

Arterial tortuosity syndrome (ATS) has also been linked to an abnormal TGF- β activity that results in elongated and tortuous arteries. The formation of elastic fibers in patients suffering from ATS is impaired [109]. The disease was linked to the glucose transporter GLUT10 (*SLC2A10*), but the mechanism is not perfectly understood yet. The evolutionary conservation of this glucose transporter was confirmed by gene and protein sequence analysis, and vascular abnormalities were observed in *slc2a10* knockdown embryos, such as a reduced heart beat and incorrect vascular patterning, thus mimicking the human disease [110].

4.6. ADAMTS_s

ADAMTS are proteins associated to microfibrils and involved in extracellular matrix remodeling. They are evolutionary conserved throughout vertebrates and even have orthologs in various invertebrates [111]. There are 19 ADAMTS proteins in mammals with different functions and activities. Some of them have been linked to cardiovascular disorders in mice models such as ADAMTS5 and 9. In human, ADAMTS5 was found to be downregulated in aneurysmal cerebral arteries [112]. Interestingly, Adamts5 and 15a were found to be strongly expressed in the zebrafish heart, but not Adamts9 [111]. Moreover, Adamts5 specific inhibition in zebrafish embryos confirmed its role in aneurysm development, as treated embryos had higher risks of developing intracranial hemorrhage than embryos from the control group [112].

4.7. Fibulins

Fibulins are other important actors of elastic fiber assembly. Eight isoforms are found in humans. They play a role in the structural integrity of elastic tissues, in their remodeling, and could also have regulating functions over TGF- β signaling [113]. Fibulin-1, 2, 4, and 5 are the most involved in the vasculature with a particular role in elastogenesis for the last three [114]. Mutations in fibulin-4 were linked to autosomal recessive cutis laxa type IB, associated with aortic dissection, and mutations in fibulin-5 with autosomal recessive cutis laxa type IA, associated with supraaortic stenosis (SVAS) and peripheral pulmonary artery stenosis [114]. Down-regulation and overexpression of *fibulin-5* were tested in the zebrafish in the context of Charcot-Marie-Tooth neurological disease, but no effect on cardiovascular system was reported [115]. Fibulin-7 could play a role in heart formation as it was associated with a congenital heart disease due to a newly identified chromosomal deletion. A KD of *fibulin-7* in the zebrafish was tested and led to similar cardiac and craniofacial defects than those found in the human syndrome [116]. Fibulin-1 was also reported to be expressed during cardiac development near the valve regions in the zebrafish, but its exact role is not described yet [117].

4.8. EMILINs

In human, EMILINs are a family composed of four isoforms, which are known to play an important role in maintaining vascular homeostasis and regulating elastogenesis [118]. In the zebrafish, eight EMILINs paralogs are found, as each human member has two paralogs with conserved structures [119]. In mice, EMILIN-1 deficiency has been linked to aortic valve disease and aortic aneurysm [120]. A recent study reported that *Emilin1a* zebrafish morphants displayed altered locomotion and abnormal motor neurons, but no alteration in cardiovascular system was described [121]. Other *Emilin* mutants have been generated through the ZMP, but no study using those mutants has been reported yet.

4.9. Ion Metabolism

We will now discuss diseases affecting elastic fibers by a modification in ion metabolism. In general, ion metabolism is well conserved between vertebrate species and the zebrafish model has been used extensively in this field, allowing the discovery of metal transporters and other biological participants by large-scale screenings [122,123].

4.9.1. Copper and Lysyl Oxidases

Copper is essential for the functional activity of the lysyl oxidase (LOX) family of enzymes, which are notably responsible for the cross-linking and fibrillar stabilization of elastin and collagen in the extracellular compartment [124]. In humans, a deficiency in copper can lead to Menkes disease or occipital horn syndrome (OHS, also called X-linked cutis laxa or type 9 Ehlers-Danlos). These disorders have mild to severe forms and multiple organs can be affected [125]. Cardiovascular symptoms are not the major impact of these diseases, but abnormal vasculature and tortuosity with thin walled arteries were reported [125].

Human LOX family comprises five members, one LOX, and four lysyl oxidase-like (LOXL1-4) [126]. Eight LOX/LOXL isoforms have been identified in the zebrafish, with an ortholog for each human one, except for LOXL4 [127]. In human and in mammal models, deficiencies in LOX have been linked to an increased risk to develop aortic aneurysms and

dissections [128]. However, in the zebrafish, they have only been studied in the context of notochord malformation [127,129] and early morphogenesis [130].

Menkes disease and OHS are often caused by a mutation in the *ATP7A* gene, which encodes a copper transporting ATPase, whose malfunction affects copper-dependent enzymes such as LOX/LOXL. A model of these diseases was developed in the zebrafish, based on the *calamity* mutant. The *calamity* mutant, resulting from the mutation of the ortholog of *ATP7A*, was characterized by an inadequate development of the notochord, as seen when LOXs were inhibited. It was described as phenotypically very close to chemically induced copper-deficient embryos, in which cartilage and vascular development were altered. Embryos showed disorganization of their intersegmental vessels, along with microaneurysm in some cases. However, these observations were not explicitly reported in the *calamity* mutant, so its vascular aspects remain to be ascertained [131].

In another study, a therapeutic strategy was tested to correct the *calamity* phenotype by targeting the wrongly-spliced mRNA by a morpholino-based approach and managed to rescue mutants in vivo [132].

Another mutant named *catastrophe* was found to affect copper metabolism in a chemical genetic screening study. It was associated to a mutation in a gene coding for a subunit of the vacuolar H⁺ ATPase (*Atp6*), which is not directly linked to copper metabolism [133]. This could lead to a better understanding of copper metabolism.

4.9.2. Calcium and Vascular Mineralization

Lastly, another modification that can affect the vascular wall and elastic fiber behavior in particular is the mineralization of the media. Ions, mainly calcium, can accumulate abnormally in the vessel wall and damage elastic fibers. This is observed in aging vessels as an expected modification that occurs with time, but there are also pathologies displaying extensive calcification of the vascular wall that is not related to age. For example, in pseudoxanthoma elasticum (PXE), elastic fibers are fragmented because of their ectopic calcification, with dermatologic, ophthalmologic, and vascular consequences [134]. Concerning vascular dysfunction, PXE patients can develop arterial stenosis, tortuosity, and occlusion, as well as intracranial arterial aneurysm [134]. PXE has been linked to mutations in *ABCC6* and *ENPP1*. These genes are also involved in another disease called “generalized arterial calcification of infancy” or GACI, which is more severe with a life expectancy of only a few months. Zebrafish models have been developed to understand the consequences associated with the loss of both these genes, separately.

ABCC6 is a member of the ATP-binding cassette transporter family, whose role in mineralization is not entirely clear yet. The naturally occurring *gräte* zebrafish mutant, characterized by bones hypermineralization, was associated with the mutation of *abcc6a*, an ortholog of *ABCC6*. Morpholino and CRISPR/Cas9 approaches were also used to create other *abcc6a* mutants, but none of them recapitulate the complete phenotype of PXE, as ectopic mineralization was only rarely observed in zebrafish mutants [135]. Yet, *abcc6a* was found to be expressed in the eyes, heart, and intestines of young adult zebrafish [136]. More recently, another mutant was obtained by a TALEN-based approach with ocular calcification and fibrotic heart, the latter not being part of human

PXE reported symptoms [136]. These differences of phenotype could be due to two reasons. First, *abcc6a* is not expressed in zebrafish liver, where it is thought to have an important role in mammals [137]. In addition, *abcc6a* has a paralog, *abcc6b*, that could reduce damages caused by *abcc6a* loss. A morpholino-based knockdown of *abcc6b* was tested alone, and revealed no phenotypic changes [138], but observations were restricted to embryos (until five days post-fertilization).

Some studies to find new therapeutic targets are also ongoing using *abcc6a* zebrafish mutants, for example with tests on vitamin K potential to reduce hypermineralization [139], or by correcting a mislocation of the Abcc6a transporter associated with certain PXE mutations [140].

Concerning the second gene associated with PXE, the zebrafish *enpp1* mutant, also called *dragonfish*, is characterized by an ectopic calcification of many tissues including soft ones. Enpp1 is an ectonucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase involved in the provision of pyrophosphate in the extracellular medium. In this mutant, ectopic mineralization was found in cartilage elements, skin, and in the cardiovascular system. Indeed, the vessels of embryos seemed to be normal but the observation of the bulbus arteriosus of adult zebrafish showed ectopic calcification. Osteoclast-like cells were also reported in the affected tissues [141].

4.10. Zebrafish Model Potential Contributions Depending on Developmental Stages

There are four main stages in zebrafish life-cycle: the embryo (until hatching; approximately 50 hours post-fertilization), the larva (until metamorphosis; around 28 dpf), the juvenile (until the end of puberty; approximately 3 months post-fertilization), and the mature adult [142]. The cardiovascular system therefore undergoes different degrees of maturity corresponding to these developmental stages and a deficiency in elastic fibers will have distinct repercussions depending on these periods.

Zebrafish models presented in this review concern mostly experimentations made on embryonic and larval stages. These are interesting for the first steps of investigation, giving an overview of the effects of a mutation or a treatment on global development and general integrity of the organism, with mainly morphological and phenomenological observations. As mentioned previously in this review, the use of zebrafish embryos and larvae in human pathology research brings numerous advantages. First, they allow to monitor a whole organism response without requiring too many specific facilities (as in mouse experimentation, for example). Secondly, their transparency enables the observation of important developmental events in vivo, notably vasculogenesis and angiogenesis in the context of cardiovascular research, and blood vessel imaging has moreover been facilitated by the development of transgenic reporter lines such as Tg(*fli1a*:EGFP) [143] or Tg(*kdrl*:EGFP) [144], in which blood vessels appear fluorescent. Also, crossing those fluorescent strains with the transparent double mutant (*roy^{-/-}*; *nacre^{-/-}*) fish line casper enables to largely improve whole zebrafish imaging at early developmental stages [145]. Blood circulation can also be monitored in vivo by microangiography to highlight any defects [146] and basic hemodynamic parameters can be collected due to the developments of digital particle image velocimetry [147,148]. Lastly, the use of zebrafish larvae until 5 dpf is facilitated by ethic committees regarding animal experimentation issues, as they are not yet considered as “animals” per se

and would therefore constitute a step in the direction of the 3R principles (Replacement, Reduction, Refinement) by reducing and replacing the mammal model use (European Commission Directive 2010/63/EU).

Despite these obvious assets, some limitations are also to be noted. As stated before, at early developmental stages, the maturity of the organism, including the cardiovascular system, has not been reached yet. Specific features such as the blood brain barrier, which takes place at the larval stage [149], or the coronary system, established after several weeks post-fertilization at the juvenile stage [150], would for example require the use of more mature models. In addition, the study of certain symptoms can be compromised, as well as severe outcomes over the long term that are impossible to consider.

The use of juvenile or adult zebrafish would be interesting in order to address these points, with the possibility of a more thorough analysis. As for larvae and embryos, numerous parameters can be measured to assess the cardiovascular function of juveniles and adults, such as weight and size of the heart and its different parts [151], but also heart rate and red blood cell flow rate [51]. Concerning vessels description and characterization, embryonic vessels are inappropriate to study histological organization and elastic mechanical properties because of their small size and immaturity. The use of older fish would be of greater interest for these concerns. In addition, the recent improvement of imaging techniques suitable for adult zebrafish is opening a new field of possibilities to visualize vessels in situ and potentially protein expression on a whole organism, with for example light sheet microscopy [152,153].

In the particular case of elastic fibers and elastin, the zebrafish model can offer a precious alternative, as the homozygous mutation of the elastin gene is rapidly lethal in mammal models (resulting in only a few days of life in mice [154]). The survival of mutant zebrafish is definitely interesting, but is also linked to the fact that elastin has been duplicated. It would be necessary to invalidate both paralogs to establish a strict comparison with the murine system. Indeed, one paralog could be able to compensate for the biological effects of the other as both paralogs are expressed jointly in almost all tissues [43]. However, the invalidation of only one paralog could provide a model to observe the impact of an elastic deficiency on the vascular architecture representing moderate forms of elastinopathies. The follow-up of heterozygous mutants is also possible, if necessary, and a comparison between homozygous mutants—for one or the other elastin gene—with a double heterozygous mutant could also be interesting, perhaps providing a greater variety of vascular outcomes due to the more or less severe phenotype.

5. Conclusions

Williams Beuren syndrome, non-syndromic supravalvular aortic stenosis, and the autosomal dominant cutis laxa are all consequences of mutations in the *ELN* gene. Patients suffering from these elastinopathies are predisposed to develop hypertension, arterial aneurysms, dissections, or stenosis. These cardiovascular conditions are also found in diseases affecting the other constituents of elastic fibers that form the microfibrils.

The development of new therapeutic strategies to treat these deadly diseases involves (i) a good understanding of the cardiovascular system at physiological and biochemical levels in humans and (ii) preliminary tests in animal models that recapitulate the disease and whose response to drugs will be as close as possible to that of humans.

In that way, the zebrafish present many advantages to study human pathologies in general and vascular diseases or malformations in particular. Indeed, zebrafish and human genomes share around 70% homology and most of the genes responsible for human cardiovascular diseases are conserved in zebrafish.

Despite some particularities, zebrafish and human cardiovascular systems are comparable and disease-model design based on pathological characteristics is possible due to the conservation of most of the mechanisms. Zebrafish is also perfectly suitable for genetic manipulations and the possibility to rapidly obtain a mutant model to test mutation consequences on a whole organism can be very practical as a first step of validation. Various models of fibrillinopathies reproducing elastic fiber defects found in human patients have been developed over the past decade and the recent release of *elastin* mutants through the Zebrafish Mutation Project will enable to mimic elastinopathies in the next few years.

The zebrafish is also well suited for the discovery of new drugs. High throughput chemical screening can easily be performed and collect more information on a real organism than the classical cell-based experiments. The possibility to test active compounds in vivo allows to study the interaction effects between the drug and the whole organism: potential toxicity, alteration by the metabolism, and pharmacokinetics and pharmacodynamics can for example be assessed.

Finally, the study of embryonic and larval zebrafish is easier compared to conventional rodent models as they are transparent and the visualization in 3D of adult circulatory system is now being resolved through the development of new imaging techniques such as light sheet microscopy.

All these points highlight the zebrafish model as a powerful tool to better understand elastic fiber-related vascular diseases, and more specifically, the zebrafish model represents a good ethical alternative for the first steps of investigations to reduce rodent usage.

Supplementary Materials: Zebrafish: All animals provided by the PRECI platform (UMS 3444, SFR Biosciences) were maintained at 28 °C under 14 h/10 h light/dark cycle. Six to eight-month-old AB/Tü zebrafish were euthanized using 400 mg/L 3-aminobenzoic acid ethyl ester (Tricaine methansulfonate). Histology: Staining: Masson-Goldner Trichrome staining was performed as previously described [155] and Orcein staining, enabling to detect elastic tissues, was carried out according to Shikata's protocol using the #01251 kit from Diapath [156,157]. Immunohistochemistry: Elastin immunostaining was performed as follows. Briefly, after deparaffinization and rehydration, antigen retrieval step was carried out by incubating 5 µm sections in pepsin reagent (#R2283, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) for 20 min at 37 °C. Endogenous peroxidases were then quenched in Bloxall® Endogenous Blocking Solution (#SP-6000-100, Vector Laboratories, Burlingame, United States) and non-specific sites were blocked with BlockAid™ Blocking Solution (#B10710, Invitrogen™, Illkirch, France). Elastin primary antibodies (#21600 (1/1000), Abcam) were incubated in blocking solution overnight at 4 °C and biotinylated secondary antibodies were incubated 30 min at room temperature. Revelation was performed using ABC Reagent and 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) chromogen (R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC Kit from Vector Laboratories, #PK-7200, Burlingame, United States), as recommended by the manufacturer, and nuclei were counterstained using hematoxylin (#H-3401-500, Vector Laboratories).

Author Contributions: M.H.: conceptualization, data curation, investigation, writing—original draft; N.E.K.: methodology; R.D.: funding acquisition,

supervision, writing—review and editing; E.L.: conceptualization, supervision, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the French National Research Agency (grant n°ANR-18-CE18-0001).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We acknowledge the contribution of the histology and imaging facility (PrImaTiss) at the LBTI institute for their advice regarding the setting for elastin immunodetection. We also greatly thank the Zebrafish facility (PRECI) from the Federative Structure of Research BioSciences UAR3444/US8 and particularly Laure BERNARD and Robert RENARD for their involvement in animal well-being.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wise, S.G.; Weiss, A.S. Tropoelastin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 494–497. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.03.017>.
2. Wagenseil, J.E.; Mecham, R.P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 957–989. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2008>.
3. Koenigsberger, M.; Sauser, R.; Bény, J.-L.; Meister, J.-J. Effects of Arterial Wall Stress on Vasomotion. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1663–1674. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.083311>.
4. Mithieux, S.M.; Weiss, A.S. Elastin. *Adv. Protein Chem.* **2005**, *70*, 437–461. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9).
5. Wise, S.G.; Yeo, G.C.; Hiob, M.A.; Rnjak-Kovacina, J.; Kaplan, D.L.; Ng, M.K.C.; Weiss, A.S. Tropoelastin: A Versatile, Bioactive Assembly Module. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1532–1541. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.003>.
6. Baldwin, A.K.; Simpson, A.; Steer, R.; Cain, S.A.; Kielty, C.M. Elastic Fibres in Health and Disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **2013**, *15*, e8. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.9>.
7. Sherratt, M.J. Tissue Elasticity and the Ageing Elastic Fibre. *Age* **2009**, *31*, 305–325. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9103-6>.
8. Wagenseil, J.E.; Mecham, R.P. Elastin in Large Artery Stiffness and Hypertension. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2012**, *5*, 264–273. <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9349-8>.
9. Spence, R.; Gerlach, G.; Lawrence, C.; Smith, C. The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2008**, *83*, 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>.
10. Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Tarrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome. *Nature* **2013**, *496*, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>.
11. Bill, B.R.; Petzold, A.M.; Clark, K.J.; Schimmenti, L.A.; Ekker, S.C. A Primer for Morpholino Use in Zebrafish. *Zebrafish* **2009**, *6*, 69–77. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0555>.
12. Hwang, W.Y.; Peterson, R.T.; Yeh, J.-R.J. Methods for Targeted Mutagenesis in Zebrafish Using TALENs. *Methods* **2014**, *69*, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.04.009>.
13. Hwang, W.Y.; Fu, Y.; Reyon, D.; Maeder, M.L.; Tsai, S.Q.; Sander, J.D.; Peterson, R.T.; Yeh, J.-R.J.; Joung, J.K. Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 227–229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>.
14. Sassen, W.A.; Köster, R.W. A Molecular Toolbox for Genetic Manipulation of Zebrafish. *Adv. Genom. Genet.* **2015**, *5*, 151–163. <https://doi.org/10.2147/AGG.S57585>.
15. Prykhodzhiy, S.V.; Fuller, C.; Steele, S.L.; Veinotte, C.J.; Razaghi, B.; Robitaille, J.M.; McMaster, C.R.; Shlien, A.; Malkin, D.; Berman, J.N. Optimized Knock-in of Point Mutations in Zebrafish Using CRISPR/Cas9. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, e102. <https://doi.org/10.1093/nar/gky512>.
16. Li, W.; Zhang, Y.; Han, B.; Li, L.; Li, M.; Lu, X.; Chen, C.; Lu, M.; Zhang, Y.; Jia, X.; et al. One-Step Efficient Generation of Dual-Function Conditional Knockout and Geno-Tagging Alleles in Zebrafish. *eLife* **2019**, *8*, e48081. <https://doi.org/10.7554/eLife.48081>.
17. de Vrieze, E.; de Bruijn, S.E.; Reurink, J.; Broekman, S.; van de Riet, V.; Aben, M.; Kremer, H.; van Wijk, E. Efficient Generation of Knock-In Zebrafish Models for Inherited Disorders Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9429. <https://doi.org/10.3390/ijms22179429>.
18. Zhang, C.; Li, J.; Tarique, I.; Zhang, Y.; Lu, T.; Wang, J.; Chen, A.; Wen, F.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; et al. A Time-Saving Strategy to Generate Double Maternal Mutants by an Oocyte-Specific Conditional Knockout System in Zebrafish. *Biology* **2021**, *10*, 777. <https://doi.org/10.3390/biology10080777>.

19. Rossi, A.; Kontarakis, Z.; Gerri, C.; Nolte, H.; Hölper, S.; Krüger, M.; Stainier, D.Y.R. Genetic Compensation Induced by Deleterious Mutations but Not Gene Knockdowns. *Nature* **2015**, *524*, 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature14580>.
20. Zebrafish Mutation Project—Wellcome Sanger Institute. Available online: <https://www.sanger.ac.uk/resources/zebrafish/zmp/> (accessed on 24 December 2021).
21. Kettleborough, R.N.W.; Busch-Nentwich, E.M.; Harvey, S.A.; Dooley, C.M.; de Bruijn, E.; van Eeden, F.; Sealy, I.; White, R.J.; Herd, C.; Nijman, I.J.; et al. A Systematic Genome-Wide Analysis of Zebrafish Protein-Coding Gene Function. *Nature* **2013**, *496*, 494–497. <https://doi.org/10.1038/nature11992>.
22. Meyer, A.; Schartl, M. Gene and Genome Duplications in Vertebrates: The One-to-Four (-to-Eight in Fish) Rule and the Evolution of Novel Gene Functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 699–704. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)00039-3](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)00039-3).
23. Raldúa, D.; Piña, B. In Vivo Zebrafish Assays for Analyzing Drug Toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, *10*, 685–697. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.896339>.
24. Glaberman, S.; Padilla, S.; Barron, M.G. Evaluating the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Pesticide Hazard Screening. *Environ. Toxicol. Chem.* **2017**, *36*, 1221–1226. <https://doi.org/10.1002/etc.3641>.
25. Bauer, B.; Mally, A.; Liedtke, D. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13417. <https://doi.org/10.3390/ijms222413417>.
26. Wiley, D.S.; Redfield, S.E.; Zon, L.I. Chemical Screening in Zebrafish for Novel Biological and Therapeutic Discovery. In *Methods in Cell Biology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 138, pp. 651–679. ISBN 978-0-12-803473-6.
27. Zon, L.I.; Peterson, R.T. In Vivo Drug Discovery in the Zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 35–44. <https://doi.org/10.1038/nrd1606>.
28. Wright, G.M.; Armstrong, L.A.; Jacques, A.M.; Youson, J.H. Trabecular, Nasal, Branchial, and Pericardial Cartilages in the Sea Lamprey, *Petromyzon Marinus*: Fine Structure and Immunohistochemical Detection of Elastin. *Am. J. Anat.* **1988**, *182*, 1–15. <https://doi.org/10.1002/aja.1001820102>.
29. Sage, E.H.; Gray, W.R. Evolution of Elastin Structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, *79*, 291–312. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9093-0_27.
30. Glasauer, S.M.K.; Neuhauss, S.C.F. Whole-Genome Duplication in Teleost Fishes and Its Evolutionary Consequences. *Mol. Genet. Genom.* **2014**, *289*, 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>.
31. Pasquier, J.; Cabau, C.; Nguyen, T.; Jouanno, E.; Severac, D.; Braasch, I.; Journot, L.; Pontarotti, P.; Klopp, C.; Postlethwait, J.H.; et al. Gene Evolution and Gene Expression after Whole Genome Duplication in Fish: The PhyloFish Database. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 368. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2709-z>.
32. Schmelzer, C.E.H.; Duca, L. Elastic Fibers: Formation, Function, and Fate during Aging and Disease. *FEBS J.* **2021**. <https://doi.org/10.1111/febs.15899>.
33. Sugitani, H.; Hirano, E.; Knutsen, R.H.; Shifren, A.; Wagenseil, J.E.; Ciliberto, C.; Kozel, B.A.; Urban, Z.; Davis, E.C.; Broekelmann, T.J.; et al. Alternative Splicing and Tissue-Specific Elastin Misassembly Act as Biological Modifiers of Human Elastin Gene Frameshift Mutations Associated with Dominant Cutis Laxa. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 22055–22067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.327940>.
34. Chung, M.I.S.; Ming Miao; Stahl, R.J.; Chan, E.; Parkinson, J.; Keeley, F.W. Sequences and Domain Structures of Mammalian, Avian, Amphibian and Teleost Tropoelastins: Clues to the Evolutionary History of Elastins. *Matrix Biol.* **2006**, *25*, 492–504. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.08.258>.
35. Ozsvar, J.; Yang, C.; Cain, S.A.; Baldock, C.; Tarakanova, A.; Weiss, A.S. Tropoelastin and Elastin Assembly. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 643110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.643110>.
36. Moriyama, Y.; Ito, F.; Takeda, H.; Yano, T.; Okabe, M.; Kuraku, S.; Keeley, F.W.; Koshiba-Takeuchi, K. Evolution of the Fish Heart by Sub/Neofunctionalization of an Elastin Gene. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10397. <https://doi.org/10.1038/ncomms10397>.
37. Bax, D.V.; Rodgers, U.R.; Bilek, M.M.M.; Weiss, A.S. Cell Adhesion to Tropoelastin Is Mediated via the C-Terminal GRKRR Motif and Integrin AlphaVbeta3. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28616–28623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017525>.
38. Nonaka, R.; Sato, F.; Wachi, H. Domain 36 of Tropoelastin in Elastic Fiber Formation. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 698–702. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00933>.
39. Kyte, J.; Doolittle, R.F. A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0).
40. Sage, H. Structure-Function Relationships in the Evolution of Elastin. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *79*, 146–153. <https://doi.org/10.1038/jid.1982.27>.
41. Brown-Augsburger, P.; Tisdale, C.; Broekelmann, T.; Sloan, C.; Mecham, R.P. Identification of an Elastin Cross-Linking Domain That Joins Three Peptide Chains: Possible Role in Nucleated Assembly. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17778–17783. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.30.17778>.
42. Sage, H.; Gray, W. Studies on the Evolution of Elastin—II. Histology. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1980**, *66*, 13–22. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90078-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90078-4).

43. Miao, M.; Bruce, A.E.E.; Bhanji, T.; Davis, E.C.; Keeley, F.W. Differential Expression of Two Tropoelastin Genes in Zebrafish. *Matrix Biol.* **2007**, *26*, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.09.011>.
44. Hofmann, C.S.; Wang, X.; Sullivan, C.P.; Toselli, P.; Stone, P.J.; McLean, S.E.; Mecham, R.P.; Schreiber, B.M.; Sonenshein, G.E. B-Myb Represses Elastin Gene Expression in Aortic Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7694–7701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412501200>.
45. Wagenseil, J.E.; Ciliberto, C.H.; Knutsen, R.H.; Levy, M.A.; Kovacs, A.; Mecham, R.P. The Importance of Elastin to Aortic Development in Mice. *Am. J. Physiol.—Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H257–H264. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00194.2010>.
46. Force, A.; Lynch, M.; Pickett, F.B.; Amores, A.; Yan, Y.L.; Postlethwait, J. Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations. *Genetics* **1999**, *151*, 1531–1545.
47. Grimes, A.C.; Kirby, M.L. The Outflow Tract of the Heart in Fishes: Anatomy, Genes and Evolution. *J. Fish Biol.* **2009**, *74*, 983–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02125.x>.
48. Monahan-Earley, R.; Dvorak, A.M.; Aird, W.C. Evolutionary Origins of the Blood Vascular System and Endothelium. *J. Thromb. Haemost.* **2013**, *11*, 46–66. <https://doi.org/10.1111/jth.12253>.
49. Farrell, A.P.; Pieperhoff, S. Design and Physiology of the Heart | Cardiac Anatomy in Fishes. In *Encyclopedia of Fish Physiology*; Farrell, A.P., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2011; pp. 998–1005. ISBN 978-0-08-092323-9.
50. Burton, D.; Burton, M. *Essential Fish Biology: Diversity, Structure and Function*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2017; ISBN 978-0-19-878555-2.
51. Hoage, T.; Ding, Y.; Xu, X. Quantifying Cardiac Functions in Embryonic and Adult Zebrafish. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *843*, 11–20. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-523-7_2.
52. Driscoll, P. Gray's Anatomy, 39th Edition. *Emerg. Med. J.* **2006**, *23*, 492. <https://doi.org/10.1136/emj.2005.027847>.
53. Männer, J.; Yelbuz, T.M. Functional Morphology of the Cardiac Jelly in the Tubular Heart of Vertebrate Embryos. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2019**, *6*, 12. <https://doi.org/10.3390/jcdd6010012>.
54. Stainier, D.Y.R. Zebrafish Genetics and Vertebrate Heart Formation. *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 39–48. <https://doi.org/10.1038/35047564>.
55. Derrick, C.J.; Sánchez-Posada, J.; Hussein, F.; Tessadori, F.; Pollitt, E.J.G.; Savage, A.M.; Wilkinson, R.N.; Chico, T.J.; van Eeden, F.J.; Bakkers, J.; et al. Asymmetric Hapln1a Drives Regionalized Cardiac ECM Expansion and Promotes Heart Morphogenesis in Zebrafish Development. *Cardiovasc. Res.* **2022**, *118*, 226–240. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab004>.
56. Scherz, P.J.; Huisken, J.; Sahai-Hernandez, P.; Stainier, D.Y.R. High-Speed Imaging of Developing Heart Valves Reveals Interplay of Morphogenesis and Function. *Dev. Camb. Engl.* **2008**, *135*, 1179–1187. <https://doi.org/10.1242/dev.010694>.
57. Lockhart, M.; Wirrig, E.; Phelps, A.; Wessels, A. Extracellular Matrix and Heart Development. *Birt. Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* **2011**, *91*, 535–550. <https://doi.org/10.1002/bdra.20810>.
58. Hu, N.; Yost, H.J.; Clark, E.B. Cardiac Morphology and Blood Pressure in the Adult Zebrafish. *Anat. Rec.* **2001**, *264*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/ar.1111>.
59. Poon, K.L.; Brand, T. The Zebrafish Model System in Cardiovascular Research: A Tiny Fish with Mighty Prospects. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2013**, *2013*, 9–28. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.4>.
60. Jensen, B.; Boukens, B.; Wang, T.; Moorman, A.; Christoffels, V. Evolution of the Sinus Venosus from Fish to Human. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2014**, *1*, 14–28. <https://doi.org/10.3390/jcdd1010014>.
61. Tessadori, F.; van Weerd, J.H.; Burkhard, S.B.; Verkerk, A.O.; de Pater, E.; Boukens, B.J.; Vink, A.; Christoffels, V.M.; Bakkers, J. Identification and Functional Characterization of Cardiac Pacemaker Cells in Zebrafish. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047644>.
62. Fishman, G.I. Understanding Conduction System Development: A Hop, Skip and Jump Away? *Circ. Res.* **2005**, *96*, 809–811. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000165653.83279.20>.
63. Liu, J.; Bressan, M.; Hassel, D.; Huisken, J.; Staudt, D.; Kikuchi, K.; Poss, K.D.; Mikawa, T.; Stainier, D.Y.R. A Dual Role for ErbB2 Signaling in Cardiac Trabeculation. *Development* **2010**, *137*, 3867–3875. <https://doi.org/10.1242/dev.053736>.
64. Pieperhoff, S.; Bennett, W.; Farrell, A.P. The Intercellular Organization of the Two Muscular Systems in the Adult Salmonid Heart, the Compact and the Spongy Myocardium. *J. Anat.* **2009**, *215*, 536–547. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01129.x>.
65. Patra, C.; Kontarakis, Z.; Kaur, H.; Rayrikar, A.; Mukherjee, D.; Stainier, D.Y.R. The Zebrafish Ventricle: A Hub of Cardiac Endothelial Cells for in Vitro Cell Behavior Studies. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2687. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02461-1>.
66. Hu, N.; Sedmera, D.; Yost, H.J.; Clark, E.B. Structure and Function of the Developing Zebrafish Heart. *Anat. Rec.* **2000**, *260*, 148–157. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20001001\)260:2<148::AID-AR50>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20001001)260:2<148::AID-AR50>3.0.CO;2-X).
67. Bensimon-Brito, A.; Ramkumar, S.; Boezio, G.L.M.; Guenther, S.; Kuenne, C.; Helker, C.S.M.; Sánchez-Iranzo, H.; Iloska, D.; Piesker, J.; Pullamsetti, S.; et al. TGF- β Signaling Promotes Tissue Formation during Cardiac Valve Regeneration in Adult Zebrafish. *Dev. Cell* **2020**, *52*, 9–20.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.027>.

68. O'Donnell, A.; Yutzey, K.E. To EndoMT or Not to EndoMT: Zebrafish Heart Valve Development. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 985–987. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316846>.
69. Beis, D.; Bartman, T.; Jin, S.-W.; Scott, I.C.; D'Amico, L.A.; Ober, E.A.; Verkade, H.; Frantsve, J.; Field, H.A.; Wehman, A.; et al. Genetic and Cellular Analyses of Zebrafish Atrioventricular Cushion and Valve Development. *Development* **2005**, *132*, 4193–4204. <https://doi.org/10.1242/dev.01970>.
70. Grimes, A.C.; Stadt, H.A.; Shepherd, I.T.; Kirby, M.L. Solving an Enigma: Arterial Pole Development in the Zebrafish Heart. *Dev. Biol.* **2006**, *290*, 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.042>.
71. Braun, M.H.; Brill, R.W.; Gosline, J.M.; Jones, D.R. Form and Function of the Bulbus Arteriosus in Yellowfin Tuna (*Thunnus Albacares*), Bigeye Tuna (*Thunnus Obesus*) and Blue Marlin (*Makaira Nigricans*): Static Properties. *J. Exp. Biol.* **2003**, *206*, 3311–3326. <https://doi.org/10.1242/jeb.00575>.
72. Olson, K.R. Design and Physiology of Arteries and Veins | Anatomical Pathways and Patterns. In *Encyclopedia of Fish Physiology*; Farrell, A.P., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2011; pp. 1085–1094. ISBN 978-0-08-092323-9.
73. Miano, J.M.; Georger, M.A.; Rich, A.; De Mesy Bentley, K.L. Ultrastructure of Zebrafish Dorsal Aortic Cells. *Zebrafish* **2006**, *3*, 455–463. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.3.455>.
74. Faury, G. Function-Structure Relationship of Elastic Arteries in Evolution: From Microfibrils to Elastin and Elastic Fibres. *Pathol. Biol.* **2001**, *49*, 310–325. [https://doi.org/10.1016/s0369-8114\(01\)00147-x](https://doi.org/10.1016/s0369-8114(01)00147-x).
75. Fritze, O.; Romero, B.; Schleicher, M.; Jacob, M.P.; Oh, D.-Y.; Starcher, B.; Schenke-Layland, K.; Bujan, J.; Stock, U.A. Age-Related Changes in the Elastic Tissue of the Human Aorta. *J. Vasc. Res.* **2012**, *49*, 77–86. <https://doi.org/10.1159/000331278>.
76. Chow, M.-J.; Turcotte, R.; Lin, C.P.; Zhang, Y. Arterial Extracellular Matrix: A Mechanobiological Study of the Contributions and Interactions of Elastin and Collagen. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 2684–2692. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.014>.
77. Gore, A.V.; Monzo, K.; Cha, Y.R.; Pan, W.; Weinstein, B.M. Vascular Development in the Zebrafish. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a006684. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006684>.
78. Isogai, S.; Horiguchi, M.; Weinstein, B.M. The Vascular Anatomy of the Developing Zebrafish: An Atlas of Embryonic and Early Larval Development. *Dev. Biol.* **2001**, *230*, 278–301. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9995>.
79. Bakkens, J. Zebrafish as a Model to Study Cardiac Development and Human Cardiac Disease. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *91*, 279–288. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr098>.
80. Schuermann, A.; Helker, C.S.M.; Herzog, W. Angiogenesis in Zebrafish. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *31*, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.037>.
81. Lien, C.-L.; Harrison, M.R.; Tuan, T.-L.; Starnes, V.A. Heart Repair and Regeneration: Recent Insights from Zebrafish Studies. *Wound Repair Regen.* **2012**, *20*, 638–646. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00814.x>.
82. Sanz-Morejón, A.; Mercader, N. Recent Insights into Zebrafish Cardiac Regeneration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2020**, *64*, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.05.020>.
83. Ribeiro, A.O.; de Oliveira, A.C.; Costa, J.M.; Nachtigall, P.G.; Herkenhoff, M.E.; Campos, V.F.; Delella, F.K.; Pinhal, D. MicroRNA Roles in Regeneration: Multiple Lessons from Zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **2021**. <https://doi.org/10.1002/dvdy.421>.
84. Penberthy, W.T.; Shafizadeh, E.; Lin, S. The Zebrafish as a Model for Human Disease. *Front. Biosci.* **2002**, *7*, D1439–D1453.
85. Lieschke, G.J.; Currie, P.D. Animal Models of Human Disease: Zebrafish Swim into View. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>.
86. Santoriello, C.; Zon, L.I. Hooked! Modeling Human Disease in Zebrafish. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 2337–2343. <https://doi.org/10.1172/JCI60434>.
87. Wilkinson, R.N.; van Eeden, F.J.M. The Zebrafish as a Model of Vascular Development and Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 124, pp. 93–122. ISBN 978-0-12-386930-2.
88. Hogan, B.M.; Schulte-Merker, S. How to Plumb a Pisces: Understanding Vascular Development and Disease Using Zebrafish Embryos. *Dev. Cell* **2017**, *42*, 567–583. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.015>.
89. Bowley, G.; Kugler, E.; Wilkinson, R.; Lawrie, A.; van Eeden, F.; Chico, T.J.A.; Evans, P.C.; Noël, E.S.; Serbanovic-Canic, J. Zebrafish as a Tractable Model of Human Cardiovascular Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *179*, 900–917. <https://doi.org/10.1111/bph.15473>.
90. Chico, T.J.A.; Ingham, P.W.; Crossman, D.C. Modeling Cardiovascular Disease in the Zebrafish. *Trends Cardiovasc. Med.* **2008**, *18*, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2008.04.002>.
91. Gabriela Espinosa, M.; Catalin Staiculescu, M.; Kim, J.; Marin, E.; Wagenseil, J.E. Elastic Fibers and Large Artery Mechanics in Animal Models of Development and Disease. *J. Biomech. Eng.* **2018**, *140*, 0208031–02080313. <https://doi.org/10.1115/1.4038704>.
92. Duque Lasio, M.L.; Kozel, B.A. Elastin-Driven Genetic Diseases. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2018**, *71–72*, 144–160. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.021>.

93. 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. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041550119>.
94. Suwanabol, P.A.; Seedial, S.M.; Shi, X.; Zhang, F.; Yamanouchi, D.; Roenneburg, D.; Liu, B.; Kent, K.C. TGF- β Increases Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation through the Smad3 and ERK MAPK Pathways. *J. Vasc. Surg.* **2012**, *56*, 446–454.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.12.038>.
95. Judge, D.P.; Dietz, H.C. Marfan's Syndrome. *Lancet* **2005**, *366*, 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67789-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67789-6).
96. Gansner, J.M.; Madsen, E.C.; Mecham, R.P.; Gitlin, J.D. Essential Role for Fibrillin-2 in Zebrafish Notochord and Vascular Morphogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **2008**, *237*, 2844–2861. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21705>.
97. Yin, X.; Hao, J.; Yao, Y. CRISPR/Cas9 in Zebrafish: An Attractive Model for FBN1 Genetic Defects in Humans. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2021**, *9*, e1775. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1775>.
98. Chen, E.; Larson, J.D.; Ekker, S.C. Functional Analysis of Zebrafish Microfibril-Associated Glycoprotein-1 (Magp1) in Vivo Reveals Roles for Microfibrils in Vascular Development and Function. *Blood* **2006**, *107*, 4364–4374. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0789>.
99. Craft, C.S.; Broekelmann, T.J.; Mecham, R.P. Microfibril-Associated Glycoproteins MAGP-1 and MAGP-2 in Disease. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2018**, *71–72*, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.006>.
100. Craft, C.S. MAGP1, the Extracellular Matrix, and Metabolism. *Adipocyte* **2014**, *4*, 60–64. <https://doi.org/10.4161/adip.32209>.
101. Alvarez, Y.; Cederlund, M.L.; Cottell, D.C.; Bill, B.R.; Ekker, S.C.; Torres-Vazquez, J.; Weinstein, B.M.; Hyde, D.R.; Vihtelic, T.S.; Kennedy, B.N. Genetic Determinants of Hyaloid and Retinal Vasculature in Zebrafish. *BMC Dev. Biol.* **2007**, *7*, 114. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-114>.
102. Robertson, I.B.; Horiguchi, M.; Zilberberg, L.; Dabovic, B.; Hadjiolova, K.; Rifkin, D.B. Latent TGF- β -Binding Proteins. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2015**, *47*, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.005>.
103. Haji-Seyed-Javadi, R.; Jelodari-Mamaghani, S.; Paylakhi, S.H.; Yazdani, S.; Nilforushan, N.; Fan, J.-B.; Klotzle, B.; Mahmoudi, M.J.; Ebrahimian, M.J.; Chelich, N.; et al. LTBP2 Mutations Cause Weill-Marchesani and Weill-Marchesani-like Syndrome and Affect Disruptions in the Extracellular Matrix. *Hum. Mutat.* **2012**, *33*, 1182–1187. <https://doi.org/10.1002/humu.22105>.
104. Rifkin, D.B.; Rifkin, W.J.; Zilberberg, L. LTBPs in Biology and Medicine; LTBP Diseases. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2018**, *71–72*, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.11.014>.
105. Callewaert, B.; Su, C.-T.; Van Damme, T.; Vlummens, P.; Malfait, F.; Vanakker, O.; Schulz, B.; Neal, M.M.; Davis, E.C.; Lee, J.G.H.; et al. Comprehensive Clinical and Molecular Analysis of 12 Families with Type 1 Recessive Cutis Laxa. *Hum. Mutat.* **2013**, *34*, 111–121. <https://doi.org/10.1002/humu.22165>.
106. Beyens, A.; Boel, A.; Symoens, S.; Callewaert, B. Cutis Laxa: A Comprehensive Overview of Clinical Characteristics and Pathophysiology. *Clin. Genet.* **2021**, *99*, 53–66. <https://doi.org/10.1111/cge.13865>.
107. Zhou, Y.; Cashman, T.J.; Nevis, K.R.; Obregon, P.; Carney, S.A.; Liu, Y.; Gu, A.; Mosimann, C.; Sondalle, S.; Peterson, R.E.; et al. Latent TGF β Binding Protein 3 Identifies a Second Heart Field in Zebrafish. *Nature* **2011**, *474*, 645–648. <https://doi.org/10.1038/nature10094>.
108. Pottie, L.; Adamo, C.S.; Beyens, A.; Lütke, S.; Tapaneeyaphan, P.; Clercq, A.D.; Salmon, P.L.; Rycke, R.D.; Gezdirici, A.; Gulec, E.Y.; et al. Bi-Allelic Premature Truncating Variants in LTBP1 Cause Cutis Laxa Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2021**, *108*, 1095–1114. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.04.016>.
109. Pletcher, B.A.; Fox, J.E.; Boxer, R.A.; Singh, S.; Blumenthal, D.; Cohen, T.; Brunson, S.; Tafreshi, P.; Kahn, E. Four Sibs with Arterial Tortuosity: Description and Review of the Literature. *Am. J. Med. Genet.* **1996**, *66*, 121–128. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19961211\)66:2<121::AID-AJMG1>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19961211)66:2<121::AID-AJMG1>3.0.CO;2-U).
110. Willaert, A.; Khatri, S.; Callewaert, B.L.; Coucke, P.J.; Crosby, S.D.; Lee, J.G.H.; Davis, E.C.; Shiva, S.; Tsang, M.; De Paepe, A.; et al. GLUT10 Is Required for the Development of the Cardiovascular System and the Notochord and Connects Mitochondrial Function to TGF β Signaling. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 1248–1259. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr555>.
111. Brunet, F.G.; Fraser, F.W.; Binder, M.J.; Smith, A.D.; Kintakas, C.; Dancevic, C.M.; Ward, A.C.; McCulloch, D.R. The Evolutionary Conservation of the A Disintegrin-like and Metalloproteinase Domain with Thrombospondin-1 Motif Metzincins across Vertebrate Species and Their Expression in Teleost Zebrafish. *BMC Evol. Biol.* **2015**, *15*, 22. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0281-9>.
112. Wang, W.; Zhang, H.; Hou, C.; Liu, Q.; Yang, S.; Zhang, Z.; Yang, W.; Yang, X. Internal Modulation of Proteolysis in Vascular Extracellular Matrix Remodeling: Role of ADAM Metalloproteinase with Thrombospondin Type 1 Motif 5 in the Development of Intracranial Aneurysm Rupture. *Aging* **2021**, *13*, 12800–12816. <https://doi.org/10.18632/aging.202948>.

113. Tsuda, T. Extracellular Interactions between Fibulins and Transforming Growth Factor (TGF)- β in Physiological and Pathological Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, E2787. <https://doi.org/10.3390/ijms19092787>.
114. Cangemi, C.; Hansen, M.L.; Argraves, W.S.; Rasmussen, L.M. Fibulins and Their Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Adv. Clin. Chem.* **2014**, *67*, 245–265. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.09.008>.
115. Won, S.Y.; Kwon, S.; Jeong, H.S.; Chung, K.W.; Choi, B.; Chang, J.W.; Lee, J.E. Fibulin 5, a Human Wharton's Jelly-derived Mesenchymal Stem Cells-secreted Paracrine Factor, Attenuates Peripheral Nervous System Myelination Defects through the Integrin-RAC1 Signaling Axis. *Stem Cells* **2020**, *38*, 1578–1593. <https://doi.org/10.1002/stem.3287>.
116. Russell, M.W.; Raeker, M.O.; Geisler, S.B.; Thomas, P.E.; Simmons, T.A.; Bernat, J.A.; Thorsson, T.; Innis, J.W. Functional Analysis of Candidate Genes in 2q13 Deletion Syndrome Implicates FBLN7 and TMEM87B Deficiency in Congenital Heart Defects and FBLN7 in Craniofacial Malformations. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 4272–4284. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu144>.
117. Zhang, H.-Y.; Lardelli, M.; Ekblom, P. Sequence of Zebrafish Fibulin-1 and Its Expression in Developing Heart and Other Embryonic Organs. *Dev. Genes Evol.* **1997**, *207*, 340–351. <https://doi.org/10.1007/s004270050121>.
118. Randell, A.; Daneshmandi, N. Elastin Microfibril Interface-Located Protein 1, Transforming Growth Factor Beta, and Implications on Cardiovascular Complications. *J. Am. Soc. Hypertens.* **2017**, *11*, 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2017.04.010>.
119. Milanetto, M.; Tiso, N.; Braghetta, P.; Volpin, D.; Argenton, F.; Bonaldo, P. Emilin Genes Are Duplicated and Dynamically Expressed during Zebrafish Embryonic Development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **2008**, *237*, 222–232. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21402>.
120. Munjal, C.; Opoka, A.M.; Osinska, H.; James, J.F.; Bressan, G.M.; Hinton, R.B. TGF- β Mediates Early Angiogenesis and Latent Fibrosis in an Emilin1-Deficient Mouse Model of Aortic Valve Disease. *Dis. Model. Mech.* **2014**, *7*, 987–996. <https://doi.org/10.1242/dmm.015255>.
121. Iacomino, M.; Doliana, R.; Marchese, M.; Capuano, A.; Striano, P.; Spessotto, P.; Bosisio, G.; Iodice, R.; Manganelli, F.; Lanteri, P.; et al. Distal Motor Neuropathy Associated with Novel EMILIN1 Mutation. *Neurobiol. Dis.* **2020**, *137*, 104757. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104757>.
122. Zhao, L.; Xia, Z.; Wang, F. Zebrafish in the Sea of Mineral (Iron, Zinc, and Copper) Metabolism. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 33. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00033>.
123. Lin, C.-H.; Hwang, P.-P. The Control of Calcium Metabolism in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1783. <https://doi.org/10.3390/ijms17111783>.
124. Rodriguez-Pascual, F.; Rosell-Garcia, T. Lysyl Oxidases: Functions and Disorders. *J. Glaucoma* **2018**, *27* (Suppl. 1), S15–S19. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000910>.
125. Ojha, R.; Prasad, A.N. Menkes Disease: What a Multidisciplinary Approach Can Do. *J. Multidiscip. Healthc.* **2016**, *9*, 371–385. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S93454>.
126. Vallet, S.D.; Ricard-Blum, S. Lysyl Oxidases: From Enzyme Activity to Extracellular Matrix Cross-Links. *Essays Biochem.* **2019**, *63*, 349–364. <https://doi.org/10.1042/EBC20180050>.
127. Gansner, J.M.; Mendelsohn, B.A.; Hultman, K.A.; Johnson, S.L.; Gitlin, J.D. Essential Role of Lysyl Oxidases in Notochord Development. *Dev. Biol.* **2007**, *307*, 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.04.029>.
128. Guo, D.; Regalado, E.S.; Gong, L.; Duan, X.; Santos-Cortez, R.L.P.; Arnaud, P.; Ren, Z.; Cai, B.; Hostetler, E.M.; Moran, R.; et al. LOX Mutations Predispose to Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 928–934. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307130>.
129. Anderson, C.; Bartlett, S.J.; Gansner, J.M.; Wilson, D.; He, L.; Gitlin, J.D.; Kelsh, R.N.; Dowden, J. Chemical Genetics Suggests a Critical Role for Lysyl Oxidase in Zebrafish Notochord Morphogenesis. *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 51–59. <https://doi.org/10.1039/b613673g>.
130. Reynaud, C.; Baas, D.; Gleyzal, C.; Le Guellec, D.; Sommer, P. Morpholino Knockdown of Lysyl Oxidase Impairs Zebrafish Development, and Reflects Some Aspects of Copper Metabolism Disorders. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2008**, *27*, 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.03.002>.
131. Mendelsohn, B.A.; Yin, C.; Johnson, S.L.; Wilm, T.P.; Solnica-Krezel, L.; Gitlin, J.D. Atp7a Determines a Hierarchy of Copper Metabolism Essential for Notochord Development. *Cell Metab.* **2006**, *4*, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.001>.
132. Madsen, E.C.; Morcos, P.A.; Mendelsohn, B.A.; Gitlin, J.D. In Vivo Correction of a Menkes Disease Model Using Antisense Oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3909–3914. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710865105>.
133. Madsen, E.C.; Gitlin, J.D. Zebrafish Mutants Calamity and Catastrophe Define Critical Pathways of Gene-Nutrient Interactions in Developmental Copper Metabolism. *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000261. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000261>.
134. Roach, E.S.; Islam, M.P. Pseudoxanthoma Elasticum. *Handb. Clin. Neurol.* **2015**, *132*, 215–221. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62702-5.00015-9>.

135. Van Gils, M.; Willaert, A.; De Vilder, E.Y.G.; Coucke, P.J.; Vanakker, O.M. Generation and Validation of a Complete Knockout Model of Abcc6a in Zebrafish. *J. Invest. Dermatol.* **2018**, *138*, 2333–2342. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.06.183>.
136. Sun, J.; She, P.; Liu, X.; Gao, B.; Jin, D.; Zhong, T.P. Disruption of Abcc6 Transporter in Zebrafish Causes Ocular Calcification and Cardiac Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *22*, 278. <https://doi.org/10.3390/ijms22010278>.
137. Jansen, R.S.; Küçükosmanoglu, A.; de Haas, M.; Saphu, S.; Otero, J.A.; Hegman, I.E.M.; Bergen, A.A.B.; Gorgels, T.G.M.F.; Borst, P.; van de Wetering, K. ABCC6 Prevents Ectopic Mineralization Seen in Pseudoxanthoma Elasticum by Inducing Cellular Nucleotide Release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20206–20211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319582110>.
138. Li, R.; Baek, K.I.; Chang, C.-C.; Zhou, B.; Hsiai, T.K. Mechanosensitive Pathways Involved in Cardiovascular Development and Homeostasis in Zebrafish. *J. Vasc. Res.* **2019**, *56*, 273–283. <https://doi.org/10.1159/000501883>.
139. Mackay, E.W.; Apschner, A.; Schulte-Merker, S. Vitamin K Reduces Hypermineralisation in Zebrafish Models of PXE and GACI. *Development* **2015**, *142*, 1095–1101. <https://doi.org/10.1242/dev.113811>.
140. Pomozi, V.; Brampton, C.; Fülöp, K.; Chen, L.-H.; Apana, A.; Li, Q.; Uitto, J.; Le Saux, O.; Váradi, A. Analysis of Pseudoxanthoma Elasticum–Causing Missense Mutants of ABCC6 In Vivo; Pharmacological Correction of the Mislocalized Proteins. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134*, 946–953. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.482>.
141. Apschner, A.; Huitema, L.F.A.; Ponsioen, B.; Peterson-Maduro, J.; Schulte-Merker, S. Pathological Mineralization in a Zebrafish *Enpp1* Mutant Exhibits Features of Generalized Arterial Calcification of Infancy (GACI) and Pseudoxanthoma Elasticum (PXE). *Dis. Model. Mech.* **2014**, *7*, 811–822. <https://doi.org/10.1242/dmm.015693>.
142. Ribas, L.; Piferrer, F. The Zebrafish (Danio Rerio) as a Model Organism, with Emphasis on Applications for Finfish Aquaculture Research. *Rev. Aquac.* **2014**, *6*, 209–240. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>.
143. Lawson, N.D.; Weinstein, B.M. Arteries and Veins: Making a Difference with Zebrafish. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 674–682. <https://doi.org/10.1038/nrg888>.
144. Jin, S.-W.; Beis, D.; Mitchell, T.; Chen, J.-N.; Stainier, D.Y.R. Cellular and Molecular Analyses of Vascular Tube and Lumen Formation in Zebrafish. *Development* **2005**, *132*, 5199–5209. <https://doi.org/10.1242/dev.02087>.
145. White, R.M.; Sessa, A.; Burke, C.; Bowman, T.; LeBlanc, J.; Ceol, C.; Bourque, C.; Dovey, M.; Goessling, W.; Burns, C.E.; et al. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for in Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002>.
146. Jung, H.M.; Isogai, S.; Kamei, M.; Castranova, D.; Gore, A.V.; Weinstein, B.M. Imaging Blood Vessels and Lymphatic Vessels in the Zebrafish. In *Methods in Cell Biology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; Volume 133, pp. 69–103. ISBN 978-0-12-803475-0.
147. Boselli, F.; Vermot, J. Live Imaging and Modeling for Shear Stress Quantification in the Embryonic Zebrafish Heart. *Methods* **2016**, *94*, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.017>.
148. Yalcin, H.C.; Amindari, A.; Butcher, J.T.; Althani, A.; Yacoub, M. Heart Function and Hemodynamic Analysis for Zebrafish Embryos. *Dev. Dyn.* **2017**, *246*, 868–880. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24497>.
149. Jeong, J.-Y.; Kwon, H.-B.; Ahn, J.-C.; Kang, D.; Kwon, S.-H.; Park, J.A.; Kim, K.-W. Functional and Developmental Analysis of the Blood-Brain Barrier in Zebrafish. *Brain Res. Bull.* **2008**, *75*, 619–628. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.043>.
150. Harrison, M.R.M.; Bussmann, J.; Huang, Y.; Zhao, L.; Osorio, A.; Burns, C.G.; Burns, C.E.; Sucov, H.M.; Siekmann, A.F.; Lien, C.-L. Chemokine-Guided Angiogenesis Directs Coronary Vasculature Formation in Zebrafish. *Dev. Cell* **2015**, *33*, 442–454. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.001>.
151. Vargas, R.; Vásquez, I.C. Cardiac and Somatic Parameters in Zebrafish: Tools for the Evaluation of Cardiovascular Function. *Fish Physiol. Biochem.* **2016**, *42*, 569–577. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0160-8>.
152. Fei, P.; Lee, J.; Packard, R.R.S.; Sereti, K.-I.; Xu, H.; Ma, J.; Ding, Y.; Kang, H.; Chen, H.; Sung, K.; et al. Cardiac Light-Sheet Fluorescent Microscopy for Multi-Scale and Rapid Imaging of Architecture and Function. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22489. <https://doi.org/10.1038/srep22489>.
153. Scott, A.; Sueiro Ballesteros, L.; Bradshaw, M.; Tsuji, C.; Power, A.; Lorrinan, J.; Love, J.; Paul, D.; Herman, A.; Emanuelli, C.; et al. In Vivo Characterization of Endogenous Cardiovascular Extracellular Vesicles in Larval and Adult Zebrafish. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2021**, *41*, 2454–2468. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.316539>.
154. Li, D.Y.; Brooke, B.; Davis, E.C.; Mecham, R.P.; Sorensen, L.K.; Boak, B.B.; Eichwald, E.; Keating, M.T. Elastin Is an Essential Determinant of Arterial Morphogenesis. *Nature* **1998**, *393*, 276–280. <https://doi.org/10.1038/30522>.
155. Goldner, J. A Modification of the Masson Trichrome Technique for Routine Laboratory Purposes. *Am. J. Pathol.* **1938**, *14*, 237–243.
156. Shikata, T.; Uzawa, T.; Yoshiwara, N.; Akatsuka, T.; Yamazaki, S. Staining Methods of Australia Antigen in Paraffin Section--Detection of Cytoplasmic Inclusion Bodies. *Jpn. J. Exp. Med.* **1974**, *44*, 25–36.
157. Henwood, A.F. Shikata's Orcein Stain—A Routine Stain for Liver Biopsies. *Aust. J. Med. Lab. Sci.* **1983**, *4*, 76–80.

Conclusions et points importants

- Le poisson-zèbre possède deux protéines Eln : l'élastine a (Elna) et l'élastine b (Elnb) ;
- Elna est la plus proche de la tropoélastine humaine ;
- Elnb est très présente dans le BA ;
- Le BA, ainsi que l'aorte ventrale, sont des équivalents fonctionnels des artères élastiques mammifères, qui lissent le flux sanguin avant son passage dans les branchies ;
- Les pressions auxquelles est confronté le système cardiovasculaire (CV) du poisson sont amplement inférieures à celles présentes chez l'humain ;
- L'organisation de l'élastine du BA ne consiste pas en des « lamelles conventionnelles » ;
- Au niveau du système CV, l'élastine est présente dans le BA, dans la paroi vasculaire et également dans les valves cardiaques ;
- L'arbre artériel du poisson est caractérisé par une baisse du contenu en élastine dans la paroi vasculaire lorsqu'on s'éloigne du cœur, comme ce qui est décrit chez l'homme et la souris ;
- Le poisson-zèbre possède des orthologues de toutes les protéines majeures impliquées dans la formation et la maturation des fibres élastiques ;
- Le poisson-zèbre est déjà utilisé comme modèle pour de nombreuses maladies CV, et également dans des pathologies associées aux fibres élastiques ;
- Aucun modèle mutant pour *elna* ou *elnb* n'a été décrit pour l'instant.

Après avoir validé la pertinence du modèle du poisson-zèbre dans l'étude de l'élastine et de son importance dans le système cardiovasculaire, la caractérisation d'une lignée de mutants déficients en Elna a été réalisée.

La mutation $elna^{sa12235}$ consiste en une substitution d'une thymine par une adénine au début de la séquence codante de la protéine, ce qui aboutit à la création d'un codon stop à la place de la Tyrosine 88. Une protéine tronquée est produite, comprenant 87 acides aminés (sur 1164 normalement), la rendant non fonctionnelle.

Les effets de la perte d'Elna ont été examinés tout au long de la vie du poisson (développement, âge adulte, vieillissement), à l'état homozygote et hétérozygote. Un intérêt particulier a été porté sur les atteintes du système cardiovasculaire.

Cette partie du travail a donné lieu à un article de recherche, publié dans *Cells* en mai 2023. Son titre est : *Characterization of the zebrafish elastin a ($elna^{sa12235}$) mutant: a new model of elastinopathy leading to heart valve defects.*

Résumé de l'article

Dans cet article, nous décrivons le mutant $elna^{sa12235}$ sous sa forme homozygote et hétérozygote afin d'établir et de caractériser un nouveau modèle pour étudier les élastinopathies et leurs complications cardiovasculaires.

Dans un premier temps, une technique de géotypage a été mise au point pour permettre la discrimination des allèles *wild type* (WT) et mutant, qui ne diffèrent l'un de l'autre que par une base. La technique retenue est basée sur le principe de ARMS PCR pour *Amplification-Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction*. Cette méthode s'appuie sur le fait que l'hybridation entre l'amorce et sa séquence cible peut contenir quelques mésappariements sans que l'élongation n'en soit affectée. Cependant, si deux bases sur les trois les plus proches de la partie 3' de l'amorce ne peuvent pas s'hybrider, la polymérase ne parvient pas à allonger le brin et la réaction n'a pas lieu. De ce fait, en ajoutant volontairement des mésappariements sur les séquences des amorces utilisées, le nucléotide qui diffère entre les allèles WT et mutant devient déterminant pour permettre ou non l'élongation du brin. Ainsi, en utilisant deux couples d'amorces, des amplicons différents sont obtenus pour les 3 géotypes ($elna^{+/+}$; $elna^{+/-}$ et $elna^{-/-}$), ce qui peut facilement être mis en évidence par la suite en faisant migrer les produits résultants de la PCR sur un gel d'électrophorèse.

Les poissons $elna^{+/-}$ (HET) et $elna^{-/-}$ (MUT) ont une espérance de vie diminuée, avec entre 50 et 60% de morts à 20 mois post fertilisation (mpf), alors que 88% des WT sont encore vivants au même âge. De plus, les poissons mutants (HET et MUT) sont sujets à de nombreuses complications, et ce dès 10 mpf. Parmi ces complications, se trouvent par exemple un gonflement de l'abdomen qui n'est pas lié à la présence d'œufs (les mâles sont aussi affectés), l'apparition d'ulcères sur le corps du poisson, et dans les cas sévères, des hydropisies. L'hydropisie est un état pathologique caractérisé par un gonflement global du poisson, suivi du soulèvement de ses écailles, et d'une difficulté progressive à nager. Si rien n'est fait, le poisson meurt rapidement, toutes ces étapes pouvant survenir en moins de 24h.

Pour éviter une souffrance due à cet état d'hydropisie, les poissons malades ont été directement euthanasiés dès les premiers signes de mal-être. Le cœur de ces poissons a donc pu être collecté pour analyse. Nous avons pu mettre en évidence un tissu dysplasique autour du BA chez tous les poissons malades disséqués, parfois également présent autour du ventricule. Ce tissu ne contient pas d'élastine, ce qui le rend facilement distinguable du BA. Il contient une grande quantité de lipides,

encapsulés dans des structures ressemblant à des nodules et entourés de cellules immunitaires, notamment de lymphocytes T (exprimant du CD3e). Ce tissu pathologique a aussi été observé par la suite sur des cœurs de poissons plus âgés (22 mpf) de tous génotypes confondus.

Ces signes pathologiques (tissu dysplasique et complications visibles) ne sont cependant pas retrouvés chez tous les poissons mutants. En effet, certains poissons ne semblent pas développer de problème particulier et atteignent même un âge avancé sans aucun signe de pathologie. Les effets de la mutation ne s'expriment donc pas chez tous les porteurs de l'allèle muté, ce qui rend la population très hétérogène.

Les cœurs d'individus de chaque génotype ont été prélevés sur des poissons apparemment sains (12 mpf) pour voir si de quelconques différences pouvaient être mises en évidence avant le développement de complications visibles. Il en a été fait de même sur des poissons plus vieux (22 mpf), eux aussi apparemment sains. L'apparence macroscopique du cœur a tout d'abord été prise en compte. Aucune différence n'a été relevée à 12 mpf. A 22 mpf, tous les cœurs étaient entourés de tissus gras et friables, mais les cœurs de certains poissons mutants HET et MUT avaient une taille 4 à 5 fois plus grande que leurs homologues WT. Une analyse séparée du ventricule et du BA a montré que la taille du ventricule était significativement augmentée chez les poissons MUT. Les BA semblent aussi impactés mais l'hétérogénéité et le faible nombre de cœurs analysés n'ont pas permis de rapporter de significativité statistique.

Au niveau des cœurs « jeunes » (12 mpf), des différences de morphologie et d'organisation des valves cardiaques ont pu être mises en évidence. En effet, les valves des poissons mutants avaient un aspect désorganisé et des structures « bulleuses » en forme de nid d'abeille étaient très présentes aussi bien au niveau des valves atrio-ventriculaires (AV) que ventriculo-bulbaires (VB). Encore une fois, tous les mutants n'étaient pas concernés, mais ils étaient néanmoins les seuls à être atteints puisqu'aucun poisson WT n'a montré d'aspect excessivement alvéolé au niveau de ses valves cardiaques (4 poissons analysés par génotype).

Ces modifications affectant les valves pourraient être à l'origine des complications qui apparaissent ultérieurement. Il est en effet connu, en tout cas chez l'humain, que des valves non fonctionnelles (régurgitations ou sténoses) peuvent entraîner l'apparition d'œdèmes systémiques, ce qui pourrait correspondre à l'hydropisie observée chez les poissons en stade final, c'est-à-dire au moment où le cœur ne parvient plus à faire correctement son travail (insuffisance cardiaque). Une fatigue cardiaque engendrée par des valves moins fonctionnelles pourrait donner lieu à une hypertrophie du ventricule, expliquant ainsi la cardiomégalie observée chez les poissons âgés.

La formation d'un tissu inflammatoire dans le contexte d'hypertrophie cardiaque a déjà été décrite chez le poisson-zèbre, dans un modèle de surcharge induite. On peut donc émettre l'hypothèse que la mutation *elna*^{sa12235} accélère la fatigue cardiaque et entraîne une survenue précoce d'événements liés au vieillissement cardiovasculaire. La mutation *elna*^{sa12235} pourrait également rendre ses porteurs plus sujets à l'action négative de certains paramètres environnementaux (e.g. pathogène, nourriture).

En définitive, le poisson-zèbre mutant *elna*^{sa12235} est un modèle intéressant pour l'étude des valves cardiaques et de l'effet du manque d'élastine sur le fonctionnement de celles-ci. Elna semble très importante pour la physiologie cardiovasculaire du poisson-zèbre et son absence, même à l'état hétérozygote, entraîne une mortalité précoce. Ce nouveau modèle pourrait donc être utilisé pour mieux comprendre la pathogenèse des élastinopathies et leurs conséquences sur le système

cardiovasculaire, ainsi que pour tester le potentiel de molécules à visée thérapeutique pour ces pathologies, même si une optimisation du modèle serait tout d'abord nécessaire pour cette utilisation.

Characterization of the Zebrafish *Elastin a* (*elna^{sa12235}*) Mutant: A New Model of Elastinopathy Leading to Heart Valve Defects

Marie Hoareau, Naïma El Kholti, Romain Debret and Elise Lambert *

Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR CNRS 5305, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université de Lyon 1, 7 Passage du Vercors, CEDEX 07, F-69367 Lyon, France; marie.hoareau@ibcp.fr (M.H.); elkholti@unistra.fr (N.E.K.); romain.debret@ibcp.fr (R.D.)

* Correspondence: elise.lambert@ibcp.fr

Abstract: Elastic fibers are extracellular macromolecules that provide resilience and elastic recoil to elastic tissues and organs in vertebrates. They are composed of an elastin core surrounded by a mantle of fibrillin-rich microfibrils and are essentially produced during a relatively short period around birth in mammals. Thus, elastic fibers have to resist many physical, chemical, and enzymatic constraints occurring throughout their lives, and their high stability can be attributed to the elastin protein. Various pathologies, called elastinopathies, are linked to an elastin deficiency, such as non-syndromic supra-ventricular aortic stenosis (SVAS), Williams–Beuren syndrome (WBS), and autosomal dominant cutis laxa (ADCL). To understand these diseases, as well as the aging process related to elastic fiber degradation, and to test potential therapeutic molecules in order to compensate for elastin impairments, different animal models have been proposed. Considering the many advantages of using zebrafish, we here characterize a zebrafish mutant for the *elastin a* paralog (*elna^{sa12235}*) with a specific focus on the cardiovascular system and highlight premature heart valve defects at the adult stage.

Citation: Hoareau, M.; El Kholti, N.; Debret, R.; Lambert, E. Characterization of the Zebrafish *Elastin a* (*elna^{sa12235}*) Mutant: A New Model of Elastinopathy Leading to Heart Valve Defects. *Cells* **2023**, *12*, 1436. <https://doi.org/10.3390/cells12101436>

Academic Editor: Nicla Romano

Received: 17 March 2023

Revised: 18 May 2023

Accepted: 19 May 2023

Published: 21 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: elastin; elastinopathies; zebrafish; animal model; cardiac valves

1. Introduction

Tropoelastin is essential for the formation of elastic fibers. These elastic fibers are responsible for the elasticity of tissues in the body, such as the skin, lungs, tendons, and blood vessels [1]. The elastic component of the vascular wall is primarily needed in elastic arteries, comprising the aorta and its first ramifications. These high-caliber arteries allow the smoothing of the cardiac

pulsatile blood flow into a continuous flow so that all organs are optimally perfused at all times [2,3].

In humans, mutations affecting the elastin gene have been associated with diseases such as Williams–Beuren syndrome (WBS), autosomal dominant cutis laxa (ADCL), and non-syndromic supraaortic stenosis (SVAS) [4,5]. Vascular complications frequently develop and can lead to severe outcomes, namely stenosis, aneurysms, and dissections. The aorta is particularly affected; however, other large vessels, such as the pulmonary artery, can be damaged as well [6–8]. Moreover, these pathologies are found to increase the risk of cardiac valvulopathies [6].

Currently, there is no available treatment, neither to restore functional elastic fibers nor to prevent vascular complications that are associated with elastin deficiency. Establishing new models and an innovative research axis could uncover processes that are still not understood and open new directions. Elastin-associated pathologies have been mainly studied through the use of murine models so far. A new approach could be interesting to support the results found in mice and possibly complete them with new insights.

Zebrafish (*Danio rerio*) is a rising alternative model that has been increasingly used to study human diseases in the past few years. Their easy and low-cost maintenance, small size and numerous descendances, ex utero embryonic development, and transparency of the larvae are undeniable advantages [9,10]. In addition, their use in high-throughput assays combined with the complexity of a vertebrate species are valuable characteristics that allow faster experimental progress than with previous models [11]. Zebrafish have been used widely in various biomedical areas, including research on cardiovascular pathologies [12,13]. They have been shown to share a lot of similarities with humans, with around 82% of disease-associated human genes having at least one ortholog in the zebrafish [14]. They also show high levels of genetic and protein sequence conservation. However, due to the third-round whole genome duplication (3R WGD), a lot of their genes are present in more than one copy [15,16]. Tropoelastin is, for example, encoded by two genes in the zebrafish: *elastin a* and *elastin b* (also referred to as *elastin 1* and 2) [17].

Recently, we described the localization of elastin in the cardiovascular system of zebrafish, particularly in the bulbus arteriosus, the atrio-ventricular, and ventriculo-bulbar cardiac valves, and in vessels [18], as it had already been shown to some extent by Miao et al. [19]. Zebrafish mutants of both *elastin a* and *elastin b* have been generated as part of the Zebrafish Mutation Project (ZMP), some of which are commercially available [20]. Nevertheless, to our knowledge, none of these mutants has yet been described.

In this article, we present and characterize a new zebrafish mutant for the *elastin a* gene (*elna^{sa12235}*). Basic parameters such as survival, weight, and size were collected, and the impact of the mutation on the cardiovascular system was assessed with a particular focus on cardiac valves. This new pathological model could henceforth be used to study cardiac valve pathophysiology and to further understand the role of elastin in zebrafish cardiovascular functions.

2. Materials and Methods

2.1. Zebrafish Husbandry

All animals were kept in a dedicated facility (PRECI—UMS 3444, SFR Biosciences) with a controlled environment: 28 °C; 14 h/10 h light/dark cycle, as stated by standard procedures [21]. Mutant zebrafish were purchased from the Zebrafish International Resource Center (ZIRC) as heterozygous eggs (*elna^{sa12235}*—Transcript ID: ENSDART00000102316). Since the crossing of these original eggs, our study has been conducted over four generations. All procedures were conducted in accordance with the guidelines of the European Union and French laws and approved by the local animal ethic committee under the regulatory control of governmental authority (CECCAPP, Comité d’Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l’Animalerie de transit de l’ENS, au PBES et au laboratoire P4 (n° C2EA15), APAFIS #33958-2021100412005226 v6).

2.2. Genotyping

Zebrafish were genotyped by performing a tail biopsy on individuals 3 months post fertilization (mpf). Zebrafish were anesthetized using buffered tricaine methanesulfonate (MS-222—pH 7) at 0.2 g/L in an E3 medium. The tail biopsies were kept in 70 mM NaOH until digestion (10 min at 95 °C), then lysates were neutralized with 1 M Tris-HCl, pH 8, and centrifuged for 5 min at 10,000 g. The supernatants were collected and used for ARMS-PCR, as described in the results section, using the Taq 2X Master Mix from BioLabs (M0270). The PCR amplification products were separated by migration on a 2% agarose gel in TAE 1X at 100 V, and bands were revealed by a 20 min ethidium bromide bath followed by UV exposition.

2.3. Survival and Weight

After genotyping, zebrafish were separated into different tanks but fed the same way. The fish were counted regularly to note any deaths in each group and spot complications. The fish weight was measured after anesthesia by immersion using buffered tricaine methanesulfonate (MS-222—pH 7) at 0.2 g/L in an E3 medium. They were briefly wiped to remove excess water and placed on a scale. For each fish, a photo was also taken to determine its size afterward. The size was measured from the mouth of the fish to the beginning of its caudal fin to prevent bias due to variation in the total length of the tail fin. The fish were then put back in their original tanks. The body mass index (BMI) was defined as weight over size² (g/cm²).

2.4. Histology

Four fish of each genotype were collected at 12 and 22 mpf and were euthanized using 400 mg/L tricaine methanesulfonate (MS-222) buffered at pH 7. Zebrafish hearts were quickly collected, fixed with formalin, embedded in paraffin (FFPE) or in Tissue-Tek® O.C.T. compound, then cut into 5 or 8 µm thick sections, respectively.

2.4.1. Elastic Fiber Staining—Orcein Acid (According to Shikata’s Method)

Orcein staining was carried out on paraffin-embedded tissue sections, after dewaxing and rehydration up to water, by immersing sections for 30 min in a commercial solution of orcein acid (#010251, Diapath, Bergamo, Italy) [22,23]. The slides were then rinsed in different solutions, and counterstaining was then performed for 5 min with hematoxylin counterstain solution (#H-3401-500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The sections were then rinsed in running tap water, dehydrated, mounted in an organic mounting medium (BioMount DPC, Biognost, Zagreb, Croatia), and scanned using the Axioscan 7 slide scanner (Zeiss, Paris, France).

2.4.2. Collagen Fiber Staining—Picrosirius Red

Dewaxed and rehydrated tissue sections were stained for 1 h with Sirius Red F3B (Direct Red 80, #365548, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) solution at 1 g/L in a saturated aqueous solution of picric acid (1.3%). After two quick washes in 0.5% acidified water, the sections were dehydrated, mounted, and scanned using the Axioscan 7 slide scanner (Zeiss) under brightfield filters.

2.4.3. Lipid Staining—Oil Red O

A total of 8 μm cryosections were rehydrated for 5 min in PBS and immersed for 5 min in a 60% isopropanol solution before being stained for 15 min in a freshly prepared 0.3% (*w/v*) Oil Red O solution in 60% isopropanol. The stained sections were then rinsed in 60% isopropanol and counterstained using hematoxylin (#H-3401-500, Vector Laboratories) for 2 min before being mounted in an aqueous mounting medium.

2.4.4. Immunohistochemistry

After deparaffinization and rehydration, the antigen retrieval step was carried out by incubating 5 μm sections (i) in pepsin reagent (#R2283, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) for 5 min at 37 °C for elastin immunodetection or (ii) in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6, at 98 °C for 20 min for CD3e immunolabeling. Endogenous peroxidases were then quenched for 10 min at room temperature (RT) in Bloxall® Endogenous Blocking Solution (#SP-6000-100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and non-specific sites were blocked for 30 min at RT with BlockAid™ Blocking Solution (#B10710, Invitrogen™, Illkirch-Graffenstaden, France). Elastin (#21600 (1/2000), Abcam, Waltham, MA, USA) or CD3e (#MA1-90582 (1/200), ThermoFisher, Waltham, MA, USA) primary antibodies were incubated in a blocking solution overnight at 4 °C, and biotinylated secondary antibodies were incubated for 30 min at RT. Revelation was performed using ABC Reagent and 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) chromogen (R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC Kit from Vector Laboratories, #PK-7200, Burlingame, CA, USA), as recommended by the manufacturer, and nuclei were counterstained using hematoxylin (#H-3401-500, Vector Laboratories).

2.5. Statistical Analysis

The data were analyzed for statistical significance using Prism (version 8.0.1, GraphPad Software, Boston, MA, USA). All sets containing more than 10 values per group were tested for normality with Shapiro–Wilk's test and for homoscedasticity with Bartlett's test. When

normality and homoscedasticity were verified, parametric tests were used, and when not, non-parametric tests were run instead. Precise test choices are mentioned in the figure legend of the corresponding data.

3. Results

3.1. The ARMS-PCR Genotyping Technique

The *elna*^{sa12235} mutation consists of a single point mutation that replaces a thymine with an adenine. This change leads to the loss of a tyrosine (Tyr88) for a stop codon at the very beginning of the protein sequence. Thus, the resulting protein is truncated (only 87 amino acids) and is likely to be degraded rapidly [24,25].

The amplification-refractory mutation system (ARMS) PCR method allows discrimination between two almost identical DNA sequences [26,27], and thus, we decided to use it for fish genotyping. This method relies on the presence of a few mismatching bases in the primer sequence (Table 1), as illustrated in Figure 1A. Indeed, it has been shown that a single mismatch is not sufficient to prevent the elongation process, whereas two mismatches at the 30 extremity of the primer do have a significant impact [28,29]. Two pairs of primers were therefore designed using a web-based program, available at: <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html> (accessed on 10 January 2022) [30], so that each allele amplification results in a different set of amplicons with specific sizes (Figure 1B). This way, the discrimination between homozygous mutants (MUT; *elna*^{sa12235/sa12235}), heterozygous mutants (HET; *elna*^{sa12235/+}), and wild-type fish (WT; *elna*^{+/+}) can be obtained accurately, as shown in Figure 1C. It has to be noted that through this specific PCR method, we should visualize, with the forward and reverse outer primers, an amplicon of 378 bp, as drawn in Figure 1B. However, as already mentioned by Peng and colleagues, the two pairs of primers (outer and inner primers) compete with one another in the system, and DNA polymerase typically prefers to amplify shorter amplicons, which explains why the 378 bp band is difficult to observe in Figure 1C [27]. This genotyping was also confirmed by quantitative PCR (Figure S1). Further, as expected, ARMS-PCR genotyping of adult fish from 3 clutches obtained by crossing heterozygous fish from ZIRC (*elna*^{sa12235/+}) showed a Mendelian distribution (Figure S2).

Table 1. The presence of a few mismatching bases in the primer sequence.

	Primer Sequence	Tm
Forward outer	AATAATTCTCAATGGAGCCTAACTCCTCA	65
Reverse outer	TCCTAGAGGGAAACATGAATGCTCATAT	65
Forward inner	ACATATCTCTCTGGCTGTAGGTGGACAT	65
Reverse inner	CACCACCATATCCACCATAACCCTCT	66

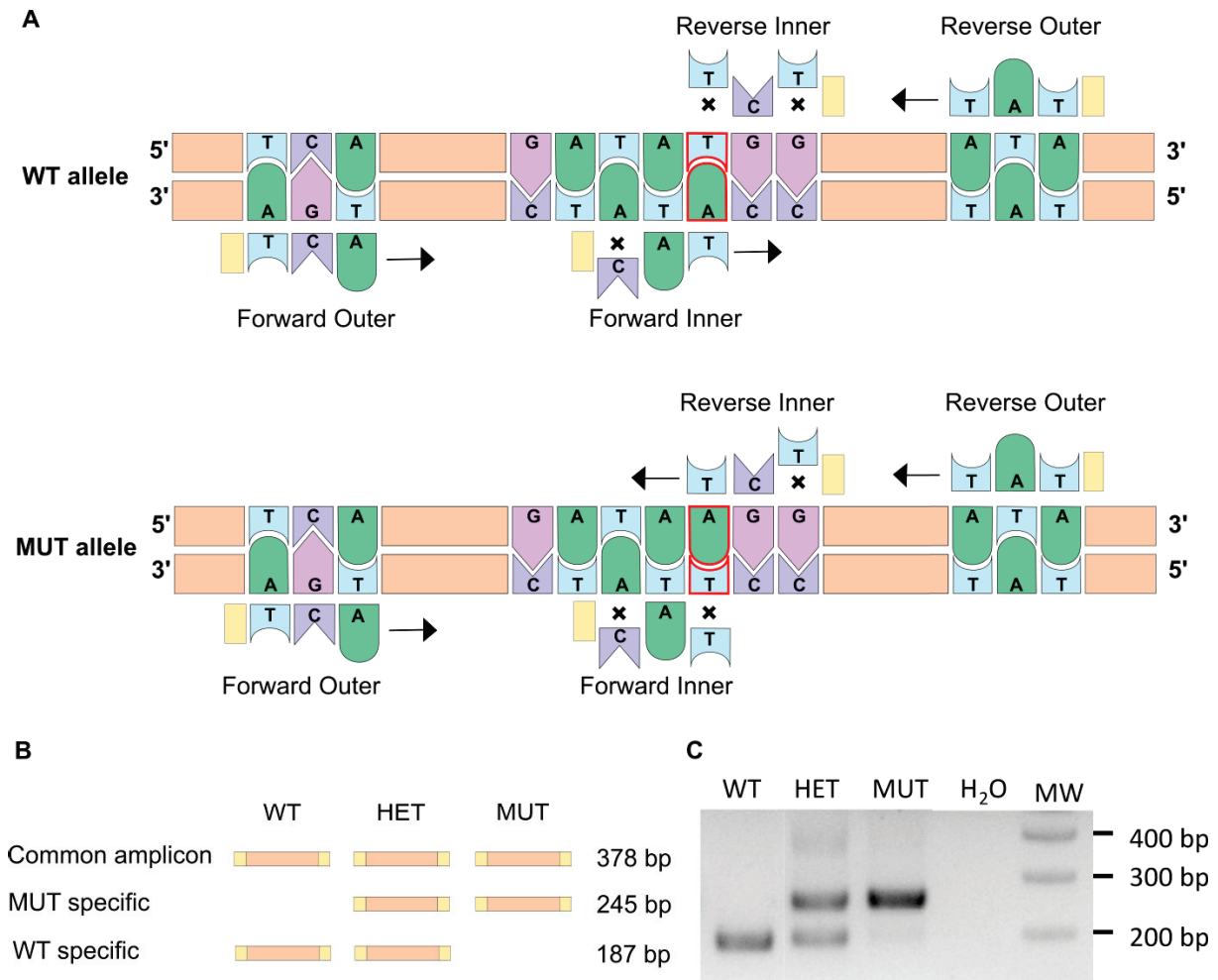


Figure 1. The ARMS-PCR technique allows to discriminate between WT and mutant alleles. (A) The ARMS-PCR principle is illustrated here. The single point mutation in the *elna^{sa12235}* mutant corresponds to the substitution of thymine into an adenine (delineated in red). Two pairs of primers are used so that PCR amplification does not lead to the same result for WT and mutant alleles. Crosses symbolize a mismatch between the primer and the DNA sequence. When two mismatches are found at the 30 extremity of the primer, the elongation cannot happen. When only one mismatch is present, transcription can occur (black arrow). (B) Schematic representation of amplicons generated through ARMS-PCR. (C) Gel electrophoresis of the PCR amplification products enables the genotype to be revealed for WT (wild type), HET (heterozygous), or MUT (mutant) individuals.

3.2. Survival and Weight

Survival, weight, and size were monitored for three independent clutches. Heterozygous (*elna^{sa12235/+}*) and homozygous (*elna^{sa12235/sa12235}*) mutants were found to have a significantly decreased life expectancy compared with their wild-type siblings. Almost half of the mutant fish were dead at 20 months post fertilization (mpf) (56% for HET and 53% for MUT), whereas only 12% of mortality was observed in the wild-type group (Figure 2A). The tracking was stopped at 22 mpf as “old” zebrafish started to die regardless of their genotype.

Zebrafish size and weight were also measured at 11 and 20 mpf, and BMI was thus calculated. Overall, there was no significant difference observed between genotypes (Figure 2B). Zebrafish globally tended to gain weight with age more than the increase in size, showing

a higher BMI at 20 mpf than at 11 mpf. We can note that the populations become more heterogeneous with age independently of the zebrafish genotype (Figure 2B).

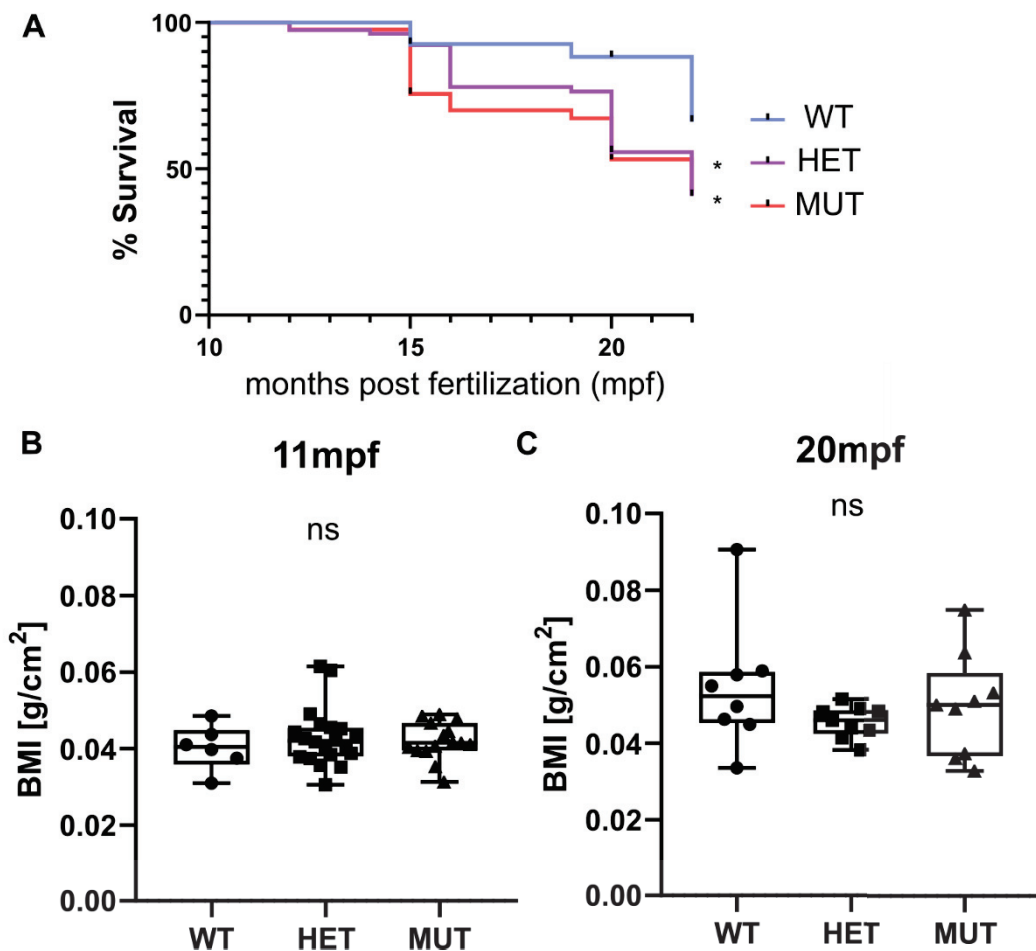


Figure 2. *elna* mutants have a shorter life expectancy. (A) Zebrafish survival from 3 independent clutches resulting from the crossing of heterozygous (*elna*^{sa12235/+}) fish was recorded after genotyping, from 10–11 mpf to 15–22 mpf (WT = 27; HET = 78; MUT = 41 zebrafish). Survival curves were compared using the log-rank Mantel-Cox test and the Log-rank test for trend; * $p < 0.05$. (B,C) Weight and size of fish were measured at 11 and 20 mpf and expressed as a body mass index (BMI). Data were analyzed by Kruskal–Wallis test; ns = non-significant; mpf = months post fertilization; WT = wild type (*elna*^{+/+}); HET = heterozygous (*elna*^{sa12235/+}); MUT = mutant (*elna*^{sa12235/sa12235}).

3.3. Severe but Highly Heterogenous Complications

Consistent with their decreased lifespan, heterozygous (*elna*^{sa12235/+}) and homozygous (*elna*^{sa12235/sa12235}) mutants were found to develop severe complications around 9–15 mpf, depending on the clutch. Nonetheless, substantial heterogeneity was observed, as some mutant fish did not show any pathological change.

The most frequent complications encountered were: a swollen belly that was not due to stuck eggs in the abdomen (Figure 3(Aiii)), important ulcers (tail, trunk, and head area) (Figure 3(Avi)), and more impressively, some fish were found all swollen with protruding scales and having trouble swimming, a condition sometimes referred to as “dropsy” (Figure 3(Aiv,Av)).

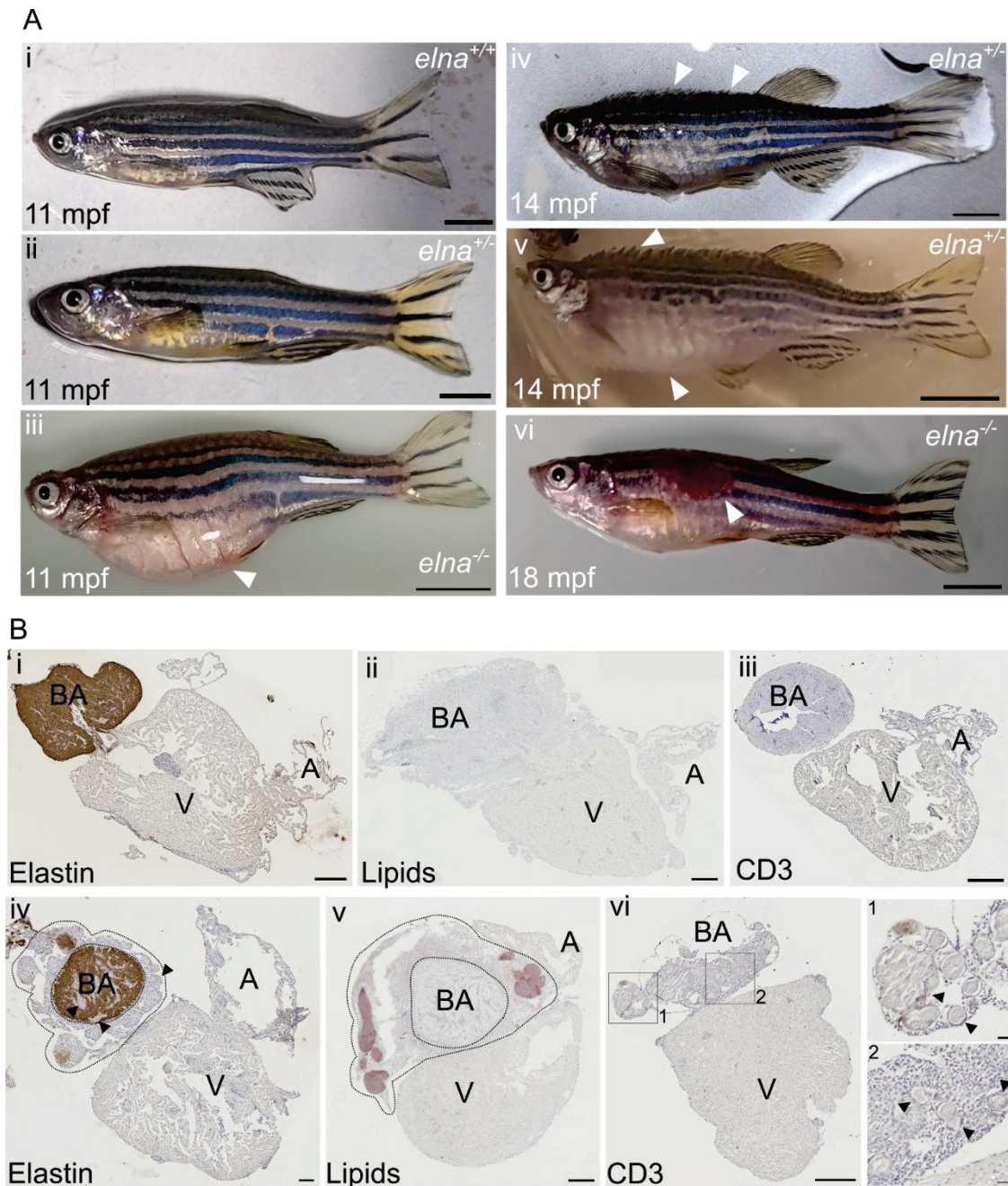


Figure 3. *elna*^{sa12235/+} and *elna*^{sa12235/sa12235} mutants suffer from severe cardiac complications. (A) Mutant zebrafish from 9 mpf were found to undergo complications such as (iii) an important swelling of the belly unrelated to stuck eggs; (iv,v) swelling of the entire body and protrusion of the scales with a rapid aggravation; (iv) early stage; (v) late stage; (vi) ulcers on their body; (i,ii) show normal fish of the same age. White arrows point to major observations of each image; scale bar = 0.5 cm. (B) Histological sections from (i,iii) normal or (iv–vi) pathological hearts from sick fish with protruding scales (here from *elna*^{sa12235/+} fish) were labeled for (i,iv) elastin; (ii,v) lipids; and (iii,vi) CD3e. In (iv) and (v), dotted lines encircle the dysplastic tissue surrounding the bulbus arteriosus; black arrows point to “nodule-like” structures found in the pathological hearts; scale bar = 200 μ m, except for zooms in vi-1 and vi-2, where scale bar = 20 μ m. BA = bulbus arteriosus; V = ventricle; A = atrium; mpf = months post fertilization.

When reaching this humane endpoint, the fish were euthanized and their hearts collected. During necropsy, we noticed that these hearts were bigger and surrounded by undetermined friable yellowish tissue. Histological analysis revealed pathological dysplastic

tissue surrounding the bulbus arteriosus (BA). The BA was still easily distinguishable because of its elastin content, as elastin was absent in the dysplastic tissue (Figure 3(Bi,Biv)). The pathological tissue was composed of small cells with a high nuclear-to-cytoplasmic ratio and sprinkled with “nodule-like” structures, sometimes also found in the BA and the ventricle (Figure 3(Biv–Bvi)). These histological transformations were observed frequently in old fish hearts (22 mpf), regardless of the genotype (Figure S3). Further immunohistochemical and histological analyses of the heart sections revealed that the nodule-like structures corresponded to encapsulated neutral lipid-positive aggregates (Figure 3(Bv)) surrounded by inflammatory cells, as demonstrated by the T cell marker CD3e labeling (Figure 3(Bvi)).

Considering the cardiovascular macroscopic and microscopic defects observed in the hearts of *elna^{sa12235/+}* and *elna^{sa12235/sa12235}* fish at the adult stage, we monitored embryonic development. *elna^{sa12235}* embryo survival was not affected during the early stages of development of individuals (from 0 to 7 dpf), and we did not notice any abnormality during elastin a mutant development based on daily observations. Cardiovascular dysfunction is usually associated with the formation of edema in zebrafish embryos [12]. Therefore, larval heartbeats were recorded at 7 days post fertilization, but this measurement revealed no difference, suggesting that the cardiovascular defects appear later at larval or adult stages (Figure S4).

3.4. Age-Associated Cardiomegaly

The hearts of 12 mpf and 22 mpf apparently healthy zebrafish were collected to determine if any difference could be observed in mutants prior to developing the complications shown in Figure 3.

No visible change was noticed comparing the 12 mpf hearts (Figure 4A). A fat layer was found surrounding the chambers of the hearts of almost all 22 mpf fish. However, the most impressive changes were found in mutant fish (*elna^{sa12235/+}* and *elna^{sa12235/sa12235}*), with some of their hearts being 4 to 5 times bigger than the normal size. The surface area of the BA (including the dysplastic tissue) and the ventricle were measured, and their ratio over the size of the fish was compared between genotypes (Figure 4B). *elna^{sa12235/sa12235}* zebrafish had significantly bigger ventricles compared with their WT siblings. The BA of elastin mutant fish also tended to increase in size, but not significantly, probably because of the heterogeneity of the dysplastic tissue.

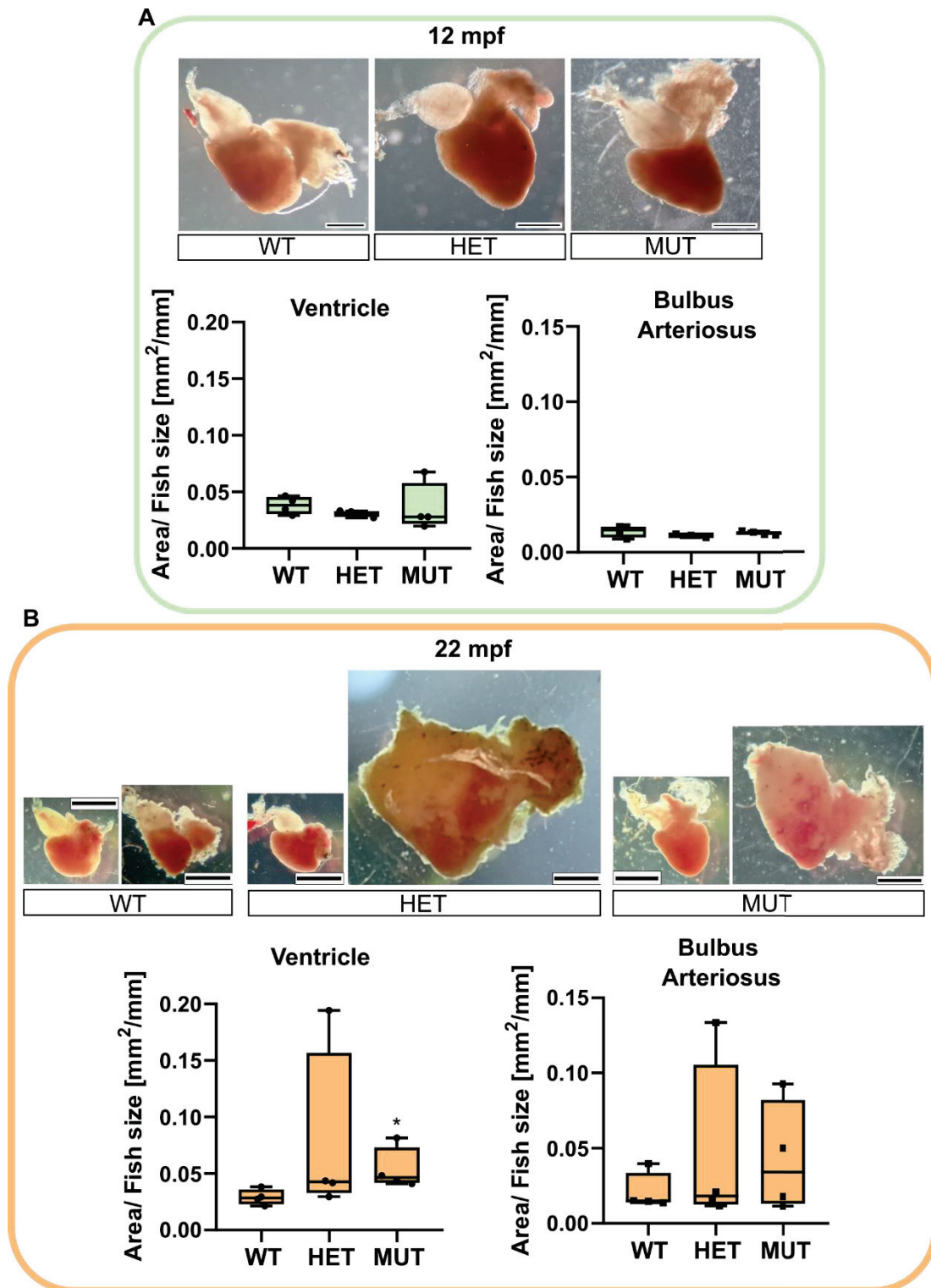


Figure 4. *elna* mutants are subject to cardiomegaly with age. Zebrafish hearts were collected from apparently healthy fish at 12 (A) or 22 (B) mpf ($n = 4$ fish per genotype and age). Representative images are shown for each genotype. The area of the ventricle and the bulbus arteriosus (including dysplastic tissue) was measured in each heart and reported, normalized with the size of the fish. Data were analyzed by Kruskal–Wallis with Dunn’s multiple comparison test; $* p < 0.05$. Scale bar = 0.5 mm. mpf = months post fertilization; WT = wild type (*elna*^{+/+}); HET = heterozygous (*elna*^{sa12235/+}); MUT = mutant (*elna*^{sa12235/sa12235}).

3.5. Cardiac Valve Morphology and Composition

The hearts of 12 mpf zebrafish were further analyzed by staining or immunolabelling of histological sections. Although the three chambers (BA, V, and A) did not show any obvious modifications, the cardiac valves did.

Mutant valves had excessively honeycomb-like areas and showed a disorganized aspect, both visible in the atrio-ventricular (A-V) (Figure 5A) and the ventriculo-bulbar (V-BA) valves (also called bulbo-ventricular valves) (Figure 5B). Moreover, they seemed larger and less defined. The width of valve leaflets is hard to measure, as it depends mostly on where the section is made. Thus, we decided to quantify the “empty” area in the honeycomb-like structures revealed by the elastin staining (by orcein) to assess the magnitude of the change. We found that these alveolate structures were also found in wild-type zebrafish valves but represented at most 20% of the total surface, whereas they could reach almost 60% in mutants (Figure 5C). Moreover, analysis of the global valve organization clearly revealed the abnormal state of the valves in more than 50% of *elna*^{sa12235} mutants, whereas no defects were observed in the valves of WT animals (Figure 5D).

The low number of individuals in the analysis did not allow for any statistical significance to be established. Moreover, the heterogeneity of the mutant population as well as the effects of an elastin a deficiency are to be kept in mind. While many mutants appear still healthy, *elna*^{sa12235/+} and *elna*^{sa12235/sa12235} zebrafish are the only ones to develop pathological valves, potentially initiating changes that will evolve into the severe complications shown in Figure 3.

As might be expected, the valves of *elna*^{sa12235/+} and *elna*^{sa12235/sa12235} mutants were found to have a markedly diminished quantity of elastin, according to both the orcein staining and the anti-elastin immunohistochemistry assay, and this reduction seemed to be dependent on fish genotype (Figure 5). However, some signals were still present in the valves of homozygous mutants. The methods used for elastin detection are not specific to elastin a. Therefore, elastin b is probably responsible for the remaining signals.

Cardiac valves of zebrafish reaching a humane endpoint (Figure 3) were more complicated to analyze, as often the entire heart was swollen and the corresponding tissue disintegrated during the inclusion steps, making the identification of the valves complex. From all the specimens collected, only one valve could be clearly seen, and it was highly honeycombed (data not shown). Furthermore, it should be noted that most valves found in pathological hearts from 22 mpf zebrafish of all genotypes were abnormally large and sometimes honeycombed as well (Figure S3).

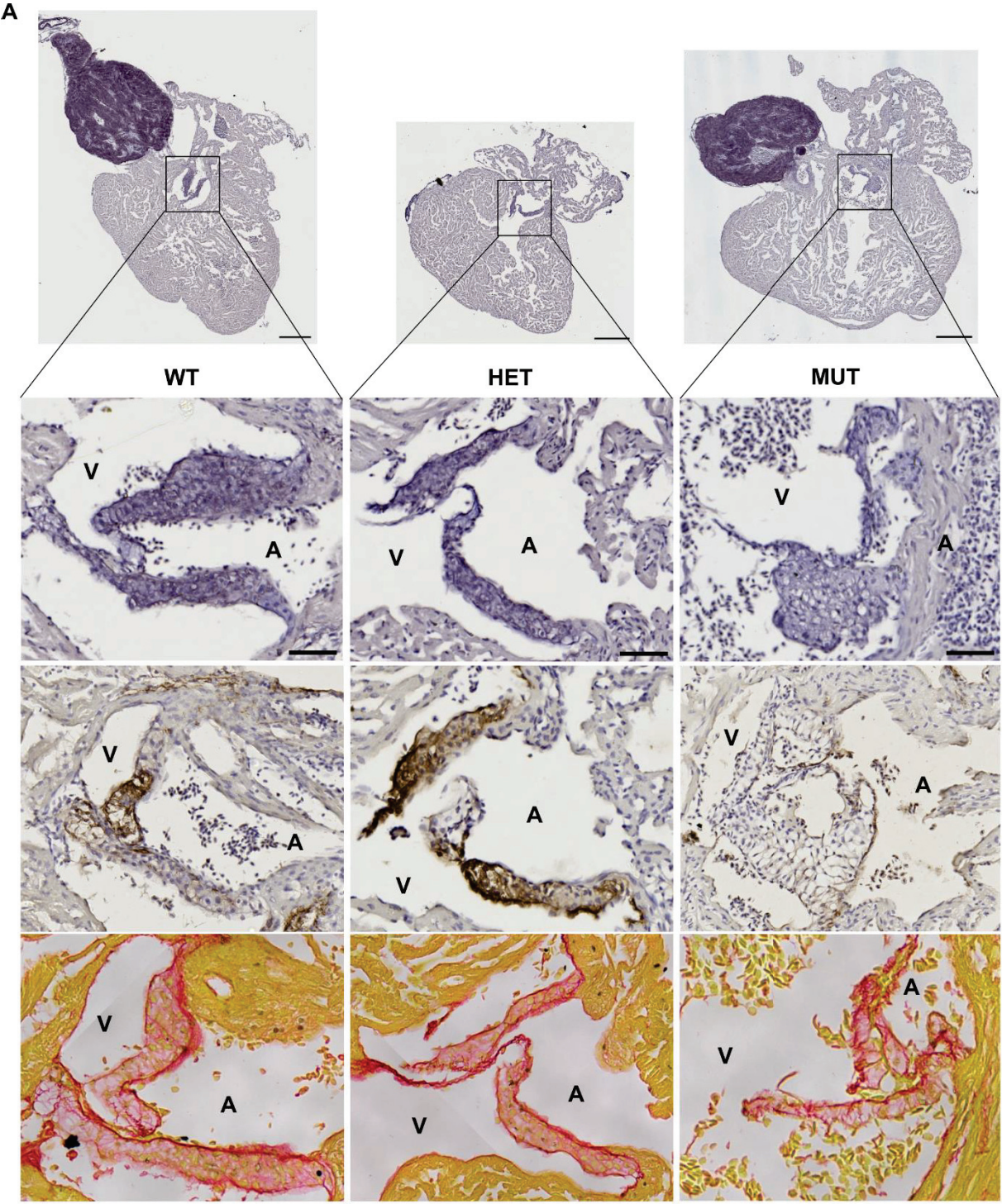
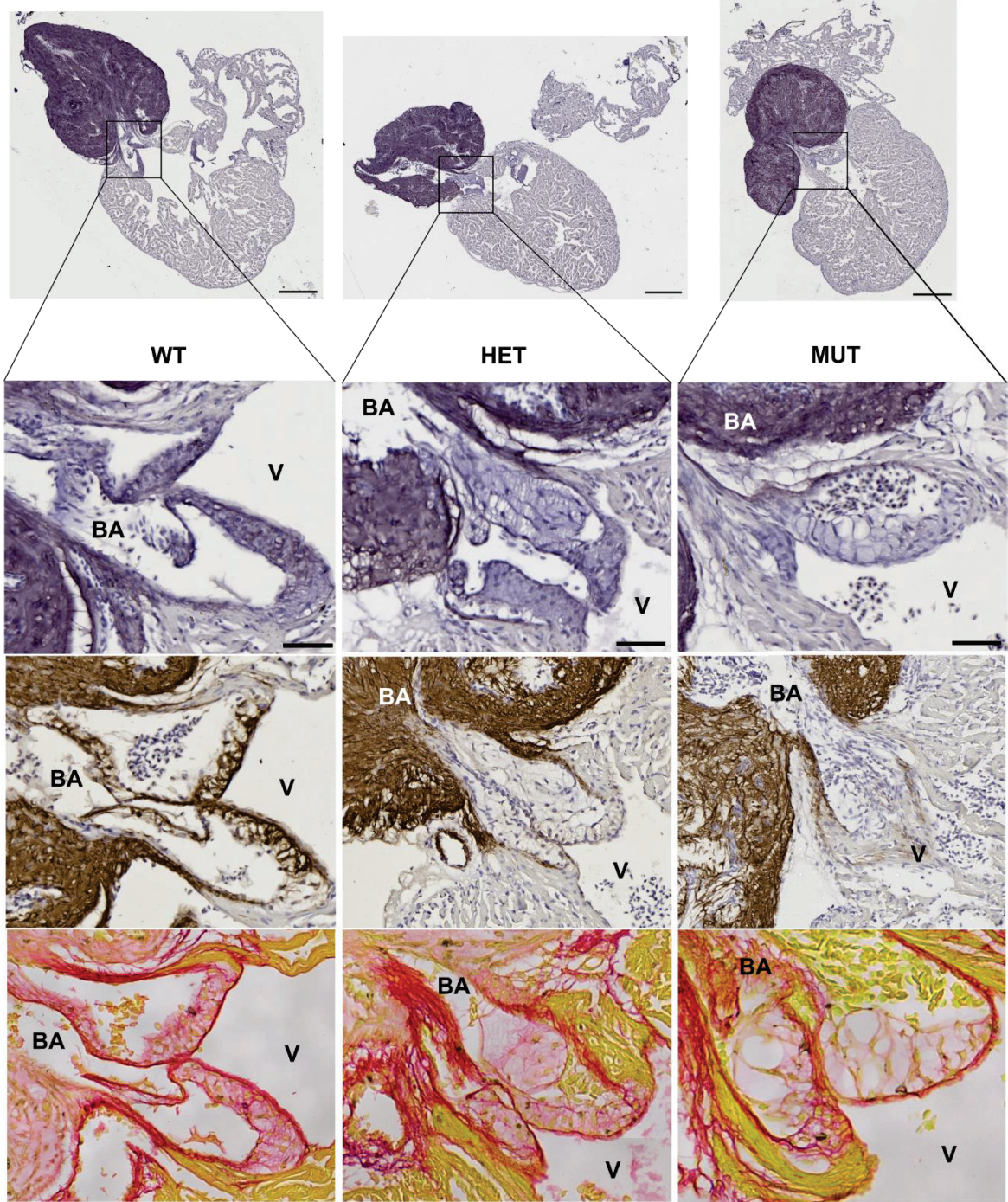
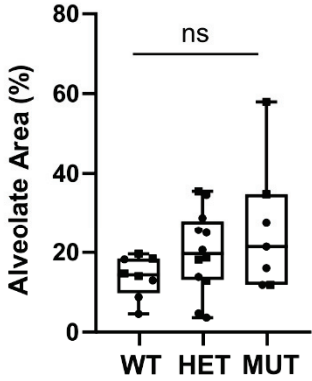


Figure 5. Cont.

B



C



D

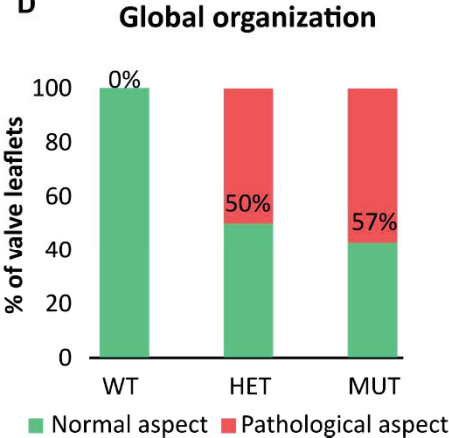


Figure 5. *elna* mutants show abnormal cardiac valves. (A,B) Histological images of the complete heart sections (orcein) and a zoom of the A-V valve (A) or BA-V valve (B) from 12 months post fertilization fish stained with orcein (first row), immunolabeled with anti-elastin antibodies (second row), or stained with picrosirius red (third row). (C) Quantification of “honeycomb-like” structures referred to as alveolate areas in valves from histological sections of zebrafish hearts. Each point is the result of one leaflet of the valve. Circles are for A-V valves, and squares are for V-BA valves. Four fish per genotype were analyzed; however, all their valves were not always visible enough to perform the analysis. (D) Global aspect of each valve leaflet was categorized as normal or pathological when the shape was unusual and the alveolate area exceeded 20% of the total surface. Scale bar = 200µm for complete heart sections and 40µm for valve images; A = atrium; V = ventricle; BA = bulbus arteriosus; SV = sinus venosus; A-V = atrio-ventricular; V-BA = ventriculo-bulbar; WT = wild type (*elna*^{+/+}); HET = heterozygous (*elna*^{sa12235/+}); MUT = mutant (*elna*^{sa12235/sa12235}); Kruskal–Wallis test was performed followed by Dunnett’s post hoc test in (C); ns = not significant.

4. Discussion

The mature heart valves are highly organized connective tissue structures populated with dynamic cell populations [31]. The extracellular matrix of the valves is stratified into elastin-, proteoglycan-, and collagen-rich layers that confer distinct biomechanical properties to the leaflets and supporting structures [32].

In this article, we describe for the first time the complications resulting from elastin deficiency in adult zebrafish, specifically concerning the cardiovascular system. Both heterozygous and homozygous mutants for the *elastin a* gene have a shorter life expectancy compared to wild-type zebrafish. They are more likely to develop ulcers, general swelling of their bodies, and protruding scales, leading invariably to premature death if the experiment is not stopped. This severe phenotype seems to be mainly due to impairment in the heart, particularly in cardiac valve function. Indeed, apart from a decreased content of elastin and before the onset of pathological outcomes, the valves of *elastin a* mutants showed an abnormal aspect resembling a honeycomb pattern.

In humans, cardiac valve insufficiency is often associated with swelling of the abdomen, ankles, and feet, also called edema [33,34]. Thus, the swelling of the fish or the “dropsy” state described in this article could be equivalent to a late stage of this condition with widespread edema. Cardiac regurgitation or aortic valve stenosis, which are associated with defective valves, are also known to cause cardiac hypertrophy in humans, particularly of the left ventricle [35]. This could be similar to what happens in some mutants, explaining the impressive increase in the volume/size of their hearts.

In sick mutant zebrafish, we also described pathological tissue surrounding the bulbus arteriosus—nicely delimited by elastin immunodetection—of the heart. This abnormal tissue consisted of lipids encapsulated in nodule-like structures surrounded by inflammatory cells. Inflammatory tissues have already been described in the heart of zebrafish in the context of overload-induced cardiac hypertrophy. Cardiomyocytes are known to secrete pro-inflammatory cytokines when stressed [36]. In our case, the origin of the pathological tissue in old zebrafish and younger mutants is not known yet, and we did not find similar observations in the literature.

We can hypothesize that it is a consequence of cardiac fatigue, triggered by valve dysfunction in mutants and by global aging in older fish. Husbandry parameters can influence the development of endocardiosis and myxomatous degeneration of the cardiac valves, along with aging [37]. However, regular analyses of the fish in our animal facility are carried out by an external veterinary laboratory using PCR and histological stainings (hematoxylin and eosin staining and specific staining (GRAM, Giemsa, and Fite-Faraco)) on young and old animals from different racks, and no bacterial infection has been detected in the last five years. Furthermore, all fish were exposed to the same environment, and mutants for *elastin a* did show severe complications more than one year before their wildtype siblings. Thus, the mutation of *elastin a* somehow accelerates cardiovascular aging or makes mutant zebrafish more susceptible to infection.

Our study demonstrates that the mutation does not affect all carriers in the same way, suggesting an incomplete penetrance. This phenotype variability could emerge from behavioral differences during growth, giving an advantage to individuals in the group in terms of access to food, for example. This observation could correspond to the interindividual variability observed in humans with a mutated *elastin* gene, where all patients will not develop the same complications [6]. Indeed, in the skin of cutis laxa patients, elastic tissue varies in content, appearance, proportion, and the way in which elastin and microfibrillar components are associated [38]. Moreover, in humans, high variability in phenotype is also observed between members of the same family carrying the same mutation on the *elastin* gene, again reflecting the differential penetrance of the mutation from one individual to another [39]. Finally, this heterogeneity in phenotype might be a common feature of connective tissue disorders since it is also observed in osteogenesis imperfecta (OI) and selected mutations in *col1a1* and *col1a2* paralogs in the zebrafish model give rise to phenotypic variability, mirroring the clinical variability associated with human disease pathology [40]. Consistent with our finding, *Eln*^{+/-} mice were also described as developing the cardiac valvular disease at a relatively low frequency in young mice (17%), whereas old mice were more affected, with 70% showing valve defects [41].

The heterogeneity of observed phenotypes in *elna*^{sa12235} mutants can also be attributed to the strong regenerative capacity of this model. Indeed, zebrafish are able to perfectly restore injured organs, including the heart and its valves [42–44]. This process could intervene in the development of cardiovascular issues associated with elastin deficiency. Therefore, we can assume that larger defects in homozygous fish lead to an earlier initiation of the regeneration process in these individuals, which consequently decreases the difference in phenotype between homozygous and heterozygous animals, thus explaining our results. In addition, this remarkable regenerative competence probably has an impact on *elna*^{sa12235} mutants and their survival because, despite the severe phenotype observed, particularly in the general morphology and size of the heart, no massive fibrosis is highlighted by picosirius red staining (Figure 5 and Figure S3) as could have been observed in mammals after infarction [45,46].

As zebrafish *elna*^{sa12235} mutants demonstrate a relatively severe phenotype, this model could be a valuable alternative to mice to test new therapeutic molecules. The use of elastin-based materials or the reinduction of elastin fiber synthesis in aged patients or elastin-deficient

patients is a crucial challenge, particularly when the cardiovascular system is impacted, and could be alternatives to heart valve surgical repair [47,48]. Various drugs and ingredients have been investigated for their capacity to induce elastin neosynthesis, among them minoxidil, an ATP-dependent K⁺ (KATP) channel opener, or dill extract, an activator of LOXL1 expression [49–54]. To date, various murine models have been employed to test those molecules [49,50,55,56].

Eln^{-/-} mice have normal cardiovascular development in utero up to an embryonic day (E) 18, but die just a few days later, between day (P) 0 and P4.5, due to the inward proliferation of medial smooth muscle cells resulting in obliteration of the large vessel lumen [2,57]. On the contrary, mice haploinsufficient for elastin (*Eln*^{+/-}) live a normal life span despite significant hypertension. However, since the generation of this mutated line, with repeated backcrossing to C57BL/6 mice, the blood pressure phenotype has become less severe (~15% increase in systolic blood pressure over WT compared to the initially reported 36% increase) [58]. Thus, further analyses are necessary to highlight cardiovascular defects in those mice (i.e., *Eln*^{+/-} arteries have smaller diameters and thinner walls than WT arteries and present an elevated number of elastic lamellae in the medial layer (11 ± 0.1 instead of 8.8 ± 0.4 lamellae in 6-month-old mice)) [59–61], which leads to a more tricky validation of the efficacy of a therapeutic molecule.

The fact that elastin exists in two copies in the zebrafish could be interesting in this particular case, as *elastin b* is still expressed in the vessels and in the bulbus arteriosus (as demonstrated by elastin immunodetection in Figure 3B and Figure S3), so that the zebrafish survives, but at the same time valves are mostly deprived of it, as elastin a seems to be the prevalent isoform expressed in this specific structure.

Another advantage of zebrafish as an animal model to validate drug efficiency is the ease of administration of a water-soluble compound. Indeed, the fish can be directly immersed in the drug solution rather than being injected into the blood circulation.

Finally, the cardiac electrophysiology (heart rate and electrocardiogram profile) of the zebrafish heart is much closer to that of humans than that of mice [11,62]. For example, the zebrafish heart contracts at a frequency of 60–100 beats/min, as in humans, whereas this rate is almost 10 times higher in mice. Considering these parameters, we can also assume that the behavior of a therapeutic molecule in zebrafish could better predict its behavior in humans compared to mice.

All these arguments lead us to consider the zebrafish model and, in particular, the *elna*^{sa12235} mutants as an alternative to the traditionally used mammalian model and as an interesting tool for developing new candidates for the treatment of valvulopathies related to elastin deficiency. Obviously, given the high heterogeneity of the observed phenotype, the number of fish used to test pharmacological molecules will have to be substantial, as for the mouse model. Despite the numerous advantages offered by the zebrafish model, it will not supplant mammalian models but could significantly reduce their number and accelerate the introduction of new therapeutic molecules.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12101436/s1>, Figure S1: Genotyping of WT, *elna*^{sa12235/+} and *elna*^{sa12235/sa12235} animals through quantitative PCR; Figure S2: Genotyping of 3 different clutches obtained from crossing heterozygote animals through ARMS-PCR; Figure S3: 22 mpf fish all show pathological hearts regardless of their genotype; Figure S4: Heart rate is not modified in *elna* mutant larvae.

Author Contributions: Conceptualization, E.L. and M.H.; methodology, E.L., N.E.K. and M.H.; investigation, M.H., N.E.K. and E.L.; visualization, M.H.; formal analysis, M.H. and E.L.; supervision, E.L. and R.D.; writing—original draft preparation, M.H. and E.L.; writing—review and editing, R.D.; funding acquisition, R.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French National Research Agency (ANR, France, grant # ANR-18-CE18-0001).

Institutional Review Board Statement: All procedures involving zebrafish were conducted in accordance with the guidelines of the European Union and French laws and were approved by the local animal ethic committee under the regulatory authority of the governmental authority (CECCAPP, Comité d’Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l’Animalerie de transit de l’ENS, au PBES et au laboratoire P4 (n° C2EA15), APAFIS #33958-2021100412005226 v6).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Acknowledgments: We thank the Zebrafish Facility (PRECI) from the Federative Structure of Research BioSciences UAR3444/US8 and particularly Laure Bernard and Robert Renard for their involvement in animal well-being. We greatly thank members of the histology and imaging facility (PrImaTiss) at the LBTI Institute. We also thank the CIQLE platform (Federative Structure of Research Santé Lyon Est) and particularly Bruno Chapuis for their great help in the acquisition of the images shown in this article. The authors acknowledge the expert advice of Club d’Analyse d’Images, a service supported by the LyMIC facility (SFR Santé Lyon-Est/UAR3453 CNRS, US7 Inserm, UCBL) and LABEX CORTEX (ANR-11-LABX-0042) of the Université Claude Bernard Lyon 1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Wise, S.G.; Weiss, A.S. Tropoelastin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 494–497. [CrossRef] [PubMed]
2. Wagenseil, J.E.; Mecham, R.P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 957–989. [CrossRef] [PubMed]

3. Cocciolone, A.J.; Hawes, J.Z.; Staiculescu, M.C.; Johnson, E.O.; Murshed, M.; Wagenseil, J.E. Elastin, Arterial Mechanics, and Cardiovascular Disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H189–H205. [CrossRef] [PubMed]
4. Baldwin, A.K.; Simpson, A.; Steer, R.; Cain, S.A.; Kielty, C.M. Elastic Fibres in Health and Disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **2013**, *15*, e8. [CrossRef]
5. Sherratt, M.J. Tissue Elasticity and the Ageing Elastic Fibre. *Age* **2009**, *31*, 305–325. [CrossRef]
6. Duque Lasio, M.L.; Kozel, B.A. Elastin-Driven Genetic Diseases. *Matrix Biol.* **2018**, *71–72*, 144–160. [CrossRef]
7. Kozel, B.A.; Barak, B.; Ae Kim, C.; Mervis, C.B.; Osborne, L.R.; Porter, M.; Pober, B.R. Williams Syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**, *7*, 42. [CrossRef]
8. Graul-Neumann, L.M.; Hausser, I.; Essayie, M.; Rauch, A.; Kraus, C. Highly Variable Cutis Laxa Resulting from a Dominant Splicing Mutation of the Elastin Gene. *Am. J. Med. Genet.* **2008**, *146A*, 977–983. [CrossRef]
9. Detrich, H.W.; Westerfield, M.; Zon, L.I. Overview of the Zebrafish System. *Methods Cell Biol.* **1999**, *59*, 3–10. [CrossRef]
10. Choi, T.-Y.; Choi, T.-I.; Lee, Y.-R.; Choe, S.-K.; Kim, C.-H. Zebrafish as an Animal Model for Biomedical Research. *Exp. Mol. Med.* **2021**, *53*, 310–317. [CrossRef]
11. González-Rosa, J.M. Zebrafish Models of Cardiac Disease: From Fortuitous Mutants to Precision Medicine. *Circ. Res.* **2022**, *130*, 1803–1826. [CrossRef]
12. Gut, P.; Reischauer, S.; Stainier, D.Y.R.; Arnaout, R. Little fish, big data: Zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease. *Physiol. Rev.* **2017**, *97*, 889–938. [CrossRef] [PubMed]
13. Bowley, G.; Kugler, E.; Wilkinson, R.; Lawrie, A.; Eeden, F.; Chico, T.J.A.; Evans, P.C.; Noël, E.S.; Serbanovic-Canic, J. Zebrafish as a Tractable Model of Human Cardiovascular Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2022**, *179*, 900–917. [CrossRef]
14. Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome. *Nature* **2013**, *496*, 498–503. [CrossRef] [PubMed]
15. Glasauer, S.M.K.; Neuhauss, S.C.F. Whole-Genome Duplication in Teleost Fishes and Its Evolutionary Consequences. *Mol. Genet. Genom.* **2014**, *289*, 1045–1060. [CrossRef]
16. Pasquier, J.; Cabau, C.; Nguyen, T.; Jouanno, E.; Severac, D.; Braasch, I.; Journot, L.; Pontarotti, P.; Klopp, C.; Postlethwait, J.H.; et al. Gene Evolution and Gene Expression after Whole Genome Duplication in Fish: The PhyloFish Database. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 368. [CrossRef]
17. Moriyama, Y.; Ito, F.; Takeda, H.; Yano, T.; Okabe, M.; Kuraku, S.; Keeley, F.W.; Koshiba-Takeuchi, K. Evolution of the Fish Heart by Sub/Neofunctionalization of an Elastin Gene. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10397. [CrossRef]
18. Hoareau, M.; El Kholti, N.; Debret, R.; Lambert, E. Zebrafish as a Model to Study Vascular Elastic Fibers and Associated Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2102. [CrossRef] [PubMed]
19. Miao, M.; Bruce, A.E.E.; Bhanji, T.; Davis, E.C.; Keeley, F.W. Differential Expression of Two Tropoelastin Genes in Zebrafish. *Matrix Biol.* **2007**, *26*, 115–124. [CrossRef] [PubMed]
20. Kettleborough, R.N.W.; Busch-Nentwich, E.M.; Harvey, S.A.; Dooley, C.M.; de Bruijn, E.; van Eeden, F.; Sealy, I.; White, R.J.; Herd, C.; Nijman, I.J.; et al. A Systematic Genome-Wide Analysis of Zebrafish Protein-Coding Gene Function. *Nature* **2013**, *496*, 494–497. [CrossRef]
21. Westerfield, M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*; University of Oregon Press: Eugene, OR, USA, 2000.
22. Shikata, T.; Uzawa, T.; Yoshiwara, N.; Akatsuka, T.; Yamazaki, S. Staining Methods of Australia Antigen in Paraffin Section—Detection of Cytoplasmic Inclusion Bodies. *Jpn. J. Exp. Med.* **1974**, *44*, 25–36.

23. Henwood, A.F. Shikata's Orcein Stain—A Routine Stain for Liver Biopsies. *Aust. J. Med. Lab. Sci.* **1983**, *4*, 76–80.
24. Waters, P.J. Degradation of Mutant Proteins, Underlying “Loss of Function” Phenotypes, Plays a Major Role in Genetic Disease. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2001**, *3*, 57–65. [PubMed]
25. Brogna, S.; Wen, J. Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) Mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 107–113. [CrossRef]
26. Little, S. Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **2001**, *9*, 9.8. [CrossRef]
27. Peng, B.; Wang, Q.; Luo, Y.; He, J.; Tan, T.; Zhu, H. A Novel and Quick PCR-Based Method to Genotype Mice with a Leptin Receptor Mutation (Db/Db Mice). *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 117–123. [CrossRef] [PubMed]
28. Huang, M.M.; Arnheim, N.; Goodman, M.F. Extension of Base Mispairs by Taq DNA Polymerase: Implications for Single Nucleotide Discrimination in PCR. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4567–4573. [CrossRef]
29. Vamvakopoulos, J.E. Multiplex Universal Genotyping Using a Modified ARMS-PCR Protocol. *Biotechniques* **2002**, *33*, 1110–1112. [CrossRef]
30. Ye, S.; Dhillon, S.; Ke, X.; Collins, A.R.; Day, I.N. An Efficient Procedure for Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, E88. [CrossRef] [PubMed]
31. Schoen, F.J. Evolving Concepts of Cardiac Valve Dynamics: The Continuum of Development, Functional Structure, Pathobiology, and Tissue Engineering. *Circulation* **2008**, *118*, 1864–1880. [CrossRef]
32. Hinton, R.B.; Yutzey, K.E. Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **2011**, *73*, 29–46. [CrossRef]
33. Bekeredjian, R.; Grayburn, P.A. Valvular Heart Disease: Aortic Regurgitation. *Circulation* **2005**, *112*, 125–134. [CrossRef] [PubMed]
34. Hoppe, U.C. How to detect impending cardiac insufficiency. *MMW Fortschr. Med.* **2005**, *147*, 30–33. [PubMed]
35. Gorton, A.J.; Keshavamurthy, S.; Saha, S.P. Diagnosis and Management of Aortic Valvular Disease in the Elderly. *Int. J. Angiol.* **2022**, *31*, 232–243. [CrossRef]
36. Kallikourdis, M.; Martini, E.; Carullo, P.; Sardi, C.; Roselli, G.; Greco, C.M.; Vignali, D.; Riva, F.; Ornbostad Berre, A.M.; Stølen, T.O.; et al. T Cell Costimulation Blockade Blunts Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14680. [CrossRef] [PubMed]
37. Cooper, T.K.; Spitsbergen, J.M. Valvular and Mural Endocardiosis in Aging Zebrafish (*Danio rerio*). *Vet. Pathol.* **2016**, *53*, 504–509. [CrossRef]
38. Sephel, G.C.; Byers, P.H.; Holbrook, K.A.; Davidson, J.M. Heterogeneity of Elastin Expression in Cutis Laxa Fibroblast Strains. *J. Investig. Dermatol.* **1989**, *93*, 147–153. [CrossRef]
39. Marchase, P.; Holbrook, K.; Pinnell, S.R. A Familial Cutis Laxa Syndrome with Ultrastructural Abnormalities of Collagen and Elastin. *J. Investig. Dermatol.* **1980**, *75*, 399–403. [CrossRef]
40. Gistelink, C.; Kwon, R.Y.; Malfait, F.; Symoens, S.; Harris, M.P.; Henke, K.; Hawkins, M.B.; Fisher, S.; Sips, P.; Guillemin, B.; et al. Zebrafish Type I Collagen Mutants Faithfully Recapitulate Human Type I Collagenopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E8037–E8046. [CrossRef]
41. Hinton, R.B.; Adelman-Brown, J.; Witt, S.; Krishnamurthy, V.K.; Osinska, H.; Sakthivel, B.; James, J.F.; Li, D.Y.; Narmoneva, D.A.; Mecham, R.P.; et al. Elastin Haploinsufficiency Results in Progressive Aortic Valve Malformation and Latent Valve Disease in a Mouse Model. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 549–557. [CrossRef]
42. Poss, K.D.; Wilson, L.G.; Keating, M.T. Heart Regeneration in Zebrafish. *Science* **2002**, *298*, 2188–2190. [CrossRef]
43. Bensimon-Brito, A.; Ramkumar, S.; Boezio, G.L.M.; Guenther, S.; Kuenne, C.; Helker, C.S.M.; Sánchez-Iranzo, H.; Iloska, D.; Piesker, J.; Pullamsetti, S.; et al. TGF- β Signaling Promotes Tissue

- Formation during Cardiac Valve Regeneration in Adult Zebrafish. *Dev. Cell* **2020**, *52*, 9–20.e7. [CrossRef] [PubMed]
44. Marques, I.J.; Lupi, E.; Mercader, N. Model Systems for Regeneration: Zebrafish. *Development* **2019**, *146*, dev167692. [CrossRef]
45. Hadi, H.A.; Alsheikh-Ali, A.A.; Mahmeed, W.A.; Suwaidi, J.M.A. Inflammatory Cytokines and Atrial Fibrillation: Current and Prospective Views. *J. Inflamm. Res.* **2010**, *3*, 75–97. [CrossRef] [PubMed]
46. Aghajanian, H.; Kimura, T.; Rurik, J.G.; Hancock, A.S.; Leibowitz, M.S.; Li, L.; Scholler, J.; Monslow, J.; Lo, A.; Han, W.; et al. Targeting Cardiac Fibrosis with Engineered T Cells. *Nature* **2019**, *573*, 430–433. [CrossRef]
47. Ibáñez-Fonseca, A.; Ramos, T.L.; González de Torre, I.; Sánchez-Abarca, L.I.; Muntión, S.; Arias, F.J.; del Cañizo, M.C.; Alonso, M.; Sánchez-Guijo, F.; Rodríguez-Cabello, J.C. Biocompatibility of Two Model Elastin-like Recombinamer-Based Hydrogels Formed through Physical or Chemical Cross-Linking for Various Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12*, e1450–e1460. [CrossRef] [PubMed]
48. Gonzalez de Torre, I.; Alonso, M.; Rodriguez-Cabello, J.-C. Elastin-Based Materials: Promising Candidates for Cardiac Tissue Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 657. [CrossRef] [PubMed]
49. Coquand-Gandit, M.; Jacob, M.-P.; Fhayli, W.; Romero, B.; Georgieva, M.; Bouillot, S.; Estève, E.; Andrieu, J.-P.; Brasseur, S.; Bouyon, S.; et al. Chronic Treatment with Minoxidil Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Aorta of Aged Mice. *Rejuvenation Res.* **2017**, *20*, 218–230. [CrossRef]
50. Knutsen, R.H.; Beeman, S.C.; Broekelmann, T.J.; Liu, D.; Tsang, K.M.; Kovacs, A.; Ye, L.; Danback, J.R.; Watson, A.; Wardlaw, A.; et al. Minoxidil Improves Vascular Compliance, Restores Cerebral Blood Flow, and Alters Extracellular Matrix Gene Expression in a Model of Chronic Vascular Stiffness. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H18–H32. [CrossRef]
51. Fhayli, W.; Boëté, Q.; Harki, O.; Briançon-Marjollet, A.; Jacob, M.-P.; Faury, G. Rise and Fall of Elastic Fibers from Development to Aging. Consequences on Arterial Structure-Function and Therapeutical Perspectives. *Matrix Biol.* **2019**, *84*, 41–56. [CrossRef]
52. Fhayli, W.; Boëté, Q.; Kihal, N.; Cenizo, V.; Sommer, P.; Boyle, W.A.; Jacob, M.-P.; Faury, G. Dill Extract Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Ascending Aorta of Aged Mice with Reversal of Age-Dependent Cardiac Hypertrophy and Involvement of Lysyl Oxidase-Like-1. *Biomolecules* **2020**, *10*, 173. [CrossRef] [PubMed]
53. Cenizo, V.; André, V.; Reymermier, C.; Sommer, P.; Damour, O.; Perrier, E. LOXL as a Target to Increase the Elastin Content in Adult Skin: A Dill Extract Induces the LOXL Gene Expression. *Exp. Dermatol.* **2006**, *15*, 574–581. [CrossRef]
54. Sohm, B.; Cenizo, V.; André, V.; Zahouani, H.; Pailler-Mattei, C.; Vogelgesang, B. Evaluation of the Efficacy of a Dill Extract in Vitro and in Vivo. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2011**, *33*, 157–163. [CrossRef]
55. Tsoporis, J.; Keeley, F.W.; Lee, R.M.; Leenen, F.H. Arterial Vasodilation and Vascular Connective Tissue Changes in Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1998**, *31*, 960–962. [CrossRef]
56. Slove, S.; Lannoy, M.; Behmoaras, J.; Pezet, M.; Sloboda, N.; Lacolley, P.; Escoubet, B.; Buján, J.; Jacob, M.-P. Potassium Channel Openers Increase Aortic Elastic Fiber Formation and Reverse the Genetically Determined Elastin Deficit in the BN Rat. *Hypertension* **2013**, *62*, 794–801. [CrossRef] [PubMed]
57. Li, D.Y.; Brooke, B.; Davis, E.C.; Mecham, R.P.; Sorensen, L.K.; Boak, B.B.; Eichwald, E.; Keating, M.T. Elastin Is an Essential Determinant of Arterial Morphogenesis. *Nature* **1998**, *393*, 276–280. [CrossRef]
58. Halabi, C.M.; Broekelmann, T.J.; Knutsen, R.H.; Ye, L.; Mecham, R.P.; Kozel, B.A. Chronic Antihypertensive Treatment Improves Pulse Pressure but Not Large Artery Mechanics in a Mouse Model of Congenital Vascular Stiffness. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2015**, *309*, H1008–H1016. [CrossRef]

59. Faury, G.; Pezet, M.; Knutsen, R.H.; Boyle, W.A.; Heximer, S.P.; McLean, S.E.; Minkes, R.K.; Blumer, K.J.; Kovacs, A.; Kelly, D.P.; et al. Developmental Adaptation of the Mouse Cardiovascular System to Elastin Haploinsufficiency. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 1419–1428. [CrossRef]
60. Wagenseil, J.E.; Nerurkar, N.L.; Knutsen, R.H.; Okamoto, R.J.; Li, D.Y.; Mecham, R.P. Effects of Elastin Haploinsufficiency on the Mechanical Behavior of Mouse Arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**, *289*, H1209–H1217. [CrossRef] [PubMed]
61. Pezet, M.; Jacob, M.-P.; Escoubet, B.; Gheduzzi, D.; Tillet, E.; Perret, P.; Huber, P.; Quaglino, D.; Vranckx, R.; Li, D.Y.; et al. Elastin Haploinsufficiency Induces Alternative Aging Processes in the Aorta. *Rejuvenation Res.* **2008**, *11*, 97–112. [CrossRef]
62. Milan, D.J.; Jones, I.L.; Ellinor, P.T.; MacRae, C.A. In Vivo Recording of Adult Zebrafish Electrocardiogram and Assessment of Drug-Induced QT Prolongation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**, *291*, H269–H273. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Materials and Methods

Genotyping by qPCR

A part of the caudal tail was collected as already described and 2 distinct qPCR were performed using the following primers: Forward primer without mutation 5'-CCATATCCACCATAACCCCCA- 3', Forward primer with mutation 5'-CCATATCCACCATAACCCCCT-3' and Reverse primer 5'-CTTCCCTCCCTGTCCTGTTG-3'. FastStart Universal SYBR Green Master (Merck) was used for qPCR reaction in a RotorGene HRM (Qiagen).

Heart rate count

Zebrafish larvae at 7 dpf were immobilized in a E3 medium drop and left undisturbed for 15 min prior to recording so that the stress of manipulation would not impact the measure unduly. Videos of the heart region were then recorded using a camera Dino-Eye Digital Eye Piece Camera (AM7025X) fixated on a binocular magnifier Olympus SZX10. 40 seconds to 1 min were recorded for each larva so that 30 sec without the fish moving could be used for analysis. Heart rate was assessed by a semiautomatic treatment on image]. Briefly, 30 seconds were selected from the movie, converted into tiff images, then stacked and reoriented so that the fish stays in the same place during the whole period. The heart region was then selected and a "dynamic reslice" was performed on a selected line on the stack to obtain an accumulation of this line in all the images (10 images/second). A periodic movement could then be characterized using a Fourier transform (FFT function on image]). The second harmonic was then highlighted (r) and multiplied by 1/300 x2 to obtain beats per minute (bpm). This method was first verified by counting manually the beats during 30 seconds put on 0.5x speed for 5 zebrafish.

Supplementary Figures

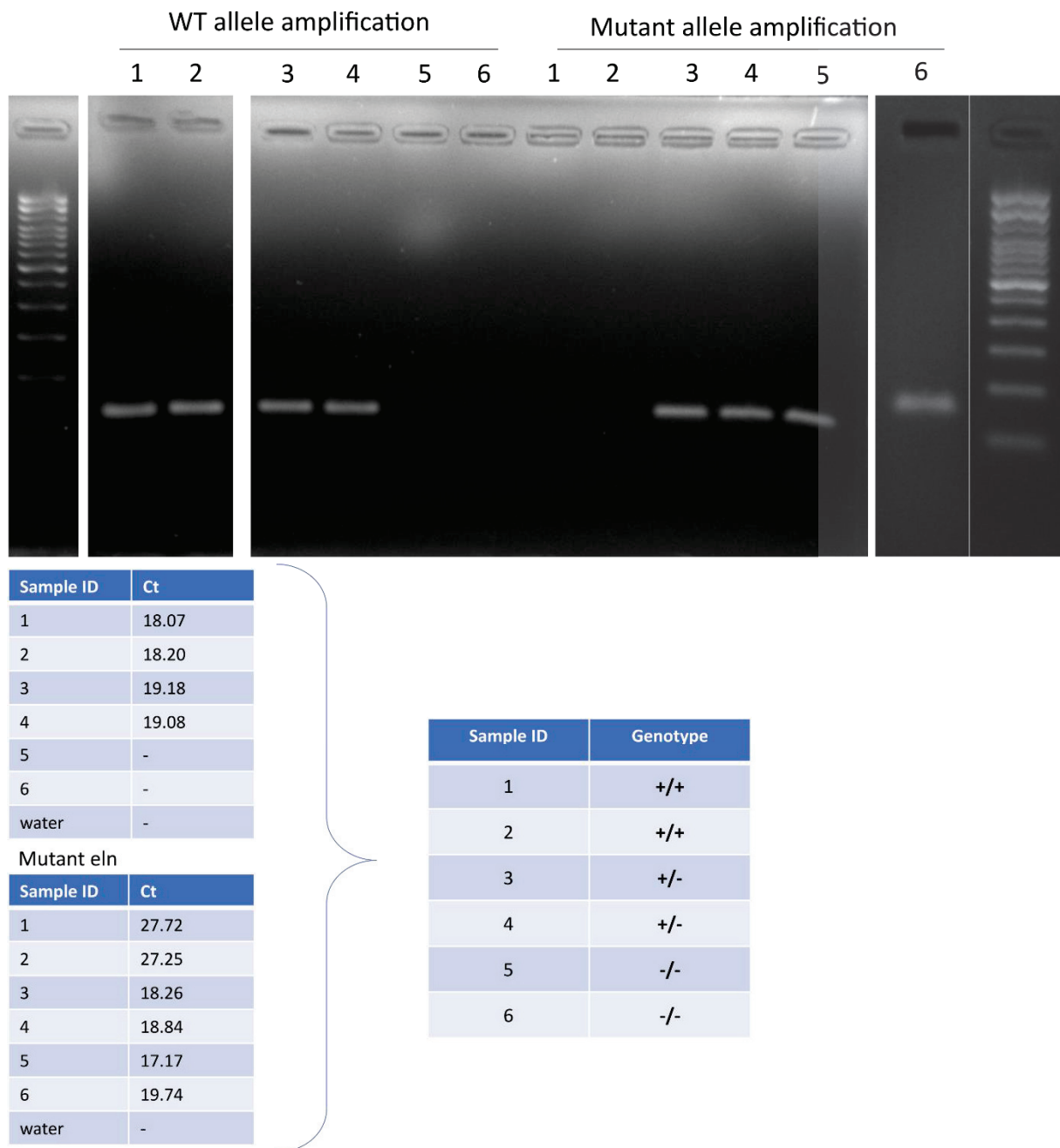


Figure S1. Genotyping of WT, *elna^{sa12235/+}* and *elna^{sa12235/sa12235}* animals through quantitative PCR.

Number and % of individuals of each genotype at adult stage

	WT		HET		HOM		Total Nb of individuals
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	
Clutch 1	9	21	23	52	12	27	44
Clutch 2	12	19	37	58	15	23	64
Clutch 3	6	16	18	47	14	37	38
Total	27	19	78	53	41	28	146

Figure S2. Genotyping of 3 different clutches obtained from crossing of heterozygote animals through ARMSPCR.

A part of the caudal tail was collected and used for the genotyping of the animals through ARMS-PCR. WT = wild type ($elna^{+/+}$) ; HET = heterozygous ($elna^{sa12235/+}$) ; MUT = mutant ($elna^{sa12235/sa12235}$).

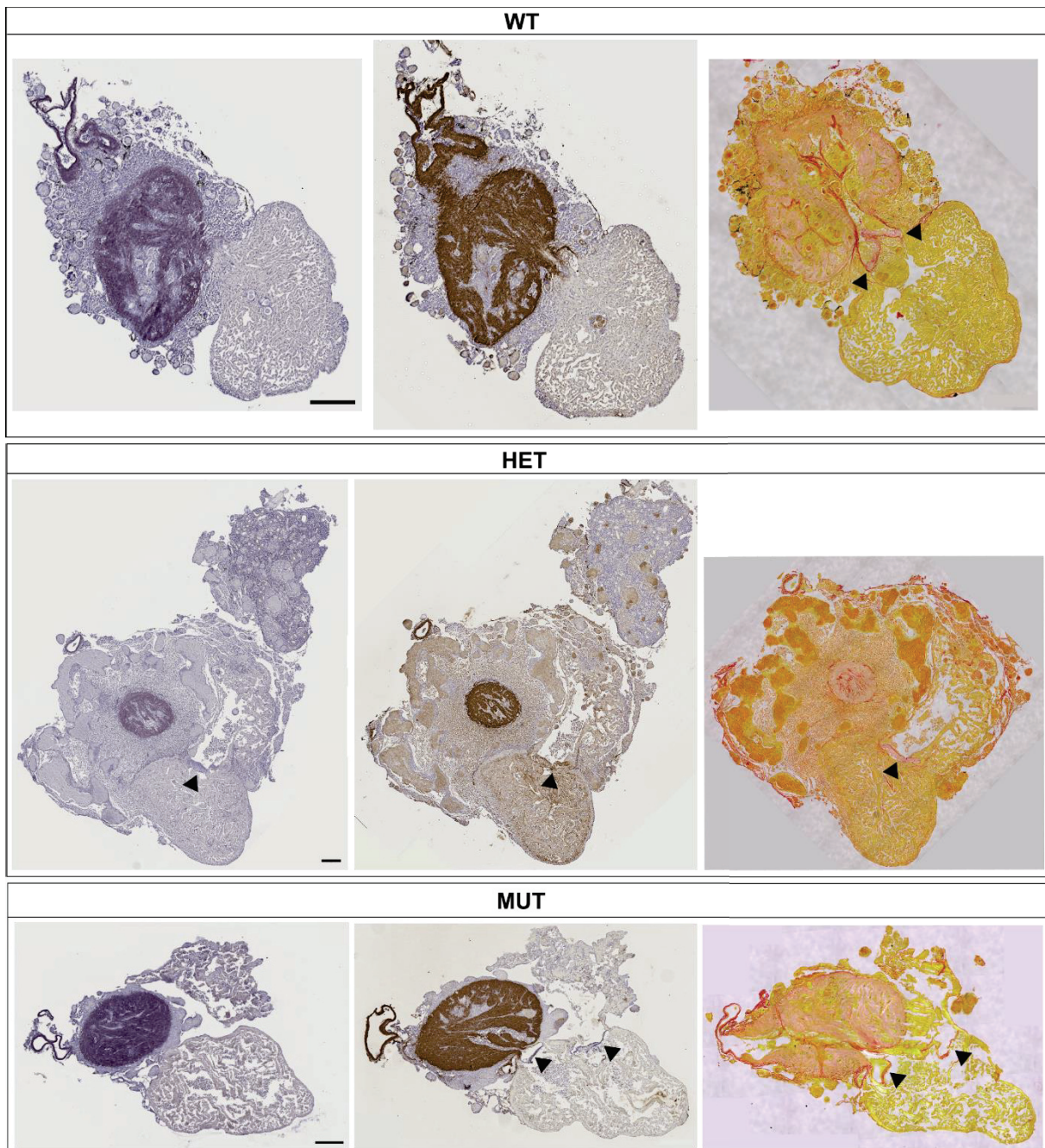


Figure S3. 22 mpf fish all show pathological hearts regardless of their genotype.

Heart sections from 22 months post fertilization (mpf) were stained with orcein (left), immunolabelled with anti-elastin antibodies (middle), or stained with picrosirius red (right). Scale bar = 200 μ m. Black arrows point to visible cardiac valves. WT = wild type (*elna*^{+/+}); HET = heterozygous (*elna*^{sa12235/+}); MUT = mutant (*elna*^{sa12235/sa12235}).

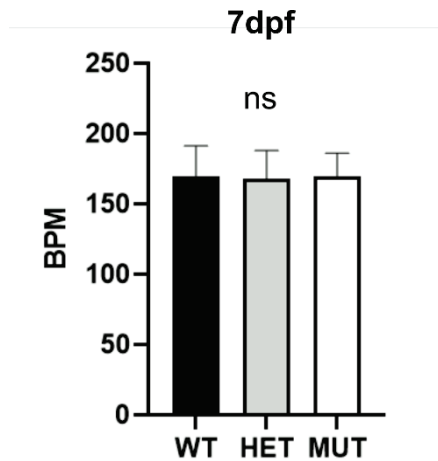


Figure S4. Heart rate is not modified in *elna* mutant larvae.

The heart rate of zebrafish larvae at 7 days post fertilization (dpf) was measured without anesthesia and reported according to their genotype. 10 to 15 larvae were assessed per genotype per experiment, and 3 experiments were repeated with different clutches. ns = non-significant, normality and homoscedasticity were tested by the ShapiroWilk test and the Bartlett test respectively and a one-way ANOVA was then performed followed by Dunnett's post hoc test. WT = wild type (*elna*^{+/+}) ; HET = heterozygous (*elna*^{sa12235/+}) ; MUT = mutant (*elna*^{sa12235/sa12235}).

Conclusions et points importants

- La mutation *elna*^{sa12235} engendre la production d'une protéine tronquée, probablement non fonctionnelle ;
- Une méthode de génotypage permettant la discrimination des allèles *wild type* et mutant, ne différant que par une base, a été optimisée à partir du principe de ARMS PCR ;
- Les mutants *elna*^{+/-} (HET) et *elna*^{-/-} (MUT) meurent plus vite que leurs homologues *wild type* *elna*^{+/+} (WT) ;
- Des complications sévères surviennent chez les mutants HET et MUT, telles que des ulcères, des gonflements abdominaux et une hydropisie entraînant la mort du poisson ;
- La population mutante est cependant très hétérogène et tous les poissons porteurs de la mutation ne développent pas forcément de signes pathologiques ;
- Les poissons mutants HET et MUT développent fréquemment une cardiomégalie avec l'âge ;
- Leurs valves sont également affectées et revêtent un aspect désorganisé et excessivement alvéolé qui n'est jamais observé chez les WT ;
- Le poisson-zèbre mutant *elna*^{sa12235} s'avère être un modèle intéressant pour l'étude des élastinopathies et de leurs complications cardiovasculaires, particulièrement au niveau des valves cardiaques.

AXE 2

Évaluation du potentiel thérapeutique de la protéine élastique synthétique (SEP)

La deuxième partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'évaluation du potentiel thérapeutique d'une protéine élastique synthétique dans le but d'une utilisation comme prothèse moléculaire pour réparer les fibres élastiques de la paroi vasculaire lors de pathologies liées à une déficience en élastine.

Ces travaux ont donné lieu à un article de recherche qui sera soumis prochainement dans *Matrix Biology* et dont le titre est : *A synthetic elastic protein as molecular prosthetic candidate to strengthen vascular wall elasticity.*

Il est à noter que la première partie de l'article, concernant la caractérisation de la SEP aux niveaux de sa structure et de ses propriétés physicochimiques et mécaniques, a été réalisée par d'autres personnes de l'équipe ou des collaborateurs. Ces expériences ne seront décrites que rapidement.

Résumé de l'article

La SEP est une protéine élastique synthétique qui a été développée dans le laboratoire et qui fait l'objet d'un brevet (Brevet #WO2017194761, (Debret et al. 2017)).

Il s'agit d'un ELR, puisque sa séquence est inspirée de motifs retrouvés dans la tropoélastine humaine et qu'elle est produite comme une protéine recombinante en système hétérologue procaryote (*E. coli*). Elle est ensuite purifiée par la méthode d'ITC, décrite dans le chapitre *Les elastin-like polypeptides.*

La SEP est constituée d'une alternance de domaines hydrophobes et de domaines de réticulation, dont les séquences ont été simplifiées à partir de celles de la hTE pour ne garder que des motifs très conservés entre différentes espèces. Le domaine 36 de la tropoélastine a été gardé en C-terminal de la SEP. En effet, ce domaine contient des motifs importants pour les interactions cellulaires et pour l'assemblage des fibres élastiques, qui seront importants pour l'activité biologique de la SEP. Un tag FLAG a également été ajouté en N-terminal de la protéine, pour permettre un suivi facilité de la protéine et surtout une façon simple de la différencier de la TE native.

Dans la première partie de l'article, la structure de la SEP et ses propriétés physicochimiques sont détaillées, ainsi que son comportement élastique. Le poids moléculaire apparent de la SEP est d'environ 55 kDa, et sa structure est majoritairement désordonnée, comme c'est le cas pour la TE (~ 60 kDa). La présence du pont disulfure entre les deux cystéines du domaine 36 a également été vérifiée par résonance magnétique nucléaire et spectrométrie de masse. La température de transition de la SEP, qui correspond à la température nécessaire pour induire la coacervation de la protéine dans un environnement fixé (ici en PBS, à pH = 7.4 et à 1 mg/mL), a été mesurée à 30 °C. Sa capacité d'autoassemblage est donc compatible avec des paramètres physiologiques (pH, T °C, [NaCl]) et est totalement réversible.

Des essais de traction sur des échantillons de SEP réticulée à la génipine ont également permis d'évaluer ses propriétés mécaniques lors d'étirement jusqu'à rupture. Quelques variations au niveau de la densité du matériel, dues au processus de fabrication, constituent des zones de fragilité pouvant

faire apparaître une résistance à la rupture sous-estimée. La SEP montre un comportement élastique dans une zone linéaire d'étirement de 1 à 2, avec un module élastique moyen de l'ordre de 50 kPa.

Nous avons ensuite testé les effets de la SEP sur des cultures primaires de cellules vasculaires humaines, à savoir des cellules endothéliales HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) et des CML issues de l'aorte (AoSMC). Des tests de toxicité et des suivis de prolifération ont permis d'établir que la SEP n'avait pas d'effet cytotoxique sur les cellules vasculaires et qu'elle n'induisait pas non plus de changement de comportement de prolifération, en tout cas au niveau des doses testées.

Un modèle d'endothélium *in vitro* en coculture avec des CML a été mis en place et optimisé pour qu'il reflète la perméabilité théorique d'un endothélium sain, c'est-à-dire que des molécules de poids moléculaire élevé ne passent pas (dextran 70 kDa). Des cellules endothéliales ont été cultivées sur un insert dont le fond est constitué d'une membrane poreuse, puis cet insert a été installé dans un puits contenant des CML en culture. Les jonctions intercellulaires caractérisées par la présence de VE-cadhérines (cadherine de l'endothélium vasculaire) ont été systématiquement marquées post expérience pour vérifier l'intégrité de la monocouche endothéliale. Des tests de passage transendothélial de la SEP ont ensuite été réalisés en l'ajoutant dans le milieu cellulaire du compartiment supérieur de la coculture et en laissant incuber pendant 24 h. Après cette période, la SEP a pu être retrouvée dans la couche de CML, où elle forme des structures fibrillaires colocalisées avec le marquage de la fibrilline-1.

Des tests en monoculture de CML ont ensuite permis de mettre en évidence le caractère LOX-dépendant de cette formation de fibres de SEP. En effet, en présence d'un inhibiteur des LOX (le β -aminopropionitrile), non seulement les dépôts de SEP diminuent très fortement, mais surtout, aucune fibre de SEP n'est formée. L'activité enzymatique des LOX est donc nécessaire à la formation des fibres de SEP, reflétant un processus enzymatique actif d'intégration.

Des tests de toxicité et d'inflammation ont également été réalisés *in vivo*, sur le poisson-zèbre. Aucune toxicité de la protéine n'a été notée, pourvu que le chorion de l'embryon soit retiré avant le test. En effet, la capacité de coaccrétion de la SEP semble promouvoir son agrégation sur le chorion, dans la plus forte concentration testée. Ce blocage des pores du chorion empêche probablement les échanges entre l'embryon et son environnement, entraînant une mort rapide de celui-ci. Au contraire, sans le chorion, aucun problème développemental n'a été mis en évidence, ni par la formation spontanée d'œdème, ni par des retards de développement cardiovasculaires, qui peuvent facilement être mis en évidence avec la lignée transgénique *Tg(fli1a:eGFP)/Casper*, dont les vaisseaux sont fluorescents. Aucune mortalité particulière due à la présence de SEP n'a été observée.

La SEP ne provoque pas non plus de réaction immunitaire après injection. En effet, le recrutement de neutrophiles a été suivi pendant 24h après une injection de SEP dans le sac vitellin, et bien que les neutrophiles soient d'abord recrutés dans les premières heures, du simple fait de l'introduction d'une aiguille dans le sac (observé également pour l'injection de PBS), les neutrophiles disparaissent rapidement, ce qui n'est pas le cas lors d'injection de substances inflammatoires (contrôle positif *E. coli*).

Enfin, des premiers tests pour évaluer la capacité de rétention de la protéine dans les vaisseaux après injection intravasculaire ont également été réalisés sur la larve. Contrairement au dextran (70 kDa), la SEP reste visible au niveau des vaisseaux sanguins des poissons pendant au moins 96 heures post injection (hpi). Le signal est d'abord majoritairement diffus dans l'arbre vasculaire du poisson-zèbre dans les premières heures même si la présence de points plus définis dans la veine caudale est notable, suggérant un dépôt de la SEP dès 3 hpi. Le signal diffus disparaît ensuite pour ne laisser que le signal ponctiforme à 24 hpi. Ce signal diminue un peu avec le temps mais est toujours bien visible à

96 hpi. Le dextran quant à lui garde un signal diffus qui est toujours visible à 24 hpi, mais qui disparaît peu à peu et n'est plus présent à 96 hpi.

De nombreux points doivent encore être validés pour avoir une idée précise du potentiel thérapeutique de la protéine et de la faisabilité de son application en tant que prothèse moléculaire vasculaire, notamment son apport mécanique *in vivo*, mais ces premiers résultats sont prometteurs et encouragent la suite du projet.

A synthetic elastic protein as molecular prosthetic candidate to strengthen vascular wall elasticity

Marie Hoareau ^a, Chloé Lorion ^{a,1}, Lauriane Lecoq ^b, Aurore Berthier ^a, Baptiste Pierrat ^c, Stéphane Avril ^c, Fabrice Pirot ^a, Pascal Sommer ^{a,2}, Jérôme Sohier ^a, Elise Lambert ^a, Romain Debret ^a

^a Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique UMR5305 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, 7 passage du Vercors 69367 Lyon cedex 7, France.

^b Microbiologie moléculaire et biochimie structurale UMR5086 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, 7 passage du Vercors 69367 Lyon cedex 7, France.

^c Ecole des Mines de Saint-Étienne, Sainbiose, U1059 INSERM, Université Jean Monnet, 158 Cr Fauriel 42100 Saint-Étienne, France.

E-mail addresses:

marie.hoareau@ibcp.fr

clorion@gattefosse.com

aurore.berthier@ibcp.fr

baptiste.pierrat@mines-stetienne.fr

avril@emse.fr

fabrice.pirot@univ-lyon1.fr

lauriane.lecoq@ibcp.fr

pascal.sommer@amu.fr

jerome.sohier@ibcp.fr

elise.lambert@ibcp.fr

romain.debret@ibcp.fr

Corresponding author:

Romain Debret

LBTI UMR5305 CNRS/UCBL

7, passage du Vercors

F-69367 Lyon cedex 7

romain.debret@ibcp.fr

¹ Present address: Gattefossé SA, 36 Chemin de Genas, CS 70070, 69804 Saint-Priest cedex, France.

² Present address: Institut des Sciences du Mouvement UMR 7287 CNRS, Aix-Marseille Université, CP 910, 163 avenue de Luminy 13288 Marseille cedex 09, France.

Abstract

The loss of elasticity is a hallmark of systemic aging or genetic syndromes (e.g. cutis laxa, Williams-Beuren and supraaortic stenosis) with direct consequences on tissue functions, and particularly deleterious when associated to the cardiovascular system. Tissue elasticity is mainly provided by large elastic fibers composed of supramolecular complexes of elastin and microfibrils. In arteries, the mature elastic fibers are located in the media compartment and form concentric elastic lamellar units together with the smooth muscle cells (SMCs). The main function of vascular elastic fibers is to allow extension and recoil of the vessel walls in response to the intraluminal pressure generated by the blood flow following cardiac systole. The synthesis of elastic fibers (elastogenesis) mainly occurs during the last third of fetal life with a peak in the perinatal period and then slowly decreases until the end of growth; as a result, elastic fiber repair is almost non-existent in adults. To date, no treatment exists to restore or repair deficient or degraded elastic fibers. A few pharmacological compounds have been proposed, but their efficacy/side effects balance remains very unfavorable. As an alternative strategy, we developed a synthetic elastic protein (SEP) inspired by the human tropoelastin, the elastin soluble precursor, to provide an elastic molecular prosthesis capable of integrating and reinforcing endogenous elastic fibers.

The SEP was easily produced in *E. coli* and purified by inverted transition cycling method. The resulting 55 kDa protein recapitulates the main physicochemical properties of the tropoelastin as thermal responsiveness, intrinsically disordered structures, and spherical self-assembly. The cross-linked SEP displays linear elastic mechanical properties under uniaxial tension loads. Using a co-culture *in vitro* model of the endothelial barrier, our results show that SEP is able to cross the cohesive endothelial monolayer to reach underlying SMCs. Moreover, SEP is processed by SMCs through a lysyl oxidase-dependent mechanism to form fibrillar structures that colocalize with fibrillin-rich microfibrils. The SEP was further characterized *in vivo* through the zebrafish model. The results indicate a global innocuity on zebrafish embryos and an absence of neutrophil recruitment following injection into the yolk sac of zebrafish. Finally, intravenous injection of a fluorescent SEP highlights its deposition in the wall of tortuous vessels which persists for several days after injection of the larvae. Taken together, our results demonstrate for the first time the incorporation of a naked tropoelastin-bioinspired polypeptide in endogenous elastic fibrillar deposits from SMCs, and its recognition by the lysyloxidase enzymatic machinery. In absence of toxicity and proinflammatory signal combined to a long-lasting accumulation in vessels *in vivo*, the SEP fulfills the first prerequisites for the development of an original biotherapeutic compound addressing the repair of elastic fibers.

Keywords

Elastic fibers, vascular smooth muscle cells, endothelial cells, zebrafish, inflammation, mechanics

Abbreviations

ADCL: autosomal dominant cutis laxa
CFU: colony forming unit
EDP: elastin-derived peptide
ELR: elastin-like recombinamer
ETD: electron transfer dissociation
GFP: green fluorescent protein
HLE: human leucocyte elastase
hpf: hours post-fertilization
hpi: hours post-injection
hTE: human tropoelastin
HUVEC: human umbilical vascular endothelial cell
IL: interleukin
ITC: inverse transition cycling
LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry
LOX: lysyl oxidase
LPS: lipopolysaccharide
MMP: matrix-metalloproteinase
NMR: nuclear magnetic resonance
PBS: phosphate-buffered saline
SEP: synthetic elastic protein
SMC: smooth muscle cell
SVAS: supra-avalvular aortic stenosis
TBS: tris-buffered saline (TBS)
TNF: tumor necrosis factor
WBS: Williams-Beuren syndrome
 β -APN: β -aminopropionitrile

Introduction

Elasticity is essential to ensure the proper functioning of multiple organs and tissues such as skin, lungs, blood vessels, tendons, and elastic cartilages. Elastic fibers are the main source of elasticity in the body. These fibers are composed of two major proteins: tropoelastin and fibrillin. Tropoelastin monomers first assemble at the surface of the cell to form small aggregates, which are then reticulated on the fibrillin-rich microfibril scaffold to form the hydrophobic elastin core and finally the elastic fiber [1-3]. Other proteins are necessary for the correct assembly of the fibers such as fibulins and microfibril-associated glycoproteins [4], and their maturation by specific cross-linking network orchestrated by lysyl oxidases (LOXs) [5]. Elastic fibers are mostly synthesized perinatally, and their formation is strongly downregulated after birth [6]. Healthy tissues do not undergo significant renewal of their fibers, meaning that they have to stay stable and functional throughout life [7, 8]. Although elastin is quite resistant to enzymatic degradation [9], elastic fibers tend to accumulate damage with time. Elastin and elastic fibers are indeed subject to several age-related modifications such as mechanical fatigue, calcification, and chemical alterations (glycation, carbamylation and peroxidation). They are also directly susceptible to proteolysis by specific proteases and matrix metalloproteinases (MMPs) [10]. All these age-related alterations weaken the fibers and can have important consequences on health [11]. The fragmentation of elastin also leads to the formation of elastin-derived peptides (EDPs), some of which are bioactive (sometimes called elastokines or matrikines) and able to modify cell behavior [12] with potential impacts on cell adhesion, proliferation, chemotaxis, protease activation and apoptosis for example [10]. Elasticity deficiencies can also result from acquired or inherited disorders (reviewed in [13]). Among them, some are directly linked to a defect in the tropoelastin gene, such as Williams Beuren syndrome (WBS) [14] and the autosomal dominant cutis laxa (ADCL) [15]. The most impacted tissues are skin, blood vessels and lungs with a broad range of symptoms. WBS is often associated with supraaortic stenosis (SVAS), a narrowing of the aortic root [16]. Other arteries are also subject to stenosis in this pathology [17]. In ADCL, patients can suffer from aortic aneurism, pulmonary emphysema, hernia and high skin laxity [15]. Some cases of acquired cutis laxa have also been described, in which the elastic fibers are more susceptible to degradation during inflammatory responses [18].

It is clear that cardiovascular complications are the most deleterious symptoms associated with the loss of elastic fiber integrity. Elastic arteries, such as the aorta, carotid and pulmonary arteries, are particularly susceptible to the deterioration of the mechanical function because these structures, located in direct proximity to the heart, must absorb the significant intraluminal distending pressure following the ejection of blood during the systolic phase. Thus, a higher number of contractile-elastic lamellar units (comprising a layer of SMCs and a lamella of elastic fibers) is requested in proximal arteries and this number decreases as distally as the caliber of arteries diminishes. Moreover, the inner elastic lamellar units undergo wider extension compared to outer units to homogenize layer extension through the arterial wall [19]. Consequently, the number of broken lamellar units noted histologically is a hallmark of artery pathophysiology and disease progression [20]. Currently, there is no satisfactory treatment to prevent, cure or restore elastic fiber integrity. Minoxidil, a K⁺-channel opener, was shown to promote elastic fiber neosynthesis in aged mice [21] and to confer long-term improvement in end-organ perfusion potentially by remodeling the arterial matrix in *Eln*^{+/-} mice [22]. However, it is also associated with important side effects, including cardiac hypertrophy and edemas formation [21]. For severe cases of SVAS, a surgical intervention is often necessary, but it does not treat the underlying causes and the risk of reoperation or mortality remains high after surgery [23].

An interesting alternative to treat elastin deficiency would be to replace it directly in affected tissues with a molecule able to integrate elastic fibers and act as the human tropoelastin (hTE) *in vivo*. Elastin-like recombinamers (ELRs) are synthetic polypeptides bioinspired by the hTE.

They are widely used in biomaterial engineering for their interesting physical and mechanical behavior and have been increasingly used in the biomedical field in the last few years [24]. They can be considered as smart polymers as they are able to respond to physicochemical parameters of their microenvironment and undergo changes in response to it. They conserve the interesting properties of the hTE, such as its high resilience upon stretching, its self-assembly capacity and its biocompatibility [25]. In addition, ELRs allow to precisely control their molecular weight, functionality, and mechanical properties by modifying their amino acid sequence at will. ELRs are now investigated for diverse biomedical applications, particularly in drug delivery [26], nanovaccines [27], but also as biocompatible stent-coating to improve the success of angioplasty [28, 29], or more recently for the engineering of venous valves [30] just to cite a few.

As a matter of fact, products inspired by elastin are exclusively used as building blocks in the formulation of biomaterials, either a vehicle or a scaffold for tissue engineering. In the present study, we have designed a new ELR for biotherapeutic purposes with the ambition to deliver an agent that can be directly processed by cells to strengthen elastic fibers. We therefore produced and purified a recombinant synthetic elastic protein (SEP) that we characterized using physicochemical and mechanical analysis tools. Then we observed how this SEP was tolerated and used by human vascular cells (endothelial and smooth muscle cells). Finally, we administered the SEP in zebrafish models to determine its biocompatibility and its distribution in the vessels over time.

Results

Production and formulation

An original synthetic elastic protein (SEP) (Fig. 1A) was designed to conform with several remarkable specificities of the human tropoelastin (hTE). This includes alternative hydrophobic (VGVAPG-VGVLPG) and crosslinking (AAAKAAAKAAK) domains, together with the presence of the C-terminal domain 36 of the hTE since it was recognized to facilitate elastic fibers assembly through the GRKRK motif and the disulfide bond [31]. The choice of primary sequences has been based on short repeated motifs that are conserved across species to avoid exacerbate immunogenic responses. In addition, a Flag tag octapeptide was added in the N-terminal region to facilitate SEP recognition and discrimination from the native hTE using specific anti-Flag antibodies. A synthetic gene coding for the SEP was inserted in the pET30a procaryotic expression vector to transform the BL21(DE3) bacterial strain. After fermentation process and cell lysis, SEP was found in equivalent amount in both soluble and insoluble phases indicating that part of the production is sequestered in inclusion bodies of the bacteria probably due to its intrinsic hydrophobicity. Its electrophoretic profile showed apparent molecular weights of 55 kDa and 110 kDa for the monomer and a probable dimer form of the protein respectively (Fig. 1B). The SEP contained in the soluble phase was then subjected to inverse transition cycling (ITC) purification based on the method described by Meyer and Chilkoti [32]. One to three cycles were usually effective to discard bacterial material and obtain the SEP with high purity grade (Fig. 1C).

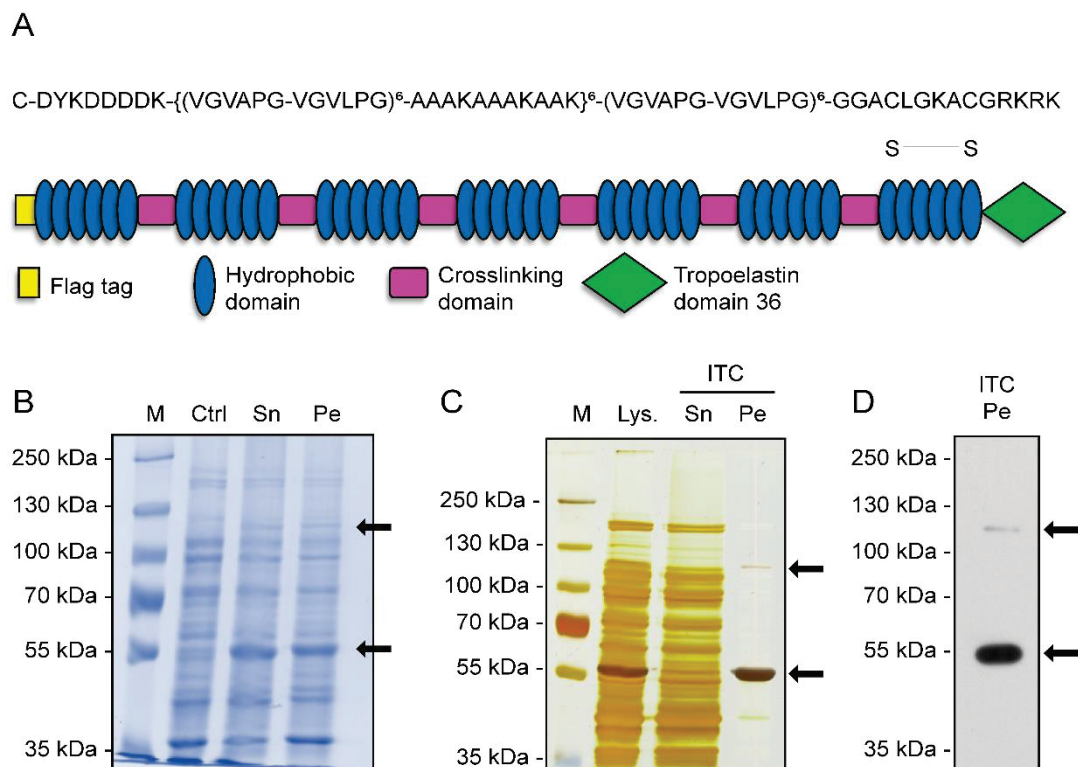


Fig. 1. SEP is produced in E. coli and is easily purified by ITC. A) Schematic representation of SEP and its primary sequence. **B)** SEP over-expression. Cell lysate was analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie blue. Results are shown for pre-induced total cell lysate (Ctrl) and induced culture phases (Sn = supernatant, Pe = pellet). Black arrows indicate SEP monomer and dimer. **C)** SEP purification by inverse transition cycling (ITC). Total cell lysate (Lys), soluble fraction (Sn) and the pellet (Pe) containing SEP were analyzed by SDS-PAGE and the gel was stained by silver nitrate. **D)** SEP identification by western blot analysis using an anti-FLAG antibody.

Identification of the SEP was performed by western blot using an anti-Flag antibody and the two forms (monomeric and dimeric) were confirmed (Fig. 1D).

SEP was formulated in aqueous solution at 1 or 10 mg/mL in 0.9 % (w/v) NaCl. Endotoxin units were measured at 5.179 IU/mL for the 1 mg/mL formulation, which is below the 350 IU/mL limit required for biomedical applications. Solution osmoses were respectively measured at 288 mOsm and 315 mOsm for the 1 mg/mL and 10 mg/mL preparations, allowing these formulations to be injected in the blood flow with very low hemolytic risk.

Structure characterization

Circular dichroism spectroscopy was used to determine secondary structures of SEP. Spectra were recorded at 0.2 mg/mL in phosphate buffer with increasing temperature (Fig. 2A). From 5°C to 25°C, the profile of SEP was characterized by a deep negative peak at 198 nm with a shoulder at 222 nm, which is indicative of a poorly ordered structure, mostly made of random coiled motifs, with the likely presence of a minority α -helix. When the temperature was raised above 35°C, the 222 nm peak was slightly red-shifted, resulting from a probable decrease of helix stability.

NMR spectra were recorded to gain conformation information on a residue-type basis (Fig. 2BC). The 2D CC DARR spectrum allows to detect the rigid parts of the protein (Fig. 2B), while the 2D HC INEPT spectrum reveals the flexible parts (Fig. 2C). Globally, SEP is a flexible molecule since all residue types are detected in the INEPT spectrum. Residue types can be assigned based on their chemical shifts, revealing that all residues could be identified in the spectra, except the N-terminus Tyr which is present in lower amount compared to other residues for which repetitive motifs are present. All residue types identified are in coil conformation according to their chemical shifts (Asp, Val, Gly, Ala, Pro and Leu). In addition, two residue types are identified in the helical conformation, namely Ala and Lys as seen in Fig. 2B. These results are in accordance with CD data and allow to confirm the α -helix structure in the region (AAAKAAAKAAK). Furthermore, cysteines are detected in the INEPT spectrum at a chemical shift ($C\alpha = 42.7$ ppm and $C\beta = 52.6$ ppm) typical of the oxidized form [33], revealing the presence of a disulfide bound between the two cysteines in the C-ter region of SEP (Fig. S1).

Finally, SEP was subjected to liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in electron transfer dissociation (ETD) mode. The resulting spectra focused on the [579-594] peptide clearly confirm the presence of a disulfide bound within this sequence (Fig. 2D).

Self-assembling and mechanical behavior

Reversible thermal responsiveness is a hallmark of native tropoelastin and many EDPs or ELRs [34, 35]. Here, we analyzed the thermal profile of a 1 mg/mL SEP solution using a dynamic light scattering approach (Fig. 3A). The data revealed that coacervation of SEP initiates above 30°C, which corresponds to the transition temperature (T_t). A maximal coacervation was achieved at 60°C. The measured size of coacervates confirmed a temperature-dependent variation of the diameter of SEP aggregates as indicated in Table 1. The formation of larger aggregates in suspension above T_t caused an abrupt increase in turbidity. Indeed, aggregates below T_t (20°C) were of about 60 nm while they reached 13 μ m above T_t (60°C). Upon cooling, the SEP recovered to a similar size as before heating, which proves the reversible transition capability of the molecule.

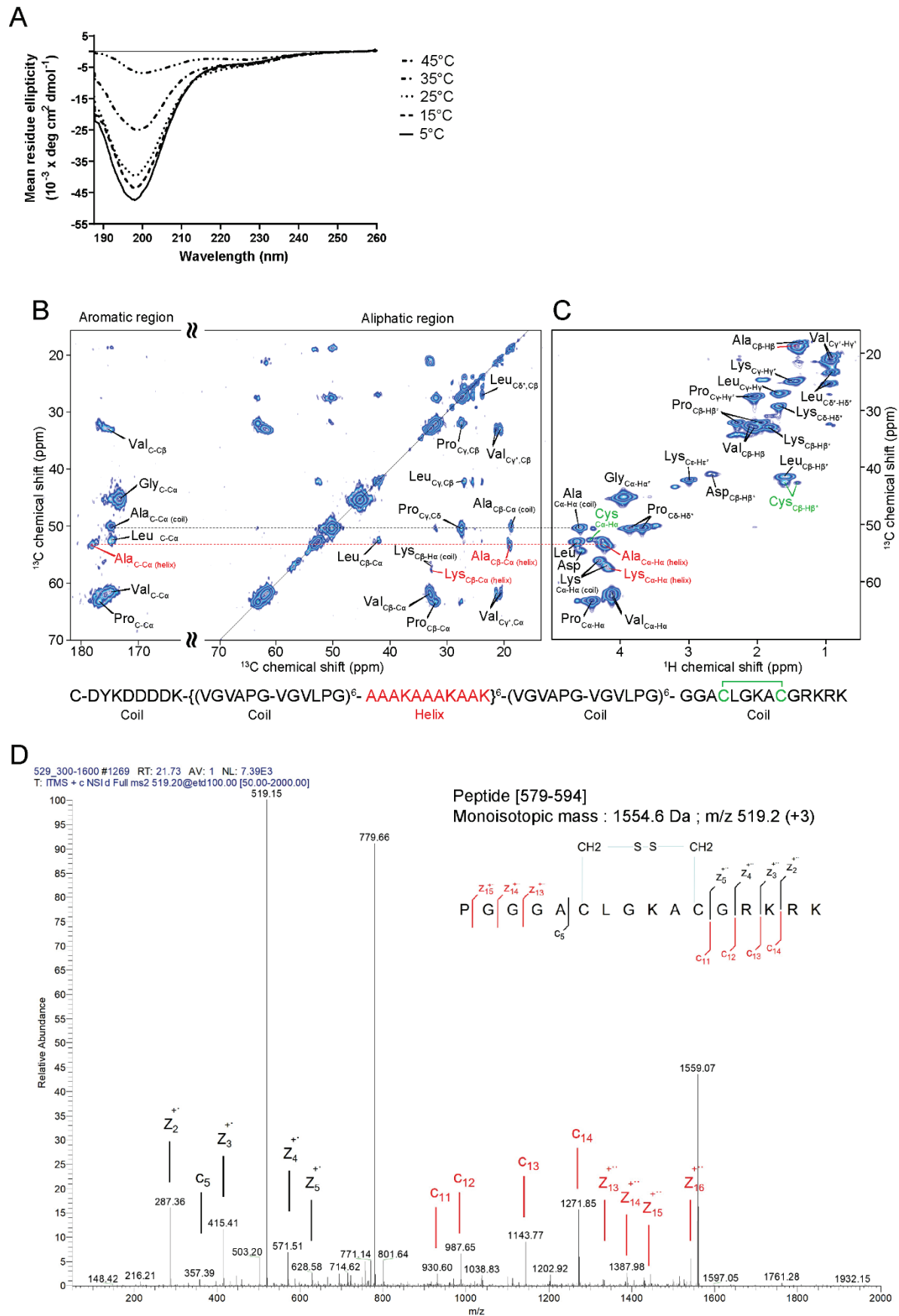


Fig. 2. SEP displays secondary structures and a disulfide bond. A) Temperature-dependent CD spectra recorded in PBS pH 7.4 at 5°C, 15°C, 25°C, 35°C and 45°C. **B)** DARR and **C)** INEPT NMR spectra of SEP coacervates. **D)** LC-MS/MS analysis: fragmentation of the SEP peptide [579-594] in ETD mode.

Table 1: Coacervate size variations after heating and cooling a 1 mg/mL SEP solution.

	Time →		
Temperature (°C)	20	60	20
Size (nm) ± SEM	61.1 ± 0.99	1.30E+04	68.5 ± 12.39

To further characterize the aggregation properties of SEP, 120 µg/mL to 2 mg/mL solutions were prepared in PBS and heated above T_i to induce coacervation. SEP was then visualized by transmission electron microscopy following negative staining (Fig. 3B). At 120 µg/mL, SEP formed small individual spheres of low internal electron-density (white arrow in Fig. 3Ba). At 240 µg/mL, spheres did not remain separate, but started to merge forming aggregates up to 2 µm in diameter (Fig. 3Bb). At 2 mg/mL, aggregates showed a higher external electron-density due to the merging of SEP individual spheres (Fig. 3Bc). Scanning electron microscopy indicated that the larger spheres observed at 2 mg/mL were due to merging (Fig. 3Ca). Edges of individual spheres were not regular (Fig. 3Cb-c). In addition to organize themselves in individual spheres, chimeric protein molecules coalesced together and connected like beads on a string (Fig. 3Cd), thus forming many varied geometrical shapes (Fig. 3Ce-f).

Since the thermal transition in solid state remains a reversible phenomenon, SEP aggregates were cross-linked to further address the mechanical behavior of the material at room temperature. Standardized tensile specimens were obtained by heating SEP solution over T_i in the presence of genipin inside silicone molds (Fig. 4Aa). The dark green samples displayed a regular dog-bone shape (Fig. 4Ab). However, the density of material was not homogeneous within the same sample due to the self-aggregation by sedimentation, showing areas of low density. These micro-defects could constitute points of brittleness and initiate material failure under stress, leading to an underestimation of the material's strength (Fig. 4Ac, white arrows). Force-displacement curves were obtained by uniaxial tension until rupture. The elastic moduli (E) were computed by linear regression over the linear regions, i.e stretch ranging from 1 to 2 (Fig. 4B). Nominal rupture stress (S_{max}) and stretch (λ_{max}) were extracted from the curves. Cross-linked SEP exhibited a linear mechanical behavior up to stretches of 2, with an average elastic modulus of 51.2 kPa and sample thicknesses varying from 245 µm to 437 µm (Table 2).

Table 2: Thickness and mechanical properties from cross-linked SEP specimens.

	Thickness (µm)	E (kPa)	S_{max} (kPa)	λ_{max} (-)
sample 1	245	58.1	81.9	2.6
sample 2	377	51.3	79.1	2.7
sample 3	437	44.3	66.8	3.3
Mean	353	51.2	75.9	2.8
SD	98	6.9	8.1	0.4

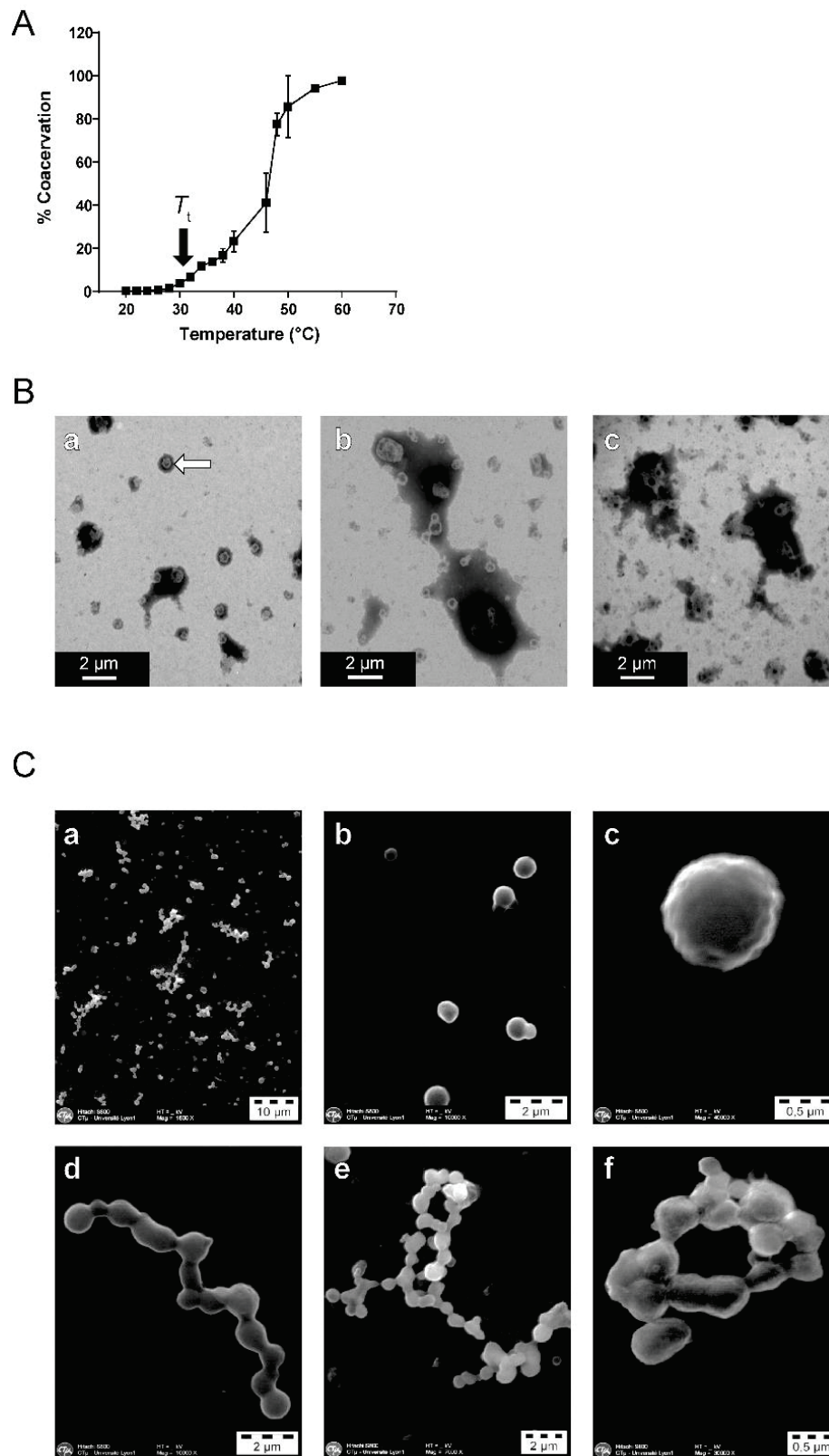


Fig. 3. SEP self-assembles over T_t . **A)** Coacervation profile of 1 mg/mL SEP solution in PBS (pH 7.4) in the temperature range 20-60°C. Change in solution turbidity at each temperature expressed as a coacervation percentage of the overall maximum. **B)** Transmission electron microscopy imaging of SEP coacervates formed at 120 µg/mL (Ba), 240 µg/mL (Bb) and 2 mg/mL in PBS (Bc). **C)** Scanning electron microscopy images of SEP structures (Ca), monomers (Cb-c) and coalescent spheres (Cd-f) formed at 2 mg/mL in PBS.

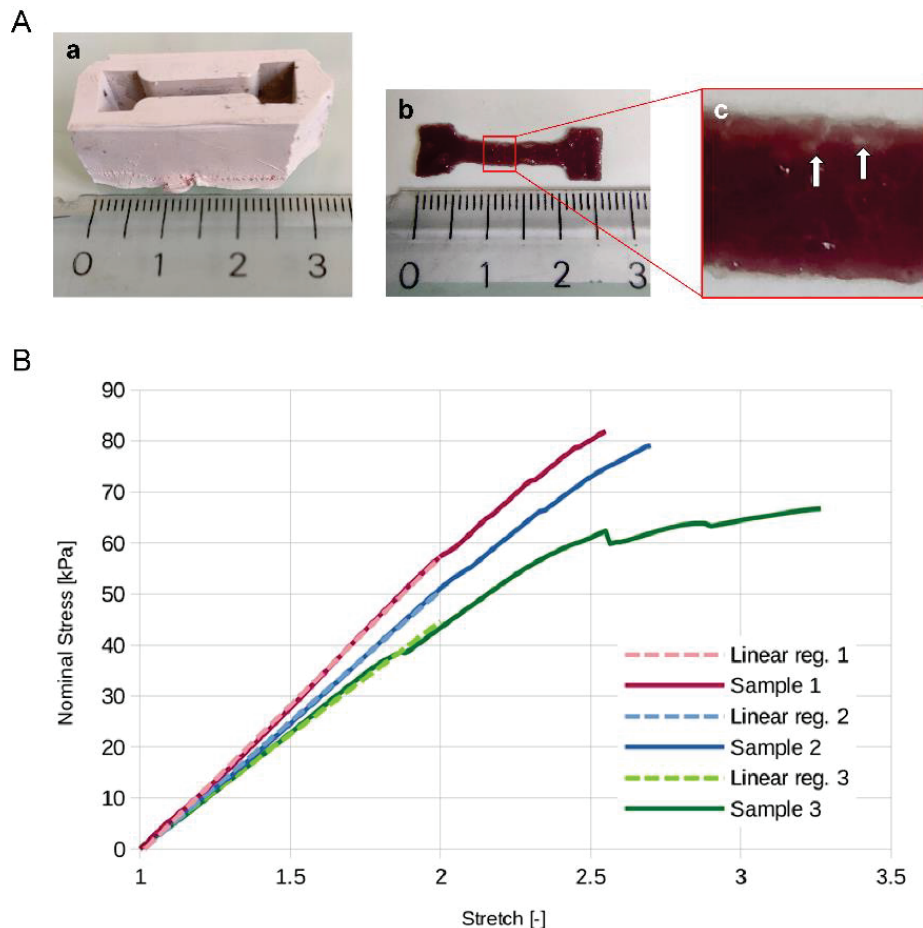


Fig. 4. Cross-linked SEP has an elastic behavior. A) Cross-linked SEP specimen preparation for traction experiments. Silicone mold used (a). Result of SEP at 50 mg/mL supplemented with 50 µg/mL genipin, heated to 40°C overnight and then removed from the mold (b). Magnified image of an area showing the density heterogeneity of a sample (c). **B)** Stress-stretch curves up to rupture for the three specimens.

Biological activity of SEP towards vascular cells

ELRs are usually designed to incorporate biomaterials and are tested for their biocompatibility in their material-formulated form. Our objective is quite different here and aims at addressing a tropoelastin-like entity to reinforce elasticity naturally by the cells themselves. Therefore, we first analyzed intrinsic biological effects of SEP on vascular cells grown as monolayers. Different concentrations of SEP, from 1 to 100 µg/mL, were introduced into the culture media of human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) and aortic smooth muscle cells (SMCs). Toxicity was first addressed by colorimetric metabolic assay after 48h (Fig. 5A-B). In these conditions, nor the HUVECs, neither the SMCs were affected by the treatment thus indicating no particular cytotoxic effect of the SEP. In the same way, the highest concentration was used to observe cell proliferation by monitoring cell density in culture over time (Fig. 5C-D). Again, SEP did not cause any significant change in the rate of proliferation of the two cell types. These results indicate that despite the strong representation of the VGVXPG hexa-motif in the SEP sequence, these sequences do not appear to reproduce the proliferation-stimulating effects of free hexapeptides as observed in different cell types [36-38].

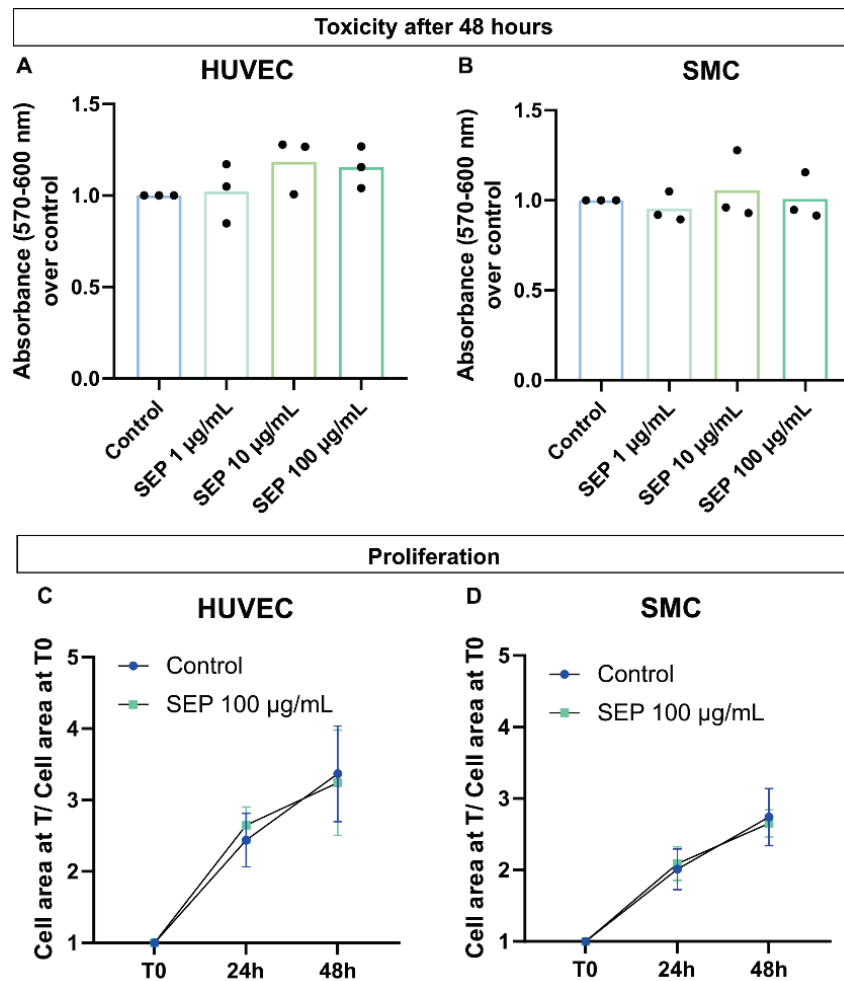


Fig. 5. SEP is not toxic and does not impact vascular cell proliferation. A-B) Cell toxicity was assessed by adding 1-100 µg/ml of SEP into the culture medium of HUVECs (A) or SMCs (B) vascular cells and measuring their viability after a 48h exposure. 3 independent experiments were realized with 6 replicates of each condition. Black dots represent the mean of each independent experiment. C-D) Cell proliferation was also evaluated for 48h after the addition of SEP on HUVECs (C) and SMCs (D). The area occupied by cells at 24 or 48h was divided by the area occupied by cells at T0 to evaluate the progression of well occupancy in each condition. 3 independent experiments were performed with 3 replicates each. The mean of all three experiments is represented with error bars corresponding to standard deviation.

Transendothelial passage and fiber formation

In order to reinforce vascular elasticity, SEP has to be delivered in the blood flow and integrate vessel walls. This concept requires that SEP is able to cross the endothelial barrier to be processed by SMCs and further incorporated into elastic lamellae. To address this, we used a co-culture model consisting in a cohesive monolayer of endothelial cells maintained in an insert above a culture of SMCs. Albumin coupled to a fluorescent dye (Fig. 6A) or SEP (Fig. 6B) were diluted in the culture medium above the endothelial cells. The integrity of the cellular junctions of endothelial cells was verified by the presence of vascular endothelial (VE)-cadherin at the level of the plasma membranes thus forming homogeneous honeycomb structures. A negative control consisting in 70 kDa fluorescent dextran was also used to check the barrier impermeability (not shown). The presence of fluorescent albumin (positive control) and SEP was sought at the level of the fibrillin-rich microfibrils produced by the underlying SMCs. While albumin is not found at the level of SMCs in the lower compartment, indicating that the protein did not passively adsorb, the SEP was immunodetected as fibrillar deposits at

the level of fibrillin-1 structures. This result demonstrates that SEP is able to cross the endothelial barrier and to rearrange near the microfibrils formed by the SMCs by a mechanism that is probably more complex than adsorption.

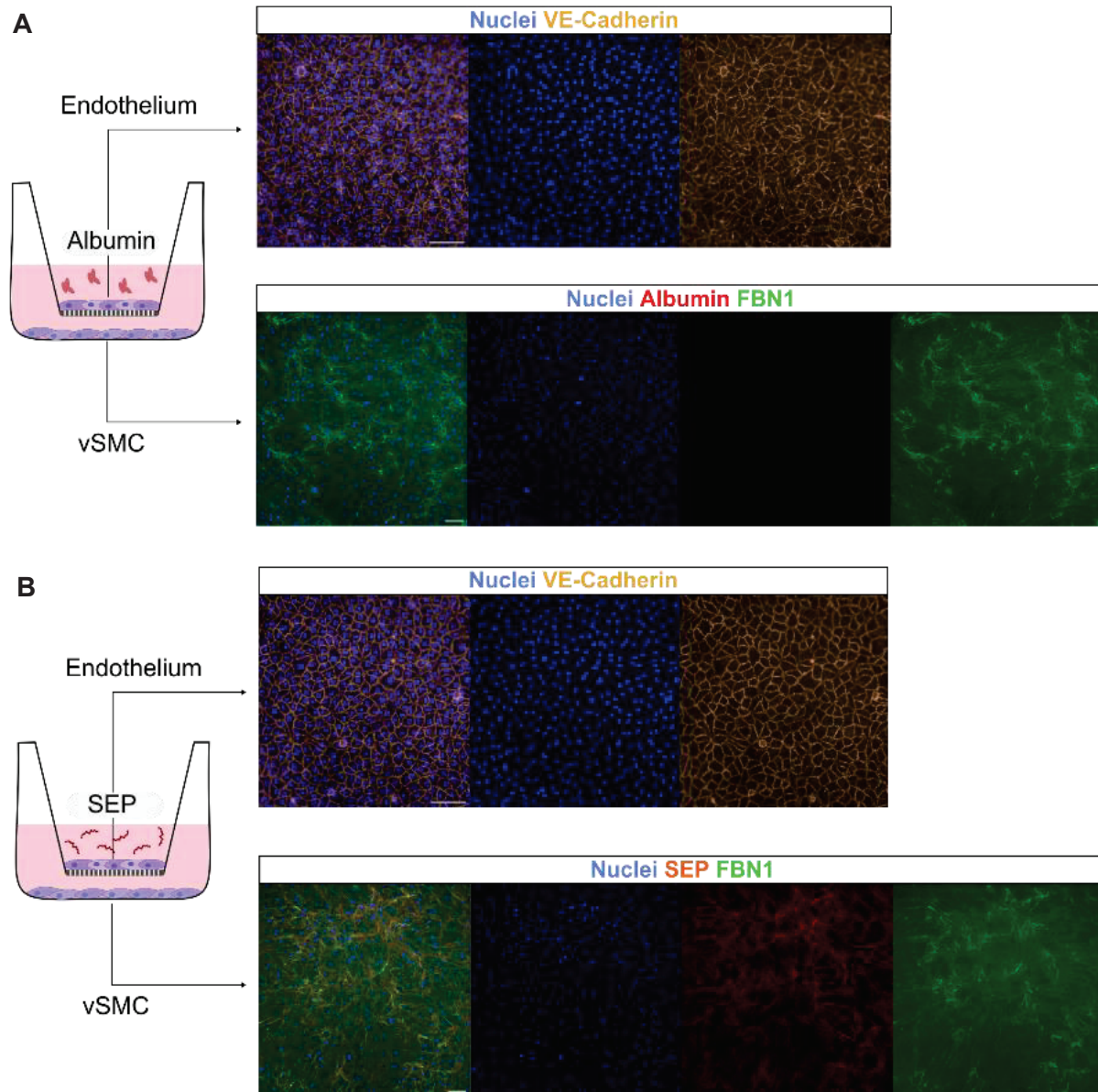


Fig. 6. SEP is able to cross the endothelium and to integrate fibrillin-rich fibers in an *in vitro* co-culture model. We developed a co-culture system to assess the transendothelial passage of SEP, which consists in endothelial cells cultured on a porous membrane on an insert, that is then put on top of vSMCs cultured in a well, as illustrated on the left. Either fluorescence-coupled Albumin (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**A**) or SEP (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**B**) was added in the culture medium of the upper compartment. After 24h, both cell layers were analyzed. The integrity of the endothelial layer was confirmed through VE-Cadherin immunolabelling, and SEP passage through the structure reproducing the endothelial barrier and subsequent handling by the SMCs was revealed by fibrillin-rich fiber and Flag immunodetection. FBN1 = fibrillin-1; vSMC = vascular smooth muscle cells. Scale bar = 100 μm .

To better understand the management of SEP by SMCs, the protein was added in a single dose at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ into the culture medium of confluent SMCs. Its integration at the level of fibrillin-1 microfibrils was observed by anti-Flag immunofluorescence at 2, 8 and 15 days posttreatment (Fig. 7A-F). After 2 days, SEP partially co-localized with fibrillin-1 structures, and

also formed smaller and more intense aggregates apparently aligned with finer fibrillin structures (Fig. 7D, white arrows). At 8 days, almost all the fibrillin structures were associated with SEP, and the intense small aggregates were still visible (Fig. 7E). At day 15, the intensity of the aggregates had decreased, and a large number of new fine structures of SEP-associated fibrillin covered all the SMCs (Fig. 7F). SEP could be associated to fibrillin structures either through specific passive interactions, or through active processes driven by SMCs. To determine whether the observed phenomenon was dependent on enzymatic activity, we used a LOX inhibitor (Fig. 7G-G'). In the presence of β -aminopropionitrile (β -APN), SEP aggregates were almost no longer visible, and only sparse co-localization with fibrillin structures could be observed. These results therefore demonstrate that SEP can be recognized by SMCs to be woven into microfibrils via the enzymatic activity of LOX. Interestingly, the fibrillar structures integrating the SEP seem stable since the SEP was still present and had not been discarded or digested by proteolysis 15 days after treatment. In this respect, however, SEP remains sensitive to degradation by main elastases such as MMP-12 and leukocyte elastase, but undoubtedly its highly repetitive sequence allows it to be quite more resistant than hTE is (Fig. S2).

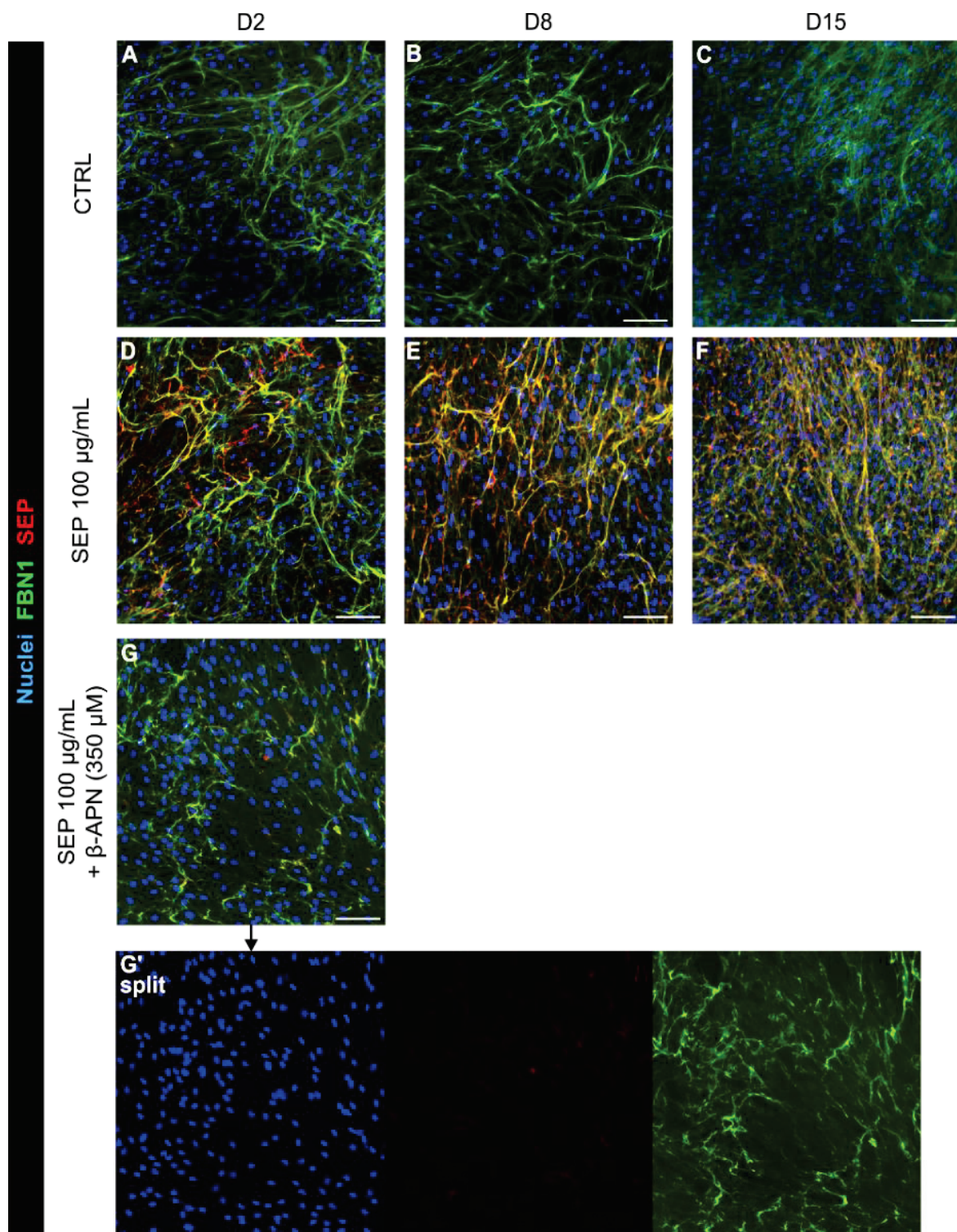


Fig. 7. SEP integration into fibrillin-rich fibers persists over time and requires LOX activity. SEP was added into the culture medium of vascular smooth muscle cells for 2 days with or without β -APN (350 μ M). Cells were then fixed at different time points, knowingly at day two (**A**, **D**, **G**), eight (**B**, **E**) and fifteen (**C**, **F**). Fibrillin-rich fibers were immunodetected in green and SEP in red. (**G'**) shows split channels of **G**, to highlight the decreased presence of SEP. FBN1 = fibrillin-1; β -APN = β -aminopropionitrile; LOX = lysyl oxidase. Scale bar = 100 μ m.

SEP behavior in the zebrafish model

The *in vitro* experiments suggest that SEP behaves as an analogue of hTE. To go further and initiate *in vivo* studies, we chose to use the zebrafish model that we recently reported as a relevant tool in the analyses of cardiovascular issues [39]. Specifically, we used the transgenic zebrafish reporter line Tg(*fli1a*:eGFP)/Casper, whose endothelial cells are fluorescent and enable vessel development observation in real time. In first intention, we evaluated the toxicity of SEP on dechorionated or non-dechorionated embryos (Fig. 8A). The embryos were incubated by immersion in increasing concentrations of SEP (25, 100 and 500 µg/mL) and their morphology and survival were monitored during 80h. A strong mortality was observed in presence of the chorion for the highest concentration of SEP. However, this is not related to a direct toxic effect of the protein on the physiology of individuals since no significant effect (development delay, pericardial edema, malformation of the tail) was observed using dechorionated individuals. We assume that it is more likely a physical phenomenon leading to accumulation of SEP in the chorion pores and preventing exchanges with the environment through this porous membrane. This assumption is notably reinforced by the presence of aggregates on the surface of the chorion likely to block the entry of the pore channels (Fig. 8A, left panel arrowheads) as previously described following immersion of zebrafish eggs in nanoparticle bath [40]. The safety of compounds derived from elastin is relatively established, however their inflammatory status is often questionable [41]. We therefore used the zebrafish reporter line Tg(*mpx*:eGFP)/Casper, whose neutrophils are labeled with GFP, to estimate the chemoattractant potential of SEP. SEP was injected into the yolk sac of 3 days post-fertilization individuals and neutrophil recruitment was monitored after 24 h (Fig. 8B). While many neutrophils were attracted to the injection site in the positive control using *E. coli* bacteria, no significant recruitment could be recorded for SEP in comparison with the vehicle injection (PBS). The inert inflammatory status of SEP was also confirmed in the human monocyte cell line THP-1 (Fig. S3). SEP or its degradation products, obtained by digestion with leukocyte elastase, did not induce an increase in the expression levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8 and TNF α) unlike the lipopolysaccharide (LPS) positive control. These results therefore argue in favor of an immunoquiescent nature of the SEP.

Finally, SEP coupled with a fluorescent dye was microinjected directly into the blood flow of the Tg(*fli1a*:eGFP)/Casper zebrafish strain to observe its distribution in the vasculature for 96h (Fig. 9). As early as 3 h post-injection (hpi), SEP was found in all visible vessels, including the caudal vein, the dorsal aorta and the intersegmental vessels. More particularly, we noted the presence of dots which could correspond to the aggregation of SEP along the vessels. At the same time, Dextran (70 kDa), used as a negative control, also showed staining throughout the vascular tree, but no focal dot could be observed, giving way to diffuse staining in the vessels. After 24 h, SEP aggregates became more defined and seemed to accumulate in the caudal vein of the individuals, where the vascular tree is the most tortuous. At this same time, the labeling of Dextran appeared diffuse and decreased in intensity compared to the time-point at 3 hpi, which may result from a clearance of the compound. Further analysis by confocal microscopy clearly highlighted the incorporation of SEP inside the vessel and beyond the endothelial barrier, thus ruling out the passive deposition of SEP in tortuous area (Fig. S4). At 96 hpi, SEP aggregates remained visible but of less intensity, whereas the Dextran was no longer detected at all. The decrease in intensity of the SEP aggregates could come either from a degradation of the exogenous material, or from the release of the fluorochrome following SEP incorporation into the blood vessel, or from a bleaching due to the oxidation of the fluorescent group over time. In conclusion, these *in vivo* results corroborate the observations made previously in *in vitro* models where SEP accumulates and persists over time. This

phenomenon therefore suggests that the protein would be processed to be integrated into the extracellular matrix of the vessels, although additional analyzes will be necessary to confirm this.

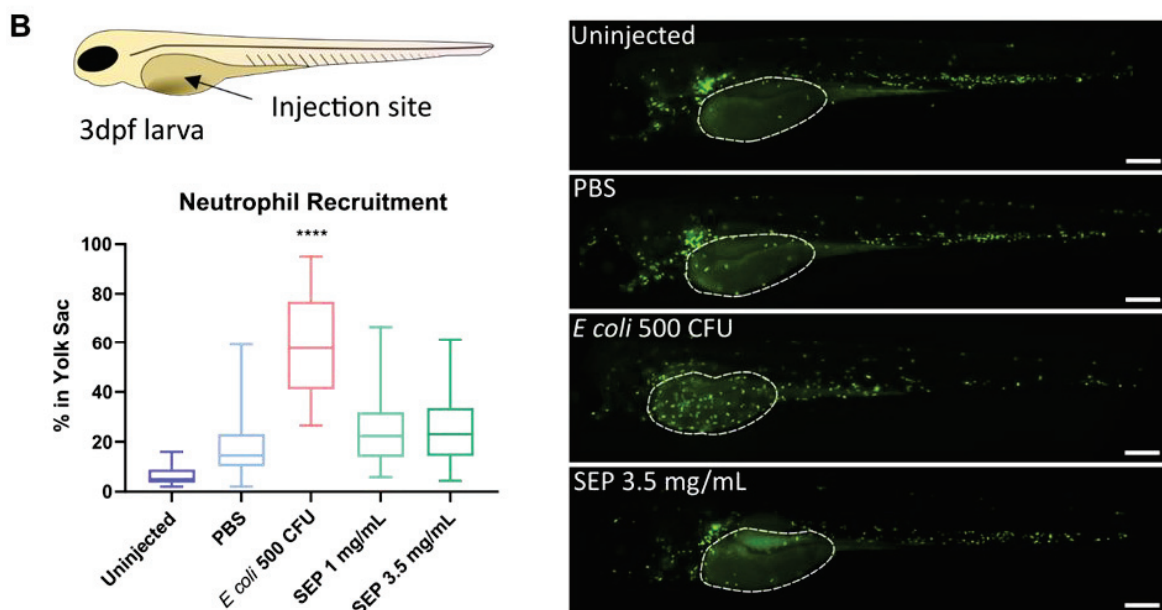
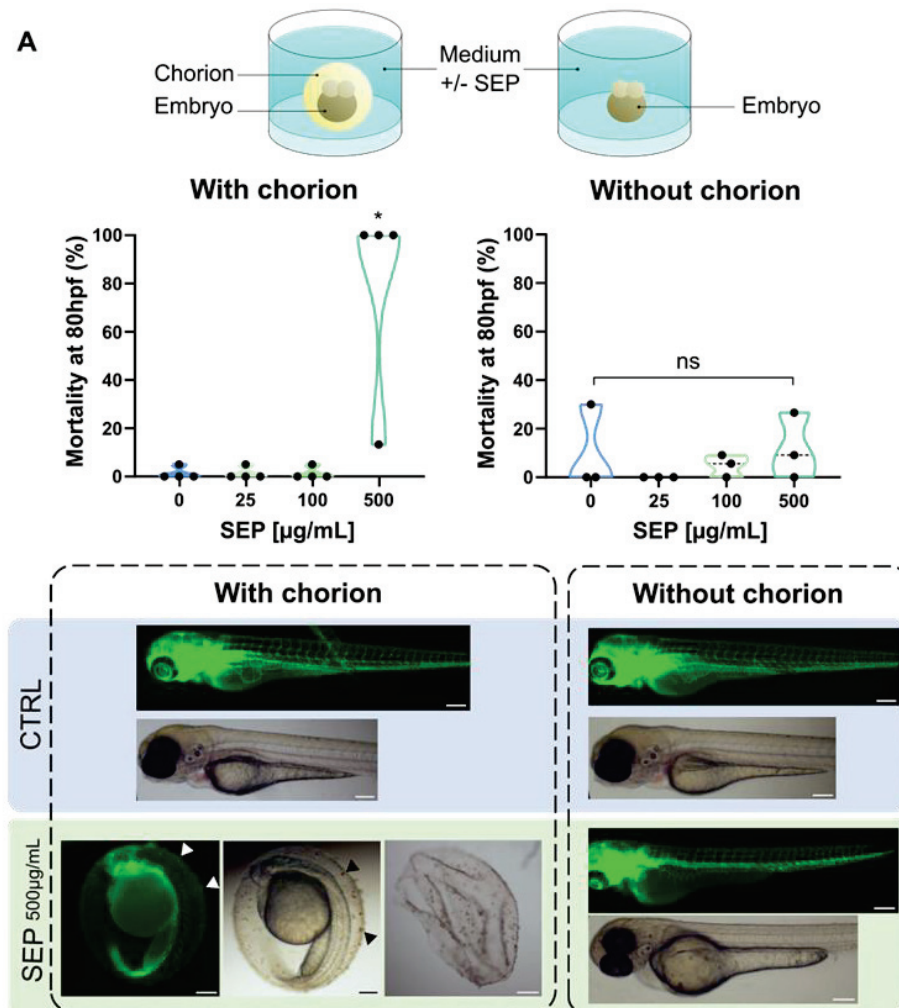


Fig. 8. SEP does not have toxic effects on zebrafish when the chorion is removed and has no pro-inflammatory action. A) SEP toxicity was assessed *in vivo* by the Fish Embryo Toxicity Test. Zebrafish embryos were put in a culture plate containing E3 medium and SEP at increasing concentrations (here from 25 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The effects were monitored for 80 hours. The chorion was either removed or not. Tg(*fli1a:eGFP*)/Casper zebrafish were used, to follow vascular development, as well as wild type AB/Tü zebrafish. Arrowheads point to SEP aggregates formed on the chorion. 4 (with chorion) and 3 (without chorion) independent experiments were performed with a total of at least 35 embryos per condition. Data were analyzed by the Kruskal-Wallis test; * = $p < 0.05$, ns = non-significant. Scale bar = 200 μm . **B)** SEP pro-inflammatory potential was assessed by monitoring the recruitment of neutrophils 24h after injection into the yolk sac. PBS was used as a negative control and *E. coli* (500 CFU) as a positive control for recruitment. Tg(*mpx:eGFP*)/Casper zebrafish were used to follow neutrophils and the proportion of neutrophil recruited at the injection site (indicated by white dotted lines) was measured. 3 independent experiments were performed with at least a total of 25 fish per condition (except for the uninjected fish). Data were analyzed by the Kruskal-Wallis test; **** = $p < 0.0001$ (compared to PBS injection). dpf = days post fertilization; CFU = colony forming unit; Scale bar = 200 μm .

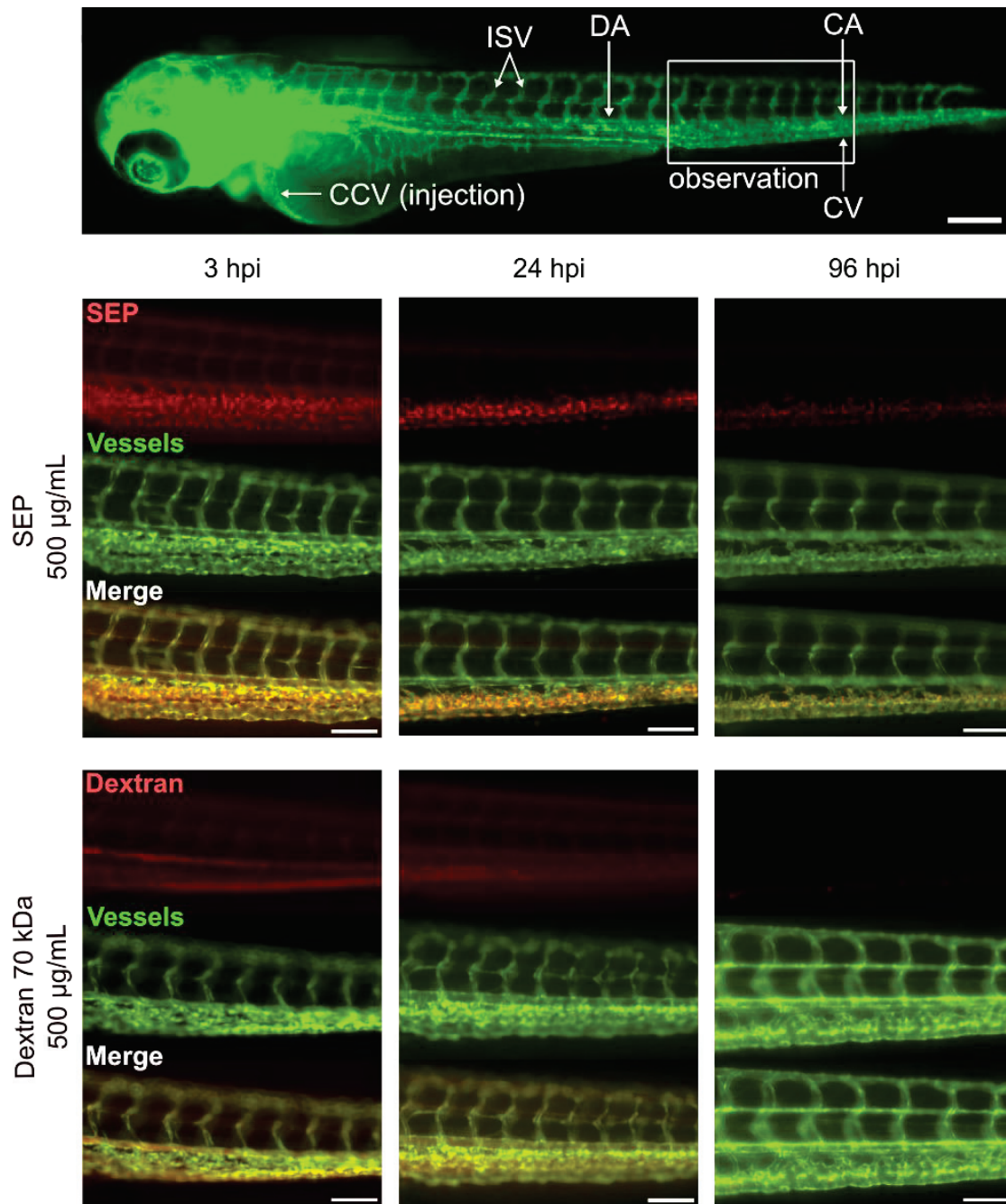


Fig. 9. SEP is retained in vessels after intravascular injection in zebrafish embryos for at least 96h. Zebrafish embryos *Tg(fli1a:eGFP)/Casper* were injected with either SEP or Dextran 70 kDa (control) at 2 days post fertilization and monitored by epifluorescence microscopy for 4 days to follow the injected molecules. Vessels appear in green and injected molecules are coupled with red fluorophores (SEP-Rhodamine and Dextran-Rhodamine). The injection was performed in the CCV and the observation zone corresponds to the tail of the embryo which is delineated with a white rectangle. hpi: hours post injection; CCV: common cardinal vein or duct of Cuvier; DA: dorsal aorta; CV: caudal vein; CA: caudal artery; ISV: intersegmental vein. Scale bar = 100 µm.

Discussion

The objective of this study was to characterize a polypeptide inspired by the human tropoelastin and to evaluate its ability to associate with elastic fibers for vascular repair purpose. The repair of damaged elastic fibers by adding tropoelastin had already been proposed following the development of a gene coding for a soluble recombinant common form of tropoelastin expressed in *E. coli* [42]. This recombinant tropoelastin had then been optimized and its incorporation into endogenous elastic fibers had been demonstrated in cultures of rat fibroblasts [43]. If this construction and others have largely contributed to the understanding of the molecular mechanisms related to the complex assembly of elastic fibers, to our knowledge however, no therapeutic application has been proposed to date. Several parameters can explain this translational lock. First concerning the intrinsic properties of hTE itself, such as the sensitivity of hTE to proteolysis and subsequent effects of the derived fragments. The multiple isoforms that should be delivered specifically to each tissue to recover the initial properties of the elastic fibers is also an almost impossible objective to achieve. Practical aspects must be taken into consideration, such as its production and purification often based on reverse phase chromatography using solvents that are not very compatible with pharmaceutical development or requiring very heavy quality controls, although the production price has been estimated as low as US\$0.70 / mg under good manufacturing practice conditions [44], this does not include pharmaceutical qualification. Finally, the possibility of delivering the protein to the target connective tissues remains a major challenge. For these reasons, hTE has in fact found another very important sector of applications in the formulation of biomaterials which fall under the slightly less restrictive regulatory issues of medical devices. We can report, among other great successes in murine models, the functionalization of vascular stents [45], or the grafting of bioresorbable vessels [46], where hTE prevents restenosis and hyperplasia. However, to our knowledge, these devices have never been validated for human applications.

The SEP used in our study takes up few conformational characteristics of hTE, in particular the alternation of hydrophobic and cross-linking domains. As retrieved in many other hTE-derived polypeptides, the hydrophobic domains consist of aliphatic amino acids (valine-glycine-leucine-alanine) and a proline repeated at regular intervals, here every 6 residues. The space between the proline residues is essential for the reversibility of the coacervation and a period of 6 residues, as found in domain 24 of hTE, allows an optimal reversibility of 98% [47]. From 9 residues and beyond, as found in domain 30 of hTE, coacervation results in the formation of stable amyloid- β structures [48, 49]. These rigid structures are therefore unwanted and can contribute to the development of neurological pathologies such as Alzheimer's disease [50]. Our NMR results, which were recorded from SEP coacervates, indicate that even in the solid state, SEP retains a significant degree of flexibility at the proline residue level. These data are in good agreement with the recent characterization of elastin in solid-state NMR coupled with Fourier Transform Infrared experiments reporting that the flexibility and elasticity of native elastin are linked to the *cis-trans* isomerization of the Xaa-Pro imide bonds [51]. Between the hydrophobic domains, we interspersed alanine-lysine-rich cross-linking domains corresponding to a motif found in domain 19 of hTE and conserved across many species. To allow cross-linking, these domains must have an α -helix or polyproline II ("extended helix") conformation, thus placing two lysines sufficiently close to cause the formation of desmosine and isodesmosine cross-links [52]. Circular dichroism and NMR analyzes indicate that SEP possesses such structures and would therefore be prone to cross-linking by endogenous machinery.

To determine the mechanical properties of SEP, we therefore used genipin, a natural non-toxic agent having already been shown to be effective in the crosslinking of lysines of elastin and its derivatives at the level of the crosslinking domains [53]. Cross-linking has the effect of insolubilizing the material, thus making coacervation irreversible, as in the process of maturation of elastic fibers. The cross-linked SEP samples could therefore be mechanically analyzed by a tensile test demonstrating a wide range of linear elongation and an elastic modulus around 50 kPa. However, the values of elastic modulus and rupture strength cannot be compared with other studies in which the samples were centrifuged in a highly saline

medium (1.5M NaCl) to force coacervation and densify the material, thus offering much higher elastic modulus values of the order of 1MPa [54, 55]. We opted for concomitant cross-linking with sedimentation of the coacervates in a physiological buffer to bring us closer to the native conditions for the elastic fiber assembly, nevertheless this process offers a less dense and less homogeneous material with areas of fragility. Though, beyond the absolute elastic modulus values, we will mainly retain the linear elastic behavior of the SEP-based material reflecting the global SEP mechanics.

We then showed that SEP added to the culture medium of human vascular cells did not impact the survival or proliferation *in vitro*. At the endothelial cell level, the reported effects of hTE and certain derived peptides in the soluble phase mainly concern the release of NO with consequences on vasorelaxation [56, 57]. Recently, a positive effect of hTE on HUVEC tubulogenesis has been reported [58]. In this study, the authors showed that this effect was indirect and responded to a signal provided by the mesenchymal stem cells treated with hTE. Regarding SMC, we could have expected a decrease in cell proliferation. Indeed, SMCs deficient in elastin, as in the case of WBS or SVAS, have a low level of tropoelastin synthesis associated with an increase in their proliferation, this phenotype was reversed by adding hTE to their culture medium [17]. However, this effect was observed for concentration of 1 mg/ml, 10 to 100-fold higher than what we tested for SEP. The most interesting point of our results on vascular cells certainly concerns the ability of SEP to cross the endothelial barrier and further be incorporated into fibrillar deposits by SMCs in a co-culture model. While it is known that elastin-derived peptides are able to cross anatomical barriers to even be found beyond the blood-brain barrier to contribute to Alzheimer's disease as mentioned above [50], we did not find any element reporting such a mechanism for hTE. The mechanism by which SEP crosses the endothelial layer is not elucidated but we found SEP inside HUVECs following treatment, suggesting a mechanism of transcytosis (not shown). Finally, SEP reaching the SMCs is processed and deposited at the level of fibrillin-1-rich fibrillar structures. Kozel and coworkers had described that hTE could passively associate with a native matrix in the absence of living cells via sulfated proteoglycans [59]. This constitutes the early phase of tropoelastin deposition, however, in the presence of an inhibitor of LOX activity (β -APN), no deposition of SEP aggregates could be observed. This result therefore clearly demonstrates an active crosslinking of the SEP at the level of the SMC matrix, rather than a passive adsorption of the protein onto pre-existing fibres. Also, this phenomenon evolves favorably over time even without further addition of SEP, definitely demonstrating an active incorporation. Although observations at the ultrastructural scale would be necessary to confirm this, SEP seems to be recognized by SMCs in a way similar to tropoelastin and correctly addressed at the level of the extracellular matrix.

In the last part of our study, we applied SEP in the zebrafish model to observe its behavior *in vivo*. Our results show no toxicity of SEP even for high doses up to 500 μ g/mL in the medium of dechorionated embryos in compliance with the guidelines n°236 proposed by the OECD for this test. Zebrafish is considered as a good, inexpensive and highly scalable model for *in vivo* drug testing in a preclinical trial and predicting the toxicity of therapeutic molecules in humans [60-62]. Besides the number of descendants generated from a single spawn (100-200 eggs per female and per week) and the small size of the embryo which enables to perform high throughput experiments without to use high amount of drug for testing, small molecules can be actively absorbed from the water by the embryo which facilitates drug administration. Also, numerous studies exist demonstrating that zebrafish is sometimes a better model, for predicting the toxic effects of drugs on humans compared to some mammalian models [63-65]. Interestingly, no defect, including pericardial edema, intersegmental vessel malformation or blood flow slowing, was observed following embryo immersion in SEP solution which suggests the absence of adverse effect of SEP on zebrafish cardiovascular system [66]. Following the evaluation of SEP toxicity in zebrafish embryos by immersion, we also injected

the SEP into the duct of Cuvier - which is the largest vessel of this animal model - of 2 dpf embryos and monitored the biodistribution of this molecule for 96h. This delivery method was chosen to come as close as possible to a drug delivery system capable of repairing the wall of vessels lacking elasticity.

In contrary to the Dextran used as control, SEP was accumulating into the caudal vein connected to the posterior cardinal vein, which collects all the blood from the body and transport it back to the heart. This vasculature forms an interconnecting network of venous tubes, in which the vascular topology results in locally high shear gradients and slower blood flow compared to the dorsal aorta [67]. This could favor the interaction between molecules in the bloodstream (and thus the SEP) and the endothelial cells. This particular tortuous topology found in zebrafish embryo vasculature could be compared to abnormal vasculature found in aortic aneurysm, supraaortic stenosis and in aging arterial wall [68]. Therefore, this last result implies the SEP deposition in pathological conditions and reinforce the interest of the zebrafish model to study drug for vascular pathologies.

With the fantastic emergence of genome editing over the last 20 years, strategies aiming at reprogramming cells for the proper production of proteins, and particularly Crispr/cas9 technology, has become a hot topic [69, 70]. However, this strategy might not be relevant for elastin deficiency since elastin is a particularly stable protein and for which time-limited administration/activation of production could be sufficient for the improvement of mechanical defects. Recently, the intradermal delivery of mRNA encoding for tropoelastin, in solution with lipofectant, has shown significant increase in elastin levels in pig skin *ex vivo*, but again this involves transfection of specific cells in the body which is difficult to consider on arterial SMCs which are buried deep in the vessel [71]. In this respect, a strategy using a protein capable of crossing the endothelial barrier and binding directly to the fibers in the tunica media *in situ* therefore remains relevant. Recently we reported the use of SEP as a single intravenous injection in an elastin haploinsufficient mouse model [72]. Aortic physio-mechanical improvements were shown for high blood pressure values at 3 days post-injection, but the presence within the vascular walls could not be observed. We had concluded that it could be a biological rather than a mechanical action of the SEP. Considering the results brought by the present study, SEP could nevertheless reach the vascular wall as shown in zebrafish, but probably in lower proportions in mice. It would be highly appropriate to perform multiple injections to increase SEP incorporation into the vascular walls until detectable levels to reach more significant mechanical input, even at low blood pressure.

Conclusions

In summary, the SEP is a novel polypeptide that mimics tropoelastin and recapitulates the physicochemical, mechanical, and biological behavior of the native protein without inducing cytotoxicity or systemic inflammation. It can be administered intravenously and actively crosses the endothelial barrier to reach vascular smooth muscle cells and incorporates into the extracellular matrix. These results encourage us to further validate its potential in relevant mammalian models to improve arterial mechanical parameters when these are compromised.

Experimental procedures

Production and purification implementation

SEP production

Gene synthesis, encoding for SEP, was outsourced to GenScript (Piscataway, USA). The DNA sequence (1794 pb) was optimized for an *E. coli* prokaryotic system expression. The gene was cloned into the pET30a prokaryotic expression vector (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) between *NdeI* and *Sall* sites.

Recombinant vector digestion with *EcoRV* restriction enzyme enabled to validate the purification of the right plasmid, prior sequencing (Eurofins Genomics France, Villeurbanne, France). pET30a-SEP vector was stored at -20°C prior to transform BL21 (DE3) competent bacteria (New England Biolabs, Évry-Courcouronnes, France).

The pET30a-SEP recombinant vector was used to transform BL21 (DE3) competent *E. coli* bacteria selected on Luria Bertani (LB) both-agar plates containing 50 µg/mL kanamycine (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). A single colony was used to inoculate 5 mL LB containing 50 µg/mL kanamycine overnight at 37°C under constant stirring. The culture was diluted 1:100 and SEP expression was induced at the exponential growth phase by the addition of 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma–Aldrich) for 4h at 30°C under constant stirring. Alternatively, for large batch production, the preculture was inoculated at 1% (v/v) in 2 L of LB-based auto induction medium (Formedium, Hunstanton, UK) supplemented with 50 µg/mL kanamycin, and cultured overnight at 37°C under constant stirring. Similarly, for NMR experiments, ¹³C-¹⁵N uniformly labeled SEP was prepared in 2 L of minimal M9 medium containing 2 g/L of ¹³C-glucose and ¹⁵NH₄Cl.

Bacteria were then harvested by centrifugation 4,000 g/4°C/10 min and the resulting cell pellet frozen overnight at -80°C. Bacteria were resuspended in water and subjected to mechanical cell disruption (Cell disruptor TS2, Constant Systems, Daventry, UK). Soluble and insoluble fractions were harvested by centrifugation 15,000 g/4°C/20 min and analyzed by Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

SEP purification

SEP was purified from the soluble *E. coli* lysate by inverse transition cycling (ITC) method, as previously reported by Chilkoti and Meyer [32]. Briefly, lysate was buffered with 50 mM TrisHCl pH 8.8, and 0.2% (w/v) polyethylenimine (Sigma-Aldrich) was added under agitation for 30 min at 4°C. The precipitate was discarded by centrifugation 15,000 g/4°C/10 min. The supernatant was warmed to 40°C for 10 min with 1 M NaCl prior centrifugation at 15,000 g/40°C/5 min. The supernatant was discarded, and the pellet containing SEP was resuspended in cold phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 containing 0.5 M NaCl and incubated on ice for 10 min to end the first ITC. A total of three rounds of ITC were applied. The final pellet was resuspended in 0.9% (w/v) NaCl or PBS. A quality control was conducted by silver staining of SDS-PAGE. The presence of endotoxin was quantified by limulus amoebocyte lysate testing (Endosafe, Charles River, Ecully, France) and osmolarity was measured by osmometer (OsmoPRO, Advanced Instruments, Paris, France). The purified SEP was passed through a 0.2 µm pore size syringe filter for sterilization and quantified using the BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France). Aqueous solutions were stored at -20°C until further use.

Western blotting

1 µg of SEP was subjected to SDS-PAGE. Proteins were transferred onto poly(vinylidene fluoride) membrane using Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette,

France). After transfer, the membrane was blocked 1h at room temperature with 5% (w/v) non-fatty milk in tris-buffered saline with Tween-20 at 0.1% (v/v) (TBS-T). Membrane was further incubated with anti-FLAG (1/5000; F1804, Sigma-Aldrich) in 2% (w/v) non-fatty milk in TBS-T overnight at 4°C. The membrane was rinsed three times with TBS-T and then incubated with secondary antibody goat anti-mouse IgG coupled to horse radish peroxidase (1/10,000, 1706516, Bio-Rad) in TBS-T for 1h at room temperature. The membrane was rinsed five times in TBS-T and revealed with enhanced chemiluminescent substrate (Super Signal West Pico, Thermo Fisher Scientific). Images were acquired with FUSION FX imager (Vilber-Lourmat, Collégien, France).

Structure characterization

Circular Dichroism

Far-UV CD spectra of SEP were recorded with a Chirascan spectrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, United Kingdom) calibrated with 1S-(+)-10-camphorsulfonic acid. Measurements were carried out 20°C to 60°C in a 0.1-cm-path-length quartz cuvette (Hellma, Müllheim, Germany), with a SEP concentration of 0.2 mg/mL in PBS at pH 7.4. Spectra were measured in a 180 nm to 260 nm wavelength range. Spectra were processed, baseline corrected, smoothed, and converted with Chirascan software. Spectral units were expressed as the mean molar ellipticity per residue.

Nuclear Magnetic Resonance

¹³C-¹⁵N SEP was dialyzed in H₂O after purification and lyophilized. 66 mg of protein were resuspended in 860 µL of PBS buffer and placed in a bath at 40 °C for 15 min for coacervation. The coacervated sample was filled into a thin-wall 3.2 mm rotor by ultracentrifugation (1h at 100,000 g, 40 °C) using an NMR filling tool. Before closing the rotor, 1.5 µl of DSS were added for chemical shift referencing.

NMR experiments were recorded on an 800 MHz spectrometer at a 17.5 kHz magic-angle spinning (MAS) spinning frequency and at temperatures of 4 °C and 40 °C. The temperature difference did not affect the NMR spectra. 2D ¹³C-¹³C DARR spectrum was recorded with a mixing time of 40 ms and 8 scans for 15h45. 2D ¹H-¹³C-INEPT spectra was recorded with 16 scans for 8h06. 2D ¹³C-¹³C INEPT-TOBSY [72] was recorded with 32 scans for 15h45 at 15 kHz MAS rate and a TOBSY mixing time of 6.2 ms.

Mass Spectrometry

After alkylation with 10 mM iodoacetamide for 45 min at room temperature, SEP was digested overnight at 37°C with sequencing grade pepsin (Promega) at a 1:20 (pepsin:SEP) mass ratio. Peptide sequences were determined by mass spectrometry performed on a LTQ Velos ETD instrument (Dual Pressure Linear Ion Trap, ETD activation mode) equipped with a nanospray source (Thermo Fisher Scientific) and coupled to a U3000 nanoLC system (Thermo Fisher Scientific). A MS survey scan was acquired over the m/z range 300-1600 in Zoom scan resolution mode. The MS/MS scans were acquired in Normal resolution mode over a dynamic m/z range for the 10 most intense MS ions bearing a charge equal or higher than 2. Acquisition parameters for the ETD MS/MS spectra were set as followed (i) reaction time to 100 ms, (ii) isolation width of the precursor ion (z=+3) to 2 amu. The spectra were recorded using dynamic exclusion of previously analyzed ions for 0.5 min with 50 millimass units (mmu) of mass tolerance. The peptide separation was obtained on a C18 PepMapmicro-precolumn (5 µm; 100 Å; 300 µm x 5 mm; Dionex) and a C18 PepMap nanocolumn (3 µm; 100 Å; 75 µm x 200

mm; Dionex) using a linear 60 min gradient from 0 to 40% of solvent B, where solvent A was 0.1% HCOOH in H₂O/CH₃CN (95/5) and solvent B was 0.1% HCOOH in H₂O/CH₃CN (20/80) at 300 nL/min flow rate.

Protein identification was performed using the SEQUEST Algorithm through the Proteome Discoverer software v1.4 (Thermo Fisher Scientific) against SEP sequence. The ETD MS/MS spectrum was validated manually.

Self-assembling

Aggregate size measurement by Dynamic Light Scattering

SEP coacervation and aggregate size in solution was measured using a Malvern-dynamic light scattering Zetasizer Nano S ZEN1600 (Malvern Panalytical, Vénissieux, France), for a range of temperatures between 20 and 60°C, with a stabilization time of 5 min. SEP samples were prepared at 1 mg/mL in PBS, pH 7.4. 11 runs were performed for each sample to determine the particle aggregate size, in order to obtain a final average value at constant temperature.

Electron microscopy

For transmission electron microscopy, SEP was dissolved at different concentrations (120 µg/mL to 2 mg/mL) in cold PBS (4°C). All solutions were equilibrated at 42°C for 15 min to generate coacervation. A formvar-carbon film grid (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, United Kingdom) was deposited on a droplet of each sample at 42°C. After 2 min, excess solutions on the grid were blotted and the adsorbed samples fixed with a 2% glutaraldehyde solution, for 2 min at 42°C. Samples were washed three times with distilled water, stained for 10 sec with 2% phosphor tungstic acid pH 7 (1M KOH) and air-dried. Observations were performed with a Philips CM120 transmission electron microscope, equipped with a digital CDD camera (Gatan), at the Centre Technique des Microstructures, University of Lyon 1. For scanning electron microscopy, all solutions were equilibrated at 42°C for 15 min to facilitate coacervation, spread on glass coverslips (Braunschweig, Germany), and air-dried at 42°C for 15 min. The resulting coverslips were subsequently repeatedly washed in PBS prior dehydration in graded ethanol solutions (50% to 100%). All samples were mounted on aluminum stubs, followed by thin (~3 nm) copper sputtering (Bal-tec MED 020, Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). Imaging was carried out using a Hitachi S800 FEG, scanning electron microscope.

Characterization of mechanical properties

Genipin cross-linked SEP stretch specimens

Purified SEP was dissolved in PBS (150 mM NaCl, pH 7.4) to a final concentration of 50 mg/mL at 4°C. Samples were coacervated at 40°C in silicone molds in presence of 50 mM aqueous genipin (Sigma-Aldrich) and cross-linked overnight at 40°C. Samples were removed from the mold and preserved in PBS, pH 7.4, containing 20 % EtOH.

Uniaxial tension tests

Uniaxial tension tests until rupture were performed in PBS at room temperature on an Instron 3343 tension machine (Instron, Élancourt, France) at 10 mm/min, fitted with a Futek LSB210 100g load cell (Futek, Irvine, CA, USA). Nominal stress was computed as the ratio of the force and the initial cross-sectional area of the sample, using the dimensions of the width of the mold and thickness measured using optical interferometry (Table 2). Stretch was computed from the

ratio of the initial length of the sample and its current length, determined by the jaw displacements.

Cell Culture and *in vitro* assays

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC; CC-2519) and human Aortic Smooth Muscle Cells (AoSMC, CC-2571) purchased from Lonza were cultured in EGM (CC-3124) and SmGM-2 media (CC-3182), respectively (Lonza, Basel, Switzerland).

Cell survival

Cell viability was evaluated using PrestoBlue reagent (A13261, Thermo Fisher Scientific). SEP was added at T = 0h and the medium was not changed before the test performed at T = 48 hours. At this time, the medium was removed, and cells were incubated for 1 hour with diluted PrestoBlue, as recommended by the provider guidelines. The signal was then measured by absorbance using a microplate reader (AMR-100, Allsheng) at 570 and 600 nm, in new plates. Results were obtained by subtracting blank to all data, subtracting the 600 nm absorbance from the 570 nm, and then normalizing everything over the mean of control wells. 6 replicate wells were attributed to each tested condition. The experiment was repeated 3 times.

Cell proliferation

SEP was added at T = 0h and the medium was not changed during the experiment. Cell proliferation was evaluated using the Cytonote-6W technology (Iprasense, Clapiers, France). Images of cells were taken at 24 and 48 hours, and proliferation was assessed by evaluating the area expansion of cultured cells over time, using the ImageJ software. 3 replicate wells were attributed to each condition tested. The experiment was repeated 3 times.

Co-culture in vitro model

HUVECs were cultured on an insert device with a porous membrane (0.4 μm – CLS3801; Merck, Darmstadt, Germany), seeded directly at confluency with complete EGM medium up and down for 2 days. SMCs were cultured for 3 to 5 days in 6 well plates in parallel, with 2 to 3 Softslips (coverslip with 4 kPa hydrogels coated with collagen; SS24-COL-4-PK; Cell Guidance Systems, Cambridge, UK) distributed in each well. At day -1, the HUVEC inserts were placed upon the SMCs in culture with EGM medium in the upper compartment and EBM (EGM without complement) in the lower compartment. These culture parameters were selected to obtain a permeability of the endothelial layer for which 70 kDa Dextran cannot cross. At day 0, the passage test was performed. SEP or fluorescently labeled Albumin (FITCAlbumin, A23015, Thermo Fisher Scientific) was added in the upper compartment at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 500 μL EBM medium. 24 h later, both the endothelium layer on the insert and the SMCs on the Softslips were collected to perform immunofluorescence. (To be noted: IF image colors were inverted so that all fibrillin-fibers appear in green and Albumin/SEP in red, so that FITC-Albumin is in fact in red).

SEP integration into fibers

SMC were cultivated on 4 kPa Softslips (same as above) with SmGM until confluency and then in SmBM (SmGM without complement) + 2% (v/v) FBS and antibiotics from the Bulletkit for SmGM (CC-4149, Lonza, Basel, Switzerland). SEP was added once at the beginning of the experiment at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For the β -APN condition (A3134, Sigma-Aldrich), cells were treated with 350 μM β -APN one hour before adding SEP. The treatment was renewed 24 h later by adding 10 μL of a 100X solution in the medium containing SEP (1 mL). Softslips were collected at day 2, 8 et 15 to perform immunofluorescence.

Immunofluorescence

Cells were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS at room temperature for 15 min and rinsed 3 times with PBS, then permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X-100 for 10 minutes on

agitation and rinsed 3 times, then incubated with 5% (w/v) BSA for 45 minutes on agitation. The following antibodies were used: anti-VE-Cadherin (1/500, 55566, BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France), anti-FLAG (1/500, F1804, Sigma-Aldrich); anti-FBN1 (1/500, HPA021057, Sigma-Aldrich). All primary antibodies were incubated with 0.5% (w/v) BSA overnight at 4°C under agitation. Secondary antibodies were diluted to 1/500 in 0.5% (w/v) BSA and incubated 1h at RT under agitation. DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) was incubated 10 min.

Zebrafish experiments

Zebrafish husbandry

All animals were kept in a dedicated facility (PRECI - UMS 3444, SFR Biosciences) with a controlled environment: 28°C; 14 h/10 h light/dark cycle, as stated by standard procedures [74]. Zebrafish eggs were collected after spawn and incubated at 28°C in E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂.2H₂O, 0.33 mM MgCl₂.6H₂O in distilled water, 0.6 µM methylene blue).

All procedures were conducted in accordance with the guidelines of the European Union and French laws and approved by the local animal ethic committee under regulatory of governmental authority (CECCAPP, Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4 (n° C2EA15), APAFIS #33958-2021100412005226 v6).

Toxicity test on zebrafish embryos

Wild-type AB/Tü and Tg(*fli1a*:eGFP)/Casper zebrafish were used. When required, dechoriation was performed with forceps under a stereomicroscope and dechorionated embryos were placed onto a 1% (w/v) agarose gel into the bottom of the wells to prevent them from sticking to the plastic. SEP at different concentrations was added in the medium of embryos at approximately 6-8 hpf. All embryos were monitored at least once a day and dead zebrafish were removed as soon as detected. Tg(*fli1a*:eGFP)/Casper zebrafish were observed at different times under an epifluorescence microscope to report any developmental issue of the cardiovascular system.

Zebrafish injection

Zebrafish embryos were anesthetized by immersion in buffered Tricaine methanesulfonate (MS-222 – pH 7) at 0.2 g/L in E3 medium and injected with molecules diluted in PBS using a microinjector (FemtoJet, Eppendorf, Montesson, France) under a stereomicroscope. Injection conditions are detailed in Table 3. After the injection, embryos were kept at 28°C in E3 medium. For the intravascular injection, SEP was coupled to a fluorophore (tetramethylrhodamine-5-maleimide (94506, Sigma-Aldrich)) so that it could be followed easily *in vivo*. SEP was incubated with the fluorophore in excess overnight on rotation, and then purified by 3 to 4 cycles of ITC as described above. Dextran 70 kDa was used as a negative control and was also coupled to a rhodamine (Rhodamine B-isothiocyanate-labeled Dextran; R9379, SigmaAldrich).

Table 3. Injection conditions for in vivo experiments.

	Inflammation	Vascular retention
Line	Tg(<i>mpx</i> :eGFP)/Casper	Tg(<i>fli1a</i> :eGFP)/Casper
Age	3 dpf	2 dpf
Volume injected	2 nL	1 nL
Administration	In the yolk sac	Intravascular, in the duct of Cuvier
Injected molecules	E coli (500 CFU) SEP (1 or 3.5 mg/mL)	SEP-rhodamine (500 µg/mL) Dextran-rhodamine 70 kDa (500 µg/mL)

dpf = days post fertilization

Zebrafish imaging

Zebrafish larvae were anesthetized by immersion using buffered Tricaine methanesulfonate (MS-222 – pH 7) at 0.2 g/L in E3 medium before imaging.

Statistical analysis

Data were analyzed for statistical significance using GraphPad Prism Software (version 8.0.1). Precise test choice is mentioned in the figure legend of corresponding data.

Acknowledgements

We thank the Zebrafish facility (PRECI) and the Protein Science Facility (PSF) from the Federative Structure of Research BioSciences UAR3444/US8. We greatly thank members of the histology and imaging facility (PrlmaTiss) at the LBTI institute. We also thank the CIQLE platform (Federative Structure of Research Santé Lyon Est). The Infrastructure de Recherche décentralisée RMN Très Hauts Champs (IR-RMN-THC) Fr3050 CNRS is gratefully acknowledged for conducting the NMR research.

Fundings

This work was supported by the Agence National de la Recherche, grant numbers ANR-11-TECS-0016 (“DHERMIC”) and ANR-18-CE18-0001 (“Arterylastic”, www.arterylastic.com).

Declarations of interest

None

Author contributions

M. Hoareau: investigation, formal analysis, methodology, writing – original draft

C. Lorion: investigation, formal analysis

L. Lecoq: investigation, formal analysis, methodology, resources, writing – original draft

A. Berthier: investigation, methodology

B. Pierrat: investigation, formal analysis, methodology, software, writing – original draft

S. Avril: validation, supervision

F. Pirot: validation, supervision

P. Sommer: supervision, funding acquisition

J. Sohier: investigation, formal analysis, conceptualization

E. Lambert: investigation, formal analysis, conceptualization, methodology, supervision, writing – original draft

R. Debret: investigation, formal analysis, conceptualization, methodology, project administration, funding acquisition, writing – original draft

References

- [1] B.A. Kozel, R.P. Mecham, Elastic fiber ultrastructure and assembly, *Matrix Biol* 84 (2019) 31-40.
- [2] J.E. Wagenseil, R.P. Mecham, New insights into elastic fiber assembly, *Birth Defects Res C Embryo Today* 81(4) (2007) 229-40.
- [3] S.G. Wise, A.S. Weiss, Tropoelastin, *Int J Biochem Cell Biol* 41(3) (2009) 494-7.
- [4] S.J. Shin, H. Yanagisawa, Recent updates on the molecular network of elastic fiber formation, *Essays Biochem* 63(3) (2019) 365-376.
- [5] C.E.H. Schmelzer, T. Hedtke, A. Heinz, Unique molecular networks: Formation and role of elastin cross-links, *IUBMB Life* 72(5) (2020) 842-854.
- [6] J.K. Belknap, N.A. Grieshaber, P.E. Schwartz, E.C. Orton, M.A. Reidy, R.A. Majack, Tropoelastin gene expression in individual vascular smooth muscle cells. Relationship to DNA synthesis during vascular development and after arterial injury, *Circ Res* 78(3) (1996) 388-94.
- [7] S.M. Mithieux, A.S. Weiss, Elastin, *Adv Protein Chem* 70 (2005) 437-61.
- [8] S.D. Shapiro, S.K. Endicott, M.A. Province, J.A. Pierce, E.J. Campbell, Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon, *J Clin Invest* 87(5) (1991) 1828-34.
- [9] F.X. Maquart, G. Bellon, S. Pasco, J.C. Monboisse, Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation, *Biochimie* 87(3-4) (2005) 353-60.
- [10] L. Duca, S. Blaise, B. Romier, M. Laffargue, S. Gayral, H. El Btaouri, C. Kawecki, A. Guillot, L. Martiny, L. Debelle, P. Maurice, Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation, *Cardiovasc Res* 110(3) (2016) 298-308.
- [11] M.J. Sherratt, Tissue elasticity and the ageing elastic fibre, *Age (Dordr)* 31(4) (2009) 305-25.
- [12] L. Duca, N. Floquet, A.J. Alix, B. Haye, L. Debelle, Elastin as a matrikine, *Crit Rev Oncol Hematol* 49(3) (2004) 235-44.
- [13] A.K. Baldwin, A. Simpson, R. Steer, S.A. Cain, C.M. Kielty, Elastic fibres in health and disease, *Expert Rev Mol Med* 15 (2013) e8.
- [14] B.R. Pober, Williams-Beuren syndrome, *N Engl J Med* 362(3) (2010) 239-52.
- [15] A. Beyens, L. Pottie, P. Sips, B. Callewaert, Clinical and Molecular Delineation of Cutis Laxa Syndromes: Paradigms for Homeostasis, *Adv Exp Med Biol* 1348 (2021) 273-309.
- [16] C.J. Lin, A.J. Cocciolone, J.E. Wagenseil, Elastin, arterial mechanics, and stenosis, *Am J Physiol Cell Physiol* 322(5) (2022) C875-C886.
- [17] Z. Urban, S. Riazi, T.L. Seidl, J. Katahira, L.B. Smoot, D. Chitayat, C.D. Boyd, A. Hinek, Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome, *Am J Hum Genet* 71(1) (2002) 30-44.
- [18] Q. Hu, J.L. Reymond, N. Pinel, M.T. Zobot, Z. Urban, Inflammatory destruction of elastic fibers in acquired cutis laxa is associated with missense alleles in the elastin and fibulin-5 genes, *J Invest Dermatol* 126(2) (2006) 283-90.
- [19] X. Yu, R. Turcotte, F. Seta, Y. Zhang, Micromechanics of elastic lamellae: unravelling the role of structural inhomogeneity in multi-scale arterial mechanics, *J R Soc Interface* 15(147) (2018).
- [20] U.K. Chowdhury, L.K. Sankhyan, S. Avneesh, R. Ray, M. Kalaivani, S. Hasija, A. Chauhan, Histologic Abnormalities of the Ascending Aorta: Effects on Aortic Remodeling after Intracardiac Repair of Tetralogy of Fallot, *Tex Heart Inst J* 47(2) (2020) 86-95.
- [21] M. Coquand-Gandit, M.P. Jacob, W. Fhayli, B. Romero, M. Georgieva, S. Bouillot, E. Esteve, J.P. Andrieu, S. Brasseur, S. Bouyon, N. Garcia-Honduvilla, P. Huber, J. Bujan, M. Atanasova, G. Faury, Chronic Treatment with Minoxidil Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Aorta of Aged Mice, *Rejuvenation Res* 20(3) (2017) 218-230.
- [22] R.H. Knutsen, S.C. Beeman, T.J. Broekelmann, D. Liu, K.M. Tsang, A. Kovacs, L. Ye, J.R. Danback, A. Watson, A. Wardlaw, J.E. Wagenseil, J.R. Garbow, M. Shoykhet, B.A. Kozel, Minoxidil improves vascular compliance, restores cerebral blood flow, and alters extracellular

matrix gene expression in a model of chronic vascular stiffness, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315(1) (2018) H18-H32.

[23] R. Roemers, J. Kluin, F. de Heer, S. Arrigoni, R. Bokenkamp, J. van Melle, T. Ebels, M. Hazekamp, Surgical Correction of Supravalvar Aortic Stenosis: 52 Years' Experience, *World J Pediatr Congenit Heart Surg* 9(2) (2018) 131-138.

[24] A.K. Varanko, J.C. Su, A. Chilkoti, Elastin-Like Polypeptides for Biomedical Applications, *Annu Rev Biomed Eng* 22 (2020) 343-369.

[25] L. Quintanilla-Sierra, C. Garcia-Arevalo, J.C. Rodriguez-Cabello, Self-assembly in elastin-like recombinamers: a mechanism to mimic natural complexity, *Mater Today Bio* 2 (2019) 100007.

[26] J.C. Rodriguez-Cabello, F.J. Arias, M.A. Rodrigo, A. Girotti, Elastin-like polypeptides in drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev* 97 (2016) 85-100.

[27] A. Girotti, J. Gonzalez-Valdivieso, I. Alonso-Sampedro, S. Escalera-Anzola, S. Ramos-Diez, F.J. Arias, Elastin-like Polymers as Nanovaccines: Protein Engineering of Self-Assembled, Epitope-Exposing Nanoparticles, *Methods Mol Biol* 2465 (2022) 41-72.

[28] I.G. de Torre, F. Wolf, M. Santos, L. Rongen, M. Alonso, S. Jockenhoevel, J.C. Rodriguez-Cabello, P. Mela, Elastin-like recombinamer-covered stents: Towards a fully biocompatible and non-thrombogenic device for cardiovascular diseases, *Acta Biomater* 12 (2015) 146-155.

[29] K.A. Woodhouse, P. Klement, V. Chen, M.B. Gorbet, F.W. Keeley, R. Stahl, J.D. Fromstein, C.M. Bellingham, Investigation of recombinant human elastin polypeptides as non-thrombogenic coatings, *Biomaterials* 25(19) (2004) 4543-53.

[30] F. Gonzalez-Perez, S. Acosta, S. Rutten, C. Emonts, A. Kopp, H.W. Henke, P. Bruners, T. Gries, J.C. Rodriguez-Cabello, S. Jockenhoevel, A. Fernandez-Colino, Biohybrid elastin-like venous valve with potential for in situ tissue engineering, *Front Bioeng Biotechnol* 10 (2022) 988533.

[31] R. Nonaka, F. Sato, H. Wachi, Domain 36 of tropoelastin in elastic fiber formation, *Biol Pharm Bull* 37(4) (2014) 698-702.

[32] D.E. Meyer, A. Chilkoti, Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides, *Nat Biotechnol* 17(11) (1999) 1112-5.

[33] D. Sharma, K. Rajarathnam, ¹³C NMR chemical shifts can predict disulfide bond formation, *J Biomol NMR* 18(2) (2000) 165-71.

[34] A. Ibanez-Fonseca, T. Flora, S. Acosta, J.C. Rodriguez-Cabello, Trends in the design and use of elastin-like recombinamers as biomaterials, *Matrix Biol* 84 (2019) 111-126.

[35] G.C. Yeo, B. Aghaei-Ghareh-Bolagh, E.P. Brackenreg, M.A. Hiob, P. Lee, A.S. Weiss, Fabricated Elastin, *Adv Healthc Mater* 4(16) (2015) 2530-2556.

[36] A. Chatron-Colliet, N. Lalun, C. Terryn, S. Kurdykowski, M. Lorenzato, A. Ruscioni, D. Ploton, L. Duca, H. Bobichon, The elastin peptide (VGVAPG)₃ induces the 3D reorganisation of PML-NBs and SC35 speckles architecture, and accelerates proliferation of fibroblasts and melanoma cells, *Histochem Cell Biol* 143(3) (2015) 245-58.

[37] K.A. Szychowski, J. Gminski, Elastin-derived peptide VGVAPG affects the proliferation of mouse cortical astrocytes with the involvement of aryl hydrocarbon receptor (Ahr), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Ppargamma), and elastin-binding protein (EBP), *Cytokine* 126 (2020) 154930.

[38] K.A. Szychowski, B. Skora, T. Pomianek, Effect of the elastin-derived peptides (VGVAPG and VVGPGA) on breast (MCF-7) and lung (A549) cancer cell lines in vitro, *Biomed Pharmacother* 151 (2022) 113149.

[39] M. Hoareau, N. El Kholi, R. Debret, E. Lambert, Zebrafish as a Model to Study Vascular Elastic Fibers and Associated Pathologies, *Int J Mol Sci* 23(4) (2022).

[40] Z.Y. Chen, N.J. Li, F.Y. Cheng, J.F. Hsueh, C.C. Huang, F.I. Lu, T.F. Fu, S.J. Yan, Y.H. Lee, Y.J. Wang, The Effect of the Chorion on Size-Dependent Acute Toxicity and Underlying Mechanisms of Amine-Modified Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos, *Int J Mol Sci* 21(8) (2020).

[41] F. Antonicelli, G. Bellon, L. Debelle, W. Hornebeck, Elastin-elastases and inflamm-aging, *Curr Top Dev Biol* 79 (2007) 99-155.

- [42] S.L. Martin, B. Vrhovski, A.S. Weiss, Total synthesis and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding human tropoelastin, *Gene* 154(2) (1995) 159-66.
- [43] P.J. Stone, S.M. Morris, S. Griffin, S. Mithieux, A.S. Weiss, Building Elastin. Incorporation of recombinant human tropoelastin into extracellular matrices using nonelastogenic rat-1 fibroblasts as a source for lysyl oxidase, *Am J Respir Cell Mol Biol* 24(6) (2001) 733-9.
- [44] G.C. Yeo, A.S. Weiss, Soluble matrix protein is a potent modulator of mesenchymal stem cell performance, *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(6) (2019) 2042-2051.
- [45] Y. Yin, S.G. Wise, N.J. Nosworthy, A. Waterhouse, D.V. Bax, H. Youssef, M.J. Byrom, M.M. Bilek, D.R. McKenzie, A.S. Weiss, M.K. Ng, Covalent immobilisation of tropoelastin on a plasma deposited interface for enhancement of endothelialisation on metal surfaces, *Biomaterials* 30(9) (2009) 1675-81.
- [46] T. Sugiura, R. Agarwal, S. Tara, T. Yi, Y.U. Lee, C.K. Breuer, A.S. Weiss, T. Shinoka, Tropoelastin inhibits intimal hyperplasia of mouse bioresorbable arterial vascular grafts, *Acta Biomater* 52 (2017) 74-80.
- [47] L.D. Muiznieks, F.W. Keeley, Proline periodicity modulates the self-assembly properties of elastin-like polypeptides, *J Biol Chem* 285(51) (2010) 39779-89.
- [48] L.L. del Mercato, G. Maruccio, P.P. Pompa, B. Bochicchio, A.M. Tamburro, R. Cingolani, R. Rinaldi, Amyloid-like fibrils in elastin-related polypeptides: structural characterization and elastic properties, *Biomacromolecules* 9(3) (2008) 796-803.
- [49] L.D. Muiznieks, S.E. Reichheld, E.E. Sitarz, M. Miao, F.W. Keeley, Proline-poor hydrophobic domains modulate the assembly and material properties of polymeric elastin, *Biopolymers* 103(10) (2015) 563-73.
- [50] C. Ma, J. Su, Y. Sun, Y. Feng, N. Shen, B. Li, Y. Liang, X. Yang, H. Wu, H. Zhang, A. Herrmann, R.E. Tanzi, K. Liu, C. Zhang, Significant Upregulation of Alzheimer's beta-Amyloid Levels in a Living System Induced by Extracellular Elastin Polypeptides, *Angew Chem Int Ed Engl* 58(51) (2019) 18703-18709.
- [51] C.L. Dabalos, K. Ohgo, K.K. Kumashiro, Detection of Labile Conformations of Elastin's Prolines by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance and Fourier Transform Infrared Techniques, *Biochemistry* 58(37) (2019) 3848-3860.
- [52] B. Bochicchio, A. Pepe, Role of polyproline II conformation in human tropoelastin structure, *Chirality* 23(9) (2011) 694-702.
- [53] L.D. Muiznieks, Genipin Cross-Linking of Elastin and Elastin-Based Proteins, *Methods Mol Biol* 1798 (2018) 213-221.
- [54] M. Miao, S.E. Reichheld, L.D. Muiznieks, E.E. Sitarz, S. Sharpe, F.W. Keeley, Single nucleotide polymorphisms and domain/splice variants modulate assembly and elastomeric properties of human elastin. Implications for tissue specificity and durability of elastic tissue, *Biopolymers* 107(5) (2017).
- [55] M. Miao, E. Sitarz, C.M. Bellingham, E. Won, L.D. Muiznieks, F.W. Keeley, Sequence and domain arrangements influence mechanical properties of elastin-like polymeric elastomers, *Biopolymers* 99(6) (2013) 392-407.
- [56] A. Fahem, A. Robinet, J.H. Cauchard, L. Duca, M. Soula-Rothhut, B. Rothhut, C. Soria, M. Guenounou, W. Hornebeck, G. Bellon, Elastokine-mediated up-regulation of MT1-MMP is triggered by nitric oxide in endothelial cells, *Int J Biochem Cell Biol* 40(8) (2008) 1581-96.
- [57] G. Faury, S. Garnier, A.S. Weiss, J. Wallach, T. Fulop, Jr., M.P. Jacob, R.P. Mecham, L. Robert, J. Verdetti, Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells, *Circ Res* 82(3) (1998) 328-36.
- [58] A. Al Halawani, L. Abdulkhalek, S.M. Mithieux, A.S. Weiss, Tropoelastin Promotes the Formation of Dense, Interconnected Endothelial Networks, *Biomolecules* 11(9) (2021).
- [59] B.A. Kozel, C.H. Ciliberto, R.P. Mecham, Deposition of tropoelastin into the extracellular matrix requires a competent elastic fiber scaffold but not live cells, *Matrix Biol* 23(1) (2004) 23-34.
- [60] S. Cassar, I. Adatto, J.L. Freeman, J.T. Gamse, I. Iturria, C. Lawrence, A. Muriana, R.T. Peterson, S. Van Cruchten, L.I. Zon, Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology, *Chem Res Toxicol* 33(1) (2020) 95-118.

- [61] J. Gierten, C. Pylatiuk, O.T. Hammouda, C. Schock, J. Stegmaier, J. Wittbrodt, J. Gehrig, F. Loosli, Automated high-throughput heartbeat quantification in medaka and zebrafish embryos under physiological conditions, *Sci Rep* 10(1) (2020) 2046.
- [62] E.E. Patton, L.I. Zon, D.M. Langenau, Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials, *Nat Rev Drug Discov* 20(8) (2021) 611-628.
- [63] G. Chimote, J. Sreenivasan, N. Pawar, J. Subramanian, H. Sivaramakrishnan, S. Sharma, Comparison of effects of anti-angiogenic agents in the zebrafish efficacy-toxicity model for translational anti-angiogenic drug discovery, *Drug Des Devel Ther* 8 (2014) 1107-23.
- [64] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity, *Science* 327(5971) (2010) 1345-50.
- [65] J.J. Zhu, Y.Q. Xu, J.H. He, H.P. Yu, C.J. Huang, J.M. Gao, Q.X. Dong, Y.X. Xuan, C.Q. Li, Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish, *J Appl Toxicol* 34(2) (2014) 139-48.
- [66] P. Gut, S. Reischauer, D.Y.R. Stainier, R. Arnaout, Little Fish, Big Data: Zebrafish as a Model for Cardiovascular and Metabolic Disease, *Physiol Rev* 97(3) (2017) 889-938.
- [67] M.J. Gomez-Garcia, A.L. Doiron, R.R.M. Steele, H.I. Labouta, B. Vafadar, R.D. Shepherd, I.D. Gates, D.T. Cramb, S.J. Childs, K.D. Rinker, Nanoparticle localization in blood vessels: dependence on fluid shear stress, flow disturbances, and flow-induced changes in endothelial physiology, *Nanoscale* 10(32) (2018) 15249-15261.
- [68] G.B. Kim, K.H. Park, S.J. Kim, Hemodynamics and Wall Shear Stress of Blood Vessels in Aortic Coarctation with Computational Fluid Dynamics Simulation, *Molecules* 27(4) (2022).
- [69] M. Alagoz, N. Kherad, Advance genome editing technologies in the treatment of human diseases: CRISPR therapy (Review), *Int J Mol Med* 46(2) (2020) 521-534.
- [70] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science* 337(6096) (2012) 816-21.
- [71] M. Lescan, R.M. Perl, S. Golombek, M. Pilz, L. Hann, M. Yasmin, A. Behring, T. Keller, A. Nolte, F. Gruhn, E. Kochba, Y. Levin, C. Schlensak, H.P. Wendel, M. Avci-Adali, De Novo Synthesis of Elastin by Exogenous Delivery of Synthetic Modified mRNA into Skin and Elastin-Deficient Cells, *Mol Ther Nucleic Acids* 11 (2018) 475-484.
- [72] Q. Boete, M. Lo, K.L. Liu, G. Vial, E. Lemarie, M. Rougelot, I. Steuckardt, O. Harki, A. Couturier, J. Gaucher, S. Bouyon, A. Demory, A. Boutin-Paradis, N. El Kholti, A. Berthier, J.L. Pepin, A. Briancon-Marjollet, E. Lambert, R. Debret, G. Faury, Physiological Impact of a Synthetic Elastic Protein in Arterial Diseases Related to Alterations of Elastic Fibers: Effect on the Aorta of Elastin-Haploinsufficient Male and Female Mice, *Int J Mol Sci* 23(21) (2022).
- [73] O.C. Andronesi, S. Becker, K. Seidel, H. Heise, H.S. Young, M. Baldus, Determination of membrane protein structure and dynamics by magic-angle-spinning solid-state NMR spectroscopy, *J Am Chem Soc* 127(37) (2005) 12965-74.
- [74] M. Westerfield, *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4th ed.2000

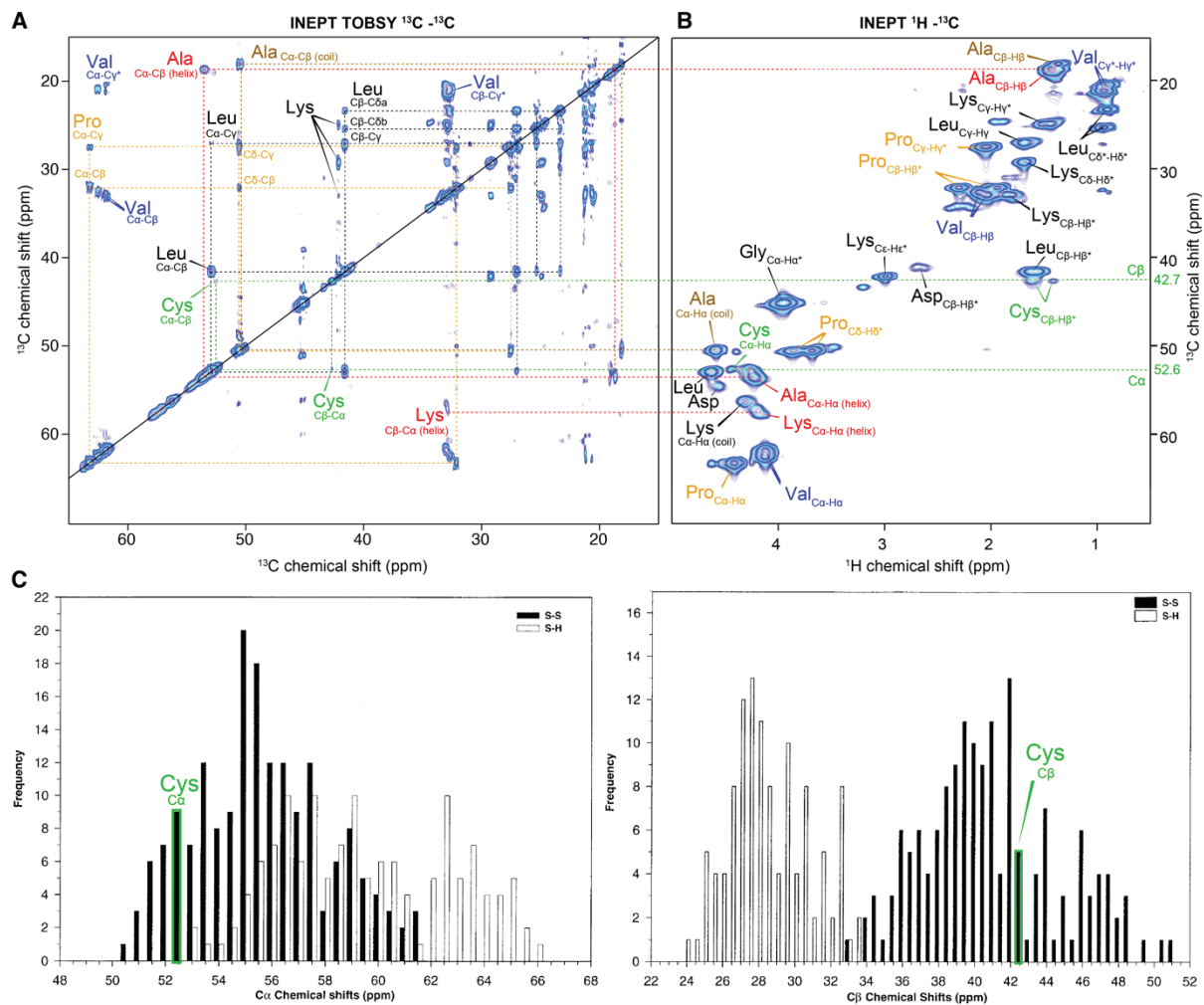


Fig. S1. C-terminal cysteine residues are in oxidized form

A) 2D ^{13}C - ^{13}C -INEPT TOBSY spectrum of SEP coacervates, used to correlate carbon chemical shifts of each residue. Dotted lines represent the connected carbon atoms. **B)** 2D ^1H - ^{13}C -INEPT spectrum of SEP coacervates (also shown in Figure 2C). Dotted lines show the connection with spectrum in A) for the Ala and Lys residues in helical conformation (in red), and for the Cys residues (in green). **C)** Highlight of the chemical shift of the SEP cysteine signal (in green) on the graph of the $\text{C}\alpha$ (left) and $\text{C}\beta$ (right) chemical shifts distribution of cysteines, as displayed in [33]. The $\text{C}\alpha$ and $\text{C}\beta$ chemical shifts of the cysteine signal in SEP correspond to the oxidized form, suggesting that they form a disulfide bond.

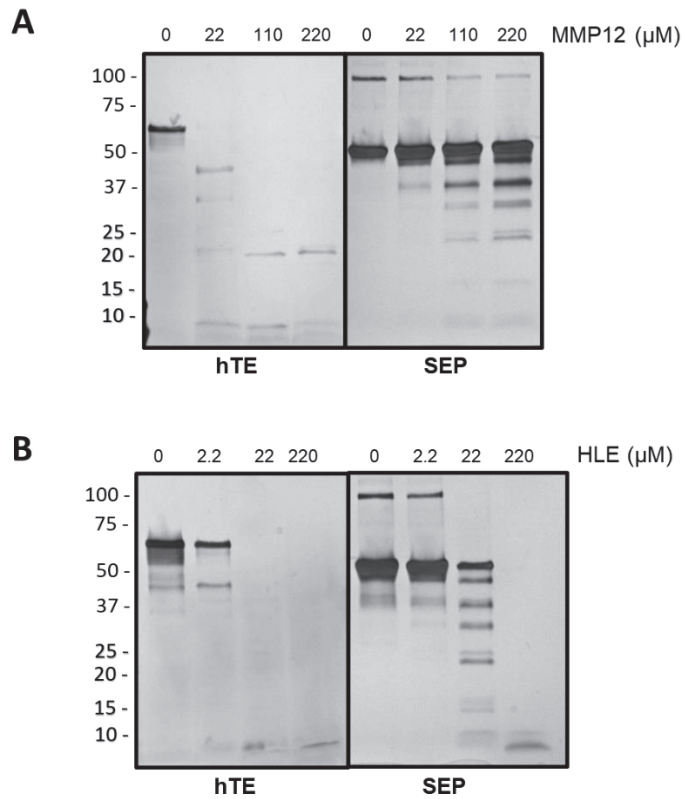


Fig. S2. SEP is less sensitive to proteolysis by MMP-12 and HLE than hTE.

1 μg of purified SEP or hTE were subjected to enzymatic proteolysis with increasing concentrations of MMP-12 **A**) or HLE **B**) as indicated. Samples were analyzed by silver-stained SDS-PAGE.

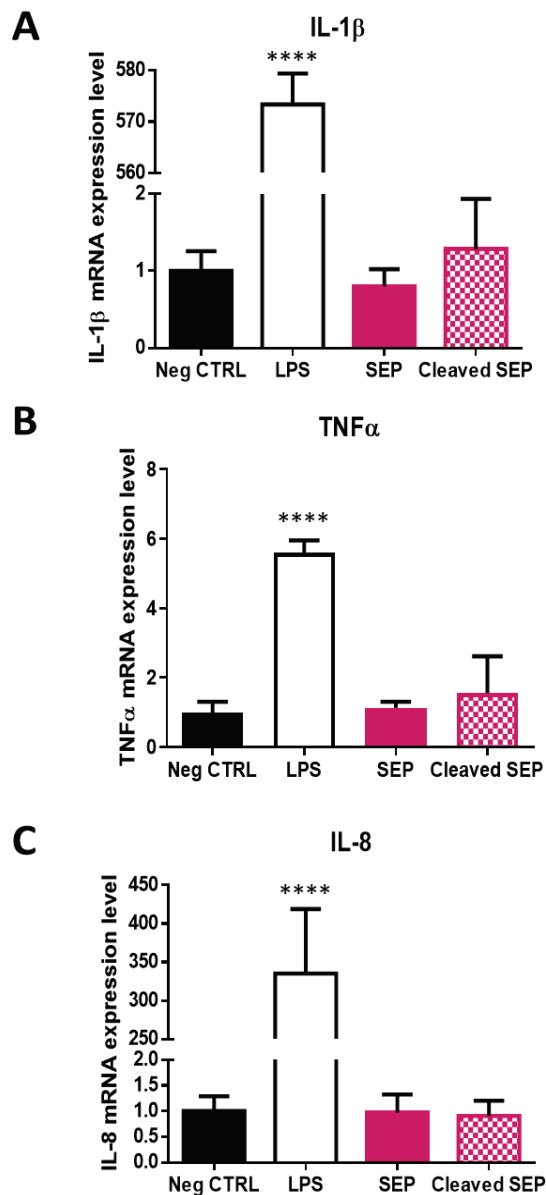


Fig. S3. SEP or its fragments do not induce pro-inflammatory cytokines expression in THP-1 cells.

THP-1 cells were treated or not (Neg CTRL) with 1 μ g of purified SEP (SEP) or 1 μ g of HLE-digested SEP (cleaved SEP) for 24 h prior total RNA extraction. 1 μ g of LPS was used as positive control. IL-1 β **A**), TNF α **B**) and IL-8 **C**) mRNA expression levels were assessed by real-time PCR. Statistical analysis by one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons *post hoc* test, **** $p < 0.0001$.

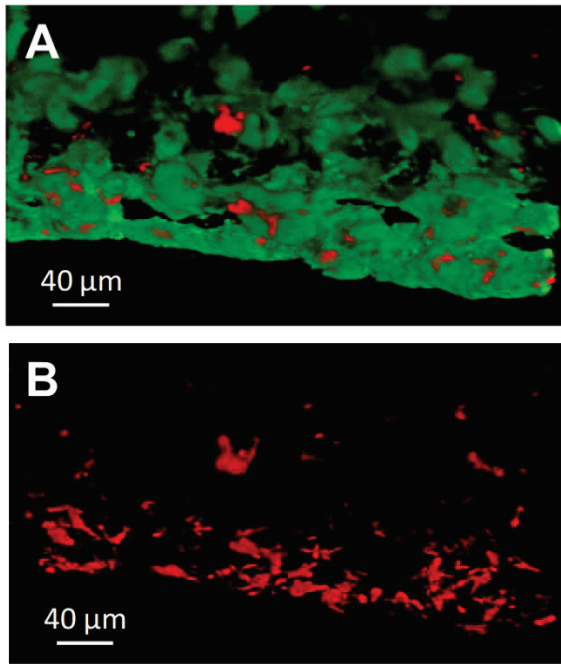


Fig. S4. SEP integrates blood vessel walls after injection in zebrafish embryos.

Zebrafish embryos *Tg(fli1a:eGFP)/Casper* were injected in the duct of Cuvier with 1 nL of 500 μg/mL SEP at 2 days post fertilization. Confocal imaging was performed 24 hpi on the caudal vein nexus. **A)** Vessels appear in green, and SEP was coupled with rhodamine (red) beforehand. **B)** Red channel showing SEP alone. Scale bar = 40 μm.

Table S1: NMR chemical shifts of residue types present in SEP sequence depending on their secondary structure (helix, coil or beta-strand). Values were taken from the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB, <https://bmrbl.io/>).

BMRB Chemical shifts (ppm)				
Residue		Ca	Cb	Ha
Ala	Helix	55.2 ± 2.8	19.7 ± 6.3	4.0 ± 0.3
	Coil	52.1 ± 1.9	19.3 ± 2.0	4.4 ± 0.4
	Strand	51.1 ± 2.1	22.9 ± 5.3	4.9 ± 0.5
Arg	Helix	59.3 ± 2.0	29.2 ± 4.0	4.0 ± 0.3
	Coil	55.9 ± 2.0	31.0 ± 1.9	4.5 ± 0.4
	Strand	54.8 ± 2.0	33.1 ± 4.5	4.8 ± 0.4
Asp	Helix	57.1 ± 2.2	39.4 ± 5.5	4.3 ± 0.3
	Coil	53.8 ± 2.0	41.2 ± 1.6	4.7 ± 0.4
	Strand	52.9 ± 2.1	41.8 ± 3.9	5.1 ± 0.4
Cys-ox (S-S)	Helix	58.9 ± 3.5	37 ± 6	4.2 ± 0.6
	Coil	55.3 ± 2.2	40.5 ± 4	4.85 ± 0.3
	Strand	54.7 ± 2.7	45.6 ± 7	5.2 ± 0.5
Cys-red (S-H)	Helix	62.3 ± 2.6	26.2 ± 2.0	4.3 ± 0.6
	Coil	58.2 ± 2.6	29.4 ± 2.1	5.0 ± 0.8
	Strand	56.4 ± 1.9	30.2 ± 2.7	5.1 ± 0.5
Gly	Helix	48.9 ± 4.9		3.8 ± 0.3
	Coil	45.2 ± 1.5		4.1 ± 2.3
	Strand	46.0 ± 0.6		4.2 ± 0.6
Leu	Helix	57.7 ± 2.1	41 ± 5	4.0 ± 0.3
	Coil	54.5 ± 2.0	42.5 ± 2.4	4.5 ± 0.4
	Strand	53.8 ± 1.9	43.4 ± 4	4.9 ± 0.4
Lys	Helix	58.9 ± 2.0	32 ± 5	4.0 ± 0.3
	Coil	56.2 ± 1.8	32.8 ± 1.7	4.4 ± 0.4
	Strand	54.8 ± 1.6	35.1 ± 3.6	4.9 ± 0.5
Pro	Helix	/	/	/
	Coil	62.6 ± 1.3	31.9 ± 1.1	4.75 ± 0.4
	Strand	/	/	/
Val	Helix	65.0 ± 3.5	31.8 ± 4.3	3.6 ± 0.4
	Coil	61.4 ± 2.2	32.8 ± 2.0	4.3 ± 0.5
	Strand	60.0 ± 2.3	34.4 ± 4.1	4.7 ± 0.4

Table S2: NMR chemical shifts of assigned residue types of ^{13}C - ^{15}N SEP, and interpretation about their secondary structure as compared with BMRB values shown in Table S1. Only two residue types show two populations, one in helical and one in coil conformation, namely Ala and Lys residues. In addition, chemical shifts allow to assign the oxidation state of the detected cysteine residues, which are typical of the oxidized form.

	SEP chemical shifts (ppm)			Probable secondary structure
	Ca	Cb	Ha	
Ala 1	53.2	19.0	4.23	helical
Ala 2	50.5	18.2	4.60	coil
Arg	56.0	31.0	/	coil
Asp	54.6	41.3	4.57	coil
Cys	52.6	42.7	4.42	ox - coil
Gly	45.3	/	3.95	coil
Leu	52.8	41.9	4.64	coil
Lys 1	57.7	32.9	4.15	helical
Lys 2	56.2	33	4.33	coil
Pro	63.3	32.0	4.41	coil
Val 1	62.3	32.8	4.14	coil
Val 2	61.8	33.0	4.15	coil

Conclusions et points importants

- La SEP est un ELR composé d'une alternance de domaines hydrophobes et de réticulation, comprenant également le domaine 36 de la tropoélastine humaine (hTE) et un tag FLAG pour permettre son suivi ;
- Son poids moléculaire apparent est de 55 kDa ;
- Sa structure est majoritairement désordonnée et la présence du pont disulfure a été vérifiée ;
- La SEP est capable de coacerver dans des conditions physiologiques, sa température de transition est évaluée à 30 °C ;
- Le SEP (sous forme réticulée) a un comportement élastique linéaire ;
- La SEP n'est pas toxique *in vitro* et ne modifie pas le comportement de prolifération des cellules vasculaires (dose maximale testée 100 µg/mL) ;
- La SEP est capable de traverser l'endothélium et d'être prise en charge par les CML dans un modèle de coculture *in vitro* récapitulant la perméabilité d'un endothélium sain ;
- Les dépôts de SEP en agrégats puis en fibres sont colocalisés avec les fibres riches en fibrilline et sont dépendants de l'activité des LOX ;
- Des tests sur embryons et larves de poissons-zèbres attestent du fait que la SEP n'est ni toxique ni immunogène *in vivo* ;
- Contrairement au dextran de poids moléculaire proche (70 kDa), la SEP est retrouvée dans les vaisseaux sanguins jusqu'à 96h après injection intravasculaire, suggérant une intégration durable dans la paroi du vaisseau.

Discussion et Perspectives

Le poisson-zèbre pour l'étude des élastinopathies

Les avantages du modèle poisson-zèbre

Il est devenu évident depuis plusieurs années que le poisson-zèbre est un modèle biologique très intéressant qui possède de nombreuses qualités complémentaires à ce que peuvent apporter les modèles rongeurs ou cellulaires. Bien que le poisson-zèbre soit plus éloigné phylogénétiquement de l'homme que la souris ou le rat, il reste un Vertébré, ce qui lui permet de conserver de nombreuses voies et fonctionnements physiologiques dont l'étude est tout à fait pertinente pour une transposition à l'humain (González-Rosa, 2022).

Le passage de l'*in vitro* à l'*in vivo* n'est pas toujours fructueux et de nombreux résultats obtenus sur cultures cellulaires ne peuvent être reproduits sur organismes vivants. Même si les modèles *in vitro* évoluent et deviennent de plus en plus complexes, avec par exemple le développement des organoïdes ou les systèmes microphysiologiques ou « *organ-on-a-chip* », le recours à l'expérimentation animale reste pour l'instant nécessaire dans certains domaines de recherche (Leung et al., 2022; Mattes, 2020).

Le poisson-zèbre est particulièrement intéressant : il offre un modèle intermédiaire plus facilement utilisable en grand nombre que le modèle murin, mais reflète également un fonctionnement plus complexe et complet que les modèles *in vitro* ou invertébrés (Figure 19).

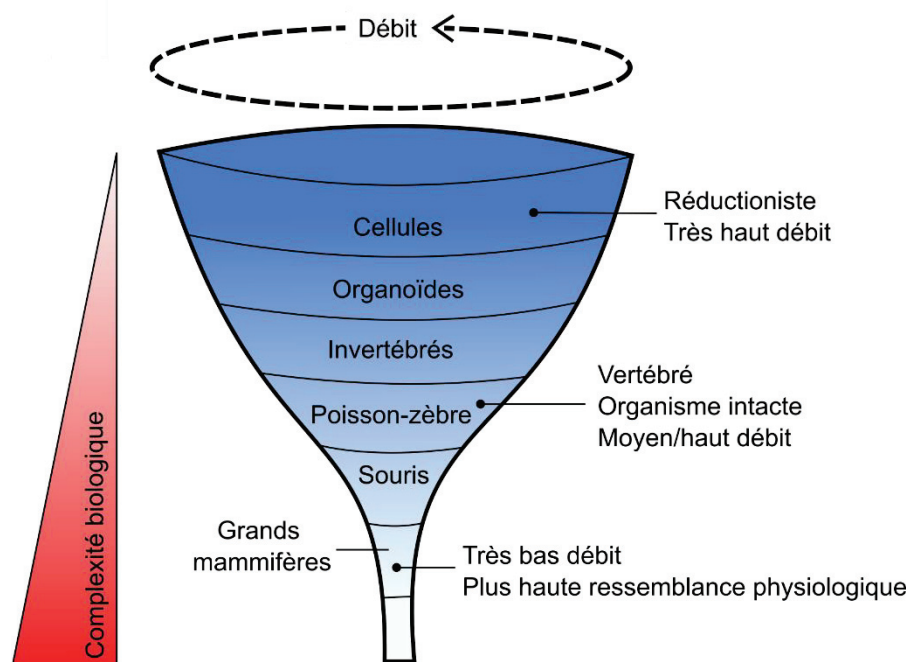


Figure 19. Le modèle du poisson-zèbre : un compromis entre complexité et potentiel haut débit. Inspiré de González-Rosa, 2022.

Une différence doit cependant être faite entre l'utilisation du poisson-zèbre dans ses premiers stades de développement (embryons/larves) ou à l'âge adulte. En effet, les embryons et larves de poisson-zèbre sont très bien adaptés aux expériences dites à « haut débit » (Gut et al., 2017), mais c'est moins le cas du poisson-zèbre adulte.

De plus, la législation actuelle ne considère pas l'utilisation des larves de moins de cinq jours post fertilisation (<5 dpf) comme entrant dans le cadre de l'expérimentation animale (*European Commission Directive 2010/63/EU*), ce qui en fait une alternative compatible avec les objectifs fixés par la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) établie en 1959 (Russell & Burch, 1959).

Ainsi, le modèle du poisson-zèbre <5 dpf est devenu incontournable pour les criblages de mutations (approches de génétique classique ou inverse) (Fitzgerald et al., 2015; Sassen & Köster, 2015) ou de molécules dont la toxicité ou le potentiel thérapeutique veut être évalué rapidement (Bauer et al., 2021; Glaberman et al., 2017; Hao et al., 2010; Zon & Peterson, 2005). Ce modèle s'est d'ailleurs avéré particulièrement propice à mettre en évidence des agents cardiotoxiques ou affectant le développement vasculaire (Asnani & Peterson, 2014; Tal et al., 2017; Zhu et al., 2014).

Aussi, les outils de prédiction *in silico* sont de plus en plus fréquemment intégrés dans les stratégies de recherche et permettent de générer un volume de données considérable. Le poisson-zèbre, dans ses premiers stades de développement, est un candidat idéal pour réaliser les validations biologiques de ces études (Gut et al., 2017), conciliant besoins de complexité et d'efficacité.

Les nombreux avantages des larves de poisson-zèbre les ont rendues très intéressantes dans le domaine cardiovasculaire et le poisson-zèbre a grandement contribué à la compréhension de processus développementaux comme la vasculogenèse ou l'angiogenèse, ainsi que de la pathogenèse de nombreuses maladies cardiovasculaires (Bowley et al., 2022; Gore et al., 2012; Hogan & Schulte-Merker, 2017; Schuermann et al., 2014; Wilkinson & van Eeden, 2014). L'accès direct à l'embryon et la possibilité d'imager *in vivo* et de manière non-invasive toutes les étapes du développement sur des larves qui restent transparentes sont des avantages indéniables, auxquels peut être ajoutée l'existence de lignées transgéniques fluorescentes ou mutantes très intéressantes (González-Rosa, 2022; Gut et al., 2017; Jung et al., 2016; Lawson & Weinstein, 2002).

Le poisson-zèbre adulte en revanche est bien moins adapté aux protocoles « haut débit » et paraît donc moins avantageux. Les tests de toxicité commencent cependant à être réalisés sur poissons adultes (Tal et al., 2020), ce qui est par exemple nécessaire pour les études de toxicité à long terme (Pecoraro et al., 2017). Des modèles utilisant le poisson-zèbre adulte ont également été développés pour tester les effets de molécules sur des cancers, ou sur des maladies liées au vieillissement (Cayuela et al., 2019; Demin et al., 2017; H.-S. Lin et al., 2019; Tal et al., 2020)

Néanmoins, l'étude d'un grand nombre d'individus reste plus facilement réalisable chez le poisson-zèbre adulte que chez la souris, et également moins coûteuse. De plus, de nombreux aspects physiologiques sont très bien conservés et offrent donc une représentation pertinente du fonctionnement humain, parfois de manière plus satisfaisante que la souris (Fang et al., 2014; Tang et al., 2021). Il faut cependant nuancer les perspectives du modèle, car il ne s'agit aucunement de remplacer entièrement le modèle murin, mais plutôt d'offrir un modèle complémentaire lorsque celui-ci n'est pas nécessaire, ou qu'il se trouve peu adapté.

Étude de l'élastine cardiovasculaire

Nous avons montré au cours de ce travail que le poisson-zèbre était un modèle intéressant pour mieux comprendre le rôle de l'élastine dans la fonction cardiovasculaire. Il est de plus déjà utilisé pour l'étude de certaines pathologies associées aux fibres élastiques. En effet, de nombreux mutants ont été décrits pour modéliser des pathologies affectant des composants des fibres élastiques tels que les fibrillines, les fibulines, les LTBP et même des pathologies où le métabolisme d'ions comme le cuivre ou le calcium est impliqué. Il en ressort donc que les composants majeurs des fibres élastiques sont bien présents chez le poisson-zèbre et qu'ils ont un rôle similaire à ce qui est décrit chez l'humain.

Le poisson-zèbre possède deux élastines : l'élastine a et l'élastine b. Leur organisation en domaines et leur séquence protéique sont assez semblables à celles de la tropoélastine humaine, surtout en ce qui concerne l'élastine a, qui est bien plus proche de la hTE que ne l'est l'élastine b. La comparaison des domaines de différentes espèces tend cependant à montrer que c'est l'organisation et les caractéristiques globales des domaines qui importent principalement pour le fonctionnement de la tropoélastine, et non sa séquence précise (M. I. S. Chung et al., 2006).

Quelques particularités ont cependant pu être mises en évidence. Les deux élastines du poisson-zèbre ont un poids moléculaire bien plus élevé que celles de la souris ou de l'humain, et donc un nombre de répétitions de domaines plus importants. Il est probable que leur capacité de coacervation en soit affectée, avec probablement une diminution de leur température de transition (Miao et al., 2003). Une température de transition plus basse serait cohérente avec le mode de vie des poissons-zèbres, qui sont poïkilothermes, à la différence des mammifères qui sont endothermes et homéothermes. Contrairement aux humains, dont la température est maintenue proche de 37°C avec des variations minimales, les poissons-zèbres vivent à des températures plus basses et sont soumis à de plus fortes variations (fixée à 28°C en animalerie ; entre 12 et 39°C à l'état naturel ; plus communément entre 24.6 et 38.6°C) (Engeszer et al., 2007; Lee et al., 2022). Ces différences reflètent donc sûrement des adaptations liées au mode de vie des espèces.

Une autre particularité importante concerne les domaines de réticulation. En effet, les motifs majoritaires de réticulation des élastines du poisson-zèbre ne favorisent pas la formation des desmosines et isodesmosines, qui sont très présentes dans l'élastine mature des mammifères (M. I. S. Chung et al., 2006). La réticulation de l'élastine mature pourrait donc être différente chez le poisson-zèbre.

L'organisation de l'élastine au niveau du BA d'autres poissons téléostéens (*Thunnus albacares*) a d'ailleurs été décrite et ne correspond pas aux lamelles élastiques caractéristiques de la paroi vasculaire, mais plutôt à des fibrilles d'élastine (Braun et al., 2003). Cette différence d'organisation de la composante élastique impacte vraisemblablement les propriétés mécaniques du BA. Aussi, le BA de certains poissons a été décrit comme étant 30 fois plus compliant que les aortes mammifères (Braun et al., 2003). Le BA est principalement composé d'Elnb, qui est la plus éloignée de la hTE. La présence de deux élastines a sûrement permis à l'Elnb d'accumuler de nombreuses modifications, qui ont par la suite permis l'émergence du BA, dont le but principal est de protéger les branchies (Moriyama et al., 2016). En effet, le BA a une fonction d'« organe de Windkessel », comparable aux artères élastiques des mammifères (Grimes et al., 2006; Grimes & Kirby, 2009; Poon & Brand, 2013). Cependant, chez le poisson, les branchies sont très proches du cœur. Ainsi, les particularités d'organisation et de compliance du BA pourraient s'expliquer par la nécessité de lisser le flux pulsatile du cœur sur un court tronçon, formé uniquement par le BA et l'aorte ventrale (Burton & Burton, 2017; Farrell & Pieperhoff, 2011).

Les pressions calculées dans le système cardiovasculaire du poisson sont sans surprise bien plus basses que celles de l'humain. Un maximum de 2.51 mmHg est observé chez le poisson-zèbre au moment de la systole dans le ventricule (N. Hu et al., 2001), contre 120 mmHg chez l'humain. Le nombre de lamelles élastiques dans la paroi vasculaire est considéré comme étant proportionnel à la pression à laquelle le vaisseau est soumis, ainsi qu'à son diamètre (Wolinsky & Glagov, 1967). Le nombre de lamelles élastiques décroît donc avec l'éloignement du cœur et la baisse de la pression sanguine (Cocciolone et al., 2018). Le BA des poissons ne semble pas organisé en lamelles, mais nous avons montré que l'aorte ventrale et l'aorte dorsal l'étaient, avec respectivement 8-10 lamelles à la sortie du BA et plus qu'une ou deux au niveau de l'aorte dorsale. Même si la tension subie par les unités lamellaires du poisson-zèbre est sûrement différente de celle des mammifères, le principe

d'organisation des lamelles reste donc similaire, avec une diminution de leur nombre associée à l'éloignement du cœur.

Le modèle *elna*^{sa12235} pour l'étude des élastinopathies

Nous avons par la suite entrepris de caractériser une lignée de poisson-zèbre mutant pour l'élastine. Une des raisons derrière ce projet était d'obtenir un modèle pathologique pour tester les effets d'un traitement avec la SEP. Nous avons choisi une mutation de l'Elna, pour favoriser l'apparition de complications au niveau des vaisseaux sanguins, où l'organisation en lamelles élastiques est conservée, sans forcément affecter le BA.

La mutation *elna*^{sa12235} produit une forme tronquée de l'Elna, remplaçant la tyrosine 88 par un codon stop précoce. Cette protéine est certainement non-fonctionnelle, ce qui devrait engendrer une situation où seule la moitié de l'Elna est produite dans le cas hétérozygote (*elna*^{+/-}) et pas du tout chez l'homozygote mutant (*elna*^{-/-}). De plus, ce mutant avait déjà été partiellement étudié dans un travail de thèse (Zorrilla, 2018), et quelques observations intéressantes avaient été rapportées.

Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence que les poissons-zèbres mutants *elna*^{+/-} et *elna*^{-/-} ont une espérance de vie diminuée. Ils ont également tendance à souffrir d'hydropisie, une condition qui se traduit par un gonflement du poisson entier, comparable à des œdèmes systémiques et au soulèvement de ses écailles, menant rapidement à la mort du poisson. Ces différents symptômes seraient attribuables, au moins en partie, à des défauts structuraux au niveau des valves cardiaques. En effet, des valves désorganisées et dont l'aspect semble différent ont été observées chez les mutants.

De manière intéressante, les valvulopathies sont aussi un symptôme retrouvé dans les déficiences en élastine chez l'humain (20-45% des patients) et la souris (Duque Lasio & Kozel, 2018; Hinton et al., 2010). L'étude des valves chez le modèle souris *Eln*^{+/-} a permis de mettre en évidence que l'haploinsuffisance en élastine entraîne des anomalies structurales des valves cardiaques et un remodelage de la MEC, qui sont présents avant le développement de la pathologie (Krishnamurthy et al., 2012). C'est probablement ce qui se passe également dans le modèle *elna*^{sa12235}.

Les valves des poissons sont globalement similaires à celles des mammifères dans leur organisation (Martin & Bartman, 2009; O'Donnell & Yutzey, 2020). L'élastine est principalement présente du côté de la chambre donneuse et participe à la fermeture complète de la valve. Pendant le passage du sang, les valvules sont soumises à une forte pression qui favorise l'étirement du tissu (Tsfamariam et al., 2019). L'élastine permettrait de maintenir une conformation spécifique des fibres de collagène pour qu'elles puissent retrouver leur état de départ une fois les forces externes supprimées, c'est-à-dire quand la pression diminue (Vesely, 1998). Il a d'ailleurs été montré que les propriétés mécaniques de valves aortiques porcines changent lorsque leur contenu en élastine est dégradé (Tsfamariam et al., 2019). Le manque d'élastine chez le mutant *elna*^{sa12235} empêche donc sûrement le fonctionnement correcte de la valve, ce qui peut conduire à des régurgitations, engendrant une fatigue du muscle cardiaque, une cardiomégalie et à terme une hydropisie.

Les événements et voies de signalisation impliqués dans la formation des valves cardiaques semblent bien conservés entre mammifères et poissons-zèbres (Chang et al., 2004; Icardo & Colvee, 2011; Rutenberg et al., 2006; Scherz et al., 2008). Les valves du poisson-zèbre sont visibles à partir de 5 dpf mais ne sont pas matures (N. Hu et al., 2000). Elles subissent ensuite un processus d'élongation, puis la sécrétion de protéines de la matrice, telles que le collagène et l'élastine, contribue à mettre en place la structure de la valve mature (Martin & Bartman, 2009). Il n'est donc pas étonnant que les premiers stades de développement (< 5 dpf) ne soient pas encore affectés par le manque d'élastine, et qu'aucun problème n'ait été observé sur cette période. De plus, le pic d'expression des élastines du

poisson-zèbre se situe entre 6 et 8 dpf, et leurs ARNm ne sont que très faiblement présents avant cela (Miao et al., 2007). Il est donc cohérent que les problèmes liés à un manque d'élastine n'apparaissent que plus tardivement.

Il faut cependant noter que le poisson-zèbre est capable de régénération sur nombre de ses organes (Marques et al., 2019), les valves cardiaques en faisant partie (Bensimon-Brito et al., 2020). Ce processus de régénération pourrait donc influencer la pathogenèse des valvulopathies par des voies qui ne représentent pas ce qui se produit chez l'homme. De plus, la voie TGF- β semble impliquée dans la dégénérescence des valves chez l'humain (Aupperle & Disatian, 2012), et le signal TGF- β a aussi été décrit comme étant diminué dans les valves cardiaques des souris *Eln*^{+/-} (Hinton et al., 2010). Ce facteur de croissance est également au cœur du processus de régénération des valves du poisson-zèbre (Bensimon-Brito et al., 2020). Il n'est donc pas impossible que les deux processus interviennent en parallèle chez le poisson zèbre.

Les effets de la mutation *elna*^{sa12235} que nous avons décrits sont très variables d'un individu à l'autre, et de nombreux poissons mutants ne développent aucune complication. Les différences que nous avons pu mettre en évidence au niveau histologique sur les valves cardiaques sont également très hétérogènes. Cependant, de manière cohérente avec nos résultats, les souris *Eln*^{+/-} développent également des valvulopathies à une fréquence très faible chez les souris jeunes (17%), alors que les souris âgées sont bien plus souvent atteintes (70%) (Hinton et al., 2010).

De plus, le changement d'aspect des valves est difficilement quantifiable. En effet, la comparaison des coupes entre elles est parfois compliquée, par exemple en ce qui concerne l'épaisseur des valvules, puisque celle-ci dépend grandement de l'endroit où la coupe a été faite. Des études complémentaires au niveau de la fonction des valves seraient nécessaires pour analyser par exemple s'il y a une régurgitation chez les mutants, ce qui pourra être fait par analyse de vidéo de microscopie chez la larve, ou par échocardiographie chez le poisson adulte.

Le modèle du poisson-zèbre permet également de mesurer de nombreux autres paramètres renseignant sur la fonction cardiaque (fréquence cardiaque, vitesse de déplacement des cellules sanguines). Il est même possible de visualiser précisément le battement cardiaque pour en extraire des données, comme par exemple la taille des chambres à différentes étapes du cycle cardiaque (Hoage et al., 2012; Lenning et al., 2018; Matrone et al., 2014; Santoso et al., 2020; Vargas & Vásquez, 2016). Il serait donc intéressant de mieux caractériser ces paramètres sur le mutant *elna*^{sa12235} pour voir à quel point la fonction cardiaque est atteinte.

D'autres techniques ont également été envisagées pour mettre en évidence un changement de perméabilité vasculaire qui pourrait entraîner les œdèmes généralisés qui sont présents lors des stades avancés d'hydropisie, et peut-être même avant dans une moindre mesure. S'il y a effectivement des fuites de liquide vers les tissus, cela pourrait être dû à une composition de la paroi vasculaire différente et donc à un autre effet du manque d'élastine. Des techniques de microangiographie sont bien décrites chez le poisson-zèbre et pourraient facilement être testées (Jung et al., 2016).

Il est par ailleurs étonnant que la mutation hétérozygote d'*elna* ait un effet aussi important sur le poisson, puisque celui-ci possède deux élastines. Des expériences de RT-qPCR ont été réalisées pour vérifier que l'expression d'*elnb* n'était pas augmentée chez les mutants, pour compenser le manque d'*elna*. Les ARNm de larves à 7 dpf ont donc été quantifiés. Aucune surexpression d'*elnb* n'a pu être mise en évidence, cependant les résultats étaient très variables entre les répétitions (résultats non montrés). L'expression des ARNm des deux élastines sur cette période peut varier énormément selon le stade exact auquel se trouve la larve (Miao et al., 2007). Comme les ARNm de plusieurs larves devaient être regroupés ensemble pour avoir assez de matériel pour une mesure, il est possible que

les différences entre individus formant le même échantillon entraînent une perte d'information individuelle.

Il serait plus intéressant de regarder le niveau d'expression des deux protéines en ayant une information spatiale sur celle-ci, soit toujours au niveau de l'ARNm par hybridation *in situ*, soit par marquage des protéines avec des anticorps spécifiques, comme décrit par Miao et al. (2007). Cela permettrait de voir quelles sont les structures les plus affectées par le manque d'*elna*, et quelles sont celles où l'*elnb* permet de compenser cette absence. On peut imaginer que l'Elna est absolument nécessaire au niveau des valves. Il est également possible que même en présence d'un phénomène de compensation, la différence entre Elna et Elnb soit suffisante pour entraîner des changements fonctionnels.

Enfin, l'étude d'un mutant pour l'élastine b serait également très intéressante. Il serait même envisageable par la suite de faire une combinaison des deux mutations (*elna* et *elnb* ; l'un à l'état homozygote et l'autre hétérozygote par exemple). Ces combinaisons pourraient de plus engendrer un phénotype plus flagrant, ce qui permettrait d'obtenir une population moins hétérogène quant au développement des complications et donc des résultats plus facilement interprétable dans le cadre d'expérience de sauvetage du phénotype ou d'efficacité de traitement.

Adaptabilité du modèle pour évaluer la SEP

Poissons sains

Les premiers tests de la SEP réalisés sur poissons-zèbres non mutés ont permis de valider le fait que la protéine n'était pas toxique *in vivo* et qu'elle n'engendrait pas de réaction immunitaire après injection.

Les tests de toxicité sur embryons de poisson-zèbre sont très bien décrits dans la littérature (Cassar et al., 2020; Patton et al., 2021) et des protocoles types ont même été mis en place pour assurer une reproductibilité fiable d'une expérience à l'autre (OECD Guidelines – Test n° 236, 2013).

En ce qui concerne les tests d'inflammation, le système immunitaire du poisson-zèbre partage de nombreuses similitudes avec celui des humains (Trede et al., 2004). Le système inné est rapidement fonctionnel, avec des macrophages primitifs capables de phagocytose dès 1 dpf (26 hpf) (Herbomel et al., 1999; Hermann et al., 2004), et des neutrophiles actifs dès 2 dpf, produisant des myéloperoxydases (Bennett et al., 2001; Lieschke et al., 2001). Le processus de réponse à l'inflammation est également très conservé entre poisson-zèbre et mammifères (Henry et al., 2013; Shelef et al., 2013).

Plusieurs voies d'administration peuvent être utilisées pour réaliser un test d'inflammation chez la larve de poisson-zèbre (Xie et al., 2020). Nous avons choisi de réaliser une injection dans le sac vitellin pour pouvoir clairement observer le recrutement des cellules immunitaires, qui ne sont normalement pas présentes à cet endroit. L'injection dans les vésicules otiques, qui fournissent le même avantage que le sac vitellin, a également été testée, mais n'a pas été retenue.

L'utilisation de lignées transgéniques telles que Tg(*mpx:eGFP*) (neutrophiles fluorescents) ou Tg(*mpeg:eGFP*) (macrophages fluorescents) sur un fond génétique Casper (poisson non pigmenté), permet de suivre facilement le recrutement des cellules immunitaires après injections de la larve.

Nous avons montré que les neutrophiles n'étaient pas recrutés au site d'injection lorsque la SEP était injectée. Des injections de SEP ont également été réalisées sur des poissons-zèbres Tg(*mpeg:eGFP*)/Casper. Leur signal étant moins fort que celui de la lignée Tg(*mpx:eGFP*), nous avons

focalisé notre analyse sur les neutrophiles, mais aucun recrutement flagrant n'a été remarqué au niveau des macrophages.

Il est probable que les larves de poisson-zèbre soient moins sensibles à certains composés que les mammifères, c'est par exemple le cas pour les lipopolysaccharides (LPS), endotoxines des bactéries Gram négatives. Bien que plusieurs études montrent une réponse inflammatoire importante après injection de LPS dans le sac vitellin (Copeland et al., 2005; Forn-Cuní et al., 2017; Yang et al., 2014), nous ne sommes pas parvenus à reproduire ce résultat après de nombreuses tentatives, plusieurs lots de LPS testés et des concentrations bien plus importantes que celles décrites dans la littérature. La réponse au LPS est médiée par le récepteur Toll-like 4 (TLR-4) chez les mammifères (Akira & Takeda, 2004; J. C. Chow et al., 1999), or il a été montré que le paralogue du TLR-4 du poisson-zèbre ne reconnaissait pas le LPS (Iliev et al., 2005; Sepulcre et al., 2009). D'autres mécanismes entrent peut-être en jeu pour expliquer la réponse de certaines larves au LPS dans les études citées plus haut, mais nous nous sommes tournés vers un autre contrôle positif d'inflammation pour poursuivre nos tests, à savoir l'injection de bactéries *E. coli* entières.

Des injections d'EDP sous forme de κ -élastine (élastine dégradée et solubilisée) ont également été réalisées sans montrer de réponse inflammatoire particulière. Les EDP sont souvent associés à un effet pro-inflammatoire, promouvant le recrutement de leucocytes (Antonicelli et al., 2007; Heinz, 2020), mais une injection ponctuelle et non-accompagnée d'événements de destruction des fibres élastiques (activité protéolytique élevée) ou de contexte inflammatoire préétabli réduit probablement leur impact sur l'organisme.

Des injections de SEP chez la souris, réalisées dans le cadre du projet Arterylastic, n'ont pas montré non plus de signe particulier d'inflammation (Boëté et al., 2022), renforçant notre conclusion que la SEP n'est pas immunogène.

Concernant la rétention vasculaire, les premiers tests sont encourageants puisque la SEP reste dans les vaisseaux plusieurs jours après son injection, ce qui n'est pas le cas du dextran de poids moléculaire comparable, qui disparaît de la circulation après quelques jours. La SEP s'accumule majoritairement dans la veine caudale et dans les petits vaisseaux présents dans cette région. Ces vaisseaux sont particulièrement tortueux et la circulation y est plus lente que dans l'aorte dorsale par exemple (Gomez-Garcia et al., 2018), ce qui pourrait contribuer à l'intégration de la SEP à ce niveau en lui offrant une interaction prolongée avec les cellules endothéliales.

Le suivi du poisson injecté par microscopie à feuillet de lumière est intéressant à ce niveau, puisqu'il permet d'imager tout le poisson en une fois, en 3D et de voir précisément où la protéine s'accumule. De premiers essais ont été réalisés sur le poisson-zèbre au stade larvaire, 24 heures après injection (Figure 20). Un suivi plus complet sur plusieurs jours pourra donc être effectué par la suite. La technique pourra également être adaptée au poisson adulte, permettant ainsi de voir si la protéine s'accumule dans certains organes après injection intravasculaire, et surtout si elle se retrouve également dans les vaisseaux adultes.

La visualisation des vaisseaux de poisson-zèbre au stade adulte est moins avantageuse que chez la larve, même si des techniques tendent à se développer pour la faciliter (Fei et al., 2016; Scott et al., 2021). Elle nécessite de traiter le poisson fixé, alors que l'imagerie sur larve peut se faire *in vivo*, sur poisson anesthésié.

Des premiers essais ont été réalisés au laboratoire pour mettre en place un protocole qui nous permettra de visualiser le système vasculaire de poisson-zèbre adulte sur organisme complet par microscopie à feuillet de lumière. Des poissons-zèbres *Tg(fli1a:eGFP)/Casper* de 6 mpf ont ainsi été

transparisés avec ou sans marquage supplémentaire par anticorps anti-GFP (kit de transparence Miltenyi Biotec MACS Clearing kit, avec des temps adaptés pour convenir au poisson-zèbre) et imagés avec le microscope à feuillet de lumière UltraMicroscope Blaze™ de Miltenyi Biotec (voir Figure 21).

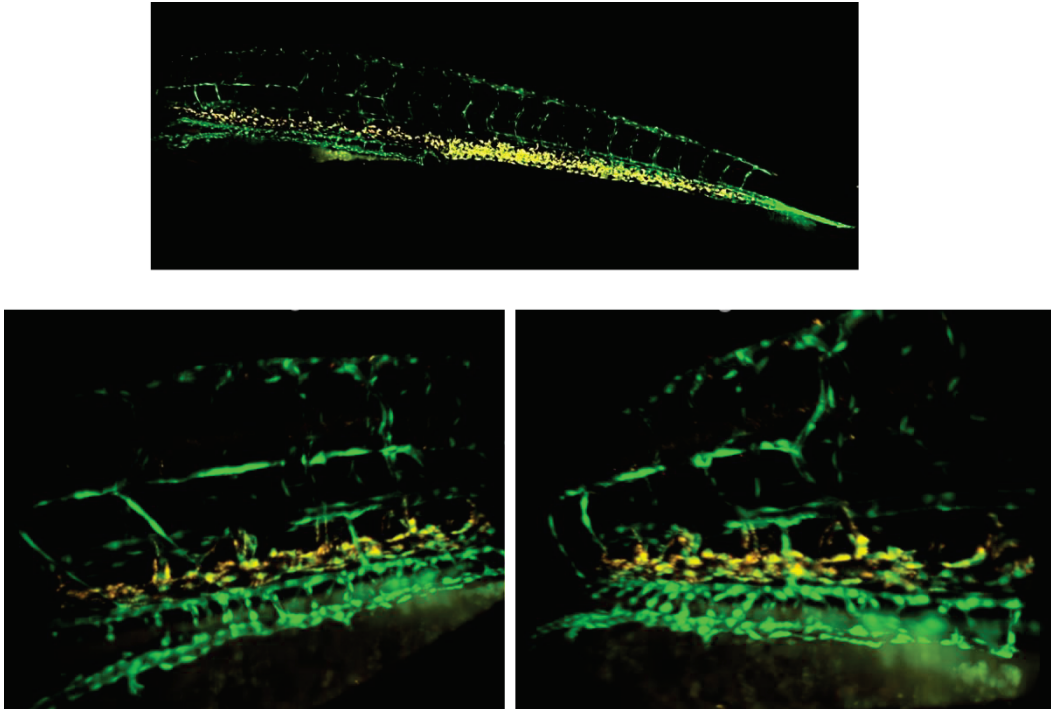


Figure 20. Suivi de la SEP après injection intravasculaire chez la larve de poisson-zèbre. Poisson à 3 dpf, $Tg(fli1a:eGFP)/Casper$ dont les vaisseaux apparaissent en vert ; SEP couplée à une rhodamine (rouge). Les deux images du bas sont un zoom de la partie comprenant la fin de l'extension du sac vitellin.

Les premiers résultats sont déjà encourageants, avec une transparence très efficace. Cependant, le marquage des vaisseaux devra être optimisée puisque la fluorescence détectée semblait équivalente avec ou sans anticorps. De plus, la préparation de l'échantillon a tendance à éteindre de

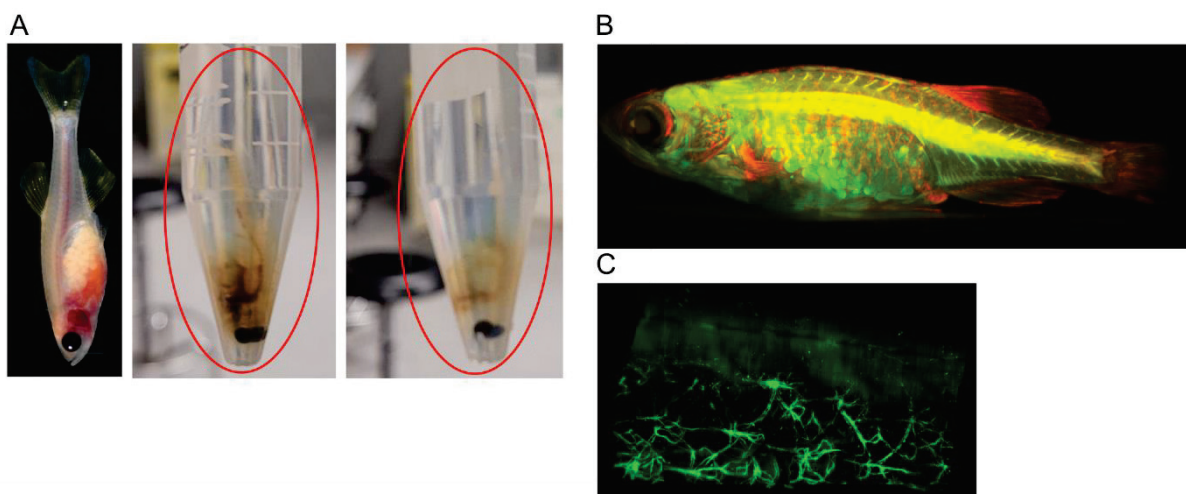


Figure 21. Essai de transparence de poisson-zèbre adulte et imagerie des vaisseaux sanguins par microscopie à feuillet de lumière. (A) Poisson-zèbre adulte $Tg(fli1a:eGFP)/Casper$ avant (gauche) et après transparence (droite) ; (B) imagerie du poisson entier en microscopie à feuillet de lumière ; (C) visualisation des vaisseaux en périphérie marqués en vert.

manière importante la fluorescence intrinsèque. Il faudra donc également optimiser la détection de la SEP une fois injectée, ce qui sera sûrement plus compliqué que pour le marquage des vaisseaux, du fait de la faible quantité de protéine qui sera présente. L'utilisation de fluorophores plus résistants à ce traitement pourrait également être envisagée.

Pour aller plus loin, il faudra probablement passer sur un modèle murin, qui permettra de valider ou non l'intégration de la SEP dans les lamelles élastiques aortiques, sur coupes histologiques. Des premiers tests ont déjà été réalisés au sein du projet Arterylastic, mais la présence de SEP n'a pas pu être mise en évidence dans les vaisseaux des souris, après une injection unique de SEP (Boëté et al., 2022). L'optimisation du protocole d'injection ainsi que de la méthode de marquage est en cours, et permettra à terme de répondre à cette question.

Poissons mutants

L'idée sous-jacente qui a mené à la caractérisation d'un mutant *elna* était d'obtenir un modèle pathologique pour pouvoir ensuite tester la SEP *in vivo* et voir si elle parvenait à corriger voire à abolir le phénotype pathologique.

Par analogie au modèle murin déficient en élastine, nous nous attendions à observer des différences au niveau de la structure des vaisseaux et notamment au niveau de l'aorte ventrale subissant la contrainte physique la plus forte. L'atteinte vasculaire n'a pas fait l'objet de recherches approfondies dans notre étude. Cependant, nous avons noté parmi les complications des ulcères chez certains poissons, ce qui peut être un signe d'une insuffisance veineuse (Eberhardt & Raffetto, 2014). La caractérisation de l'atteinte vasculaire sera donc plus amplement étudiée par la suite.

Bien que les complications mises en évidence ne soient pas celles qui étaient attendues, il serait tout de même intéressant de tester les effets de la SEP sur les poissons mutants. Il faudrait cependant réfléchir aux paramètres d'injection les plus pertinents (injection de la protéine à un stade précoce en prévention des altérations ou injection chez l'adulte pour réparer les défauts existants). Les signes pathologiques associés à la mutation n'apparaissent en effet que tardivement et aucune complication liée au manque d'élastine n'a été observée avant l'âge adulte, cependant les modifications qui mènent à ces troubles sont peut-être présentes bien plus tôt.

La synthèse des fibres élastiques, en tout cas chez les mammifères, a lieu principalement sur la période périnatale (Myers et al., 1983; Ozsvar et al., 2021). Il est probable que l'élastogenèse soit également précoce chez le poisson, ce qui serait d'ailleurs cohérent avec le profil d'expression des ARNm d'*elna* et *elnb* (Miao et al., 2007).

Un des avantages du poisson zèbre est qu'il est totalement accessible au moment du pic d'expression de l'élastine. Ce n'est pas le cas des modèles souris, ni mammifères en général. En effet, chez la souris, la période de gestation n'est pas encore terminée lorsque la synthèse des fibres élastiques commence (Kelleher et al., 2004; Wagenseil et al., 2010). Des expériences de « sauvetage phénotypique » sont donc compliquées à mettre en place, et nécessitent le sacrifice de la mère. A ce niveau, le poisson-zèbre offre une alternative très intéressante. Un traitement intervenant à ce moment critique pour la synthèse d'élastine pourrait donc être testé.

Les bénéfices de la SEP sur les valves cardiaques du poisson semblent cependant peu probables. L'intégration de la protéine dans les valves cardiaques paraît effectivement moins réalisable que dans la paroi vasculaire, et la SEP risque de ne pas être adaptée à cette application. Il est cependant envisageable de tester d'autres molécules à visée thérapeutique, pour en trouver qui améliorent le

phénotype, ou de tester des molécules dont les effets proélastogéniques ont déjà été rapportés (minoxidil, extraits d'aneth) (Coquand-Gandit et al., 2017; Fhayli et al., 2020). Les tests par immersion sont très faciles à mettre en place et de nombreuses molécules pourraient ainsi être testées, du moment qu'elles sont solubles. Dans le cas contraire, des tests par injection pourront être envisagés (Cassar et al., 2020; Guarin et al., 2021; Pensado-López et al., 2021).

Pour finir, nous avons croisé la lignée *elna*^{sa12235} avec la lignée transgénique Tg(*flia1:eGFP*)/Casper. Il serait intéressant de comparer si la SEP se dépose de la même façon dans les poissons adultes WT et dans les poissons mutés *elna*. La prise en charge de la SEP dans les vaisseaux pourrait mettre en évidence une composition altérée de la paroi vasculaire chez les mutants, sur le même principe que celui mentionné pour les tests de microangiographie, ou pourrait révéler des perturbations du flux sanguin, favorisant l'intégration de la SEP sur certains segments.

Evaluation des effets de la SEP *in vitro*

Toxicité et prolifération

Les expériences réalisées *in vitro* ont permis de déterminer que la SEP n'avait pas d'effet sur la survie ou sur la prolifération des cellules vasculaires humaines en culture (HUVEC et AoSMC ; dose maximale testée 100 µg/mL).

Un effet négatif de la SEP sur la prolifération cellulaire aurait cependant pu être attendu, bien que de nombreux effets contradictoires de la hTE et de ses peptides dérivés aient été rapportés. En effet, il est admis que la perte d'un allèle fonctionnel de l'élastine, et donc le manque d'élastine qui en découle, induit une hyperprolifération des CML dans la paroi vasculaire chez les souris (Li et al., 2013), ainsi que chez les patients humains (Urbán et al., 2002). L'élastine semble donc avoir un rôle de régulateur qui empêche l'hyperprolifération des CML. De plus, il a été montré que l'ajout de TE inhibait la prolifération des CML de souris en culture (Karnik et al., 2003). L'effet est cependant bien plus flagrant sur les cellules issues de souris *Eln*^{+/-} et n'est peut-être pas significatif au niveau des CML *Eln*^{+/+} (seule une ANOVA globale est réalisée). Il a par ailleurs été montré que l'ajout d'un peptide IGVAPG (comparable à un peptide dérivé de l'élastine) n'avait un effet inhibiteur que sur la prolifération des cellules provenant de patients WBS et non sur les cellules non mutées (Kinneer et al., 2013). Une autre étude a montré que les peptides de type VGVAPG augmentent la prolifération des CML en culture (Mochizuki et al., 2002). Pour finir, Urbán et al., (2002) ont quant à eux montré une diminution de la prolifération de CML « normales » lorsque de l'élastine était ajoutée dans le milieu de culture à une concentration de 1 mg/mL, ce qui est 10 fois plus élevé que les concentrations de SEP que nous avons testées.

Il est donc possible que des concentrations plus élevées de SEP finissent par impacter la prolifération cellulaire. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la SEP sur des CML issues de patients WBS, pour voir si elle a un effet similaire à la hTE.

Intégration dans les fibres élastiques

Nous avons également montré que la SEP est capable de former des fibres de manière dépendante de l'activité des LOX et que ces fibres sont visibles à partir de deux jours post traitement et durables pendant au moins 15 jours en culture, sans que l'on puisse noter une diminution de leur présence au cours du temps. De plus, les fibres de SEP colocalisent (du moins en grande partie) avec le marquage des fibres de fibrilline.

Le fait que l'ajout d'un inhibiteur des LOX empêche totalement la formation des fibres de SEP permet d'exclure un dépôt passif de la SEP, ce qui a été décrit pour la hTE, qui est capable de se lier à

la matrice en l'absence de cellule vivante (Kozel et al., 2004). Il avait déjà été démontré que l'ajout exogène de TE sur cellules en culture pouvait aboutir à des fibres réticulées par les LOX et dont le signal coïncide avec celui de la fibrilline-1 (Wachi et al., 2005). Nous montrons donc que la SEP en est également capable.

Ces premières étapes sont encourageantes, mais de nombreuses autres expériences sont nécessaires pour valider le potentiel de la SEP à réparer les fibres élastiques. Premièrement, aucun test fonctionnel n'a pour l'instant été réalisé et il est donc impossible de savoir si les fibres néoformées à partir de la SEP ont un comportement semblable aux fibres élastiques natives, ou *a minima* si elles sont capables d'améliorer la réponse au stress mécanique des cellules.

En effet, les fibres formées après leur fenêtre de synthèse au cours du développement sont souvent désorganisées et ne permettent pas de rétablir un comportement physiologique, possiblement du fait de l'absence de certains protagonistes de l'assemblage des fibres au moment de cette néosynthèse. C'est notamment le cas des fibres qui se forment après un traitement au minoxidil (Fhayli, Boëté, et al., 2019) ou lors de la réexpression de l'élastine dans certaines pathologies comme l'athérosclérose ou la COPD (Phinikaridou et al., 2018; Schmelzer & Duca, 2022). Au niveau cellulaire, il est difficile de mettre en évidence une organisation « correcte » des fibres, puisque les cellules ne sont pas organisées de la même façon que dans la paroi vasculaire, ni soumises aux mêmes contraintes. Cependant, l'ultrastructure des fibres néoformées en présence de SEP pourrait être observée par microscopie électronique à transmission (MET) et l'intégration de la SEP dans le réseau matriciel pourrait être analysé par marquage immunologique avec des billes d'or. Une étude approfondie des propriétés mécaniques de ces fibres élastiques est également nécessaire. Ce dernier point sera abordé dans la section suivante.

Des tests d'injection intravasculaire de la SEP sur souris ont montré des effets intéressants de la protéine. En effet, Boëté et al. (2022) montrent que les souris *Eln^{+/-}* injectées avec la SEP présentent moins de ruptures de leurs lamelles élastiques, et une rigidité artérielle réduite comparé aux souris contrôles. La présence de la SEP dans la paroi vasculaire n'a néanmoins pas pu être mise en évidence, et il est donc possible que les effets de la protéine soient liés non pas à son intégration dans les fibres élastiques de la média, mais à l'activation de voies de signalisation, par exemple en se fixant sur l'ERC. Le minoxidil et l'aneth, par exemple, ont des effets similaires sur les aortes de souris, sans que ces molécules ne puissent intégrer les fibres élastiques (Bouider et al., 2015; Fhayli et al., 2020). La SEP, en plus de son rôle structurel de consolidation des fibres élastiques, pourrait également enclencher des signaux cellulaires.

Si l'on envisage que la SEP puisse réparer les fibres élastiques sans s'y intégrer, c'est donc qu'elle est capable de relancer l'expression de leurs composants. Lors de ce travail de thèse, nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet clair de la SEP sur la quantité de fibres de fibrilline synthétisées, qui semble identique dans les conditions contrôles et traitées, avec dans les deux cas une forte hétérogénéité d'une culture à l'autre. De plus, l'impact sur la transcription de certains gènes clés a été recherché mais la variabilité entre les répétitions d'expérience n'a pas permis de conclure dans un sens ou dans l'autre. Il faut également noter la difficulté à produire des fibres élastiques *in vitro* avec nos CML aortiques humaines. Un milieu favorisant leur synthèse a été optimisé, mais l'expression de la tropoélastine était parfois très faible dans nos cultures, même après plusieurs semaines. De plus, les caractéristiques du donneur (sexe, âge, particularités génétiques non renseignées) peuvent également influencer ce taux de synthèse. Ainsi, sur les deux donneurs différents dont nous avons obtenu des cellules, celles provenant du plus âgé ne synthétisaient qu'une très faible quantité d'élastine, affectant la présence de fibres finales. L'impact de l'âge sur la production d'élastine *in vitro* a d'ailleurs déjà été observé dans d'autres études (Mecham, 2008; Sephel & Davidson, 1986). Il se

pourrait donc que la capacité des cellules à répondre à un signal proélastogénique dépendent de paramètres liés à l'âge ou plus globalement, liés au donneur dont ces cellules proviennent. Par exemple, il a été montré que l'activation de l'ERC par les EDP était réduite dans les cellules âgées (Duca et al., 2016; Scandolera et al., 2015).

Un dernier point concernant l'action de la SEP sur les fibres élastiques concerne sa résistance aux attaques enzymatiques. Nous avons montré que la SEP était moins dégradée que la hTE *in vitro*, en présence de MMP-12 et de HLE. Cette réduction de sensibilité est intéressante puisqu'elle laissera potentiellement plus de temps à la SEP pour être intégrée dans des fibres élastiques avant d'être dégradée et ce même si un environnement inflammatoire est en place. Il serait cependant intéressant de mesurer la résistance à la protéolyse des fibres formées par la SEP. En effet, la principale protection de l'élastine dans les fibres élastiques vient du fait que ses séquences cibles sont inaccessibles, soit parce que déjà engagées dans un motif de réticulation, soit parce que protégées par le manteau de fibrilline. Ainsi, il serait intéressant de voir à l'échelle ultrastructurale par MET si l'intégration de la SEP dans les fibres néoformées favorise leur résistance à la dégradation enzymatique.

Concernant l'effet des produits de dégradation de la SEP, seules 6 séquences bioactives des 28 décrites dans la TE (Heinz, 2020 – [Tableau 4](#)) peuvent être produites à partir de la protéine. Leurs effets connus sont énumérés dans le [Tableau 7](#) ci-dessous. Il est évidemment possible que d'autres motifs bioactifs existent dans la protéine, mais ils n'ont pas encore été décrits à ce jour.

Tableau 7 - Séquences bioactives présentes dans la SEP

Séquences	Effets connus
GVLPG	Stimulation de la sécrétion de pro-MMP1
VGVPAG	Expression de la pro-MMP-1 et de la MT1-MMP ; Chimiotaxie des fibroblastes, des monocytes, et des cellules endothéliales ; Sécrétion de cytokines pro-Th-1 ; Myofibrillogenèse ; Vasorelaxation ; Expression des ARNm de TIMP-2 et 3 ; expression des MMP-2 et 3 ; Fibroblastes : prolifération et expression de l'élastine ; CML : prolifération, réponses ostéogéniques
VGVPAGV	
GVAPG	
GVAPGV	
PGVGVA	
	Augmentation de l'expression d'élastases

A partir de Heinz, 2020.

Effets sur les CML

Dans les travaux présentés de cette thèse, seule la neutralité de la SEP sur la prolifération des CML a été validée. Cependant, de nombreuses autres expériences ont été entreprises pour évaluer plus précisément l'effet de la SEP sur les CML.

Il a été montré que la hTE en culture favorise un phénotype contractile sur les CML vasculaires, tout comme le peptide VGVPAG seul (Karnik, Wythe, et al., 2003). Il est donc possible d'imaginer que la SEP ait le même effet, ce qui serait cohérent avec le fait qu'elle ne semble pas augmenter la sécrétion de matrice extracellulaire post traitement. Il a été décrit que l'expression de l' α -SMA augmente dans les CML contractiles (Rensen et al., 2007) et que ces cellules sont également plus « étirées », par opposition au phénotype dédifférencié ou synthétique, où les cellules sont plutôt arrondies.

Nos premiers tests n'ont pas pu mettre en évidence une quelconque augmentation de l'expression de l' α -SMA dans les conditions traitées à la SEP, que ce soit au niveau de la transcription

de son ARNm (par RT-qPCR ; *quantitative reverse transcription PCR*) ou au niveau protéique par marquage en immunofluorescence (IF) (Figure 22).

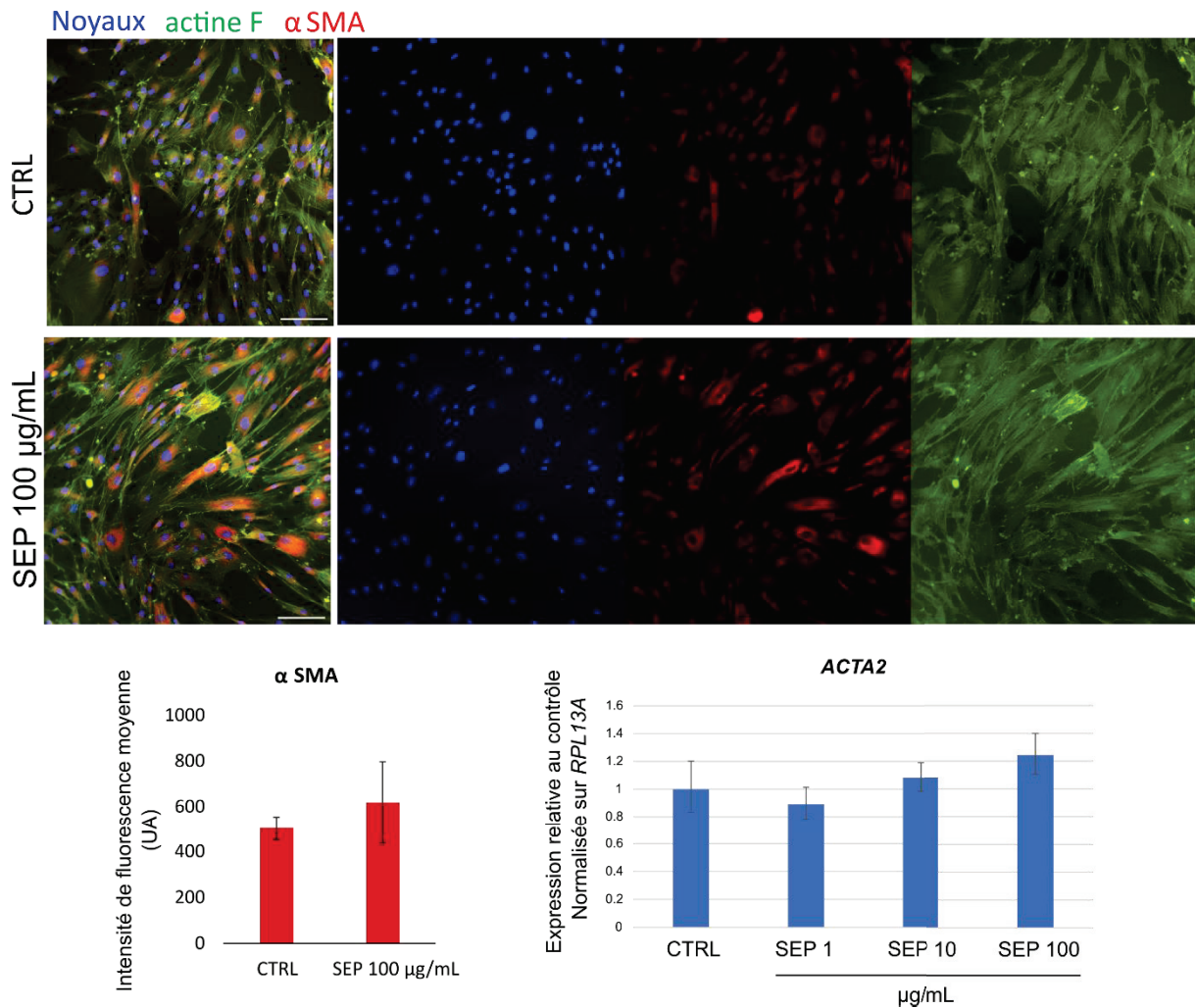


Figure 22. La SEP n'a pas d'effet sur l'expression de l' α -SMA. Les CML en culture traitées à la SEP ne montrent pas de différence d'expression de l' α -SMA, ni au niveau de l'ARNm, mesuré par RT qPCR, ni au niveau de l'expression de la protéine, observé par IF. ACTA2 est le gène codant pour l' α -SMA ; UA = unité arbitraire ; Barre d'échelle = 100 μ m.

Des marqueurs plus binaires que l' α -SMA pourraient être quantifiés pour mettre en évidence un changement de phénotype, comme par exemple la smootheline, la calponine et la chaîne lourde de la myosine 11, qui sont des marqueurs plus spécifiques du phénotype contractile (Rensen et al., 2007). De plus, des analyses en Western Blot seront réalisées pour obtenir une quantification plus fiable que celle des mesures d'intensité en IF. Des analyses de profil transcriptomique pourraient également révéler de manière plus efficace si la SEP provoque un changement comportemental de la cellule ou non. En effet, plusieurs études en *single cell RNAseq* (séquençage du transcriptome) ont permis de définir des marqueurs spécifiques à chaque phénotype des CML, ou du moins à ceux qui ont été mis en évidence pour le moment. Le phénotype dit « synthétique » est cependant remis en question quant au profil transcriptomique auquel il correspond (Yap et al., 2021).

Il était par ailleurs prévu que nous fassions des tests de comportement et de réponse au stress mécanique des cellules avec ou sans traitements par la SEP. Cela n'a malheureusement pas pu être fait, faute de temps, mais il serait intéressant de poursuivre ce projet. Des expériences de TFM

(*Traction Force Microscopy*) pourront être réalisées pour définir les forces de traction des cellules avec ou sans traitement à la SEP.

Il a été montré que les CML anévrismales (issues de patients ayant développé un anévrisme) présentent des particularités par rapport aux CML saines (Petit et al., 2021). Premièrement, elles ont une forme plus étalée et moins symétrique, avec de larges extensions membranaires ; les forces de traction qui leur sont associées sont également plus élevées que celles des cellules saines, lorsque mesurées par TFM après détachement des cellules (Petit et al., 2021). Des analyses par AFM ont également été réalisées sur ces cellules, mais n'ont pas pu démontrer de différence de rigidité de leur cytosquelette (Petit et al., 2022).

Il serait intéressant de voir si la SEP peut avoir un effet sur la réponse de ces cellules pathologiques et si elle est capable de rétablir un comportement normal. L'analyse de cette réponse à un stress mécanique pourrait être réalisée en utilisant le système de FlexCell®, qui permet d'appliquer une déformation sur une membrane sur laquelle sont cultivées les cellules (Riehl et al., 2012). L'analyse de la réponse des cellules saines et pathologiques, avec ou sans traitement par la SEP, pourrait également mettre en évidence des activations différentes de voies de mécanotransduction.

Les expériences discutées dans cette partie sont réalisées sur cellules dites « isolées », c'est-à-dire qu'elles sont ensemencées en densité telle qu'elles ne parviennent pas à confluence pendant la durée de l'expérience. Dans ces conditions, les CML ne produisent que très peu de fibrilline, et pas du tout d'élastine. Il est donc peu probable que les effets observés lors d'un traitement soient dus simplement à la présence de SEP dans la MEC. Les effets rapportés par Boëté et al. (2022) sont également en faveur d'un signal cellulaire déclenché par la SEP, comme mentionné précédemment. Comme défini dans l'introduction, la séquence de la SEP comporte deux motifs d'interactions principaux : l'un compatible avec une liaison sur l'ERC, et l'autre au niveau des intégrines de type $\alpha_v\beta_3$. La capacité effective de la SEP à lier ces récepteurs a été évaluée à partir de coatings de SEP sur lesquels des fibroblastes dermiques humains ont été déposés en présence ou non d'inhibiteurs de ces récepteurs (lactose et anticorps bloquant respectivement) (Travail de thèse de C. Lorion, 2015; Brevet #WO2017194761, (Debret et al., 2017)). Dans ces conditions, l'adhérence des fibroblastes était diminuée en présence des inhibiteurs, et ce de façon cumulative, démontrant que la SEP peut se lier à l'ERC et à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ de façon distincte. Toutefois, ces résultats ne permettent pas de savoir si la protéine sous forme soluble dans le milieu peut également interagir avec ces récepteurs membranaires. Dans le cas où la SEP aurait effectivement des effets sur les CML, au niveau de la promotion d'un certain phénotype ou d'une modification de la réponse au stress mécanique, il serait intéressant de tester les effets des inhibiteurs de ces voies d'interactions (lactose et anticorps bloquant). D'autres inhibiteurs de l'ERC, un peu plus spécifique, ont également été décrits tels que l'acide 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acétylneuraminique (DANA), qui est un inhibiteur de sialidase, ou la chondroïtine sulfate, un autre antagoniste de l'EBP (Tembely et al., 2022; Wahart et al., 2019).

Passage transendothélial

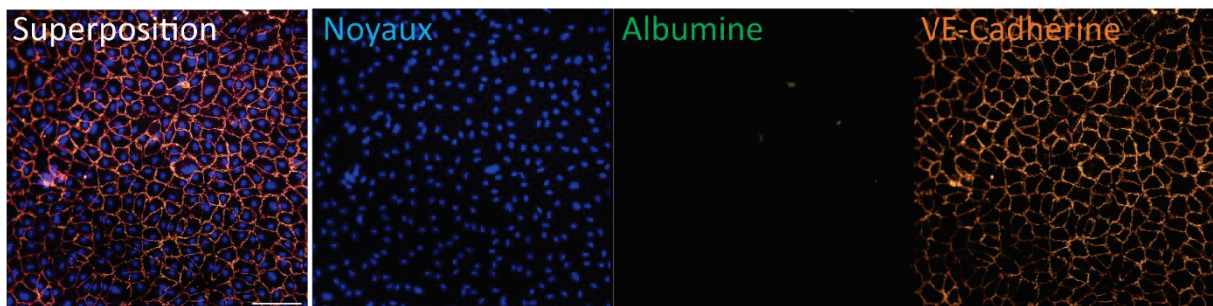
Nous avons montré dans le dernier article présenté que la SEP pouvait traverser l'endothélium pour rejoindre les CML dans un modèle de coculture *in vitro*.

La quantification du passage de la SEP a cependant été plus compliquée à obtenir que prévu et nous n'y sommes pas parvenu. En effet, dans les premiers essais, le système d'insert n'était pas en coculture et nous dosions simplement le passage de plusieurs molécules fluorescentes du compartiment du haut vers celui du bas à différents temps. Une fois les paramètres de culture de la couche endothéliale fixés pour obtenir un passage du dextran 4 kDa mais pas du dextran 70 kDa, des dosages ont été réalisés, mais seule une très faible quantité de SEP semblait traverser (proche de celle

du dextran 70 kDa). En revanche, contrairement au dextran ou à l'albumine (65 kDa) qui a également été utilisée comme contrôle, une large proportion de la SEP était internalisée dans les cellules endothéliales pendant l'expérience (Figure 23).

Les molécules présentes dans le sang peuvent traverser l'endothélium de plusieurs façons. Les 2 principales sont le passage paracellulaire ou le passage transcellulaire qu'on appelle aussi transcytose (Claesson-Welsh, 2015). La SEP étant retrouvée à l'intérieur des cellules, un mécanisme de transcytose pourrait entrer en jeu. Des marquages ultérieurs ont permis de mettre en évidence que la SEP est localisée dans des compartiments de type endosome (positifs pour le marqueur d'endosome précoce EEA1 ; *early endosome antigen 1*) et très peu dans les lysosomes (marqueur LAMP-1 ; *Lysosome-associated membrane glycoprotein 1*). De plus, les cellules laissées en culture plusieurs jours sans SEP dans leur milieu, après une incubation de 24h en présence de SEP, maintiennent un contenu intracellulaire en SEP relativement élevé et ce jusqu'à 96h après l'incubation (temps maximum testé), sans que cela ne semble impacter la survie des cellules (pas de mort cellulaire observée).

A



B

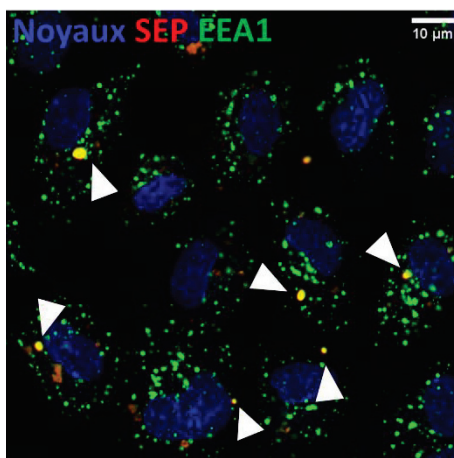


Figure 23. La SEP est internalisée dans les cellules endothéliales.

(A) Membranes des inserts récupérées après une expérience de passage transendothélial. La SEP est encore présente en grande quantité dans le tapis cellulaire ; barre d'échelle = 100 μm ; (B) La SEP est en partie retrouvée dans les endosomes des cellules endothéliales ; barre d'échelle = 10 μm ; EEA1 = early endosome antigen 1, marqueur des endosomes précoces.

La transcytose nécessite que la cellule soit polarisée, c'est-à-dire qu'il y a un sens de circulation des endosomes d'un côté à l'autre (haut vers bas, ou lumen vers média). Ce signal manquait peut-être

dans notre premier modèle *in vitro*. Nous avons donc mis en place un modèle de coculture avec des CML cultivées dans le fond du puits où se trouve l'insert lors du test de passage. La SEP s'est avérée toujours impossible à doser dans le milieu, mais nous savons maintenant que c'est sûrement parce qu'elle ne reste pas en solution et qu'elle se dépose au fond du puits en agrégats, ou dans le cas des cocultures, parce qu'elle est directement prise en charge par les CML pour former des fibres.

La voie précise qui permet le passage de la SEP n'a pas été identifiée, et la protéine est toujours présente dans les cellules endothéliales à la fin de l'expérience, même lors des cocultures. Cependant, l'identification de la voie n'est pas forcément une priorité, sauf si une intervention devient nécessaire pour augmenter son passage, auquel cas il faudra savoir sur quelle voie agir. Le modèle *in vitro* ne prend pas non plus en compte que la protéine sera dans un flux et non pas stagnante au-dessus de sa cible, ce qui diminuera son passage effectif dans des conditions *in vivo*.

Il est cependant intéressant de mentionner que la perméabilité qui a été choisie pour modéliser le passage transendothélial correspond à ce qui est décrit pour un endothélium sain (Pauty et al., 2017). Or, les conditions pathologiques affectent souvent l'intégrité endothéliale et peuvent donc en modifier sa perméabilité, comme c'est le cas lors d'inflammation ou dans l'athérosclérose (Lobbes et al., 2010; Phinikaridou et al., 2012). Il a d'ailleurs été montré récemment que la perméabilité vasculaire était augmentée au niveau des anévrismes, et qu'elle pouvait de plus servir de marqueur prédictif pour évaluer le risque de rupture chez la souris (Adams et al., 2020).

Dans le cas particulier des anévrismes, le flux sanguin est perturbé au niveau de l'affaiblissement de la paroi et une circulation très lente est souvent observée dans les déformations sacculaires ou fusiformes, voire une stagnation qui peut parfois mener à la formation d'un thrombus (Del Alamo et al., 2009). La SEP pourrait donc être plus longtemps en contact avec la paroi vasculaire là où elle est nécessaire. Il faudra évidemment confirmer ces hypothèses *in vivo*.

Pour finir, la pharmacocinétique de la SEP n'a pas encore été décrite. Cependant, des études ont été faites sur les ELP en général et montrent que de nombreux paramètres dépendent de la taille de l'ELP. Kuna et al. (2018) ont caractérisé le devenir d'ELP de 25 à 86 kDa après injection intraveineuse chez la souris. Pour l'ELP de poids moléculaire le plus proche de la SEP (ELP-127 = 50 kDa et SEP = 55 kDa), les caractéristiques suivantes ont été mesurées :

- Demi-vie plasmatique pendant la phase de distribution : 1.07 heures
- Demi-vie plasmatique terminale (pendant la phase d'élimination) : 7.05 heures
- Tissus cibles : Reins (cortex >> médulla) >> foie >> poumons \cong cœur \cong cerveau > rate

Des tests de stabilité *in vitro* dans du plasma à 37°C ont également mis en évidence un faible taux de dégradation. 51% de l'ELP dans sa forme entière était encore détectable après 10 jours. Une autre étude a montré que les ELP ne traversaient pas la barrière du placenta, et ce dès 25 kDa (Bidwell, 2021; Kuna, Waller, et al., 2018).

Pour finir, les effets de la SEP sur les cellules endothéliales n'ont pas spécifiquement été caractérisés. Les cellules endothéliales sont des cellules élastogéniques et sont aussi sujettes à de potentielles activations de leur ERC (Wahart et al., 2019). Des injections chez la souris ont mis en évidence que la SEP serait capable de restaurer une fonction endothéliale correcte chez les femelles *Eln^{-/-}*, au niveau de leur réponse à l'acétylcholine (qui induit une vasodilatation) (Boëté et al., 2022). L'activation de l'ERC par des EDP a aussi été reliée à des effets vasodilatateurs, par la production de NO (Faury et al., 1995). Il serait intéressant de comprendre plus en détail les effets de la SEP sur les cellules endothéliales, mais cela nécessiterait peut-être de changer de type cellulaire, afin d'étudier la

réponse de cellules endothéliales de l'aorte, plutôt que des HUVEC, qui sont les cellules que nous avons utilisées jusqu'à présent.

Annexes

Communications orales

- 8th FEBS Advanced Lecture Course – Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets
Mai 2022, Grèce
“The Synthetic Elastic Protein: A promising tool to restore defective elastic fibers in the context of vascular elastinopathies”
Prix Young Investigator Award de l’ISMB
- 26^e Journée scientifique de l’EDISS (École doctorale interdisciplinaire Sciences-Santé)
Novembre 2021, Lyon (visioconférence)
“In vitro evaluation of a synthetic elastic protein for vascular applications”
Prix du Jury
- Joint Meeting of the French and German Societies for Matrix Biology
Mai 2021, (visioconférence)
“The Synthetic Elastic Protein: a promising tool to improve mechanical deficit of vascular elastinopathies”

Communication par affiche

- Journée Scientifique de la SFR Santé Lyon Est
Novembre 2021, Lyon
“The Synthetic Elastic Protein: a promising tool to restore defective elastic fibers in the context of vascular elastinopathies”

Évènements de vulgarisation scientifique

- Fête de la Science 2022 : Les espèces modèles de la recherche en biologie - Atelier « Poisson-zèbre »
- Fête de la Science 2021 : Atelier « Culture cellulaire »

Activité d’encadrement

- Stagiaire de Master 1 du cursus Biologie Cellulaire et Moléculaire (BMC)
Janvier - Février 2022 (7 semaines)



The Synthetic Elastic Protein :

A promising tool to restore defective elastic fibers in the context of vascular elastinopathies

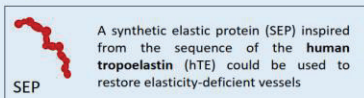
Marie Hoareau¹, Elise Lambert¹, Romain Debret¹

¹Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory, UMR5305 CNRS/UCBL, Lyon, France;

Context

Elasticity is essential for the proper function of arteries in which a deficiency can lead to severe pathologies, such as aortic aneurysms and dissections. So far, there is no satisfactory treatment to restore elastic fibers using drugs. As an alternative strategy, the Arterlystic ANR project proposes the use of a synthetic elastic protein (SEP) to restore elastic properties of tissues *in situ* by integrating damaged vessels after being injected in the vascular system.

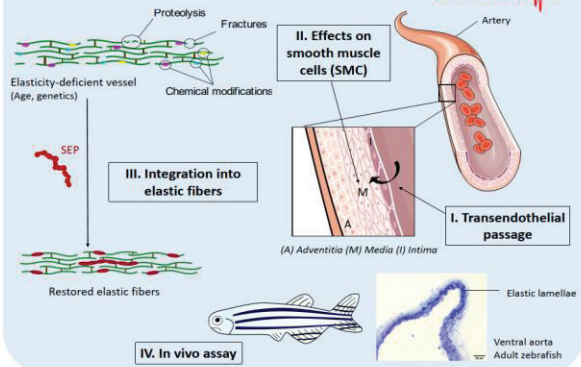
The synthetic elastic protein



SEP sequence

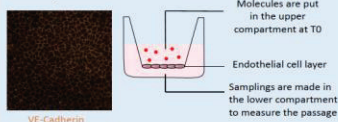


Thesis Project

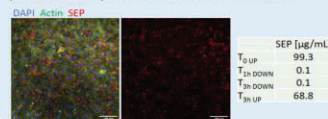


I. SEP enters endothelial cells

To reach its target (the media), SEP should cross the intima, the first layer of the vessel. There are two main ways to do so : the paracellular pathway or transcytosis.

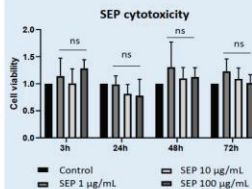


An *in vitro* model of the endothelium was developed to assess the transendothelial passage of SEP. After 3 hours, no SEP was found in the lower compartment, but a lot of protein remained in the cell layer. Although SEP is unable to cross paracellularly, it can enter cells and its capacity to perform transcytosis remains to be determined.

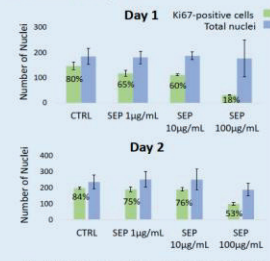


II. SEP does not have a cytotoxic effect on smooth muscle cells and has a negative and reversible effect on their proliferation

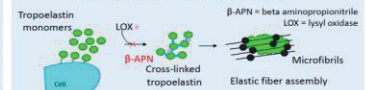
SEP cytotoxicity was assessed by a PrestoBlue[®] assay. The protein was incubated at different concentrations with SMC and their viability was tested at 3, 24, 48 and 72 hours. No sign of cytotoxicity was found.



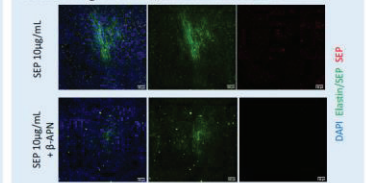
SEP was incubated for one day in culture with SMC and its effect on proliferation was tested at day 1 and 2.



III. SEP interacts with the elastogenesis machinery

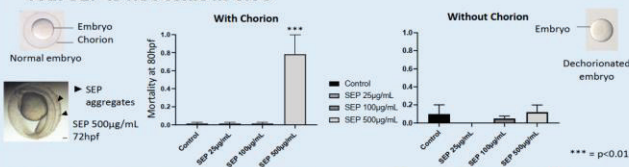


SEP was incubated in SMC cultures with or without an inhibitor of LOX, the enzymes responsible for the cross-linking of elastin, and in our case SEP.



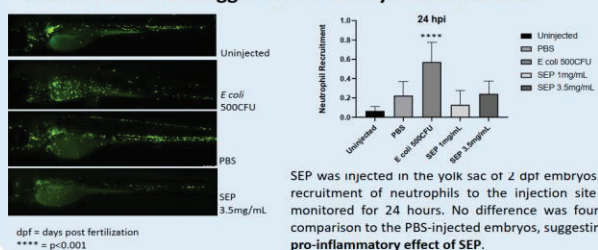
No real fibers were obtained, but SEP was found to form LOX-dependent aggregates. Their impact on elastogenesis remains unknown. Some optimization will be needed to find the right conditions for SEP to help form fibers.

IVa. SEP is not toxic in vivo

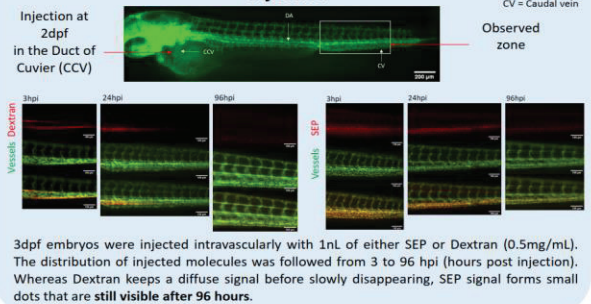


SEP toxicity *in vivo* was evaluated using the Fish Embryo Toxicity Test with the zebrafish model, as described by the OECD guidelines. Although the protein had a strong negative effect on embryos with their chorion, it had no toxicity when the chorion was removed. The protein was found to aggregate on the chorion, probably disturbing the exchanges between the embryo and its environment, explaining malformations and growth delay that were not found when the chorion was absent.

IVb. SEP does not trigger inflammatory reaction in vivo



IVc. SEP is retained in the vasculature at least 96 hours after injection



Conclusion

These first results are encouraging since they validate the first necessary steps for our protein to act as a potential treatment. Nevertheless, a lot remains to be done: characterize more precisely the effects of the protein on vascular smooth muscle cell behavior, evaluate its proper integration into elastic fibers first by pursuing ongoing experiments *in vitro* and then in vessels *in vivo*. Lastly, the capacity of SEP to really improve biomechanical properties of treated vessels will be evaluated, both on a cellular model using aneurysmal cells and *in vivo* with an elastin-deficient model of zebrafish.

More information about the Arterlystic project on www.arterlystic.com

Références

- Adams, L. C., Brangsch, J., Reimann, C., Kaufmann, J. O., Nowak, K., Buchholz, R., Karst, U., Botnar, R. M., Hamm, B., & Makowski, M. R. (2020). Noninvasive imaging of vascular permeability to predict the risk of rupture in abdominal aortic aneurysms using an albumin-binding probe. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59842-2>
- Ahmed, S., & Warren, D. T. (2018). Vascular smooth muscle cell contractile function and mechanotransduction. *Vessel Plus*, *2*, 36. <https://doi.org/10.20517/2574-1209.2018.51>
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, *4*(7), 499-511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- Alexopoulou, A. N., Multhaupt, H. A. B., & Couchman, J. R. (2007). Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(3), 505-528. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.10.014>
- Al-U'datt, D., Allen, B. G., & Nattel, S. (2019). Role of the lysyl oxidase enzyme family in cardiac function and disease. *Cardiovascular Research*, *115*(13), 1820-1837. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz176>
- Amiram, M., Quiroz, F. G., Callahan, D. J., & Chilkoti, A. (2011). Highly Parallel Method for Synthesis of DNA Repeats Enables Discovery of "Smart" Protein Polymers. *Nature materials*, *10*(2), 141-148. <https://doi.org/10.1038/nmat2942>
- Andrault, P.-M., Panwar, P., Mackenzie, N. C. W., & Brömme, D. (2019). Elastolytic activity of cysteine cathepsins K, S, and V promotes vascular calcification. *Scientific Reports*, *9*(1), 9682. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45918-1>
- Antonicelli, F., Bellon, G., Debelle, L., & Hornebeck, W. (2007). Elastin-elastases and inflamm-aging. *Current Topics in Developmental Biology*, *79*, 99-155. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)79005-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)79005-6)
- Arackal, A., & Alsayouri, K. (2022). Histology, Heart. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545143/>
- Argraves, W. S., Tanaka, A., Smith, E. P., Twal, W. O., Argraves, K. M., Fan, D., & Haudenschild, C. C. (2009). Fibulin-1 and fibrinogen in human atherosclerotic lesions. *Histochemistry and Cell Biology*, *132*(5), 559-565. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0628-7>
- Arribas, S. M., Hinek, A., & González, M. C. (2006). Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, *111*(3), 771-791. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.003>
- Ashor, A. W., Lara, J., Siervo, M., Celis-Morales, C., & Mathers, J. C. (2014). Effects of exercise modalities on arterial stiffness and wave reflection : A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*, *9*(10), e110034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110034>
- Ashworth, J. L., Murphy, G., Rock, M. J., Sherratt, M. J., Shapiro, S. D., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (1999). Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases : Implications for connective tissue remodelling. *The Biochemical Journal*, *340* (Pt 1)(Pt 1), 171-181.
- Asnani, A., & Peterson, R. T. (2014). The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Disease Models & Mechanisms*, *7*(7), 763-767. <https://doi.org/10.1242/dmm.016170>
- Aupperle, H., & Disatian, S. (2012). Pathology, protein expression and signaling in myxomatous mitral valve degeneration : Comparison of dogs and humans. *Journal of Veterinary Cardiology: The Official Journal of the European Society of Veterinary Cardiology*, *14*(1), 59-71. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2012.01.005>
- Baeyens, N., Bandyopadhyay, C., Coon, B. G., Yun, S., & Schwartz, M. A. (2016). Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(3), 821-828. <https://doi.org/10.1172/JCI83083>
- Bailey, A. J. (2001). Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mechanisms of Ageing and Development*, *122*(7), 735-755. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00225-1](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00225-1)

- Baldock, C., Siegler, V., Bax, D. V., Cain, S. A., Mellody, K. T., Marson, A., Haston, J. L., Berry, R., Wang, M.-C., Grossmann, J. G., Roessle, M., Kielty, C. M., & Wess, T. J. (2006). Nanostructure of fibrillin-1 reveals compact conformation of EGF arrays and mechanism for extensibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(32), 11922-11927. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601609103>
- Baldwin, A. K., Simpson, A., Steer, R., Cain, S. A., & Kielty, C. M. (2013). Elastic fibres in health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *15*, e8. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.9>
- Baralle, F. E., & Giudice, J. (2017). Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *18*(7), 437-451. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.27>
- Bauer, B., Mally, A., & Liedtke, D. (2021). Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13417. <https://doi.org/10.3390/ijms222413417>
- Bax, D. V., Rodgers, U. R., Bilek, M. M. M., & Weiss, A. S. (2009). Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRR motif and integrin alphaVbeta3. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(42), 28616-28623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017525>
- Bella, J., & Hulmes, D. J. S. (2017). Fibrillar Collagens. *Sub-Cellular Biochemistry*, *82*, 457-490. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_14
- Bendeck, M. P., & Langille, B. L. (1991). Rapid accumulation of elastin and collagen in the aortas of sheep in the immediate perinatal period. *Circulation Research*, *69*(4), 1165-1169. <https://doi.org/10.1161/01.res.69.4.1165>
- Benjamins, J. W., Yeung, M. W., van de Vegte, Y. J., Said, M. A., van der Linden, T., Ties, D., Juarez-Orozco, L. E., Verweij, N., & van der Harst, P. (2022). Genomic insights in ascending aortic size and distensibility. *EBioMedicine*, *75*, 103783. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103783>
- Bennett, C. M., Kanki, J. P., Rhodes, J., Liu, T. X., Paw, B. H., Kieran, M. W., Langenau, D. M., Delahaye-Brown, A., Zon, L. I., Fleming, M. D., & Look, A. T. (2001). Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood*, *98*(3), 643-651. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.3.643>
- Ben-Shlomo, Y., Spears, M., Boustred, C., May, M., Anderson, S. G., Benjamin, E. J., Boutouyrie, P., Cameron, J., Chen, C.-H., Cruickshank, J. K., Hwang, S.-J., Lakatta, E. G., Laurent, S., Maldonado, J., Mitchell, G. F., Najjar, S. S., Newman, A. B., Ohishi, M., Pannier, B., ... Wilkinson, I. B. (2014). Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction : An individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *Journal of the American College of Cardiology*, *63*(7), 636-646. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.09.063>
- Bensimon-Brito, A., Ramkumar, S., Boezio, G. L. M., Guenther, S., Kuenne, C., Helker, C. S. M., Sánchez-Iranzo, H., Iloska, D., Piesker, J., Pullamsetti, S., Mercader, N., Beis, D., & Stainier, D. Y. R. (2020). TGF- β Signaling Promotes Tissue Formation during Cardiac Valve Regeneration in Adult Zebrafish. *Developmental Cell*, *52*(1), 9-20.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.027>
- Beyens, A., Boel, A., Symoens, S., & Callewaert, B. (2021). Cutis laxa : A comprehensive overview of clinical characteristics and pathophysiology. *Clinical Genetics*, *99*(1), 53-66. <https://doi.org/10.1111/cge.13865>
- Bidwell, G. L. (2021). Novel Protein Therapeutics Created Using the Elastin-Like Polypeptide Platform. *Physiology*, *36*(6), 367-381. <https://doi.org/10.1152/physiol.00026.2021>
- Blacher, J., Demuth, K., Guerin, A. P., Safar, M. E., Moatti, N., & London, G. M. (1998). Influence of biochemical alterations on arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *18*(4), 535-541. <https://doi.org/10.1161/01.atv.18.4.535>
- Blaise, S., Romier, B., Kawecki, C., Ghirardi, M., Rabenoelina, F., Baud, S., Duca, L., Maurice, P., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H., Tarpin, M., Martiny, L., Garbar, C., Dauchez, M., Debelle, L., & Durlach, V. (2013). Elastin-derived peptides are new regulators of insulin resistance development in mice. *Diabetes*, *62*(11), 3807-3816. <https://doi.org/10.2337/db13-0508>

- Bochaton-Piallat, M.-L., & Bäck, M. (2018). Novel concepts for the role of smooth muscle cells in vascular disease : Towards a new smooth muscle cell classification. *Cardiovascular Research*, *114*(4), 477-480. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy031>
- Bochicchio, B., Laurita, A., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H., & Pepe, A. (2013). Investigating the role of (2S,4R)-4-hydroxyproline in elastin model peptides. *Biomacromolecules*, *14*(12), 4278-4288. <https://doi.org/10.1021/bm4011529>
- Boëté, Q., Lo, M., Liu, K.-L., Vial, G., Lemarié, E., Rougelot, M., Steuckardt, I., Harki, O., Couturier, A., Gaucher, J., Bouyon, S., Demory, A., Boutin-Paradis, A., El Kholti, N., Berthier, A., Pépin, J.-L., Briançon-Marjollet, A., Lambert, E., Debret, R., & Faury, G. (2022). Physiological Impact of a Synthetic Elastic Protein in Arterial Diseases Related to Alterations of Elastic Fibers : Effect on the Aorta of Elastin-Haploinsufficient Male and Female Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(21), 13464. <https://doi.org/10.3390/ijms232113464>
- Bolignano, D., Greco, M., Arcidiacono, V., Tripolino, O., Vita, C., Provenzano, M., Donato, C., Chiarella, S., Fuiano, G., De Sarro, G., Russo, E., Andreucci, M., Foti, D. P., & Coppolino, G. (2021). Cathepsin-K is a potential cardiovascular risk biomarker in prevalent hemodialysis patients. *International Urology and Nephrology*, *53*(1), 171-175. <https://doi.org/10.1007/s11255-020-02602-y>
- Bönner, F., Borg, N., Burghoff, S., & Schrader, J. (2012). Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. *PLoS One*, *7*(4), e34730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034730>
- Booms, P., Pregla, R., Ney, A., Barthel, F., Reinhardt, D. P., Pletschacher, A., Mundlos, S., & Robinson, P. N. (2005). RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture : A potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome. *Human Genetics*, *116*(1-2), 51-61. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1194-7>
- Bouider, N., Fhayli, W., Ghandour, Z., Boyer, M., Harrouche, K., Florence, X., Pirotte, B., Lebrun, P., Faury, G., & Khelili, S. (2015). Design and synthesis of new potassium channel activators derived from the ring opening of diazoxide : Study of their vasodilatory effect, stimulation of elastin synthesis and inhibitory effect on insulin release. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*(8), 1735-1746. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.02.043>
- Boutouyrie, P., Chowienczyk, P., Humphrey, J. D., & Mitchell, G. F. (2021). Arterial Stiffness and Cardiovascular Risk in Hypertension. *Circulation Research*, *128*(7), 864-886. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318061>
- Bowley, G., Kugler, E., Wilkinson, R., Lawrie, A., Eeden, F., Chico, T. J. A., Evans, P. C., Noël, E. S., & Serbanovic-Canic, J. (2022). Zebrafish as a tractable model of human cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology*, *179*(5), 900-917. <https://doi.org/10.1111/bph.15473>
- Braun, M. H., Brill, R. W., Gosline, J. M., & Jones, D. R. (2003). Form and function of the bulbus arteriosus in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and blue marlin (*Makaira nigricans*) : Static properties. *Journal of Experimental Biology*, *206*(19), 3311-3326. <https://doi.org/10.1242/jeb.00575>
- Brazeau, M. D., & Friedman, M. (2015). The origin and early phylogenetic history of jawed vertebrates. *Nature*, *520*(7548), 490-497. <https://doi.org/10.1038/nature14438>
- Brengle, B. M., Lin, M., Roth, R. A., Jones, K. D., Wagenseil, J. E., Mecham, R. P., & Halabi, C. M. (2023). A new mouse model of elastin haploinsufficiency highlights the importance of elastin to vascular development and blood pressure regulation. *Matrix Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2023.02.003>
- Britton, K. A., & Fox, C. S. (2011). Perivascular adipose tissue and vascular disease. *Clinical Lipidology*, *6*(1), 79-91. <https://doi.org/10.2217/clp.10.89>
- Bruns, R. R., Press, W., & Gross, J. (1987). A large-scale, orthogonal network of microfibril bundles in the corneal stroma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *28*(12), 1939-1946.
- Budakoti, M., Panwar, A. S., Molpa, D., Singh, R. K., Büsselberg, D., Mishra, A. P., Coutinho, H. D. M., & Nigam, M. (2021). Micro-RNA : The darkhorse of cancer. *Cellular Signalling*, *83*, 109995. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.109995>

- Burrige, K. (2017). Focal adhesions : A personal perspective on a half century of progress. *The FEBS Journal*, 284(20), 3355-3361. <https://doi.org/10.1111/febs.14195>
- Burton, D., & Burton, M. (2017). *Essential Fish Biology : Diversity, Structure and Function*. Oxford University Press.
- Callewaert, B., Renard, M., Huchtagowder, V., Albrecht, B., Hausser, I., Blair, E., Dias, C., Albino, A., Wachi, H., Sato, F., Mecham, R. P., Loeys, B., Coucke, P. J., De Paepe, A., & Urban, Z. (2011). New insights into the pathogenesis of autosomal-dominant cutis laxa with report of five ELN mutations. *Human Mutation*, 32(4), 445-455. <https://doi.org/10.1002/humu.21462>
- Campana, E. M. G. (2020). Arterial Stiffness : The New Frontier in Hypertension and Cardiovascular Disease. *Int J Cardiovasc Sci*, 33(2), 143-144.
- Campbell, J. H., & Campbell, G. R. (2012). Smooth muscle phenotypic modulation—A personal experience. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), 1784-1789. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.243212>
- Cangemi, C., Hansen, M. L., Argraves, W. S., & Rasmussen, L. M. (2014). Fibulins and their role in cardiovascular biology and disease. *Advances in Clinical Chemistry*, 67, 245-265. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.09.008>
- Cao, G., Xuan, X., Hu, J., Zhang, R., Jin, H., & Dong, H. (2022). How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00993-2>
- Carmo, M., Colombo, L., Bruno, A., Corsi, F. R. M., Roncoroni, L., Cuttin, M. S., Radice, F., Mussini, E., & Settembrini, P. G. (2002). Alteration of elastin, collagen and their cross-links in abdominal aortic aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery*, 23(6), 543-549. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2002.1620>
- Carreras, I., Rich, C. B., Panchenko, M. P., & Foster, J. A. (2002). Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription in aortic smooth muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(3), Article 3. <https://doi.org/10.1002/jcb.10163>
- Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S., & Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), 95-118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>
- Cayuela, M. L., Claes, K. B. M., Ferreira, M. G., Henriques, C. M., van Eeden, F., Varga, M., Vierstraete, J., & Mione, M. C. (2019). The Zebrafish as an Emerging Model to Study DNA Damage in Aging, Cancer and Other Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 178. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00178>
- Cenizo, V., André, V., Reymermier, C., Sommer, P., Damour, O., & Perrier, E. (2006). LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin : A dill extract induces the LOXL gene expression. *Experimental Dermatology*, 15(8), 574-581. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00442.x>
- Cha, S. G., Song, M. K., Lee, S. Y., Kim, G. B., Kwak, J. G., Kim, W. H., & Bae, E. J. (2019). Long-term cardiovascular outcome of Williams syndrome. *Congenital Heart Disease*, 14(5), 684-690. <https://doi.org/10.1111/chd.12810>
- Chabot, B., & Shkreta, L. (2016). Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *The Journal of Cell Biology*, 212(1), 13-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.201510032>
- Chai, H., Tao, Z., Chen, W., Xu, Y., Huang, F., Su, C., & Chen, X. (2018). Cortistatin attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm through inactivation of the ERK1/2 signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(2), 1801-1806. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.033>
- Chan, T.-F., Poon, A., Basu, A., Addleman, N. R., Chen, J., Phong, A., Byers, P. H., Klein, T. E., & Kwok, P.-Y. (2008). Natural variation in four human collagen genes across an ethnically diverse population. *Genomics*, 91(4), 307-314. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.12.008>

- Chang, C.-P., Neilson, J. R., Bayle, J. H., Gestwicki, J. E., Kuo, A., Stankunas, K., Graef, I. A., & Crabtree, G. R. (2004). A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell*, *118*(5), 649-663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.010>
- Chen, Z., Shin, M. H., Moon, Y. J., Lee, S. R., Kim, Y. K., Seo, J.-E., Kim, J. E., Kim, K. H., & Chung, J. H. (2009). Modulation of elastin exon 26A mRNA and protein expression in human skin *in vivo*. *Experimental Dermatology*, *18*(4), 378-386. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00799.x>
- Cheng, C. K., Bakar, H. A., Gollasch, M., & Huang, Y. (2018). Perivascular Adipose Tissue : The Sixth Man of the Cardiovascular System. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, *32*(5), 481-502. <https://doi.org/10.1007/s10557-018-6820-z>
- Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., & Gusovsky, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(16), 10689-10692. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.10689>
- Chow, M.-J., Turcotte, R., Lin, C. P., & Zhang, Y. (2014). Arterial Extracellular Matrix : A Mechanobiological Study of the Contributions and Interactions of Elastin and Collagen. *Biophysical Journal*, *106*(12), 2684-2692. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.014>
- Chung, I.-M., Gold, H. K., Schwartz, S. M., Ikari, Y., Reidy, M. A., & Wight, T. N. (2002). Enhanced extracellular matrix accumulation in restenosis of coronary arteries after stent deployment. *Journal of the American College of Cardiology*, *40*(12), 2072-2081. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(02\)02598-6](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)02598-6)
- Chung, M. I. S., Ming Miao, Stahl, R. J., Chan, E., Parkinson, J., & Keeley, F. W. (2006). Sequences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins : Clues to the evolutionary history of elastins. *Matrix Biology*, *25*(8), 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.08.258>
- Ciofani, G., Genchi, G. G., Liakos, I., Athanassiou, A., Mattoli, V., & Bandiera, A. (2013). Human recombinant elastin-like protein coatings for muscle cell proliferation and differentiation. *Acta Biomaterialia*, *9*(2), 5111-5121. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.016>
- Claesson-Welsh, L. (2015). Vascular permeability—The essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *120*(3), 135-143. <https://doi.org/10.3109/03009734.2015.1064501>
- Claesson-Welsh, L., Dejana, E., & McDonald, D. M. (2021). Permeability of the Endothelial Barrier : Identifying and Reconciling Controversies. *Trends in Molecular Medicine*, *27*(4), 314-331. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.11.006>
- Cocciolone, A. J., Hawes, J. Z., Staiculescu, M. C., Johnson, E. O., Murshed, M., & Wagenseil, J. E. (2018). Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *315*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00087.2018>
- Codriansky, K. A., Quintanilla-Dieck, M. J., Gan, S., Keady, M., Bhawan, J., & R nger, T. M. (2009). Intracellular degradation of elastin by cathepsin K in skin fibroblasts—A possible role in photoaging. *Photochemistry and Photobiology*, *85*(6), 1356-1363. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00592.x>
- Collighan, R. J., & Griffin, M. (2009). Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins : Biological significance and medical applications. *Amino Acids*, *36*(4), 659-670. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0190-y>
- Copeland, S., Warren, H. S., Lowry, S. F., Calvano, S. E., Remick, D., & Inflammation and the Host Response to Injury Investigators. (2005). Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *12*(1), 60-67. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005>
- Coquand-Gandit, M., Jacob, M.-P., Fhayli, W., Romero, B., Georgieva, M., Bouillot, S., Estève, E., Andrieu, J.-P., Brasseur, S., Bouyon, S., Garcia-Honduvilla, N., Huber, P., Buj n, J., Atanasova, M., & Faury, G. (2017). Chronic Treatment with Minoxidil Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Aorta of Aged Mice. *Rejuvenation Research*, *20*(3), 218-230. <https://doi.org/10.1089/rej.2016.1874>
- Daamen, W. F., Hafmans, T., Veerkamp, J. H., & Van Kuppevelt, T. H. (2001). Comparison of five procedures for the purification of insoluble elastin. *Biomaterials*, *22*(14), 1997-2005. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00383-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00383-5)

- Daamen, W. F., Hafmans, T., Veerkamp, J. H., & van Kuppevelt, T. H. (2005). Isolation of intact elastin fibers devoid of microfibrils. *Tissue Engineering*, *11*(7-8), 1168-1176. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1168>
- Dallas, S. L., Sivakumar, P., Jones, C. J. P., Chen, Q., Peters, D. M., Mosher, D. F., Humphries, M. J., & Kielty, C. M. (2005). Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(19), 18871-18880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410762200>
- Dalton, C. J., & Lemmon, C. A. (2021). Fibronectin : Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling. *Cells*, *10*(9), 2443. <https://doi.org/10.3390/cells10092443>
- Dao, H. H., Essalihi, R., Bouvet, C., & Moreau, P. (2005). Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis : Impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovascular Research*, *66*(2), 307-317. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.012>
- Davis, E. C., & Mecham, R. P. (1998). Intracellular trafficking of tropoelastin. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *17*(4), 245-254. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(98\)90078-6](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(98)90078-6)
- Debret, R., Cenizo, V., Aimond, G., André, V., Devillers, M., Rouvet, I., Mégarbané, A., Damour, O., & Sommer, P. (2010). Epigenetic Silencing of Lysyl Oxidase-Like-1 through DNA Hypermethylation in an Autosomal Recessive Cutis Laxa Case. *Journal of Investigative Dermatology*, *130*(11), 2594-2601. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.186>
- Degtarev, A., & Foster, J. A. (1999). The role of NF-1 factors in regulation of elastin gene transcription. *Matrix Biology*, *18*(3), 295-307. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(99\)00020-7](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(99)00020-7)
- Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., & Weinstein, B. M. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions : Molecular basis and pathological implications. *Developmental Cell*, *16*(2), 209-221. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.004>
- Del Alamo, J. C., Marsden, A. L., & Lasheras, J. C. (2009). Recent advances in the application of computational mechanics to the diagnosis and treatment of cardiovascular disease. *Revista Espanola De Cardiologia*, *62*(7), 781-805. [https://doi.org/10.1016/s1885-5857\(09\)72359-x](https://doi.org/10.1016/s1885-5857(09)72359-x)
- Del Monaco, M., Covello, S. P., Kennedy, S. H., Gilinger, G., Litwack, G., & Uitto, J. (1997). Identification of novel glucocorticoid-response elements in human elastin promoter and demonstration of nucleotide sequence specificity of the receptor binding. *The Journal of Investigative Dermatology*, *108*(6), 938-942. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12295241>
- Demin, K. A., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Meshalkina, D. A., Efimova, E. V., Morzherin, Y. Y., & Kalueff, A. V. (2017). Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish : Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes. *Neurotoxicology and Teratology*, *62*, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.04.002>
- Despanie, J., Dhandhukia, J. P., Hamm-Alvarez, S. F., & MacKay, J. A. (2016). Elastin-Like Polypeptides : Therapeutic Applications for an Emerging Class of Nanomedicines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, *240*, 93-108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.010>
- de Vrieze, E., de Bruijn, S. E., Reurink, J., Broekman, S., van de Riet, V., Aben, M., Kremer, H., & van Wijk, E. (2021). Efficient Generation of Knock-In Zebrafish Models for Inherited Disorders Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 9429. <https://doi.org/10.3390/ijms22179429>
- Di Gregoli, K., Mohamad Anuar, N. N., Bianco, R., White, S. J., Newby, A. C., George, S. J., & Johnson, J. L. (2017). MicroRNA-181b Controls Atherosclerosis and Aneurysms Through Regulation of TIMP-3 and Elastin. *Circulation Research*, *120*(1), 49-65. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309321>
- DiCamillo, S. J., Yang, S., Panchenko, M. V., Toselli, P. A., Naggar, E. F., Rich, C. B., Stone, P. J., Nugent, M. A., & Panchenko, M. P. (2006). Neutrophil elastase-initiated EGFR/MEK/ERK signaling counteracts stabilizing effect of autocrine TGF-beta on tropoelastin mRNA in lung fibroblasts. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *291*(2), L232-243. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00530.2005>

- Dobnikar, L., Taylor, A. L., Chappell, J., Oldach, P., Harman, J. L., Oerton, E., Dzierzak, E., Bennett, M. R., Spivakov, M., & Jørgensen, H. F. (2018). Disease-relevant transcriptional signatures identified in individual smooth muscle cells from healthy mouse vessels. *Nature Communications*, *9*(1), 4567. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06891-x>
- Doué, M., Okwieka, A., Berquand, A., Gorisse, L., Maurice, P., Velard, F., Terryn, C., Molinari, M., Duca, L., Piétrement, C., Gillery, P., & Jaisson, S. (2021). Carbamylation of elastic fibers is a molecular substratum of aortic stiffness. *Scientific Reports*, *11*(1), 17827. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97293-5>
- Dridi, S. M., Foucault Bertaud, A., Igondjo Tchen, S., Senni, K., Ejeil, A. L., Pellat, B., Lyonnet, S., Bonnet, D., Charpiot, P., & Godeau, G. (2005). Vascular wall remodeling in patients with supraaortic stenosis and Williams Beuren syndrome. *Journal of Vascular Research*, *42*(3), 190-201. <https://doi.org/10.1159/000085141>
- Duca, L., Blaise, S., Romier, B., Laffargue, M., Gayral, S., El Btaouri, H., Kawecki, C., Guillot, A., Martiny, L., Debelle, L., & Maurice, P. (2016). Matrix ageing and vascular impacts : Focus on elastin fragmentation. *Cardiovascular Research*, *110*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw061>
- Duca, L., Floquet, N., Alix, A. J. P., Haye, B., & Debelle, L. (2004). Elastin as a matrikine. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *49*(3), 235-244. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.007>
- Duong, C. N., & Vestweber, D. (2020). Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin. *Frontiers in Physiology*, *11*, 519. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00519>
- Duque Lasio, M. L., & Kozel, B. A. (2018). Elastin-driven genetic diseases. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *71-72*, 144-160. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.021>
- Durier, S., Fassot, C., Laurent, S., Boutouyrie, P., Couetil, J.-P., Fine, E., Lacolley, P., Dzau, V. J., & Pratt, R. E. (2003). Physiological Genomics of Human Arteries : Quantitative Relationship Between Gene Expression and Arterial Stiffness. *Circulation*, *108*(15), 1845-1851. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000091407.86925.7A>
- Eberhardt, R. T., & Raffetto, J. D. (2014). Chronic Venous Insufficiency. *Circulation*, *130*(4), 333-346. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006898>
- Eble, J. A., & Niland, S. (2009). The extracellular matrix of blood vessels. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(12), 1385-1400. <https://doi.org/10.2174/138161209787846757>
- Eckersley, A., Mellody, K. T., Pilkington, S., Griffiths, C. E. M., Watson, R. E. B., O’Cualain, R., Baldock, C., Knight, D., & Sherratt, M. J. (2018). Structural and compositional diversity of fibrillin microfibrils in human tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(14), 5117-5133. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001483>
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A., & Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in the wild : A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, *4*(1), 21-40. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>
- Exposito, J.-Y., Valcourt, U., Cluzel, C., & Lethias, C. (2010). The Fibrillar Collagen Family. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(2), 407-426. <https://doi.org/10.3390/ijms11020407>
- Fang, L., Liu, C., & Miller, Y. I. (2014). Zebrafish models of dyslipidemia : Relevance to atherosclerosis and angiogenesis. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *163*(2), 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.09.004>
- Farrell, A. P., & Pieperhoff, S. (2011). DESIGN AND PHYSIOLOGY OF THE HEART | Cardiac Anatomy in Fishes. In A. P. Farrell (Éd.), *Encyclopedia of Fish Physiology* (p. 998-1005). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00139-8>
- Faury, G. (2001). Function-structure relationship of elastic arteries in evolution : From microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathologie-Biologie*, *49*(4), 310-325. [https://doi.org/10.1016/s0369-8114\(01\)00147-x](https://doi.org/10.1016/s0369-8114(01)00147-x)
- Faury, G., Pezet, M., Knutsen, R. H., Boyle, W. A., Heximer, S. P., McLean, S. E., Minkes, R. K., Blumer, K. J., Kovacs, A., Kelly, D. P., Li, D. Y., Starcher, B., & Mecham, R. P. (2003). Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, *112*(9), 1419-1428. <https://doi.org/10.1172/JCI19028>

- Faury, G., Ristori, M. T., Verdetti, J., Jacob, M. P., & Robert, L. (1995). Effect of elastin peptides on vascular tone. *Journal of Vascular Research*, 32(2), 112-119. <https://doi.org/10.1159/000159084>
- Fei, P., Lee, J., Packard, R. R. S., Sereti, K.-I., Xu, H., Ma, J., Ding, Y., Kang, H., Chen, H., Sung, K., Kulkarni, R., Ardehali, R., Kuo, C.-C. J., Xu, X., Ho, C.-M., & Hsiai, T. K. (2016). Cardiac Light-Sheet Fluorescent Microscopy for Multi-Scale and Rapid Imaging of Architecture and Function. *Scientific Reports*, 6, 22489. <https://doi.org/10.1038/srep22489>
- Fernández-Alfonso, M. S., Gil-Ortega, M., García-Prieto, C. F., Aranguéz, I., Ruiz-Gayo, M., & Somoza, B. (2013). Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 402053. <https://doi.org/10.1155/2013/402053>
- Fhayli, W., Boëté, Q., Harki, O., Briançon-Marjollet, A., Jacob, M.-P., & Faury, G. (2019). Rise and fall of elastic fibers from development to aging. Consequences on arterial structure-function and therapeutical perspectives. *Matrix Biology*, 84, 41-56. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.08.005>
- Fhayli, W., Boëté, Q., Kihal, N., Cenizo, V., Sommer, P., Boyle, W. A., Jacob, M.-P., & Faury, G. (2020). Dill Extract Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Ascending Aorta of Aged Mice with Reversal of Age-Dependent Cardiac Hypertrophy and Involvement of Lysyl Oxidase-Like-1. *Biomolecules*, 10(2), E173. <https://doi.org/10.3390/biom10020173>
- Fhayli, W., Boyer, M., Ghandour, Z., Jacob, M. P., Andrieu, J. P., Starcher, B. C., Estève, E., & Faury, G. (2019). Chronic administration of minoxidil protects elastic fibers and stimulates their neosynthesis with improvement of the aorta mechanics in mice. *Cellular Signalling*, 62, 109333. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.05.018>
- Figueroa, X. F., & Duling, B. R. (2009). Gap Junctions in the Control of Vascular Function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(2), 251-266. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2117>
- Fitzgerald, T., Gerety, S., Jones, W., van Kogelenberg, M., King, D., McRae, J., Morley, K., Parthiban, V., Al-Turki, S., Ambridge, K., Barrett, D., Bayzatinova, T., Clayton, S., Coomber, E., Gribble, S., Jones, P., Krishnappa, N., Mason, L., Middleton, A., ... Hurlles, M. (2015). Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature*, 519(7542), 223-228. <https://doi.org/10.1038/nature14135>
- Flamia, R., Zhdan, P. A., Martino, M., Castle, J. E., & Tamburro, A. M. (2004). AFM study of the elastin-like biopolymer poly(ValGlyGlyValGly). *Biomacromolecules*, 5(4), 1511-1518. <https://doi.org/10.1021/bm049930r>
- Fletcher, E. E., Yan, D., Kosiba, A. A., Zhou, Y., & Shi, H. (2019). Biotechnological applications of elastin-like polypeptides and the inverse transition cycle in the pharmaceutical industry. *Protein Expression and Purification*, 153, 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.09.006>
- Forn-Cuní, G., Varela, M., Pereiro, P., Novoa, B., & Figueras, A. (2017). Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. *Scientific Reports*, 7, 41905. <https://doi.org/10.1038/srep41905>
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 244-254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Frismantiene, A., Philippova, M., Erne, P., & Resink, T. J. (2018). Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cellular Signalling*, 52, 48-64. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.08.019>
- Fritze, O., Romero, B., Schleicher, M., Jacob, M. P., Oh, D.-Y., Starcher, B., Schenke-Layland, K., Bujan, J., & Stock, U. A. (2012). Age-related changes in the elastic tissue of the human aorta. *Journal of Vascular Research*, 49(1), 77-86. <https://doi.org/10.1159/000331278>
- Gayral, S., Garnotel, R., Castaing-Berthou, A., Blaise, S., Fougerat, A., Berge, E., Montheil, A., Malet, N., Wymann, M. P., Maurice, P., Debelle, L., Martiny, L., Martinez, L. O., Pshezhetsky, A. V., Duca, L., & Laffargue, M. (2014). Elastin-derived peptides potentiate atherosclerosis through the immune Neu1-PI3Ky pathway. *Cardiovascular Research*, 102(1), 118-127. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt336>

- Gill, V., Kumar, V., Singh, K., Kumar, A., & Kim, J.-J. (2019). Advanced Glycation End Products (AGEs) May Be a Striking Link Between Modern Diet and Health. *Biomolecules*, *9*(12), 888. <https://doi.org/10.3390/biom9120888>
- Girardin, F., & Pechère-Bertschi, A. (2005). Traitement de l'hypertension artérielle et interactions médicamenteuses. *Rev Med Suisse*, *032*, 2099-2104.
- Glaberman, S., Padilla, S., & Barron, M. G. (2017). Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening. *Environmental toxicology and chemistry*, *36*(5), 1221-1226. <https://doi.org/10.1002/etc.3641>
- Godó, S., & Shimokawa, H. (2017). Endothelial Functions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *37*(9), e108-e114. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309813>
- Gomez-Garcia, M. J., Doiron, A. L., Steele, R. R. M., Labouta, H. I., Vafadar, B., Shepherd, R. D., Gates, I. D., Cramb, D. T., Childs, S. J., & Rinker, K. D. (2018). Nanoparticle localization in blood vessels : Dependence on fluid shear stress, flow disturbances, and flow-induced changes in endothelial physiology. *Nanoscale*, *10*(32), 15249-15261. <https://doi.org/10.1039/C8NR03440K>
- Gonzalez de Torre, I., Alonso, M., & Rodriguez-Cabello, J.-C. (2020). Elastin-Based Materials : Promising Candidates for Cardiac Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00657>
- Gonzalez de Torre, I. G., Wolf, F., Santos, M., Rongen, L., Alonso, M., Jockenhoevel, S., Rodríguez-Cabello, J. C., & Mela, P. (2015). Elastin-like recombinamer-covered stents : Towards a fully biocompatible and non-thrombogenic device for cardiovascular diseases. *Acta Biomaterialia*, *12*, 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.029>
- González-Pérez, F., Acosta, S., Rütten, S., Emonts, C., Kopp, A., Henke, H.-W., Bruners, P., Gries, T., Rodríguez-Cabello, J. C., Jockenhoevel, S., & Fernández-Colino, A. (2022). Biohybrid elastin-like venous valve with potential for in situ tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.988533>
- González-Rosa, J. M. (2022). Zebrafish Models of Cardiac Disease : From Fortuitous Mutants to Precision Medicine. *Circulation Research*, *130*(12), 1803-1826. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.320396>
- Gopalakrishnan, K., Kumarasamy, S., Abdul-Majeed, S., Kalinoski, A. L., Morgan, E. E., Gohara, A. F., Nauli, S. M., Filipiak, W. E., Saunders, T. L., & Joe, B. (2012). Targeted disruption of Adamts16 gene in a rat genetic model of hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(50), 20555-20559. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211290109>
- Gore, A. V., Monzo, K., Cha, Y. R., Pan, W., & Weinstein, B. M. (2012). Vascular development in the zebrafish. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(5), a006684. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006684>
- Gorisse, L., Pietrement, C., Vuiblet, V., Schmelzer, C. E. H., Köhler, M., Duca, L., Debelle, L., Fornès, P., Jaisson, S., & Gillery, P. (2016). Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(5), 1191-1196. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517096113>
- Graul-Neumann, L. M., Hausser, I., Essayie, M., Rauch, A., & Kraus, C. (2008). Highly variable cutis laxa resulting from a dominant splicing mutation of the elastin gene. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *146A*(8), 977-983. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32242>
- Gray, G., Toor, I., Castellan, R., Crisan, M., & Meloni, M. (2018). Resident cells of the myocardium : More than spectators in cardiac injury, repair and regeneration. *Current Opinion in Physiology*, *1*, 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2017.08.001>
- Grimes, A. C., & Kirby, M. L. (2009). The outflow tract of the heart in fishes : Anatomy, genes and evolution. *Journal of Fish Biology*, *74*(5), 983-1036. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02125.x>
- Grimes, A. C., Stadt, H. A., Shepherd, I. T., & Kirby, M. L. (2006). Solving an enigma : Arterial pole development in the zebrafish heart. *Developmental Biology*, *290*(2), 265-276. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.042>

- Grootaert, M. O. J., & Bennett, M. R. (2021). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis : Time for a re-assessment. *Cardiovascular Research*, *117*(11), 2326-2339. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab046>
- Guarin, M., Ny, A., De Croze, N., Maes, J., Léonard, M., Annaert, P., & de Witte, P. A. M. (2021). Pharmacokinetics in Zebrafish Embryos (ZFE) Following Immersion and Intrayolk Administration : A Fluorescence-Based Analysis. *Pharmaceuticals*, *14*(6), 576. <https://doi.org/10.3390/ph14060576>
- Guillot, A., Dauchez, M., Belloy, N., Jonquet, J., Duca, L., Romier, B., Maurice, P., Debelle, L., Martiny, L., Durlach, V., Baud, S., & Blaise, S. (2016). Impact of sialic acids on the molecular dynamic of bi-antennary and tri-antennary glycans. *Scientific Reports*, *6*, 35666. <https://doi.org/10.1038/srep35666>
- Gut, P., Reischauer, S., Stainier, D. Y. R., & Arnaout, R. (2017). LITTLE FISH, BIG DATA : ZEBRAFISH AS A MODEL FOR CARDIOVASCULAR AND METABOLIC DISEASE. *Physiological Reviews*, *97*(3), 889-938. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2016>
- Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L., & Winberg, J.-O. (2011). Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *The FEBS Journal*, *278*(1), 28-45. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07920.x>
- Haitoglou, C. S., Tsilibary, E. C., Brownlee, M., & Charonis, A. S. (1992). Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(18), 12404-12407.
- Hao, J., Williams, C. H., Webb, M. E., & Hong, C. C. (2010). Large Scale Zebrafish-Based In vivo Small Molecule Screen. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *46*, e2243. <https://doi.org/10.3791/2243>
- Haschke, M. (2018). Hypertension résistante. *2018 18:50*, *18*(50), 1059-1065.
- Hassouneh, W., MacEwan, S. R., & Chilkoti, A. (2012). Chapter nine—Fusions of Elastin-Like Polypeptides to Pharmaceutical Proteins. In K. D. Wittrup & G. L. Verdine (Éds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 502, p. 215-237). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416039-2.00024-0>
- Heinz, A. (2020). Elastases and elastokines : Elastin degradation and its significance in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *55*(3), 252-273. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1768208>
- Heinz, A., Jung, M. C., Duca, L., Sippl, W., Taddese, S., Ihling, C., Rusciani, A., Jahreis, G., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H., & Schmelzer, C. E. H. (2010). Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases—Cleavage site specificities and release of matrikines. *The FEBS Journal*, *277*(8), 1939-1956. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07616.x>
- Heinz, A., Jung, M. C., Jahreis, G., Rusciani, A., Duca, L., Debelle, L., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H., & Schmelzer, C. E. H. (2012). The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie*, *94*(1), 192-202. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.10.006>
- Hellström, M., Mattsson, C., Hellström, S., & Engström-Laurent, A. (2003). Hyaluronan is differently located in arteries and veins. An immunohistochemical study in the rat. *Cells, Tissues, Organs*, *173*(4), 227-233. <https://doi.org/10.1159/000070378>
- Henry, K. M., Loynes, C. A., Whyte, M. K. B., & Renshaw, S. A. (2013). Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. *Journal of Leukocyte Biology*, *94*(4), 633-642. <https://doi.org/10.1189/jlb.1112594>
- Herbomel, P., Thisse, B., & Thisse, C. (1999). Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*, *126*(17), 3735-3745. <https://doi.org/10.1242/dev.126.17.3735>
- Hermann, A. C., Millard, P. J., Blake, S. L., & Kim, C. H. (2004). Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos. *Journal of Immunological Methods*, *292*(1-2), 119-129. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.06.016>
- Hinek, A., Braun, K. R., Liu, K., Wang, Y., & Wight, T. N. (2004). Retrovirally mediated overexpression of versican v3 reverses impaired elastogenesis and heightened proliferation exhibited by fibroblasts from Costello syndrome and Hurler disease patients. *The American Journal of Pathology*, *164*(1), 119-131. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63103-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63103-3)

- Hinek, A., Pshezhetsky, A. V., Itzstein, M. von, & Starcher, B. (2006). Lysosomal Sialidase (Neuraminidase-1) Is Targeted to the Cell Surface in a Multiprotein Complex That Facilitates Elastic Fiber Assembly *. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3698-3710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508736200>
- Hinek, A., Smith, A. C., Cutiongco, E. M., Callahan, J. W., Gripp, K. W., & Weksberg, R. (2000). Decreased Elastin Deposition and High Proliferation of Fibroblasts from Costello Syndrome Are Related to Functional Deficiency in the 67-kD Elastin-Binding Protein. *American Journal of Human Genetics*, 66(3), 859-872.
- Hinton, R. B., Adelman-Brown, J., Witt, S., Krishnamurthy, V. K., Osinska, H., Sakthivel, B., James, J. F., Li, D. Y., Narmoneva, D. A., Mecham, R. P., & Benson, D. W. (2010). Elastin Haploinsufficiency Results in Progressive Aortic Valve Malformation and Latent Valve Disease in a Mouse Model. *Circulation Research*, 107(4), 549-557. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.221358>
- Hirano, E., Knutsen, R. H., Sugitani, H., Ciliberto, C. H., & Mecham, R. P. (2007). Functional rescue of elastin insufficiency in mice by the human elastin gene : Implications for mouse models of human disease. *Circulation Research*, 101(5), 523-531. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.153510>
- Hisada, T., Ordway, R. W., Kirber, M. T., Singer, J. J., & Walsh, J. V. (1991). Hyperpolarization-activated cationic channels in smooth muscle cells are stretch sensitive. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 417(5), 493-499. <https://doi.org/10.1007/BF00370945>
- Hoage, T., Ding, Y., & Xu, X. (2012). Quantifying Cardiac Functions in Embryonic and Adult Zebrafish. In X. Peng & M. Antonyak (Éds.), *Cardiovascular Development* (Vol. 843, p. 11-20). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-523-7_2
- Hogan, B. M., & Schulte-Merker, S. (2017). How to Plumb a Pisces : Understanding Vascular Development and Disease Using Zebrafish Embryos. *Developmental Cell*, 42(6), 567-583. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.015>
- Hornstra, I. K., Birge, S., Starcher, B., Bailey, A. J., Mecham, R. P., & Shapiro, S. D. (2003). Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14387-14393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210144200>
- Hu, N., Sedmera, D., Yost, H. J., & Clark, E. B. (2000). Structure and function of the developing zebrafish heart. *The Anatomical Record*, 260(2), 148-157. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20001001\)260:2<148::AID-AR50>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20001001)260:2<148::AID-AR50>3.0.CO;2-X)
- Hu, N., Yost, H. J., & Clark, E. B. (2001). Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *The Anatomical Record*, 264(1), 1-12. <https://doi.org/10.1002/ar.1111>
- Hu, Q., Reymond, J.-L., Pinel, N., Zobot, M.-T., & Urban, Z. (2006). Inflammatory destruction of elastic fibers in acquired cutis laxa is associated with missense alleles in the elastin and fibulin-5 genes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126(2), 283-290. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700047>
- Humphrey, J. D., Schwartz, M. A., Tellides, G., & Milewicz, D. M. (2015). Role of Mechanotransduction in Vascular Biology. *Circulation Research*, 116(8), 1448-1461. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.304936>
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J.-R. J., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227-229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>
- Icardo, J. M., & Colvee, E. (2011). The Atrioventricular Region of the Teleost Heart. A Distinct Heart Segment. *The Anatomical Record*, 294(2), 236-242. <https://doi.org/10.1002/ar.21320>
- Iliev, D. B., Roach, J. C., Mackenzie, S., Planas, J. V., & Goetz, F. W. (2005). Endotoxin recognition : In fish or not in fish? *FEBS Letters*, 579(29), 6519-6528. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.061>
- Iliopoulos, D. C., Kritharis, E. P., Giagini, A. T., Papadodima, S. A., & Sokolis, D. P. (2009). Ascending thoracic aortic aneurysms are associated with compositional remodeling and vessel stiffening but not weakening in age-matched subjects. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 137(1), 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.07.023>

- Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function : A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 42, 11-55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>
- Islam, S., & Watanabe, H. (2020). Versican : A Dynamic Regulator of the Extracellular Matrix. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 68(11), 763-775. <https://doi.org/10.1369/0022155420953922>
- Isogai, Z., Aspberg, A., Keene, D. R., Ono, R. N., Reinhardt, D. P., & Sakai, L. Y. (2002). Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4565-4572. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110583200>
- Izzo, J. L., & Shykoff, B. E. (2001). Arterial stiffness : Clinical relevance, measurement, and treatment. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 2(1), 29-34, 37-40.
- Jacob, M.-P. (2003). L'invalidation du gène de la fibuline-5 induit une élastinopathie. *médecine/sciences*, 19(4), Article 4. <https://doi.org/10.1051/medsci/2003194395>
- Jaisson, S., Kerkeni, M., Santos-Weiss, I. C. R., Addad, F., Hammami, M., & Gillery, P. (2015). Increased serum homocitrulline concentrations are associated with the severity of coronary artery disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53(1), 103-110. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0642>
- Jana, S., Hu, M., Shen, M., & Kassiri, Z. (2019). Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0286-3>
- Janssens, S., & Lijnen, H. R. (2006). What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models? *Cardiovascular Research*, 69(3), 585-594. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.010>
- Jariwala, N., Ozols, M., Bell, M., Bradley, E., Gilmore, A., Debelle, L., & Sherratt, M. J. (2022). Matrikines as mediators of tissue remodelling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 185, 114240. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114240>
- Jensen, D. E., Rich, C. B., Terpstra, A. J., Farmer, S. R., & Foster, J. A. (1995). Transcriptional regulation of the elastin gene by insulin-like growth factor-I involves disruption of Sp1 binding. Evidence for the role of Rb in mediating Sp1 binding in aortic smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(12), 6555-6563. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6555>
- Jensen, S. A., Vrhovski, B., & Weiss, A. S. (2000). Domain 26 of Tropoelastin Plays a Dominant Role in Association by Coacervation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28449-28454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004265200>
- Jiao, Y., Li, G., Korneva, A., Caulk, A. W., Qin, L., Bersi, M. R., Li, Q., Li, W., Mecham, R. P., Humphrey, J. D., & Tellides, G. (2017). Deficient Circumferential Growth Is the Primary Determinant of Aortic Obstruction Attributable to Partial Elastin Deficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(5), 930-941. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309079>
- Johnson, R. T., Solanki, R., & Warren, D. T. (2021). Mechanical programming of arterial smooth muscle cells in health and ageing. *Biophysical Reviews*, 13(5), 757-768. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00833-6>
- Jung, H. M., Isogai, S., Kamei, M., Castranova, D., Gore, A. V., & Weinstein, B. M. (2016). Imaging blood vessels and lymphatic vessels in the zebrafish. *Methods in Cell Biology*, 133, 69-103. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.03.023>
- Kaartinen, V., & Warburton, D. (2003). Fibrillin controls TGF-beta activation. *Nature Genetics*, 33(3), 331-332. <https://doi.org/10.1038/ng0303-331>
- Kähäri, V. M. (1994). Dexamethasone suppresses elastin gene expression in human skin fibroblasts in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201(3), 1189-1196. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1831>
- Kähäri, V. M., Chen, Y. Q., Bashir, M. M., Rosenbloom, J., & Uitto, J. (1992). Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(36), 26134-26141.

- Kähäri, V. M., Fazio, M. J., Chen, Y. Q., Bashir, M. M., Rosenbloom, J., & Uitto, J. (1990). Deletion analyses of 5'-flanking region of the human elastin gene. Delineation of functional promoter and regulatory cis-elements. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(16), 9485-9490.
- Karam, J. A., Vazquez, D. V., Lin, V. K., & Zimmern, P. E. (2007). Elastin expression and elastic fibre width in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with and without prolapse. *BJU International*, *100*(2), 346-350. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2007.06998.x>
- Karamanos, N. K., Piperigkou, Z., Theocharis, A. D., Watanabe, H., Franchi, M., Baud, S., Brézillon, S., Götte, M., Passi, A., Vigetti, D., Ricard-Blum, S., Sanderson, R. D., Neill, T., & Iozzo, R. V. (2018). Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics. *Chemical Reviews*, *118*(18), 9152-9232. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00354>
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S. S., Vynios, D. H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C. E. H., Duca, L., Durbeej, M., Afratis, N. A., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V., & Onisto, M. (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS Journal*, *288*(24), 6850-6912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>
- Karnik, S. K., Brooke, B. S., Bayes-Genis, A., Sorensen, L., Wythe, J. D., Schwartz, R. S., Keating, M. T., & Li, D. Y. (2003). A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development (Cambridge, England)*, *130*(2), 411-423. <https://doi.org/10.1242/dev.00223>
- Karnik, S. K., Wythe, J. D., Sorensen, L., Brooke, B. S., Urness, L. D., & Li, D. Y. (2003). Elastin induces myofibrillogenesis via a specific domain, VGVAPG. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *22*(5), 409-425. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(03\)00076-3](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(03)00076-3)
- Karoulias, S. Z., Taye, N., Stanley, S., & Hubmacher, D. (2020). The ADAMTS/Fibrillin Connection : Insights into the Biological Functions of ADAMTS10 and ADAMTS17 and Their Respective Sister Proteases. *Biomolecules*, *10*(4), 596. <https://doi.org/10.3390/biom10040596>
- Kawecki, C., Bocquet, O., Schmelzer, C. E. H., Heinz, A., Ihling, C., Wahart, A., Romier, B., Bennisroune, A., Blaise, S., Terryn, C., Linton, K. J., Martiny, L., Duca, L., & Maurice, P. (2019). Identification of CD36 as a new interaction partner of membrane NEU1 : Potential implication in the pro-atherogenic effects of the elastin receptor complex. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *76*(4), 791-807. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2978-6>
- Kawecki, C., Hézard, N., Bocquet, O., Poitevin, G., Rabenoelina, F., Kauskot, A., Duca, L., Blaise, S., Romier, B., Martiny, L., Nguyen, P., Debelle, L., & Maurice, P. (2014). Elastin-derived peptides are new regulators of thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *34*(12), 2570-2578. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304432>
- Kelleher, C. M., McLean, S. E., & Mecham, R. P. (2004). Vascular extracellular matrix and aortic development. *Current Topics in Developmental Biology*, *62*, 153-188. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)62006-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)62006-0)
- Kettleborough, R. N. W., Busch-Nentwich, E. M., Harvey, S. A., Dooley, C. M., de Bruijn, E., van Eeden, F., Sealy, I., White, R. J., Herd, C., Nijman, I. J., Fényes, F., Mehroke, S., Scahill, C., Gibbons, R., Wali, N., Carruthers, S., Hall, A., Yen, J., Cuppen, E., & Stemple, D. L. (2013). A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, *496*(7446), 494-497. <https://doi.org/10.1038/nature11992>
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J., & Shuttleworth, C. A. (2002). Elastic fibres. *Journal of Cell Science*, *115*(14), 2817-2828. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.14.2817>
- Kielty, C. M., Sherratt, Michael. J., Marson, A., & Baldock, C. (2005). Fibrillin Microfibrils. In *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 70, p. 405-436). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70012-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70012-7)
- Kinnear, C., Chang, W. Y., Khattak, S., Hinek, A., Thompson, T., de Carvalho Rodrigues, D., Kennedy, K., Mahmut, N., Pasceri, P., Stanford, W. L., Ellis, J., & Mital, S. (2013). Modeling and Rescue of the Vascular Phenotype of Williams-Beuren Syndrome in Patient Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, *2*(1), Article 1. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0054>
- Kodigepalli, K. M., Thatcher, K., West, T., Howsmon, D. P., Schoen, F. J., Sacks, M. S., Breuer, C. K., & Lincoln, J. (2020). Biology and Biomechanics of the Heart Valve Extracellular Matrix. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, *7*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/jcdd7040057>

- Koeth, R. A., Kalantar-Zadeh, K., Wang, Z., Fu, X., Tang, W. H. W., & Hazen, S. L. (2013). Protein carbamylation predicts mortality in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *24*(5), 853-861. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012030254>
- Konova, E., Baydanoff, S., Atanasova, M., & Velkova, A. (2004). Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Experimental Gerontology*, *39*(2), 249-254. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.10.003>
- Korkmaz, B., Horwitz, M. S., Jenne, D. E., & Gauthier, F. (2010). Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacological Reviews*, *62*(4), 726-759. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002733>
- Kowara, M., Cudnoch-Jedrzejewska, A., Opolski, G., & Wlodarski, P. (2017). MicroRNA regulation of extracellular matrix components in the process of atherosclerotic plaque destabilization. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *44*(7), 711-718. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12772>
- Kozel, B. A., Barak, B., Ae Kim, C., Mervis, C. B., Osborne, L. R., Porter, M., & Pober, B. R. (2021). Williams syndrome. *Nature reviews. Disease primers*, *7*(1), 42. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00276-z>
- Kozel, B. A., Ciliberto, C. H., & Mecham, R. P. (2004). Deposition of tropoelastin into the extracellular matrix requires a competent elastic fiber scaffold but not live cells. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *23*(1), 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.02.004>
- Kozel, B. A., & Mecham, R. P. (2019). Elastic Fiber Ultrastructure and Assembly. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, *84*, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.10.002>
- Kozel, B. A., Rongish, B. J., Czirok, A., Zach, J., Little, C. D., Davis, E. C., Knutsen, R. H., Wagenseil, J. E., Levy, M. A., & Mecham, R. P. (2006). Elastic fiber formation : A dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *Journal of Cellular Physiology*, *207*(1), 87-96. <https://doi.org/10.1002/jcp.20546>
- Kozel, B. A., Wachi, H., Davis, E. C., & Mecham, R. P. (2003). Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(20), 18491-18498. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212715200>
- Kraus, L. M., & Kraus, A. P. (2001). Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney International. Supplement*, *78*, S102-107. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.59780102.x>
- Kretz, R., Bozorgmehr, B., Kariminejad, M. H., Rohrbach, M., Hausser, I., Baumer, A., Baumgartner, M., Giunta, C., Kariminejad, A., & Häberle, J. (2011). Defect in proline synthesis : Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 deficiency leads to a complex clinical phenotype with collagen and elastin abnormalities. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *34*(3), 731-739. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9319-3>
- Krishnamurthy, V. K., Opoka, A. M., Kern, C. B., Guilak, F., Narmoneva, D. A., & Hinton, R. B. (2012). Maladaptive matrix remodeling and regional biomechanical dysfunction in a mouse model of aortic valve disease. *Matrix Biology*, *31*(3), 197-205. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.01.001>
- Kuang, P.-P., Berk, J. L., Rishikof, D. C., Foster, J. A., Humphries, D. E., Ricupero, D. A., & Goldstein, R. H. (2002). NF-kappaB induced by IL-1beta inhibits elastin transcription and myofibroblast phenotype. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *283*(1), C58-65. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00314.2001>
- Kuang, P.-P., Zhang, X.-H., Rich, C. B., Foster, J. A., Subramanian, M., & Goldstein, R. H. (2007). Activation of elastin transcription by transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *292*(4), L944-952. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00184.2006>
- Kuna, M., Mahdi, F., Chade, A. R., & Bidwell, G. L. (2018). Molecular Size Modulates Pharmacokinetics, Biodistribution, and Renal Deposition of the Drug Delivery Biopolymer Elastin-like Polypeptide. *Scientific Reports*, *8*(1), 7923. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24897-9>
- Kuna, M., Waller, J. P., Logue, O. C., & Bidwell, G. L. (2018). Polymer size affects biodistribution and placental accumulation of the drug delivery biopolymer elastin-like polypeptide in a rodent pregnancy model. *Placenta*, *72-73*, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.10.005>

- Lacolley, P., Regnault, V., Segers, P., & Laurent, S. (2017). Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening : Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiological Reviews*, 97(4), 1555-1617. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2017>
- Lafuse, W. P., Wozniak, D. J., & Rajaram, M. V. S. (2021). Role of Cardiac Macrophages on Cardiac Inflammation, Fibrosis and Tissue Repair. *Cells*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/cells10010051>
- Lasheras, J. C. (2007). The Biomechanics of Arterial Aneurysms. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 39(1), 293-319. <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.39.050905.110128>
- Lawson, N. D., & Weinstein, B. M. (2002). In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Developmental Biology*, 248(2), Article 2. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0711>
- Lecaille, F., Chazeirat, T., Saidi, A., & Lalmanach, G. (2022). Cathepsin V : Molecular characteristics and significance in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 88, 101086. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101086>
- Lee, C. J., Paull, G. C., & Tyler, C. R. (2022). Improving zebrafish laboratory welfare and scientific research through understanding their natural history. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 97(3), 1038-1056. <https://doi.org/10.1111/brv.12831>
- Lenning, M., Fortunato, J., Le, T., Clark, I., Sherpa, A., Yi, S., Hofsteen, P., Thamilarasu, G., Yang, J., Xu, X., Han, H.-D., Hsiai, T. K., & Cao, H. (2018). Real-Time Monitoring and Analysis of Zebrafish Electrocardiogram with Anomaly Detection. *Sensors*, 18(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/s18010061>
- Leppert, P. C., & Yu, S. Y. (1991). Three-Dimensional Structures of Uterine Elastic Fibers : Scanning Electron Microscopic Studies. *Connective Tissue Research*, 27(1), 15-31. <https://doi.org/10.3109/03008209109006992>
- Leung, C. M., de Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G.-A., Ko, J., Rho, H. S., Chen, Z., Habibovic, P., Jeon, N. L., Takayama, S., Shuler, M. L., Vunjak-Novakovic, G., Frey, O., Verpoorte, E., & Toh, Y.-C. (2022). A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6>
- Li, W., Li, Q., Qin, L., Ali, R., Qyang, Y., Tassabehji, M., Pober, B. R., Sessa, W. C., Giordano, F. J., & Tellides, G. (2013). Rapamycin inhibits smooth muscle cell proliferation and obstructive arteriopathy attributable to elastin deficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(5), 1028-1035. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300407>
- Li, W., Zhang, Y., Han, B., Li, L., Li, M., Lu, X., Chen, C., Lu, M., Zhang, Y., Jia, X., Zhu, Z., Tong, X., & Zhang, B. (2019). One-step efficient generation of dual-function conditional knockout and geno-tagging alleles in zebrafish. *ELife*, 8, e48081. <https://doi.org/10.7554/eLife.48081>
- Lieschke, G. J., Oates, A. C., Crowhurst, M. O., Ward, A. C., & Layton, J. E. (2001). Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood*, 98(10), 3087-3096. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.10.3087>
- Lillie, M. A., & Gosline, J. M. (2007). Limits to the durability of arterial elastic tissue. *Biomaterials*, 28(11), 2021-2031. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.016>
- Lin, C.-J., Staiculescu, M. C., Hawes, J. Z., Cocciolone, A. J., Hunkins, B. M., Roth, R. A., Lin, C.-Y., Mecham, R. P., & Wagenseil, J. E. (2019). Heterogeneous Cellular Contributions to Elastic Laminae Formation in Arterial Wall Development. *Circulation research*, 125(11), 1006-1018. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315348>
- Lin, H.-S., Huang, Y.-L., Wang, Y.-R. S., Hsiao, E., Hsu, T.-A., Shiao, H.-Y., Jiaang, W.-T., Sampurna, B. P., Lin, K.-H., Wu, M.-S., Lai, G.-M., & Yuh, C.-H. (2019). Identification of Novel Anti-Liver Cancer Small Molecules with Better Therapeutic Index than Sorafenib via Zebrafish Drug Screening Platform. *Cancers*, 11(6), 739. <https://doi.org/10.3390/cancers11060739>
- Liu, G., Hitomi, H., Hosomi, N., Lei, B., Nakano, D., Deguchi, K., Mori, H., Masaki, T., Ma, H., Griendling, K. K., & Nishiyama, A. (2011). Mechanical stretch augments insulin-induced vascular smooth muscle cell proliferation by insulin-like growth factor-1 receptor. *Experimental Cell Research*, 317(17), 2420-2428. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.07.016>

- Liu, J. M., & Davidson, J. M. (1988). The elastogenic effect of recombinant transforming growth factor-beta on porcine aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *154*(3), 895-901. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(88\)90224-0](https://doi.org/10.1016/0006-291x(88)90224-0)
- Liu, J., Sukhova, G. K., Yang, J.-T., Sun, J., Ma, L., Ren, A., Xu, W.-H., Fu, H., Dolganov, G. M., Hu, C., Libby, P., & Shi, G.-P. (2006). Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells. *Atherosclerosis*, *184*(2), 302-311. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.05.012>
- Liu, M., & Gomez, D. (2019). Smooth Muscle Cell Phenotypic Diversity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *39*(9), 1715-1723. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312131>
- Liu, X., Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J. A., Yanagisawa, H., Zuo, J., & Li, T. (2004). Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nature Genetics*, *36*(2), 178-182. <https://doi.org/10.1038/ng1297>
- Liu, Y., Li, X., Peng, D., Tan, Z., Liu, H., Qing, Y., Xue, Y., & Shi, G.-P. (2009). Usefulness of Serum Cathepsin L as an Independent Biomarker in Patients With Coronary Heart Disease. *The American journal of cardiology*, *103*(4), 476-481. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.10.011>
- Lobbes, M. B. I., Heeneman, S., Passos, V. L., Welten, R., Kwee, R. M., van der Geest, R. J., Wiethoff, A. J., Caravan, P., Misselwitz, B., Daemen, M. J. A. P., van Engelshoven, J. M. A., Leiner, T., & Kooi, M. E. (2010). Gadofosveset-enhanced magnetic resonance imaging of human carotid atherosclerotic plaques : A proof-of-concept study. *Investigative Radiology*, *45*(5), 275-281. <https://doi.org/10.1097/RLI.0b013e3181d5466b>
- Lockhart-Cairns, M. P., Cain, S. A., Dajani, R., Steer, R., Thomson, J., Alanazi, Y. F., Kielty, C. M., & Baldock, C. (2022). Latent TGFβ complexes are transglutaminase cross-linked to fibrillin to facilitate TGFβ activation. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *107*, 24-39. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2022.01.005>
- Lockhart-Cairns, M. P., Newandee, H., Thomson, J., Weiss, A. S., Baldock, C., & Tarakanova, A. (2020). Transglutaminase-Mediated Cross-Linking of Tropoelastin to Fibrillin Stabilises the Elastin Precursor Prior to Elastic Fibre Assembly. *Journal of Molecular Biology*, *432*(21), 5736-5751. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.023>
- Lorion, C. (2015). *Développement, caractérisation et potentiels thérapeutiques d'Elactiv', une protéine élastique biomimétique, inspirée de la tropoélastine humaine*. UCBL.
- Luisetti, M., Ma, S., Iadarola, P., Stone, P. J., Viglio, S., Casado, B., Lin, Y. Y., Snider, G. L., & Turino, G. M. (2008). Desmosine as a biomarker of elastin degradation in COPD : Current status and future directions. *European Respiratory Journal*, *32*(5), 1146-1157. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174807>
- Lupu, F., Kinasevitz, G., & Dormer, K. (2020). The role of endothelial shear stress on haemodynamics, inflammation, coagulation and glycocalyx during sepsis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *24*(21), 12258-12271. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15895>
- MacEwan, S. R., & Chilkoti, A. (2010). Elastin-like polypeptides : Biomedical applications of tunable biopolymers. *Biopolymers*, *94*(1), 60-77. <https://doi.org/10.1002/bip.21327>
- Maeda, I., Mizoiri, N., Briones, M. P. P., & Okamoto, K. (2007). Induction of macrophage migration through lactose-insensitive receptor by elastin-derived nonapeptides and their analog. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, *13*(4), 263-268. <https://doi.org/10.1002/psc.845>
- Maquart, F.-X., Pasco, S., Ramont, L., Hornebeck, W., & Monboisse, J.-C. (2004). An introduction to matrikines : Extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *49*(3), 199-202. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.06.007>
- Maquart, F.-X., Siméon, A., Pasco, S., & Monboisse, J.-C. (1999). Régulation de l'activité cellulaire par la matrice extracelulaire : Le concept de matrikines. *Journal de la Société de Biologie*, *193*(4-5), Article 4-5. <https://doi.org/10.1051/jbio/1999193040423>
- Marques, I. J., Lupi, E., & Mercader, N. (2019). Model systems for regeneration : Zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, *146*(18), dev167692. <https://doi.org/10.1242/dev.167692>

- Martin, R. T., & Bartman, T. (2009). Analysis of heart valve development in larval zebrafish. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 238(7), 1796-1802. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21976>
- Martino, M., & Tamburro, A. M. (2001). Chemical synthesis of cross-linked poly(KGGVG), an elastin-like biopolymer. *Biopolymers*, 59(1), 29-37. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(200107\)59:1<29::AID-BIP1003>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0282(200107)59:1<29::AID-BIP1003>3.0.CO;2-F)
- Martins-Oliveira, A., Castro, M. M., Oliveira, D. M. M., Rizzi, E., Ceron, C. S., Guimaraes, D., Reis, R. I., Costa-Neto, C. M., Casarini, D. E., Ribeiro, A. A., Gerlach, R. F., & Tanus-Santos, J. E. (2013). Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. *International Journal of Cardiology*, 167(4), 1199-1205. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.03.137>
- Martufi, G., & Gasser, T. C. (2012). Turnover of fibrillar collagen in soft biological tissue with application to the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(77), 3366-3377. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0416>
- Marzin, P., Cormier-Daire, V., & Tsilou, E. (1993). Weill-Marchesani Syndrome. In M. P. Adam, D. B. Everman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Éds.), *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1114/>
- Matrone, G., Maqsood, S., Taylor, J., Mullins, J. J., Tucker, C. S., & Denvir, M. A. (2014). Targeted Laser Ablation of the Zebrafish Larval Heart Induces Models of Heart Block, Valvular Regurgitation, and Outflow Tract Obstruction. *Zebrafish*, 11(6), 536-541. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1027>
- Mattes, W. B. (2020). In vitro to in vivo translation. *Current Opinion in Toxicology*, 23-24, 114-118. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.09.001>
- Mauviel, A., Chen, Y. Q., Kähäri, V. M., Ledo, I., Wu, M., Rudnicka, L., & Uitto, J. (1993). Human recombinant interleukin-1 beta up-regulates elastin gene expression in dermal fibroblasts. Evidence for transcriptional regulation in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6520-6524.
- McGowan, S. E., Jackson, S. K., Olson, P. J., Parekh, T., & Gold, L. I. (1997). Exogenous and endogenous transforming growth factors-beta influence elastin gene expression in cultured lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 17(1), 25-35. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.17.1.2686>
- Mead, T. J., & Apte, S. S. (2018). ADAMTS proteins in human disorders. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 71-72, 225-239. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.06.002>
- Mecham, R. P. (2008). Methods in Elastic Tissue Biology : Elastin Isolation and Purification. *Methods (San Diego, Calif.)*, 45(1), 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.01.007>
- Mecham, R. P., & Gibson, M. A. (2015). The Microfibril-Associated Glycoproteins (MAGPs) and the Microfibrillar Niche. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 47, 13-33. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.003>
- Médicaments pour traiter l'hypertension. (2017). *Medical Letter*, 1516, 57-66.
- Meneghetti, M. C. Z., Hughes, A. J., Rudd, T. R., Nader, H. B., Powell, A. K., Yates, E. A., & Lima, M. A. (2015). Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *Journal of the Royal Society, Interface*, 12(110), 0589. <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0589>
- Merrilees, M. J., Lemire, J. M., Fischer, J. W., Kinsella, M. G., Braun, K. R., Clowes, A. W., & Wight, T. N. (2002). Retrovirally mediated overexpression of versican v3 by arterial smooth muscle cells induces tropoelastin synthesis and elastic fiber formation in vitro and in neointima after vascular injury. *Circulation Research*, 90(4), Article 4.
- Mervis, C. B., Morris, C. A., Klein-Tasman, B. P., Velleman, S. L., & Osborne, L. R. (1993). 7q11.23 Duplication Syndrome. In M. P. Adam, D. B. Everman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Éds.), *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK327268/>
- Metaxa-Mariatou, V., McGavigan, C. J., Robertson, K., Stewart, C., Cameron, I. T., & Campbell, S. (2002). Elastin distribution in the myometrial and vascular smooth muscle of the human uterus. *Molecular Human Reproduction*, 8(6), 559-565. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.6.559>

- Meyer, D. E., & Chilkoti, A. (1999). Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nature Biotechnology*, 17(11), 1112-1115. <https://doi.org/10.1038/15100>
- Meyer, D. E., & Chilkoti, A. (2004). Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, 5(3), 846-851. <https://doi.org/10.1021/bm034215n>
- Miao, M., Bellingham, C. M., Stahl, R. J., Sitarz, E. E., Lane, C. J., & Keeley, F. W. (2003). Sequence and structure determinants for the self-aggregation of recombinant polypeptides modeled after human elastin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48553-48562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308465200>
- Miao, M., Bruce, A. E. E., Bhanji, T., Davis, E. C., & Keeley, F. W. (2007). Differential expression of two tropoelastin genes in zebrafish. *Matrix Biology*, 26(2), 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.09.011>
- Miao, M., Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Sitarz, E. E., Sharpe, S., & Keeley, F. W. (2017). Single nucleotide polymorphisms and domain/splice variants modulate assembly and elastomeric properties of human elastin. Implications for tissue specificity and durability of elastic tissue. *Biopolymers*, 107(5), e23007. <https://doi.org/10.1002/bip.23007>
- Michel, J.-B. (2020). Phylogenic Determinants of Cardiovascular Frailty, Focus on Hemodynamics and Arterial Smooth Muscle Cells. *Physiological Reviews*, 100(4), 1779-1837. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2019>
- Miekus, N., Luise, C., Sippl, W., Baczek, T., Schmelzer, C. E. H., & Heinz, A. (2019). MMP-14 degrades tropoelastin and elastin. *Biochimie*, 165, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.001>
- Mikhaylova, L., Malmquist, J., & Nurminskaya, M. (2007). Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a. *Calcified Tissue International*, 81(5), 372-381. <https://doi.org/10.1007/s00223-007-9073-6>
- Mikulíková, K., Eckhardt, A., Kunes, J., Zicha, J., & Mikšík, I. (2008). Advanced glycation end-product pentosidine accumulates in various tissues of rats with high fructose intake. *Physiological Research*, 57(1), 89-94. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931093>
- Millasseau, S. C., Stewart, A. D., Patel, S. J., Redwood, S. R., & Chowienczyk, P. J. (2005). Evaluation of carotid-femoral pulse wave velocity : Influence of timing algorithm and heart rate. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 45(2), 222-226. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000154229.97341.d2>
- Milligan, J. J., Saha, S., Jenkins, I. C., & Chilkoti, A. (2022). Genetically encoded elastin-like polypeptide nanoparticles for drug delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, 74, 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.11.006>
- Min, S., Kinnear, C., D'Alessandro, L. C. A., Bouwmeester, J., Yao, R., Chiasson, D., Keeley, F., & Mital, S. (2020). Genetic Diagnosis and the Severity of Cardiovascular Phenotype in Patients With Elastin Arteriopathy. *Circulation. Genomic and Precision Medicine*, 13(6), e002971. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.120.002971>
- Mithieux, S. M., & Weiss, A. S. (2005). Elastin. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 437-461. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9)
- Mochizuki, S., Brassart, B., & Hinek, A. (2002). Signaling Pathways Transduced through the Elastin Receptor Facilitate Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44854-44863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205630200>
- Mohamed, M. M., & Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins : Multifunctional enzymes in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(10), 764-775. <https://doi.org/10.1038/nrc1949>
- Monahan-Earley, R., Dvorak, A. M., & Aird, W. C. (2013). Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 11(Suppl 1), 46-66. <https://doi.org/10.1111/jth.12253>
- Moore, K. J., & Fisher, E. A. (2012). The double-edged sword of fibronectin in atherosclerosis. *EMBO Molecular Medicine*, 4(7), 561-563. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200238>

- Moriyama, Y., Ito, F., Takeda, H., Yano, T., Okabe, M., Kuraku, S., Keeley, F. W., & Koshiba-Takeuchi, K. (2016). Evolution of the fish heart by sub/neofunctionalization of an elastin gene. *Nature Communications*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms10397>
- Moulin, L., Cenizo, V., Antu, A. N., André, V., Pain, S., Sommer, P., & Debret, R. (2017). Methylation of LOXL1 Promoter by DNMT3A in Aged Human Skin Fibroblasts. *Rejuvenation Research*, 20(2), 103-110. <https://doi.org/10.1089/rej.2016.1832>
- Murakumo, M., Ushiki, T., Abe, K., Matsumura, K., Shinno, Y., & Koyanagi, T. (1995). Three-Dimensional Arrangement of Collagen and Elastin Fibers in the Human Urinary Bladder : A Scanning Electron Microscopic Study. *Journal of Urology*, 154(1), 251-256. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)67289-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)67289-6)
- Myers, B., Dubick, M., Last, J. A., & Rucker, R. B. (1983). Elastin synthesis during perinatal lung development in the rat. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 761(1), 17-22. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(83\)90357-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(83)90357-4)
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), 562-573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
- Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2006). Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 102, 47-90. <https://doi.org/10.1007/b137240>
- Niculet, E., Bobeica, C., & Tatu, A. L. (2020). <p>Glucocorticoid-Induced Skin Atrophy : The Old and the New</p>. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 13, 1041-1050. <https://doi.org/10.2147/CCID.S224211>
- Noda, K., Kitagawa, K., Miki, T., Horiguchi, M., Akama, T. O., Taniguchi, T., Taniguchi, H., Takahashi, K., Ogra, Y., Mecham, R. P., Terajima, M., Yamauchi, M., & Nakamura, T. (2020). A matricellular protein fibulin-4 is essential for the activation of lysyl oxidase. *Science Advances*, 6(48), eabc1404. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc1404>
- Ochieng, J., Furtak, V., & Lukyanov, P. (2002). Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate Journal*, 19(7-9), 527-535. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014082.99675.2f>
- Ochieng, J., Warfield, P., Green-Jarvis, B., & Fentie, I. (1999). Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(3), 505-514. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(19991201\)75:3<505::aid-jcb14>3.3.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(19991201)75:3<505::aid-jcb14>3.3.co;2-9)
- O'Connell, M. K., Murthy, S., Phan, S., Xu, C., Buchanan, J., Spilker, R., Dalman, R. L., Zarins, C. K., Denk, W., & Taylor, C. A. (2008). The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 27(3), 171-181. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.10.008>
- O'Donnell, A., & Yutzey, K. E. (2020). To EndoMT or Not to EndoMT : Zebrafish Heart Valve Development. *Circulation Research*, 126(8), 985-987. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316846>
- OECD. (2013). *Test No. 236 : Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. Organisation for Economic Co-operation and Development. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., & Folkman, J. (1997). Endostatin : An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88(2), 277-285. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81848-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81848-6)
- O'Rourke, M. F., Safar, M. E., & Dzau, V. (2010). The Cardiovascular Continuum extended : Aging effects on the aorta and microvasculature. *Vascular Medicine (London, England)*, 15(6), 461-468. <https://doi.org/10.1177/1358863X10382946>
- Ozsvar, J., Yang, C., Cain, S. A., Baldock, C., Tarakanova, A., & Weiss, A. S. (2021). Tropoelastin and Elastin Assembly. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 643110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.643110>
- Pan, S. (2009). Molecular Mechanisms Responsible for the Atheroprotective Effects of Laminar Shear Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7), 1669-1682. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2487>

- Parashar, A., Gourgas, O., Lau, K., Li, J., Muiznieks, L., Sharpe, S., Davis, E., Cerruti, M., & Murshed, M. (2021). Elastin calcification in in vitro models and its prevention by MGP's N-terminal peptide. *Journal of Structural Biology*, 213(1), 107637. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107637>
- Park, J. E., JebaMercy, G., Pazhanchamy, K., Guo, X., Ngan, S. C., Liou, K. C. K., Lynn, S. E., Ng, S. S., Meng, W., Lim, S. C., Leow, M. K.-S., Richards, A. M., Pennington, D. J., de Kleijn, D. P. V., Sorokin, V., Ho, H. H., McCarthy, N. E., & Sze, S. K. (2021). Aging-induced isoDGR-modified fibronectin activates monocytic and endothelial cells to promote atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 324, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.020>
- Patton, E. E., Zon, L. I., & Langenau, D. M. (2021). Zebrafish disease models in drug discovery : From preclinical modelling to clinical trials. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(8), 611-628. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00210-8>
- Pauty, J., Usuba, R., Takahashi, H., Suehiro, J., Fujisawa, K., Yano, K., Nishizawa, T., & Matsunaga, Y. T. (2017). A Vascular Permeability Assay Using an In Vitro Human Microvessel Model Mimicking the Inflammatory Condition. *Nanotheranostics*, 1(1), 103-113. <https://doi.org/10.7150/ntno.18303>
- Pecoraro, R., Marino, F., Salvaggio, A., Capparucci, F., Di Caro, G., Iaria, C., Salvo, A., Rotondo, A., Tibullo, D., Guerriero, G., Scalisi, E. M., Zimbone, M., Impellizzeri, G., & Brundo, M. V. (2017). Evaluation of Chronic Nanosilver Toxicity to Adult Zebrafish. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.01011>
- Peddi, S., Roberts, S. K., & MacKay, J. A. (2020). Nanotoxicology of an Elastin-like Polypeptide Rapamycin Formulation for Breast Cancer. *Biomacromolecules*, 21(3), 1091-1102. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01431>
- Pensado-López, A., Fernández-Rey, J., Reimunde, P., Crecente-Campo, J., Sánchez, L., & Torres Andón, F. (2021). Zebrafish Models for the Safety and Therapeutic Testing of Nanoparticles with a Focus on Macrophages. *Nanomaterials*, 11(7), 1784. <https://doi.org/10.3390/nano11071784>
- Petit, C., Karkhaneh Yousefi, A.-A., Ben Moussa, O., Michel, J.-B., Guignandon, A., & Avril, S. (2021). Regulation of SMC traction forces in human aortic thoracic aneurysms. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 20(2), 717-731. <https://doi.org/10.1007/s10237-020-01412-6>
- Petit, C., Karkhaneh Yousefi, A.-A., Guilbot, M., Barnier, V., & Avril, S. (2022). Atomic Force Microscopy Stiffness Mapping in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Journal of Biomechanical Engineering*, 144(8), 081001. <https://doi.org/10.1115/1.4053657>
- Petit, C., Mousavi, S. J., & Avril, S. (2019). Chapter 6—Review of the Essential Roles of SMCs in ATAA Biomechanics. In M. H. Doweidar (Éd.), *Advances in Biomechanics and Tissue Regeneration* (p. 95-114). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816390-0.00006-6>
- Phillippi, J. A. (2022). On vasa vasorum : A history of advances in understanding the vessels of vessels. *Science Advances*, 8(16), eabl6364. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl6364>
- Phinikaridou, A., Andia, M. E., Protti, A., Indermuehle, A., Shah, A., Smith, A., Warley, A., & Botnar, R. M. (2012). Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. *Circulation*, 126(6), 707-719. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.092098>
- Phinikaridou, A., Lacerda, S., Lavin, B., Andia, M. E., Smith, A., Saha, P., & Botnar, R. M. (2018). Tropoelastin : A novel marker for plaque progression and instability. *Circulation. Cardiovascular Imaging*, 11(8), e007303. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.117.007303>
- Plaimauer, B., Zimmermann, K., Völkel, D., Antoine, G., Kerschbaumer, R., Jenab, P., Furlan, M., Gerritsen, H., Lämmle, B., Schwarz, H. P., & Scheiflinger, F. (2002). Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood*, 100(10), 3626-3632. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1397>
- Plenz, G. A. M., Deng, M. C., Robenek, H., & Völker, W. (2003). Vascular collagens : Spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 166(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(01\)00766-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(01)00766-3)

- Pocock, G., Richards, C., & Richards, D. (2019). *Physiologie humaine et physiopathologie* (5th éd.). Elsevier.
- Pocza, P., Süli-Vargha, H., Darvas, Z., & Falus, A. (2008). Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *International Journal of Cancer*, *122*(9), 1972-1980. <https://doi.org/10.1002/ijc.23296>
- Poon, K. L., & Brand, T. (2013). The zebrafish model system in cardiovascular research : A tiny fish with mighty prospects. *Global Cardiology Science and Practice*, *2013*(1), 4. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.4>
- Procknow, S. S., & Kozel, B. A. (2022). Emerging mechanisms of elastin transcriptional regulation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *323*(3), C666-C677. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00228.2022>
- Prykhozhiy, S. V., Fuller, C., Steele, S. L., Veinotte, C. J., Razaghi, B., Robitaille, J. M., McMaster, C. R., Shlien, A., Malkin, D., & Berman, J. N. (2018). Optimized knock-in of point mutations in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Nucleic Acids Research*, *46*(17), e102. <https://doi.org/10.1093/nar/gky512>
- Rabkin, S. W. (2017). The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 147, p. 239-265). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.002>
- Rahn, D. D., Acevedo, J. F., & Word, R. A. (2008). Effect of vaginal distention on elastic fiber synthesis and matrix degradation in the vaginal wall : Potential role in the pathogenesis of pelvic organ prolapse. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *295*(4), R1351-1358. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90447.2008>
- Randell, A., & Daneshtalab, N. (2017). Elastin microfibril interface-located protein 1, transforming growth factor beta, and implications on cardiovascular complications. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH*, *11*(7), 437-448. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2017.04.010>
- Rapaka, R. S., & Urry, D. W. (1978). Coacervation of sequential polypeptide models of tropoelastin. Synthesis of H-(Val-Ala-Pro-Gly)_n-Val-OMe and H-(Val-Pro-Gly-Gly)_n-Val-OMe. *International Journal of Peptide and Protein Research*, *11*(2), 97-108.
- Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Lu, R., Sharpe, S., & Keeley, F. W. (2019). Sequence variants of human tropoelastin affecting assembly, structural characteristics and functional properties of polymeric elastin in health and disease. *Matrix Biology*, *84*, 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.06.010>
- Reitamo, S., Remitz, A., Tamai, K., Ledo, I., & Uitto, J. (1994). Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level. *The Biochemical Journal*, *302* (Pt 2)(Pt 2), 331-333. <https://doi.org/10.1042/bj3020331>
- Rensen, S. S. M., Doevendans, P. A. F. M., & van Eys, G. J. J. M. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal*, *15*(3), 100-108.
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(1), a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Ricard-Blum, S., & Salza, R. (2014). Matricryptins and matrikines : Biologically active fragments of the extracellular matrix. *Experimental Dermatology*, *23*(7), 457-463. <https://doi.org/10.1111/exd.12435>
- Riehl, B. D., Park, J.-H., Kwon, I. K., & Lim, J. Y. (2012). Mechanical Stretching for Tissue Engineering : Two-Dimensional and Three-Dimensional Constructs. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *18*(4), 288-300. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0465>
- Rifkin, D. B., Rifkin, W. J., & Zilberberg, L. (2018). LTBP in Biology and Medicine; LTBP Diseases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, *71-72*, 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.11.014>
- Rippel, R. A., Ghanbari, H., & Seifalian, A. M. (2012). Tissue-engineered heart valve : Future of cardiac surgery. *World Journal of Surgery*, *36*(7), 1581-1591. <https://doi.org/10.1007/s00268-012-1535-y>
- Ritz-Timme, S., & Collins, M. J. (2002). Racemization of aspartic acid in human proteins. *Ageing Research Reviews*, *1*(1), 43-59. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00363-3](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00363-3)
- Robert, L., Robert, A. M., & Fülöp, T. (2008). Rapid increase in human life expectancy : Will it soon be limited by the aging of elastin? *Biogerontology*, *9*(2), 119-133. <https://doi.org/10.1007/s10522-007-9122-6>

- Roberts, S., Dzuricky, M., & Chilkoti, A. (2015). Elastin-like polypeptides as models of intrinsically disordered proteins. *FEBS Letters*, 589(19 Pt A), 2477-2486. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.029>
- Robertson, I. B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., Hadjiolova, K., & Rifkin, D. B. (2015). Latent TGF- β -binding proteins. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 47, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.005>
- Robinet, A., Millart, H., Oszust, F., Hornebeck, W., & Bellon, G. (2007). Binding of elastin peptides to S-Gal protects the heart against ischemia/reperfusion injury by triggering the RISK pathway. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(9), 1968-1978. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6477com>
- Rodríguez-Cabello, J. C., Escalera ☆, S., Juanes-Gusano ☆, D., Santos, M., & Girotti, A. (2022). Designing Elastin-Like Recombinamers for Therapeutic and Regenerative Purposes. In *Multifunctional Hydrogels for Biomedical Applications* (p. 37-62). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527825820.ch3>
- Rodriguez-Pascual, F. (2021). The Evolutionary Origin of Elastin : Is Fibrillin the Lost Ancestor? In *Extracellular Matrix—Developments and Therapeutics*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95411>
- Roemers, R., Kluin, J., de Heer, F., Arrigoni, S., Bökenkamp, R., van Melle, J., Ebels, T., & Hazekamp, M. (2018). Surgical Correction of Supravalvar Aortic Stenosis : 52 Years' Experience. *World Journal for Pediatric & Congenital Heart Surgery*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.1177/2150135117745004>
- Romier, B., Ivaldi, C., Sartelet, H., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H., Garnotel, R., Guillot, A., Jonquet, J., Bertin, E., Guéant, J.-L., Alberto, J.-M., Bronowicki, J.-P., Amoyel, J., Hocine, T., Duca, L., Maurice, P., Bennasroune, A., Martiny, L., Debelle, L., ... Blaise, S. (2018). Production of Elastin-Derived Peptides Contributes to the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Diabetes*, 67(8), 1604-1615. <https://doi.org/10.2337/db17-0490>
- Romney, J. S., & Lewanczuk, R. Z. (2001). Vascular Compliance Is Reduced in the Early Stages of Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 24(12), 2102-2106. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.12.2102>
- Rosenbloom, J., Bashir, M., Yeh, H., Rosenbloom, J., Ornstein-Goldstein, N., Fazio, M., Kahari, V. M., & Uitto, J. (1991). Regulation of elastin gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 624, 116-136. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb17012.x>
- Rusciani, A., Duca, L., Sartelet, H., Chatron-Colliet, A., Bobichon, H., Ploton, D., Le Naour, R., Blaise, S., Martiny, L., & Debelle, L. (2010). Elastin peptides signaling relies on neuraminidase-1-dependent lactosylceramide generation. *PLoS One*, 5(11), e14010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014010>
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Rutenberg, J. B., Fischer, A., Jia, H., Gessler, M., Zhong, T. P., & Mercola, M. (2006). Developmental patterning of the cardiac atrioventricular canal by Notch and Hairy-related transcription factors. *Development (Cambridge, England)*, 133(21), 4381-4390. <https://doi.org/10.1242/dev.02607>
- Sage, E. H., & Gray, W. R. (1977). Evolution of elastin structure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 79, 291-312. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9093-0_27
- Santamaria, S., & de Groot, R. (2020). ADAMTS proteases in cardiovascular physiology and disease. *Open Biology*, 10(12), 200333. <https://doi.org/10.1098/rsob.200333>
- Santoso, F., Farhan, A., Castillo, A. L., Malhotra, N., Saputra, F., Kurnia, K. A., Chen, K. H.-C., Huang, J.-C., Chen, J.-R., & Hsiao, C.-D. (2020). An Overview of Methods for Cardiac Rhythm Detection in Zebrafish. *Biomedicine*, 8(9), 329. <https://doi.org/10.3390/biomedicine8090329>
- Sassen, W. A., & Köster, R. W. (2015). A molecular toolbox for genetic manipulation of zebrafish. *Advances in Genomics and Genetics*, 5, 151-163. <https://doi.org/10.2147/AGG.S57585>
- Scandolera, A., Rabenoelina, F., Chaintreuil, C., Rusciani, A., Maurice, P., Blaise, S., Romier-Crouzet, B., El Btaouri, H., Martiny, L., Debelle, L., & Duca, L. (2015). Uncoupling of Elastin Complex Receptor during In Vitro Aging Is Related to Modifications in Its Intrinsic Sialidase Activity and the Subsequent Lactosylceramide Production. *PLoS One*, 10(6), e0129994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129994>

- Scherz, P. J., Huisken, J., Sahai-Hernandez, P., & Stainier, D. Y. R. (2008). High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function. *Development (Cambridge, England)*, *135*(6), 1179-1187. <https://doi.org/10.1242/dev.010694>
- Schmelzer, C. E. H., & Duca, L. (2022). Elastic fibers : Formation, function, and fate during aging and disease. *The FEBS Journal*, *289*(13), 3704-3730. <https://doi.org/10.1111/febs.15899>
- Schmelzer, C. E. H., Heinz, A., Troilo, H., Lockhart-Cairns, M. P., Jowitt, T. A., Marchand, M. F., Bidault, L., Bignon, M., Hedtke, T., Barret, A., McConnell, J. C., Sherratt, M. J., Germain, S., Hulmes, D. J. S., Baldock, C., & Muller, L. (2019). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)-mediated cross-linking of tropoelastin. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(4), 5468-5481. <https://doi.org/10.1096/fj.201801860RR>
- Schuermann, A., Helker, C. S. M., & Herzog, W. (2014). Angiogenesis in zebrafish. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *31*, 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.037>
- Scott, A., Sueiro Ballesteros, L., Bradshaw, M., Tsuji, C., Power, A., Lorriman, J., Love, J., Paul, D., Herman, A., Emanuelli, C., & Richardson, R. J. (2021). In Vivo Characterization of Endogenous Cardiovascular Extracellular Vesicles in Larval and Adult Zebrafish. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *41*(9), 2454-2468. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.316539>
- Sengle, G., & Sakai, L. Y. (2015). The fibrillin microfibril scaffold : A niche for growth factors and mechanosensation? *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *47*, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.002>
- Sephel, G. C., & Davidson, J. M. (1986). Elastin Production in Human Skin Fibroblast Cultures and Its Decline with Age. *Journal of Investigative Dermatology*, *86*(3), 279-285. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12285424>
- Sepulcre, M. P., Alcaraz-Pérez, F., López-Muñoz, A., Roca, F. J., Meseguer, J., Cayuela, M. L., & Mulero, V. (2009). Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling : Fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *182*(4), 1836-1845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801755>
- Shanahan, C. M., Cary, N. R., Salisbury, J. R., Proudfoot, D., Weissberg, P. L., & Edmonds, M. E. (1999). Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis : Evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*, *100*(21), 2168-2176. <https://doi.org/10.1161/01.cir.100.21.2168>
- Shapiro, B. P., Owan, T. E., Mohammed, S. F., Meyer, D. M., Mills, L. D., Schalkwijk, C. G., & Redfield, M. M. (2008). Advanced glycation end products accumulate in vascular smooth muscle and modify vascular but not ventricular properties in elderly hypertensive canines. *Circulation*, *118*(10), 1002-1010. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.777326>
- Shapiro, S. D., Endicott, S. K., Province, M. A., Pierce, J. A., & Campbell, E. J. (1991). Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *The Journal of Clinical Investigation*, *87*(5), 1828-1834. <https://doi.org/10.1172/JCI115204>
- Shelef, M. A., Tauzin, S., & Huttenlocher, A. (2013). Neutrophil migration : Moving from zebrafish models to human autoimmunity. *Immunological Reviews*, *256*(1), 269-281. <https://doi.org/10.1111/imr.12124>
- Sherratt, M. J. (2009). Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, *31*(4), 305-325. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9103-6>
- Sherratt, M. J., Wess, T. J., Baldock, C., Ashworth, J., Purslow, P. P., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2001). Fibrillin-rich microfibrils of the extracellular matrix : Ultrastructure and assembly. *Micron (Oxford, England: 1993)*, *32*(2), 185-200. [https://doi.org/10.1016/s0968-4328\(99\)00082-7](https://doi.org/10.1016/s0968-4328(99)00082-7)
- Shi, J., Wang, A., Sen, S., Wang, Y., Kim, H. J., Mitts, T. F., & Hinek, A. (2012). Insulin induces production of new elastin in cultures of human aortic smooth muscle cells. *The American Journal of Pathology*, *180*(2), 715-726. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.022>

- Sims, T. J., Rasmussen, L. M., Oxlund, H., & Bailey, A. J. (1996). The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening. *Diabetologia*, 39(8), 946-951. <https://doi.org/10.1007/BF00403914>
- Sivaraman, B., Bashur, C. A., & Ramamurthi, A. (2012). Advances in biomimetic regeneration of elastic matrix structures. *Drug delivery and translational research*, 2(5), 323-350. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0070-6>
- Sokolis, D. P., Kritharis, E. P., Giagini, A. T., Lampropoulos, K. M., Papadodima, S. A., & Iliopoulos, D. C. (2012). Biomechanical response of ascending thoracic aortic aneurysms : Association with structural remodelling. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 15(3), 231-248. <https://doi.org/10.1080/10255842.2010.522186>
- Soldatos, G., & Cooper, M. E. (2006). Advanced glycation end products and vascular structure and function. *Current Hypertension Reports*, 8(6), 472-478. <https://doi.org/10.1007/s11906-006-0025-8>
- Sorokin, V., Vickneson, K., Kofidis, T., Woo, C. C., Lin, X. Y., Foo, R., & Shanahan, C. M. (2020). Role of Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Interactions in Vessel Wall Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 11, 599415. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599415>
- Spencer, J. A., Hacker, S. L., Davis, E. C., Mecham, R. P., Knutsen, R. H., Li, D. Y., Gerard, R. D., Richardson, J. A., Olson, E. N., & Yanagisawa, H. (2005). Altered vascular remodeling in fibulin-5-deficient mice reveals a role of fibulin-5 in smooth muscle cell proliferation and migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 2946-2951. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500058102>
- Spofford, C. M., & Chilian, W. M. (2001). The elastin-laminin receptor functions as a mechanotransducer in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 280(3), H1354-1360. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.3.H1354>
- Sproul, E. P., & Argraves, W. S. (2013). A cytokine axis regulates elastin formation and degradation. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 32(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.11.004>
- Stenmark, K. R., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E., Anwar, A., Li, M., Riddle, S., & Frid, M. (2011). The adventitia : Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*, 1(1), 141-161. <https://doi.org/10.1002/cphy.c090017>
- Ström, A., Olin, A. I., Aspberg, A., & Hultgårdh-Nilsson, A. (2006). Fibulin-2 is present in murine vascular lesions and is important for smooth muscle cell migration. *Cardiovascular Research*, 69(3), 755-763. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.001>
- Sugitani, H., Hirano, E., Knutsen, R. H., Shifren, A., Wagenseil, J. E., Ciliberto, C., Kozel, B. A., Urban, Z., Davis, E. C., Broekelmann, T. J., & Mecham, R. P. (2012). Alternative splicing and tissue-specific elastin misassembly act as biological modifiers of human elastin gene frameshift mutations associated with dominant cutis laxa. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 22055-22067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.327940>
- Swee, M. H., Parks, W. C., & Pierce, R. A. (1995). Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(25), 14899-14906. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.14899>
- Szabó, Z., Levi-Minzi, S. A., Christiano, A. M., Struminger, C., Stoneking, M., Batzer, M. A., & Boyd, C. D. (1999). Sequential loss of two neighboring exons of the tropoelastin gene during primate evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 49(5), 664-671. <https://doi.org/10.1007/pl00006587>
- Szauter, K. M., Cao, T., Boyd, C. D., & Csiszar, K. (2005). Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. *Pathologie-Biologie*, 53(7), 448-456. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.033>
- Takaoka, M., Nagata, D., Kihara, S., Shimomura, I., Kimura, Y., Tabata, Y., Saito, Y., Nagai, R., & Sata, M. (2009). Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. *Circulation Research*, 105(9), 906-911. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.199653>
- Tal, T., Kilty, C., Smith, A., LaLone, C., Kennedy, B., Tennant, A., McCollum, C. W., Bondesson, M., Knudsen, T., Padilla, S., & Kleinstreuer, N. (2017). Screening for angiogenic inhibitors in zebrafish to evaluate a

- predictive model for developmental vascular toxicity. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 70, 70-81. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.12.004>
- Tal, T., Yaghoobi, B., & Lein, P. J. (2020). Translational Toxicology in Zebrafish. *Current opinion in toxicology*, 23-24, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.05.004>
- Tanaka, N., Tajima, S., Ishibashi, A., Uchida, K., & Shigematsu, T. (2001). Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin. *Archives of Dermatological Research*, 293(7), 363-367. <https://doi.org/10.1007/s004030100239>
- Tang, D., Geng, F., Yu, C., & Zhang, R. (2021). Recent Application of Zebrafish Models in Atherosclerosis Research. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 643697. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.643697>
- Tarbell, J. M., & Cancel, L. M. (2016). The glycocalyx and its significance in human medicine. *Journal of Internal Medicine*, 280(1), 97-113. <https://doi.org/10.1111/joim.12465>
- Tatti, O., Vehviläinen, P., Lehti, K., & Keski-Oja, J. (2008). MT1-MMP releases latent TGF-beta1 from endothelial cell extracellular matrix via proteolytic processing of LTBP-1. *Experimental Cell Research*, 314(13), 2501-2514. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.05.018>
- Tembely, D., Henry, A., Vanalderwiert, L., Toussaint, K., Bennasroune, A., Blaise, S., Sartelet, H., Jaisson, S., Galés, C., Martiny, L., Duca, L., Romier-Crouzet, B., & Maurice, P. (2022). The Elastin Receptor Complex : An Emerging Therapeutic Target Against Age-Related Vascular Diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 815356. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.815356>
- Tesfamariam, M. D., Mirza, A. M., Chaparro, D., Ali, A. Z., Montalvan, R., Saytashev, I., Gonzalez, B. A., Barreto, A., Ramella-Roman, J., Hutcheson, J. D., & Ramaswamy, S. (2019). Elastin-Dependent Aortic Heart Valve Leaflet Curvature Changes During Cyclic Flexure. *Bioengineering*, 6(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6020039>
- Theocharis, A., Gialeli, C., Hascall, V., & Karamanos, N. K. (2012). 1.1 Extracellular matrix : A functional scaffold. In *Extracellular Matrix : Pathobiology and Signaling* (p. 3-20). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110258776.3>
- Thomson, J., Singh, M., Eckersley, A., Cain, S. A., Sherratt, M. J., & Baldock, C. (2019). Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins : Functional interactions and extracellular regulation of growth factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 89, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.07.016>
- Tiedemann, K., Bätge, B., Müller, P. K., & Reinhardt, D. P. (2001). Interactions of fibrillin-1 with heparin/heparan sulfate, implications for microfibrillar assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 36035-36042. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104985200>
- Timmer-DE Mik, L., Broekhuijsen-VAN Henten, D. M., Oldhoff, J. M., DE Geer, D. B., Sigurdsson, V., & Pasmans, S. G. M. A. (2009). Acquired cutis laxa in childhood Sweet's syndrome. *Pediatric Dermatology*, 26(3), 358-360. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2009.00919.x>
- Toupance, S., Brassart, B., Rabenoelina, F., Ghoneim, C., Vallar, L., Polette, M., Debelle, L., & Birembaut, P. (2012). Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clinical & Experimental Metastasis*, 29(5), 511-522. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9467-3>
- Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., & Montezano, A. C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4), 529-539. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy023>
- Trede, N. S., Langenau, D. M., Traver, D., Look, A. T., & Zon, L. I. (2004). The Use of Zebrafish to Understand Immunity. *Immunity*, 20(4), 367-379. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00084-6)
- Truter, S., Rosenbaum-Fiedler, J., Sapadin, A., & Lebowitz, M. (1996). Calcification of elastic fibers in pseudoxanthoma elasticum. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 63(3-4), 210-215.

- Tsamis, A., Krawiec, J. T., & Vorp, D. A. (2013). Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease : A review. *Journal of the Royal Society, Interface*, *10*(83), 20121004. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1004>
- Tsuda, T. (2018). Extracellular Interactions between Fibulins and Transforming Growth Factor (TGF)- β in Physiological and Pathological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), E2787. <https://doi.org/10.3390/ijms19092787>
- Tsuruga, E., Irie, K., & Yajima, T. (2007). Fibrillin-2 degradation by matrix metalloproteinase-2 in periodontium. *Journal of Dental Research*, *86*(4), 352-356. <https://doi.org/10.1177/154405910708600410>
- Tu, Y., & Weiss, A. S. (2008). Glycosaminoglycan-Mediated Coacervation of Tropoelastin Abolishes the Critical Concentration, Accelerates Coacervate Formation, and Facilitates Spherule Fusion : Implications for Tropoelastin Microassembly. *Biomacromolecules*, *9*(7), 1739-1744. <https://doi.org/10.1021/bm7013153>
- Umeda, H., Nakamura, F., & Suyama, K. (2001). Oxodesmosine and isooxodesmosine, candidates of oxidative metabolic intermediates of pyridinium cross-links in elastin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *385*(1), 209-219. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2145>
- Unsöld, C., Hyytiäinen, M., Bruckner-Tuderman, L., & Keski-Oja, J. (2001). Latent TGF-beta binding protein LTBP-1 contains three potential extracellular matrix interacting domains. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 1), 187-197. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.1.187>
- Urbán, Z., Riazi, S., Seidl, T. L., Katahira, J., Smoot, L. B., Chitayat, D., Boyd, C. D., & Hinek, A. (2002). Connection between Elastin Haploinsufficiency and Increased Cell Proliferation in Patients with Supravalvular Aortic Stenosis and Williams-Beuren Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *71*(1), 30-44.
- Vallet, S. D., & Ricard-Blum, S. (2019). Lysyl oxidases : From enzyme activity to extracellular matrix cross-links. *Essays in Biochemistry*, *63*(3), 349-364. <https://doi.org/10.1042/EBC20180050>
- van der Loop, F. T., Schaart, G., Timmer, E. D., Ramaekers, F. C., & van Eys, G. J. (1996). Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *The Journal of Cell Biology*, *134*(2), 401-411. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.2.401>
- Van Teeffelen, J. W., Brands, J., Stroes, E. S., & Vink, H. (2007). Endothelial glycocalyx : Sweet shield of blood vessels. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *17*(3), 101-105. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2007.02.002>
- Varani, J., Dame, M. K., Rittie, L., Fligel, S. E. G., Kang, S., Fisher, G. J., & Voorhees, J. J. (2006). Decreased collagen production in chronologically aged skin : Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *The American Journal of Pathology*, *168*(6), 1861-1868. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051302>
- Varanko, A. K., Su, J. C., & Chilkoti, A. (2020). Elastin-Like Polypeptides for Biomedical Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-092419-061127>
- Vargas, R., & Vásquez, I. C. (2016). Cardiac and somatic parameters in zebrafish : Tools for the evaluation of cardiovascular function. *Fish Physiology and Biochemistry*, *42*(2), 569-577. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0160-8>
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., & Marth, J. (1999). Proteoglycans and Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20693/>
- Velandia-Piedrahita, C. A., Morel, A., Fonseca-Mendoza, D. J., Huertas-Quiñones, V. M., Castillo, D., Bonilla, J. D., Hernandez-Toro, C. J., Miranda-Fernández, M. C., Restrepo, C. M., & Cabrera, R. (2020). A Novel Splice-Site Mutation in the ELN Gene Suggests an Alternative Mechanism for Vascular Elastinopathies. *The Application of Clinical Genetics*, *13*, 233-240. <https://doi.org/10.2147/TACG.S282240>
- Verbrugge, F. H., Tang, W. H. W., & Hazen, S. L. (2015). Protein carbamylation and cardiovascular disease. *Kidney International*, *88*(3), 474-478. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.166>
- Verderio, E., Gaudry, C., Gross, S., Smith, C., Downes, S., & Griffin, M. (1999). Regulation of Cell Surface Tissue Transglutaminase : Effects on Matrix Storage of Latent Transforming Growth Factor- β Binding

- Protein-1. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(11), 1417-1432.
<https://doi.org/10.1177/002215549904701108>
- Verhamme, P., & Hoylaerts, M. F. (2006). The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clinica Belgica*, 61(5), 213-219. <https://doi.org/10.1179/acb.2006.036>
- Vesely, I. (1998). The role of elastin in aortic valve mechanics. *Journal of Biomechanics*, 31(2), 115-123.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(97\)00122-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(97)00122-x)
- Villacorta, L., & Chang, L. (2015). The role of perivascular adipose tissue in vasoconstriction, arterial stiffness, and aneurysm. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 21(2), 137-147.
<https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0048>
- Villalba, N., Baby, S., & Yuan, S. Y. (2021). The Endothelial Glycocalyx as a Double-Edged Sword in Microvascular Homeostasis and Pathogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.711003>
- Vrhovski, B., & Weiss, A. S. (1998). Biochemistry of tropoelastin. *European Journal of Biochemistry*, 258(1), Article 1. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2580001.x>
- Wachi, H., Sato, F., Murata, H., Nakazawa, J., Starcher, B. C., & Seyama, Y. (2005). Development of a new in vitro model of elastic fiber assembly in human pigmented epithelial cells. *Clinical Biochemistry*, 38(7), Article 7. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.04.006>
- Wagenseil, J. E., Ciliberto, C. H., Knutsen, R. H., Levy, M. A., Kovacs, A., & Mecham, R. P. (2010). The importance of elastin to aortic development in mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(2), H257-H264. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00194.2010>
- Wagenseil, J. E., & Mecham, R. P. (2009). Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological reviews*, 89(3), 957-989. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2008>
- Wagenseil, J. E., & Mecham, R. P. (2012). Elastin in large artery stiffness and hypertension. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 5(3), 264-273. <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9349-8>
- Wagenseil, J. E., Nerurkar, N. L., Knutsen, R. H., Okamoto, R. J., Li, D. Y., & Mecham, R. P. (2005). Effects of elastin haploinsufficiency on the mechanical behavior of mouse arteries. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289(3), H1209-1217. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00046.2005>
- Wahart, A., Hocine, T., Albrecht, C., Henry, A., Sarazin, T., Martiny, L., El Btaouri, H., Maurice, P., Bennisroune, A., Romier-Crouzet, B., Blaise, S., & Duca, L. (2019). Role of elastin peptides and elastin receptor complex in metabolic and cardiovascular diseases. *The FEBS Journal*, 286(15), 2980-2993.
<https://doi.org/10.1111/febs.14836>
- Wang, W., Zhang, H., Hou, C., Liu, Q., Yang, S., Zhang, Z., Yang, W., & Yang, X. (2021). Internal modulation of proteolysis in vascular extracellular matrix remodeling : Role of ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5 in the development of intracranial aneurysm rupture. *Aging*, 13(9), 12800-12816. <https://doi.org/10.18632/aging.202948>
- Wang, X., & Khalil, R. A. (2018). Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 81, 241-330. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>
- Wang, Y., Nangia-Makker, P., Tait, L., Balan, V., Hogan, V., Pienta, K. J., & Raz, A. (2009). Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. *The American Journal of Pathology*, 174(4), 1515-1523.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080816>
- Wang, Z., Nicholls, S. J., Rodriguez, E. R., Kummu, O., Hökkö, S., Barnard, J., Reynolds, W. F., Topol, E. J., DiDonato, J. A., & Hazen, S. L. (2007). Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nature Medicine*, 13(10), 1176-1184. <https://doi.org/10.1038/nm1637>
- Watts, S. W., Flood, E. D., Garver, H., Fink, G. D., & Roccabianca, S. (2020). A New Function for Perivascular Adipose Tissue (PVAT) : Assistance of Arterial Stress Relaxation. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58368-x>
- Wessel, A., Gravenhorst, V., Buchhorn, R., Gosch, A., Partsch, C.-J., & Pankau, R. (2004). Risk of sudden death in the Williams-Beuren syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 127A(3), 234-237.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30012>

- Wight, T. N., Kinsella, M. G., Evanko, S. P., Potter-Perigo, S., & Merrilees, M. J. (2014). Versican and the Regulation of Cell Phenotype in Disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(8), 2441-2451. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.028>
- Wight, T. N., Lara, S., Riessen, R., Le Baron, R., & Isner, J. (1997). Selective deposits of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries. *The American Journal of Pathology*, 151(4), 963-973.
- Wight, T. N., & Merrilees, M. J. (2004). Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis : Key roles for versican. *Circulation Research*, 94(9), 1158-1167. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126921.29919.51>
- Wilkinson, R. N., & van Eeden, F. J. M. (2014). Chapter Five—The Zebrafish as a Model of Vascular Development and Disease. In T. J. A. Chico (Éd.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 124, p. 93-122). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386930-2.00005-7>
- Wise, S. G., & Weiss, A. S. (2009). Tropoelastin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(3), 494-497. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.03.017>
- Wittig, C., & Szulcek, R. (2021). Extracellular Matrix Protein Ratios in the Human Heart and Vessels : How to Distinguish Pathological From Physiological Changes? *Frontiers in Physiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2021.708656>
- Wognum, S., Schmidt, D. E., & Sacks, M. S. (2009). On the mechanical role of de novo synthesized elastin in the urinary bladder wall. *Journal of Biomechanical Engineering*, 131(10), 101018. <https://doi.org/10.1115/1.4000182>
- Wolinsky, H., & Glagov, S. (1967). A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circulation Research*, 20(1), 99-111. <https://doi.org/10.1161/01.res.20.1.99>
- Wünnemann, F., Ta-Shma, A., Preuss, C., Leclerc, S., van Vliet, P. P., Oneglia, A., Thibeault, M., Nordquist, E., Lincoln, J., Scharfenberg, F., Becker-Pauly, C., Hofmann, P., Hoff, K., Audain, E., Kramer, H.-H., Makalowski, W., Nir, A., Gerety, S. S., Hurles, M., ... Mital, S. (2020). Loss of ADAMTS19 causes progressive non-syndromic heart valve disease. *Nature genetics*, 52(1), 40-47. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0536-2>
- Xie, Y., Meijer, A. H., & Schaaf, M. J. M. (2020). Modeling Inflammation in Zebrafish for the Development of Anti-inflammatory Drugs. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 620984. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.620984>
- Yamamoto, Y., Sakata, N., Meng, J., Sakamoto, M., Noma, A., Maeda, I., Okamoto, K., & Takebayashi, S. (2002). Possible involvement of increased glycoxidation and lipid peroxidation of elastin in atherogenesis in haemodialysis patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17(4), 630-636. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.4.630>
- Yamin, R., & Morgan, K. G. (2012). Deciphering actin cytoskeletal function in the contractile vascular smooth muscle cell. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 17), 4145-4154. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.232306>
- Yang, L.-L., Wang, G.-Q., Yang, L.-M., Huang, Z.-B., Zhang, W.-Q., & Yu, L.-Z. (2014). Endotoxin Molecule Lipopolysaccharide-Induced Zebrafish Inflammation Model : A Novel Screening Method for Anti-Inflammatory Drugs. *Molecules*, 19(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules19022390>
- Yap, C., Mieremet, A., de Vries, C. J. M., Micha, D., & de Waard, V. (2021). Six Shades of Vascular Smooth Muscle Cells Illuminated by KLF4 (Krüppel-Like Factor 4). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41(11), 2693-2707. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.316600>
- Yasuda, Y., Li, Z., Greenbaum, D., Bogoy, M., Weber, E., & Brömme, D. (2004). Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36761-36770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403986200>
- Ye, G. J. C., Nesmith, A. P., & Parker, K. K. (2014). The role of mechanotransduction on vascular smooth muscle myocytes cytoskeleton and contractile function. *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 297(9), 1758. <https://doi.org/10.1002/ar.22983>

- Zampetaki, A., Attia, R., Mayr, U., Gomes, R. S. M., Phinikaridou, A., Yin, X., Langley, S. R., Willeit, P., Lu, R., Fanshawe, B., Fava, M., Barallobre-Barreiro, J., Molenaar, C., So, P.-W., Abbas, A., Jahangiri, M., Waltham, M., Botnar, R., Smith, A., & Mayr, M. (2014). Role of miR-195 in aortic aneurysmal disease. *Circulation Research*, *115*(10), 857-866. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304361>
- Zarkovic, K., Larroque-Cardoso, P., Pucelle, M., Salvayre, R., Waeg, G., Nègre-Salvayre, A., & Zarkovic, N. (2014). Elastin aging and lipid oxidation products in human aorta. *Redox Biology*, *4*, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.008>
- Zhang, M., Pierce, R. A., Wachi, H., Mecham, R. P., & Parks, W. C. (1999). An open reading frame element mediates posttranscriptional regulation of tropoelastin and responsiveness to transforming growth factor beta1. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.11.7314>
- Zhang, P., Huang, A., Ferruzzi, J., Mecham, R. P., Starcher, B. C., Tellides, G., Humphrey, J. D., Giordano, F. J., Niklason, L. E., & Sessa, W. C. (2012). Inhibition of microRNA-29 enhances elastin levels in cells haploinsufficient for elastin and in bioengineered vessels—Brief report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(3), 756-759. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.238113>
- Zhao, Q., Jia, Y., & Xiao, Y. (2009). Cathepsin K : A therapeutic target for bone diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *380*(4), 721-723. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.139>
- Zhu, J.-J., Xu, Y.-Q., He, J.-H., Yu, H.-P., Huang, C.-J., Gao, J.-M., Dong, Q.-X., Xuan, Y.-X., & Li, C.-Q. (2014). Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, *34*(2), 139-148. <https://doi.org/10.1002/jat.2843>
- Zon, L. I., & Peterson, R. T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *4*(1), 35-44. <https://doi.org/10.1038/nrd1606>
- Zong, W., Stein, S. E., Starcher, B., Meyn, L. A., & Moalli, P. A. (2010). Alteration of vaginal elastin metabolism in women with pelvic organ prolapse. *Obstetrics and gynecology*, *115*(5), 953-961. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181da7946>
- Zorrilla, M. (2018). *CONTRIBUTION OF ELASTIN TO CARDIOVASCULAR DEVELOPMENT IN ZEBRAFISH* [Travail de thèse]. Université de Pittsburg.