



HAL
open science

Les fibulines, de nouveaux acteurs dans les maladies chroniques hépatiques

Célia Thomas

► **To cite this version:**

Célia Thomas. Les fibulines, de nouveaux acteurs dans les maladies chroniques hépatiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2024. Français. NNT : 2024URENB019 . tel-04948431

HAL Id: tel-04948431

<https://theses.hal.science/tel-04948431v1>

Submitted on 14 Feb 2025

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 DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : *Biologie Cellulaire, Biologie du Développement (MED10)*

Par **Célia THOMAS**

Les fibulines, de nouveaux acteurs dans les maladies chroniques hépatiques

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 16 septembre 2024.

Unité de recherche : Inserm UMR-S 1085 – Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail)

Rapporteurs avant soutenance :

Patricia ROUSSELLE Directrice de recherche, CNRS UMR 5305, Université Claude Bernard Lyon 1
Maxime LEHMANN Professeur des Universités, INSERM UMR-S 1255, Université de Strasbourg

Composition du Jury :

Président : Vincent LAGENTE Professeur des Universités, INSERM UMR 1241, Université de Rennes

Examineurs : Alain COLIGE Professeur associé – Maître de recherches, FNRS, Université de Liège
Vincent LAGENTE Professeur des Universités, INSERM UMR 1241, Université de Rennes

Rapporteurs : Patricia ROUSSELLE Directrice de recherche, CNRS UMR 5305, Université Claude Bernard Lyon 1
Maxime LEHMANN Professeur des Universités, INSERM UMR-S 1255, Université de Strasbourg

Directrice de thèse : Nathalie THÉRET Directrice de recherche, INSERM UMR-S 1085, Université de Rennes

Co-encadrant de thèse : Vincent LEGAGNEUX Chargé de recherche, INSERM UMR-S 1085, Université de Rennes

Remerciements

Je tenais tout d'abord à adresser mes premiers remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ces travaux : le **Dr. Patricia Rousselle** et le **Pr. Maxime Lehmann** en tant que rapporteurs, ainsi que le **Pr. Vincent Lagente** et le **Pr. Alain Colige** en tant qu'examineurs. Je vous remercie vivement pour votre disponibilité et le temps précieux que vous y aurez consacré.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi individuel dont le **Pr. Alain Colige** a également fait partie, ainsi que le **Dr. Orlando Musso**. Je vous remercie sincèrement pour l'accompagnement et les conseils que vous avez apporté à ce projet.

Je tiens à remercier le **Dr. Michel Samson** de m'avoir accueillie au sein de l'**Irset**. Merci pour les discussions et questions sur mon projet lors des séminaires mais également pour la confiance accordée lors de l'organisation de journées scientifiques en tant que membre du Doc'7.

Mes prochains remerciements sont ensuite adressés à mes deux directeurs de thèse, **Nathalie** et **Vincent**. Je vous remercie sincèrement pour m'avoir fait confiance dans ce projet, pour votre disponibilité malgré des emplois du temps souvent bien chargés, pour votre accompagnement et vos conseils qui m'ont fait évoluer dans ce projet mais également dans le monde de la recherche. Vous m'avez appris tellement de choses qui m'ont servi dans ce projet et qui me serviront dans ma future carrière, j'en suis certaine. Nathalie, je te remercie pour m'avoir appris la rigueur des termes à utiliser que ce soit à l'oral ou à l'écrit, de m'avoir toujours fait penser à relire une revue ou un article sous un autre angle et de m'avoir appris à me poser les bonnes questions au bon moment. Vincent, je te remercie de m'avoir accompagné sur mon apprentissage R et sur les réflexions statistiques ; je suis maintenant devenue experte dans les graphiques en tout genre ! Je te remercie également pour ta disponibilité à tout moment dès que j'avais une question et que je passais une tête à ton bureau. Nathalie et Vincent, merci pour votre confiance tout au long de ces 3 années de doctorat !

Je remercie ensuite **Dominique** qui m'a accompagnée sur ma première année de thèse. Tu m'as appris toutes les techniques de bioch' et de biomol pour ce projet. Je te remercie pour ta bonne humeur, tes conseils et ton accompagnement. Merci de m'avoir transmis toutes les techniques secrètes pour que les western-blots fonctionnent (presque) tout le temps et de m'avoir donné toutes les astuces qui m'ont tellement apporté pour les deux années suivantes. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi et aurait aimé continuer ma thèse à tes côtés.

Je souhaite également remercier une autre personne importante à ce projet, **Fidaa**. Je suis heureuse que tu sois arrivée au début de ma troisième année de thèse car j'ai pu apprendre à travailler avec toi et également découvrir de nouvelles techniques mais aussi de nouvelles approches de réflexion. Je te remercie pour toutes les discussions que nous avons pu avoir au bureau, parfois tard le soir, mais qui m'ont beaucoup apporté. Merci pour ta bonne humeur, ta détermination et tes conseils (et aussi les plats/desserts libanais !).

Mes remerciements vont ensuite à l'ensemble de **l'équipe 5 – Dymec2** : Merci **Sophie L.** pour tes remarques et questions lors des réunions d'équipe et tes derniers conseils pendant la rédaction du manuscrit. Merci **Fred** pour ton enthousiasme et ta disponibilité à tout épreuve. Avec un tournevis ou un Pipet-boy dans la poche de ta blouse, tu as su régler n'importe quel problème que j'ai pu avoir au cours de ma thèse. Merci aux membres du bureau 324 (un peu dispersé au cours de ces trois ans entre départ, soutenance de thèse et travaux) : Merci **Sophie R.** et **Marie** pour les discussions plus ou moins scientifiques et les conseils d'anciennes doctorantes que je notais toujours dans un coin de ma tête. Merci **Charbel** pour toutes les petites discussions de voisin de bureau. Merci **Minna** (ma voisine de bureau n°2) pour les discussions entre 2 lectures d'article et les gâteaux coréens que tu ramenaient parfois, et bon courage pour la suite de ta thèse (mais je ne me fais aucun soucis pour toi).

Je remercie également les doctorants et post-doctorants du labo, **Laura, Tom, Marie K., Anna, Valentin, Hélène, Florian, Joan, Jérémy, Rima, Ghiles**, mais aussi les (petits) nouveaux, **Margaux, Alison, Camille**. Je remercie aussi **Jennifer, Clémence, Claudie, Stéphanie, Adeline, Antoine** et j'en oublie certainement (ne m'en voulez pas), mais il y a beaucoup de monde à l'Irset ! Je vous remercie pour les concours de gâteaux, les pique-niques au Thabor, les soirées à thème, les soirées dans la salle du bas du Tivoli, le midi raclette au labo... et j'en passe. Ces trois années sont passées si vite et c'est aussi grâce à vous !

Je tiens tout particulièrement à remercier **Melany**. Nous sommes arrivées ensemble dans l'équipe en 2021, toi en tant que doctorante en 3^{ème} année et moi commençant à peine la thèse. Tu n'es restée au départ que 3 mois mais le sort en aura décidé autrement et ton retour 1 an après était une super nouvelle (pour moi en tout cas) ! Tu as été d'une extrême gentillesse avec moi et d'une grande aide lors de mes débuts en culture cell (ou devrais-je dire, en culture bactérienne...). Merci pour ta joie de vivre, tes rires et ta bonne humeur sans faille. Je suis également admirative de ta persévérance et de ta détermination qui ont fait de toi une Docteure très récemment. Je suis heureuse de t'avoir rencontré sur mon chemin, j'ai trouvé une amie, et j'espère bien te revoir très bientôt (en Bretagne, au Canada ou au Mexique, pourquoi pas, l'avenir nous le dira).

Je remercie également **Franck**, mon maître de stage de master, et l'équipe EGD de l'IGDR. Grâce à ce stage, mais surtout à toi, j'avais pu confirmer mon envie de travailler dans la recherche qui s'est encore plus renforcée ces dernières années.

Merci à ma famille :

Papa, Maman, je vous remercie pour votre soutien tout au long de ces 3 longues années. Vous avez toujours été là pour moi, vous m'avez fait confiance et vous avez toujours cru en moi. Vous n'avez peut-être pas tout compris de ma thèse, mais je sais que vous êtes fiers de moi et je vous en remercie. Je remercie également **mes deux frères** qui m'ont également suivie au cours de ces dernières années.

Je remercie **ma marraine et Lili** pour votre soutien et vos encouragements. Je n'étais encore qu'en licence que vous m'aviez déjà dit « Nous serons là pour ta soutenance de thèse ! » et vous serez là !

Je souhaitais également remercier **Claire et Paulette** de m'avoir soutenue tout au long de ce doctorat. Vous m'avez suivie à chaque instant et je vous remercie pour l'attention que vous m'avez portée !

Romain et Laurie, merci de m'avoir suivie ces dernières années de thèse. Grâce aux week-ends escape game ou escapade à vélo, j'ai pu décompresser et oublier l'espace d'un week-end mes fibulines et mes manip. Merci d'avoir été présents et de m'avoir soutenue !

Et enfin, je garde le meilleur pour la fin, mais surtout le plus important : un infini merci à toi, **Sacha**. Alors que toi aussi tu te lançais dans une toute nouvelle aventure en 2021, et pas des moindres, celle de l'entrepreneuriat, tu as toujours été là pour moi. Merci de m'avoir soutenue ces 3 dernières années mais les autres années précédentes avant encore ! Malgré mon stress et mes peurs, tu as toujours su me faire relativiser et me donner confiance en moi. Je ne sais combien de fois j'ai répété mes oraux devant toi (et j'espère d'ailleurs que tu es devenu un expert en fibulines et fibrose hépatique !). Merci pour tes conseils qui m'ont fait grandir et qui m'ont ouvert parfois les yeux. Merci pour ton amour. Je t'aime.

Table des matières

Remerciements.....	1
Table des matières	5
Liste des abréviations.....	8
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux	12
Introduction	13
I. Le foie et la fibrose hépatique.....	14
A. Généralités sur le foie.....	14
1. <i>Principales fonctions hépatiques.....</i>	<i>14</i>
2. <i>Organisation cellulaire du foie</i>	<i>16</i>
B. La physiopathologie du foie	17
1. <i>Atteinte hépatique aiguë : inflammation, régénération et réparation</i>	<i>17</i>
2. <i>Maladies chroniques hépatiques : de la fibrose hépatique au carcinome hépatocellulaire.</i>	<i>18</i>
C. Les cellules étoilées du foie, acteurs majeurs au cours de la fibrose hépatique.....	22
1. <i>Quiescence et stockage de la vitamine A.....</i>	<i>22</i>
2. <i>Activation et inactivation des cellules étoilées du foie : étapes clés dans le contrôle de la réparation tissulaire et de la fibrose hépatique.....</i>	<i>23</i>
D. La matrice extracellulaire.....	28
1. <i>Principales fonctions et principaux composants de la matrice extracellulaire</i>	<i>28</i>
2. <i>Remodelage de la matrice extracellulaire au cours de la fibrose hépatique.....</i>	<i>39</i>
II. Les fibulines	41
A. Origine, structure, évolution et expression des fibulines	41
1. <i>Organisation structurelle des fibulines.....</i>	<i>43</i>
2. <i>Evolution et diversification de la famille des fibulines</i>	<i>43</i>
3. <i>Expression des fibulines chez l'humain</i>	<i>46</i>

B.	Principales fonctions des fibulines	48
1.	<i>Assemblage de la matrice fibrillaire</i>	48
2.	<i>Influence des fibulines dans l'adhésion cellulaire et certaines fonctions cellulaires</i>	52
C.	Implications physiopathologiques des fibulines.....	54
1.	<i>Phénotypes des souris invalidées pour les gènes des fibulines</i>	54
2.	<i>Mutations et maladies génétiques chez l'humain</i>	55
3.	<i>Rôles des fibulines dans la cicatrisation et la fibrose</i>	58
4.	<i>Association des fibulines avec l'inflammation</i>	60
5.	<i>Implication des fibulines dans le cancer</i>	60
D.	La fibuline-3.....	63
1.	<i>Structure et expression de la fibuline-3</i>	63
2.	<i>Principales interactions et fonctions associées de la fibuline-3</i>	65
3.	<i>Principales implications physiopathologiques de la fibuline-3</i>	66
III.	Contexte et objectifs de la thèse	70
A.	Contexte : les fibulines dans le foie, implications dans les maladies chroniques hépatiques et le carcinome hépatocellulaire	70
1.	<i>L'expression des fibulines dans la fibrose hépatique</i>	70
2.	<i>Les sources cellulaires des fibulines dans le foie</i>	71
3.	<i>Les fibulines dans le carcinome hépatocellulaire</i>	72
B.	Objectifs de la thèse	73
	Matériels et Méthodes	75
	Résultats	82
I.	Caractérisation des fibulines 2, 3 et 5 dans la fibrose hépatique	83
A.	Article	83
B.	Résultats supplémentaires	147
1.	<i>Tests d'immunolocalisation de la fibuline-3</i>	147
2.	<i>Expérimentations dans les CEFs primaires</i>	150
II.	Caractérisation de la relation entre la fibuline-3 et ADAMTS5	157
A.	Introduction	157

B. Résultats	160
1. <i>Etude mécanistique : Quelle relation entre fibuline-3 et ADAMTS5 ?</i>	160
2. <i>Etude des niveaux d'expression de la fibuline-3 et d'ADAMTS5 dans la fibrose hépatique</i> 166	
C. Discussion.....	168
Discussion et Perspectives	170
I. La fibuline-3, une fibuline distincte des autres ?	171
II. Un rôle possible de la fibuline-3 dans le remodelage matriciel	175
III. Un lien entre la fibuline-3 et la sénescence des CEFs ?	177
IV. Conclusion	179
Références bibliographiques	180
Annexes	205
A. Communications scientifiques	206
B. Enseignements.....	207
C. Animations scientifiques	207
D. Autres formations suivies	207

Liste des abréviations

ADAMs : *A Disintegrin And Metalloproteinases*
ADAMTSs : *ADAMs with ThromboSpondin motifs*
ADAMTSLs : *ADAMTS-Like*
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
 α -SMA : *alpha Smooth muscle actin*
AT : Anaphylatoxine

B-LINK : *BM-LINKage*
BMP-1 : *Bone Morphogenetic-1*

cbEGF : *calcium-binding Epidermal Growth Factor*
CEFs : Cellules étoilées du foie
CESFs : Cellules endothéliales sinusoidales du foie
CHC : Carcinome hépatocellulaire
COMP : *Cartilage Oligomeric Matrix Protein*
CS : Chondroïtine sulfate

DAMPs : *Damage-Associated Molecular Patterns*
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
DS : Dermatine sulfate

EBP : *Elastin Binding Protein*
EFEMP : *EGF-containing Fibulin Extracellular Matrix Protein*
EGF : *Epidermal Growth Factor*
EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*
ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*
EPR : Epithélium pigmentaire rétinien

FAK : *Focal Adhesion Kinase*
FBLN : *Fibulin*
FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique

GAGs : Glycosaminoglycanes

HA : Hyaluronane ou Acide hyaluronique
HIER : *Heat Induced Epitope Retrieval*
HMCN : *Hemicentin*
HS : Heparan sulfate
HUVECs : *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IFN : *Interferon*
IL : *Interleukin*

KS : Kératane sulfate

LAP : *Latency Associated Protein*

LOX : *Lysyl Oxydase*

LOXL : *Lysyl Oxydase-like*

LTBP : *Latent TGF- β Binding Protein*

MCH : Maladie chronique hépatique

MEC : Matrice extracellulaire

ML : Malattia Leventinese

MMPs : *Matrix MetalloProteinases*

NAFLD : *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* (Maladie du foie gras non alcoolique)

NASH : *Non-Alcoholic Steatohepatitis* (Stéatose hépatique non-alcoolique)

NK : *Natural Killer*

PGs : Protéoglycanes

PPI : Protein-Protein Interactions

RE : Réticulum endoplasmique

RGD : Tripeptide Arginine-Glycine-Acide aspartique

ROS : *Reactive Oxygen Species*

scRNA-seq : *Single cell RNA sequencing*

SHG : *Second Harmonic Generation*

siRNA : *Small interfering RNA*

SLRPs : *Small Leucine-Rich Proteoglycans*

SPOCK : *Secreted Protein acidic and rich in cysteine/Osteonectin CWCV and Kazal-like domain*

T β RI : *TGF- β Receptor Type I*

T β RII : *TGF- β Receptor Type II*

TE : Tropoélastine

TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF- β : *Transforming Growth Factor β*

TIMPs : *Tissue Inhibitor of Metalloproteases*

UPR : *Unfolded Protein Response*

VWA : *Von Willebrand A*

Liste des figures

Figure 1. Organisation du foie.	15
Figure 2. Représentation à l'échelle cellulaire d'un foie sain et d'un foie fibrotique.	20
Figure 3. Dynamique des cellules étoilées du foie après une agression.....	24
Figure 4. Dynamique des cellules étoilées hépatiques.....	27
Figure 5. Représentation simplifiée de la matrice extracellulaire.	29
Figure 6. Les principales étapes de la formation des fibres de collagène.....	31
Figure 7. Les différentes étapes de l'élastogénèse.	32
Figure 8. La structure des protéoglycanes avec des chaînes de glycosaminoglycanes.	34
Figure 9. Principales étapes de l'assemblage de la matrice de fibronectine.....	35
Figure 10. Représentation de différentes compositions et architectures de MEC en fonction du tissu.	38
Figure 11. La famille des fibulines.....	42
Figure 12. L'évolution des gènes des fibulines.	44
Figure 13. Représentation des isoformes de la fibuline-1.	45
Figure 14. Expression tissulaire des fibulines chez l'humain.	47
Figure 15. Implications et associations décrites des fibulines dans l'assemblage de certains composants de la matrice extracellulaire.	51
Figure 16. Distribution anatomique de l'expression de la fibuline-3 chez l'humain.....	64
Figure 17. La régulation de la signalisation TGF- β médiée par la fibuline-3.	66
Figure 18. Tests d'immunolocalisation de la fibuline-3 avec l'anticorps HPA070841.....	149
Figure 19. Transfection de siRNA dans les cellules étoilées primaires.....	151
Figure 20. Effet de l'inactivation des fibulines 2 et 3 sur le réseau de fibres de stress des CEFs primaires.	153
Figure 21. La diminution de la fibuline-3 semble induire la sénescence dans les CEFs primaires.	155
Figure 22. La famille des Adamalysines.....	158
Figure 23. Représentation schématique des plasmides pour la surexpression d'ADAMTS5 (A) et de la fibuline-3 (B).....	161
Figure 24. La surexpression d'ADAMTS5 diminue la quantité de fibuline-3 dans les cellules COS7.....	162

Figure 25. L'expression de la fibuline-3 est inhibée par celle d'ADAMTS5 de façon dose-dépendante.	163
Figure 26. L'inhibition de la fibuline-3 est spécifique d'ADAMTS5.....	165
Figure 27. Etude comparative de l'expression d'ADAMTS5 et de la fibuline-3 dans le contexte de la fibrose hépatique.....	167
Figure 28. Représentation schématique des phénotypes de CEFs observés après inhibition de l'expression d'EFEMP1 et de FBLN2 par interférence ARN (siRNA).....	172
Figure 29. Hypothèse d'un réseau impliquant la fibuline-3, TIMP-3 et ADAMTS5 dans la régulation des interactions cellule-matrice extracellulaire.....	176

Liste des tableaux

Tableau 1. Le score METAVIR.....	21
Tableau 2. Phénotypes des souris invalidées pour les gènes de la famille des fibulines.....	55
Tableau 3. Principales maladies associées à des mutations dans les gènes de la famille des fibulines.....	57
Tableau 4. Les fibulines dans différents types de cancer.....	62
Tableau 5. Liste des couples de primers utilisés en RT-qPCR.....	79
Tableau 6. Liste des plasmides utilisés pour la surexpression dans les cellules COS7.....	81

Introduction

I. Le foie et la fibrose hépatique

A. Généralités sur le foie

1. Principales fonctions hépatiques

Le foie est un organe vital, impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, telles que le métabolisme des macronutriments, le stockage du glucose sous forme de glycogène, le métabolisme du cholestérol et des lipides et la fabrication de la bile (Trefts et al., 2017). Le foie possède également une fonction de détoxification des substances endogènes, comme l'urée, ou exogènes, comme l'alcool ou les médicaments. Ces fonctions sont principalement médiées par les hépatocytes et impliquent des échanges dynamiques avec le sang grâce à une vascularisation importante et une organisation spécifique (**Figure 1A**) (Ficht & Iannacone, 2020). Le foie est composé de 4 lobes organisés en plusieurs millions d'unités fonctionnelles appelées lobules hépatiques. Ces lobules sont organisés sous forme hexagonale autour de la veine centrale. Aux extrémités de cet hexagone, on retrouve la triade portale avec l'artère hépatique, la veine portale et les canaux biliaires. La veine portale amène les métabolites provenant du tube digestif et l'artère portale fournit le sang oxygéné et les nutriments aux cellules hépatiques. Ces deux vaisseaux convergent sous forme de capillaires, appelés sinusoides, délimités par des cellules endothéliales spécialisés et entourés d'hépatocytes (**Figure 1B**). Une fois chargé en CO₂ et en nutriments métabolisés, le sang retourne dans la circulation générale par la veine hépatique centrale. Le foie est également impliqué dans la sécrétion de la bile qui est transportée vers le système digestif grâce aux canalicules et canaux biliaires.

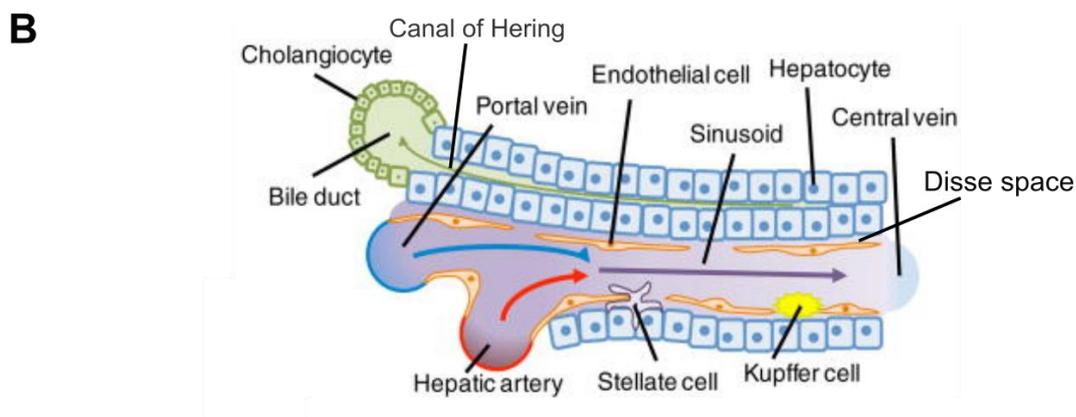
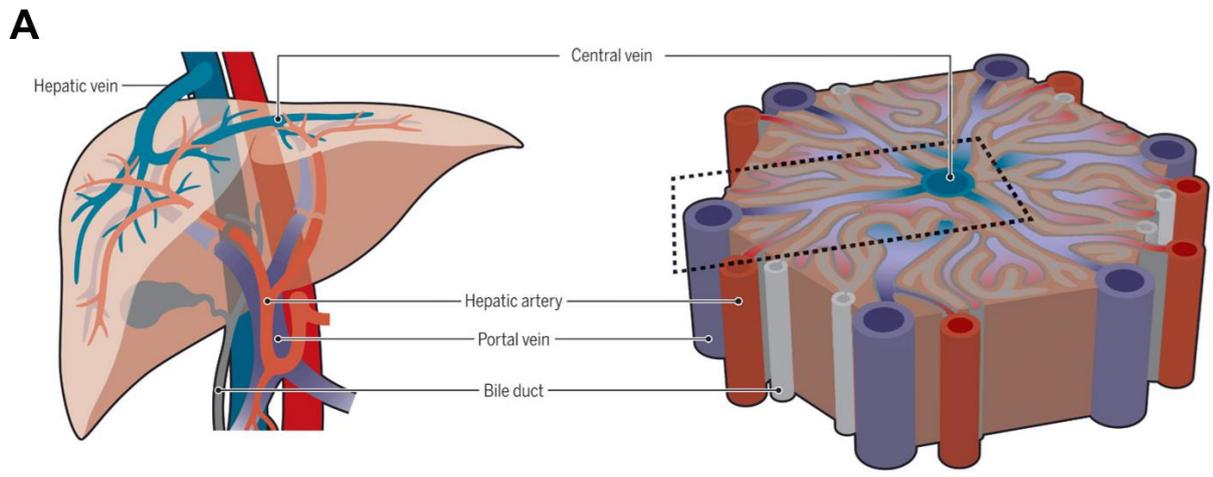


Figure 1. Organisation du foie.

A. Organisation vasculaire du foie et du lobule hépatique (Ficht & Iannacone, 2020). Le foie est fortement vascularisé avec la veine porte, qui apporte le sang riche en nutriments, et l'artère hépatique, qui apporte le sang riche en oxygène. Elles convergent ensuite vers un sinusoiide avant de se déverser dans la veine centrale. Le foie est composé de millions de lobules hépatiques organisés sous forme d'hexagones, avec aux extrémités, le canal biliaire, l'artère hépatique et la veine porte et, au centre, la veine centrale.

B. Organisation du sinusoiide Adaptée de (Trefts et al., 2017). Le sinusoiide est un capillaire formé par les cellules endothéliales sinusoiidales (en orange), où l'on retrouve les cellules étoilées du foie (en violet) et les cellules de Kupffer (en jaune). De part et d'autre du sinusoiide, on retrouve les hépatocytes (en bleu) séparés de la circulation sanguine par l'espace de Disse.

2. Organisation cellulaire du foie

Les lobules hépatiques sont constitués de différents types cellulaires qui possèdent des fonctions uniques mais qui coopèrent afin de réguler les fonctions hépatiques à plusieurs niveaux. On peut distinguer deux catégories de cellules : les cellules parenchymateuses et non-parenchymateuses. Les cellules parenchymateuses correspondent aux cellules épithéliales : les hépatocytes et les cholangiocytes. Les cellules non-parenchymateuses correspondent à toutes les autres cellules hépatiques parmi lesquelles les cellules endothéliales sinusoidales du foie, les cellules de Kupffer, les cellules étoilées du foie et les fibroblastes portaux. Le foie possède également des cellules souches intra-hépatiques appelées cellules progénitrices du foie qui peuvent se différencier en hépatocytes ou en cholangiocytes.

Les hépatocytes correspondent à la plus grande population cellulaire du foie, représentant environ 60% de sa composition cellulaire. Ils forment ainsi la majorité du volume hépatique et remplissent la plupart des fonctions hépatiques. Ce sont des cellules épithéliales polarisées avec un pôle basal (ou sinusoidal), dont la surface est amplifiée par la formation de microvillosités facilitant les échanges entre les hépatocytes et le sang, ainsi que la prise en charge de nutriments ou de xénobiotiques provenant de la veine porte. Le pôle apical (ou biliaire) représente l'interface entre l'hépatocyte et le canalicule biliaire et correspond au lieu de sécrétion de la bile.

Les cholangiocytes représentent la seconde population épithéliale du foie et tapissent la lumière du canal biliaire. Ils régulent la composition de la bile en sécrétant ou absorbant l'eau ou les solutés présents. Ils assurent également un rôle de maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale des canaux biliaires.

Les cellules endothéliales sinusoidales du foie (CESFs) sont des cellules endothéliales spécialisées avec des caractéristiques uniques et représentent 15 à 20% des cellules hépatiques. Elles constituent la paroi des sinusoides hépatiques à l'interface entre la lumière du vaisseau contenant les cellules sanguines, et l'espace de Disse qui les sépare des hépatocytes. Les CESFs sont caractérisées par la présence de pores (ou fenestrations) transmembranaires qui facilitent les échanges entre le sang circulant et les hépatocytes ; échanges qui sont essentiels aux fonctions hépatiques (Poisson et al., 2017).

Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie et représentent environ 15% des cellules totales hépatiques. Retrouvées au niveau de la lumière du sinusoides, elles participent à la réponse immédiate en cas d'agression par des agents pathogènes ou des toxines, grâce à la reconnaissance des stimuli provenant de la circulation portale. Elles peuvent induire des signaux pro-

ou anti-inflammatoires selon les facteurs impliqués et phagocyter certains débris cellulaires ou pathogènes, contribuant ainsi à la protection du foie (Dixon et al., 2013).

Les cellules étoilées du foie (CEFs) sont localisées dans l'espace de Disse, entre la paroi des sinusoides et les hépatocytes. Dans un foie sain, elles sont dans un état quiescent et participent au métabolisme et au stockage de la vitamine A sous forme de gouttelettes lipidiques. En réponse à une agression et à la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, les CEFs sont activées et se différencient en myofibroblastes contractiles capables de sécréter des composants de la matrice extracellulaire. Ce processus contribue à la cicatrisation du foie et à la réparation tissulaire. Néanmoins, dans le contexte des atteintes chroniques, le dépôt continu de matrice cicatricielle (dont le collagène fibrillaire) par ces cellules aboutit au développement d'une fibrose hépatique septale. Les rôles et fonctions de ces cellules seront détaillées dans la section **I.C.**

Les fibroblastes portaux représentent une seconde source de myofibroblastes dans le foie. C'est une petite population de cellules qui entourent la veine portale et contribuent au maintien et à l'intégrité du tractus portal. De façon similaire aux CEFs, les fibroblastes portaux peuvent être activés et se différencier sous forme de myofibroblastes contribuant également aux processus de remodelage matriciel dans le contexte particulier de la fibrose hépatique portale (Kisseleva & Brenner, 2021).

Les cellules progénitrices du foie se localisent dans le canal de Hering situé dans l'espace porte, à l'interface entre les canalicules et les canaux biliaires. Elles expriment des marqueurs fœtaux spécifiques de deux lignages cellulaires, les hépatocytes et les cholangiocytes, et sont donc capables de générer ces deux types cellulaires. En cas de lésion hépatique, elles participent ainsi à la régénération du parenchyme.

B. La physiopathologie du foie

1. Atteinte hépatique aiguë : inflammation, régénération et réparation

Le foie est exposé à de multiples agressions infectieuses (virus, parasites) ou chimiques (alcool, polluants, médicaments). Les lésions provoquées par ces agressions entraînent une réponse hépatique aiguë caractérisée par trois processus biologiques : la réponse inflammatoire, la réparation tissulaire (cicatrisation) et la régénération cellulaire. Ces processus n'excèdent pas 6 mois et conduisent à la restauration des fonctions hépatiques.

L'inflammation est la première étape de la réponse hépatique aiguë. Suite à la mort des hépatocytes, la rupture de l'intégrité des cellules entraîne le relargage de facteurs inflammatoires tels que les alarmines ou les DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) (McDonald & Kubes, 2016). En réponse à ces molécules, les neutrophiles ainsi que les monocytes infiltrent le site lésé, produisent des médiateurs inflammatoires et participent à l'inflammation locale. Les cellules de Kupffer, les macrophages résidents du foie, détectent la lésion et recrutent également une autre population de macrophages qui participent à l'élimination des débris cellulaires et/ou des pathogènes présents dans le sang, favorisant ainsi le renouvellement du foie. Par ailleurs, les facteurs de l'inflammation participent directement à l'activation des cellules impliquées dans la réparation tissulaire.

La régénération du foie correspond au renouvellement des cellules hépatiques. Le foie possède une capacité élevée à se régénérer après une lésion (S. A. Mao et al., 2014). Les signaux inflammatoires entraînent la prolifération des hépatocytes non lésés ainsi que des cellules non-parenchymateuses, dont les cellules progénitrices du foie. La progression dans le cycle cellulaire est également favorisée par la présence de facteurs de croissance, en partie produits par les CEFs activées. Une fois que le foie est revenu à sa masse physiologique et qu'il est de nouveau fonctionnel, le processus de régénération s'arrête.

En parallèle, un processus de **remodelage matriciel** permet la réparation du tissu lésé. Ce remodelage est effectué principalement par les CEFs activées par les signaux pro-inflammatoires et qui se différencient en myofibroblastes. Ces cellules sont alors capables de sécréter des composants matriciels, principalement du collagène I (fibrillaire), et contribuent ainsi à la cicatrisation. Dans un contexte de lésion aiguë, l'équilibre entre l'accumulation et la dégradation de la matrice est finement contrôlé par les CEFs qui produisent également des protéases de la matrice extracellulaire et des enzymes impliquées dans l'assemblage de la matrice fibrillaire comme les Lysyl Oxydases (LOX). Ce contrôle permet de restaurer l'architecture normale du foie ainsi que les fonctions hépatiques.

2. Maladies chroniques hépatiques : de la fibrose hépatique au carcinome hépatocellulaire

Dans le contexte d'agressions répétées et régulières, l'inflammation devient chronique et la population de CEFs activées s'amplifie contribuant à l'accumulation de tissu cicatriciel (fibrose) et au développement d'une maladie chronique hépatique (MCH). Ces maladies sont principalement associées à des infections virales (virus de l'hépatite B et C), à une consommation excessive d'alcool

ou de médicaments ou à des maladies du foie gras non alcoolique (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD). La NAFLD se développe dans un contexte de résistance à l'insuline, de diabète de type 2, d'obésité et de troubles métaboliques, en particulier la stéatose hépatique non-alcoolique (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*, NASH) dont la prévalence a considérablement augmenté ces dernières décennies et qui affecte aujourd'hui un quart de la population globale adulte (Devarbhavi et al., 2023). Les MCHs sont caractérisées par une détérioration progressive des fonctions hépatiques. C'est un processus continu d'inflammation, de destruction, de cicatrisation et de régénération du tissu hépatique évoluant sous forme de fibrose et de cirrhose. La cirrhose constitue le stade final des MCHs et représente un risque majeur de décès ou de développement d'un carcinome hépatocellulaire.

La fibrose hépatique est un processus dégénératif accompagné d'une accumulation excessive de matrice fibrillaire et d'une réduction de l'activité des protéases de la matrice (Friedman, 2000). L'accumulation de matrice dans l'espace de Disse et la rigidification du tissu ont pour conséquence de réduire les échanges de substances solubles entre le compartiment sanguin et les cellules parenchymateuses. Cette réduction des échanges est amplifiée par une réduction des microvillosités des hépatocytes ainsi que par une perte des fenestrations des cellules endothéliales, entraînant la capillarisation du sinusoiide hépatique (**Figure 2**) (Poisson et al., 2017). Ces processus conduisent ainsi au dysfonctionnement des cellules hépatiques.

La cirrhose est le stade final de la fibrose, caractérisée par une altération significative de la vascularisation du lobule hépatique, favorisant la survenue d'hémorragies hépatiques le plus souvent fatales. Par ailleurs, la désorganisation de l'architecture hépatique et la régénération excessive des hépatocytes favorisent la formation de nodules hépatocytaires qui évoluent dans la majorité des cas vers un statut pré-néoplasique qui précède le développement d'un carcinome hépatocellulaire.

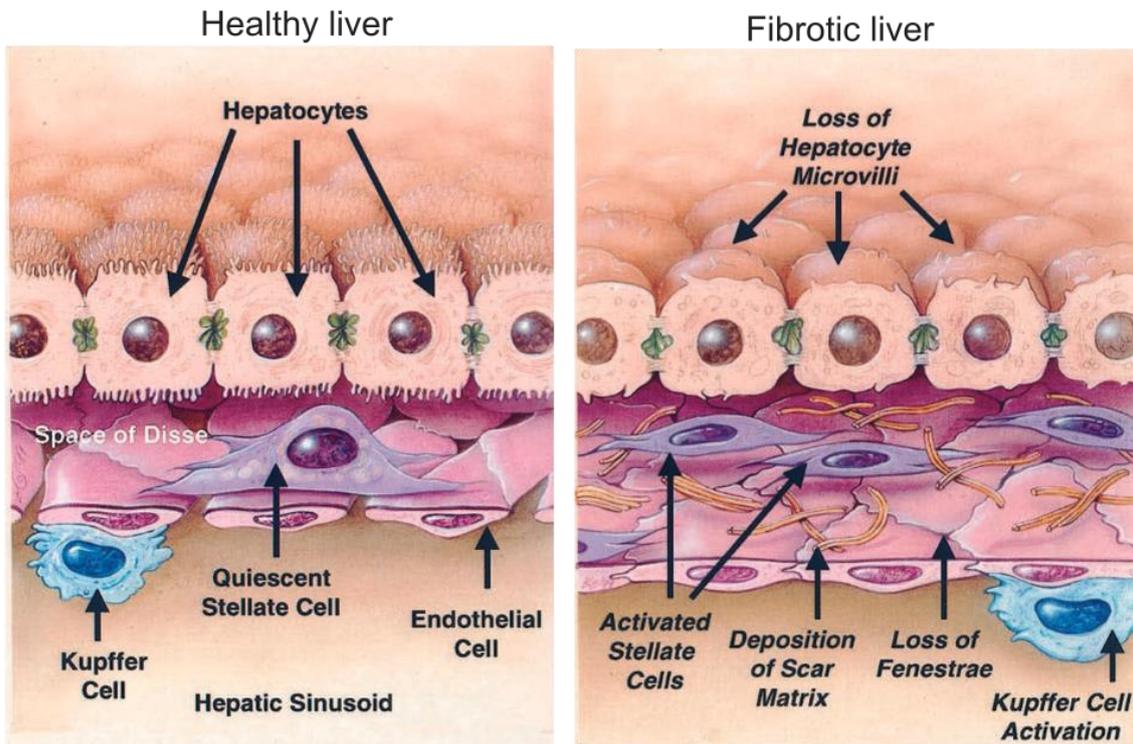


Figure 2. Représentation à l'échelle cellulaire d'un foie sain et d'un foie fibrotique.
Adaptée de (Friedman, 2000).

Représentation des principaux types cellulaires retrouvés au niveau de l'espace sinusoidal et de l'espace de Disse.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente la troisième cause de mort associée à un cancer dans le monde et son incidence ne cesse d'augmenter (Bray et al., 2024). La survenue du CHC est fortement associée à la fibrose hépatique et à la cirrhose : 80 à 90% des cas de CHC se développent dans un contexte fibrotique et approximativement 1 personne sur 3 atteinte d'une cirrhose développe un CHC (Baglieri et al., 2019). La rigidification des tissus et l'inflammation chronique au cours de la fibrose hépatique préparent un microenvironnement tumoral favorable à l'initiation, au développement et à la progression tumorale. Dans la majorité des cas, le CHC est diagnostiqué très tardivement, lorsque les symptômes apparaissent et que les fonctions hépatiques sont fortement diminuées. Les traitements thérapeutiques sont limités et le taux de survie est faible. Ainsi des approches supprimant les causes des MCHs ou traitant la fibrose hépatique avant qu'elle ne soit irréversible permettraient de combattre le risque d'un dysfonctionnement hépatique fatal ou la survenue du CHC.

Il existe aujourd'hui plusieurs méthodes d'évaluation clinique de la fibrose. La biopsie hépatique permet d'estimer l'atteinte tissulaire du foie d'un patient en quantifiant et en localisant le dépôt de matrice à partir de coupes histologiques colorées au rouge Sirius ou au Trichrome de Masson qui révèle le collagène fibrillaire. La fibrose peut, par exemple, être mesurée grâce au score METAVIR qui s'appuie sur l'évaluation de la fibrose et de l'activité nécrotique et inflammatoire des tissus (**Tableau 1**). Il permet de définir des catégories de patients et sert à poser des indications thérapeutiques et à apprécier l'évolution des lésions lors d'un suivi. La lettre A (Activité ; A0 à A3) correspond à l'activité de l'hépatite et la lettre F (Fibrose ; F0 à F4) caractérise les lésions fibreuses, et ces deux paramètres sont quantifiés séparément. A partir du stade F2, l'atteinte hépatique est considérée comme significative. Le dernier stade, le grade F4, correspond à une cirrhose histologique avec une fibrose entourant les nodules de régénération. Les techniques de microscopie de génération de seconde harmonique (SHG), plus récentes, permettent une visualisation des fibres de collagène plus sensible et plus précise, mais ne sont néanmoins pas encore accessible en routine à l'hôpital (Gailhouste et al., 2010).

Tableau 1. Le score METAVIR.

	Activité (Nécrose et Inflammation)	Fibrose
Absente	A0	F0
Minime	A1	F1
Modérée	A2	F2
Sévère	A3	F3
Cirrhose		F4

La biopsie hépatique reste une méthode invasive et est aujourd'hui beaucoup moins utilisée grâce au développement d'approches non-invasives qui permettent également d'évaluer l'étendue de la fibrose efficacement.

Les analyses sanguines permettent de détecter la présence de marqueurs hépatiques. Plusieurs tests sont utilisés actuellement en routine : le Fibrotest® (haptoglobine, gGT, bilirubine, a2-macroglobuline, apolipoprotéine A1), le Fibromètre® (a2-macroglobuline, acide hyaluronique, plaquettes, taux de prothrombine, ASAT, ALAT, urée) ou encore l'Actitest (alpha-2-macroglobuline,

haptoglobine, apolipoprotéine A1, bilirubine totale, g-glutamyl-transpeptidase). L'établissement d'un score FIB-4 reposant sur l'âge du patient, le taux de plaquettes et de transaminases (ASAT et ALAT) est utilisé comme un outil de dépistage et permet d'orienter vers des tests plus spécifiques si nécessaire.

Les approches de mesures d'élasticité du foie à l'aide d'ultrasons, appelées élastométries, permettent de mesurer le degré d'élasticité du foie à partir de deux paramètres physiques : la rigidité du foie et l'atténuation ultrasonore qui indique la présence et le degré d'une surcharge en graisse dans les tissus hépatiques. Le Fibroscan®, ou élastographie impulsionnelle, est la méthode la plus utilisée actuellement.

C. Les cellules étoilées du foie, acteurs majeurs au cours de la fibrose hépatique

Décrites pour la première fois en 1876 par l'anatomiste allemand Karl von Kupffer, les cellules étoilées du foie (CEFs) sont localisées dans l'espace de Disse, entre les cellules endothéliales sinusoidales, qui délimitent le sinusoïde, et les hépatocytes. Dans un foie normal, elles représentent environ 10% des cellules résidentes totales (Friedman, 2008). Elles sont essentielles aux fonctions hépatocellulaires dans le foie normal et contribuent à la réparation tissulaire hépatique après une lésion. Dans le contexte d'agressions chroniques, le maintien de l'activation des CEFs est considéré comme une cause principale de la fibrogenèse.

1. Quiescence et stockage de la vitamine A

Dans le foie normal, les CEFs quiescentes jouent un rôle clé dans le stockage et le transport des rétinoïdes et des métabolites de la vitamine A (Wake, 1980). Les rétinoïdes sont retrouvés dans les CEFs sous forme de gouttelettes lipidiques (Friedman, 2008). En réponse à l'inflammation, les CEFs sont activées, se différencient et changent de fonctions. L'activation des CEFs s'accompagne d'une perte des gouttelettes de rétinoïdes et le relargage de ces rétinoïdes dans le microenvironnement promeut la régénération hépatique en favorisant la survie des hépatocytes après une agression (Kamm & McCommis, 2022; Shmarakov et al., 2013).

2. Activation et inactivation des cellules étoilées du foie : étapes clés dans le contrôle de la réparation tissulaire et de la fibrose hépatique

Suite à une lésion hépatique, les CEFs sont activées par divers stimuli inflammatoires. Elles sortent de leur état quiescent, perdent leurs gouttelettes lipidiques et se différencient en myofibroblastes prolifératifs, dotés de capacités contractiles et migratrices. Les CEFs activées sécrètent des composants de la matrice extracellulaire et contribuent au remodelage matriciel et à la réparation tissulaire. Dans le cas d'une lésion aiguë, les CEFs sont ensuite éliminées par divers mécanismes. Dans le cas de lésions chroniques, la population de CEFs activées est maintenue et amplifiée par le microenvironnement inflammatoire, favorisant l'accumulation de la matrice et le développement de la fibrose hépatique. Les transitions dynamiques entre différents états des CEFs jouent donc un rôle essentiel dans l'équilibre entre réparation tissulaire et fibrose hépatique. Grâce aux récents progrès de phénotypage moléculaire, nous savons que les différents états des CEFs sont en réalité très nombreux, reflétant la grande plasticité de ces cellules ; cette notion sera d'ailleurs détaillée plus loin. On distingue cependant quelques étapes clés dans le cycle de vie des CEFs : l'initiation, la perpétuation et l'élimination, correspondant aux principales étapes de la réponse aux lésions, de la réparation tissulaire et de la fibrose (**Figure 3**) (Tsuchida & Friedman, 2017).

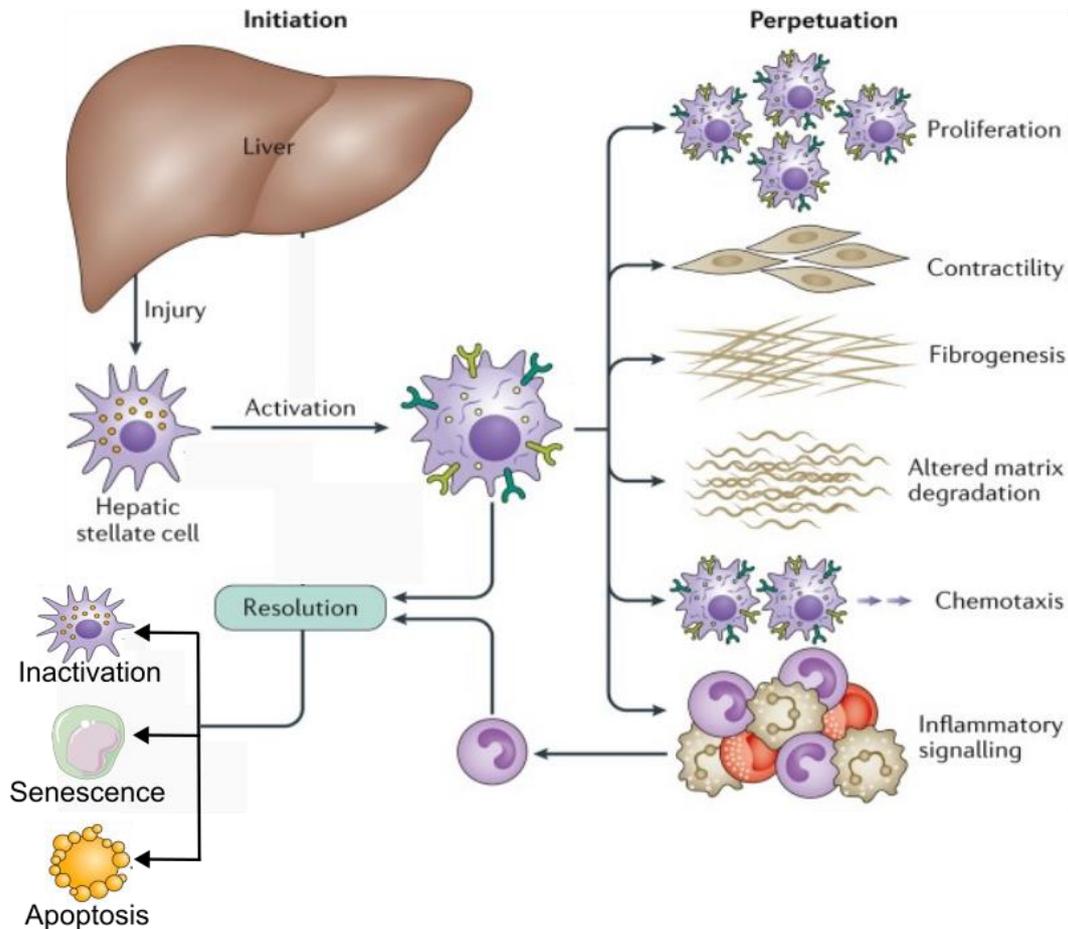


Figure 3. Dynamique des cellules étoilées du foie après une agression.

Adaptée de (Tsuchida & Friedman, 2017)

La lésion hépatique initie la différenciation des CEFs quiescentes vers leur phénotype activé. La perpétuation est caractérisée par des modifications phénotypiques spécifiques dont la prolifération, la contractilité, la fibrogenèse, un défaut de dégradation de la matrice, le chimiotactisme et la signalisation inflammatoire. Au cours de la résolution de la fibrose hépatique, les CEFs activées peuvent être éliminées par apoptose, sénescence ou inactivation.

2.1. Phase d'initiation

L'initiation se réfère aux événements précoces de l'activation des CEFs, lorsque la cellule devient sensible à de nombreux signaux extracellulaires. Cette phase résulte majoritairement d'une stimulation paracrine par toutes les cellules avoisinantes. La mort cellulaire des hépatocytes provoquée par les agressions entraîne le relargage de corps apoptotiques, d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) et de diverses molécules associées aux lésions (DAMPs) créant un microenvironnement inflammatoire. Ces signaux induisent le recrutement de cellules immunitaires comme les cellules de Kupffer ou les monocytes qui vont contribuer à la réponse inflammatoire en produisant des cytokines, comme l'IL-1 et l'IL-6, et certains facteurs de croissance,

comme le TGF- β , et ainsi initier l'activation des CEFs (Higashi et al., 2017). La perte des fenestrations des CEFs et la capillarisation du sinusöide entraînent une hypertension portale qui contribue également à l'activation des CEFs (DeLeve, 2015).

2.2. Phase de perpétuation : prolifération, contractilité et fibrogenèse

La phase de perpétuation aboutit à la différenciation complète des CEFs en myofibroblastes. Cette différenciation est caractérisée par de nombreux changements phénotypiques : la perte des gouttelettes de rétinoides, la prolifération, la capacité migratoire, la fibrogenèse (production de matrice fibrillaire) et la contractilité avec notamment l'expression de la protéine alpha-actine du muscle lisse (α -SMA) (Higashi et al., 2017). Le phénotype myofibroblastique des CEFs activées est maintenu *via* la production autocrine de facteurs pro-fibrosants comme le TGF- β , ainsi que par des forces mécaniques induites par la rigidification du microenvironnement (Tsuchida & Friedman, 2017). La rigidification de la matrice extracellulaire, provoquée par le dépôt de matrice fibrillaire, induit des signaux mécaniques vers les CEFs mais également vers les cellules du système immunitaire, qui perpétuent également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires contribuant au maintien des CEFs dans leur état activé (Y.-Q. Zhao et al., 2023). La rigidité de la matrice participe par ailleurs directement à l'activation mécanique du TGF- β (Hinz, 2009; Wipff et al., 2007). Ces événements vont aboutir à l'accumulation de CEFs activées et de la matrice extracellulaire, contribuant ainsi à la réparation tissulaire ou à la fibrose hépatique dans le cas d'agressions chroniques.

2.3. Elimination des CEFs activées et résolution de la fibrose hépatique

De nombreuses études ont désormais démontré la possibilité d'inverser la fibrose hépatique par certains traitements anti-fibrotiques ou lorsque la cause des lésions chroniques est supprimée (Kisseleva & Brenner, 2021). Différents mécanismes contribuant à l'élimination des CEFs ont été identifiés : la mort programmée, la sénescence ou l'inactivation de ces cellules.

La mort programmée, principalement par apoptose, est l'un des processus impliqués dans l'élimination des CEFs. D'autres mécanismes comme la nécroptose, la pyroptose et la ferroptose ont également été décrits comme pouvant participer à l'élimination des CEFs mais sont encore des concepts récents et moins bien décrits (Gao et al., 2023). L'induction de l'apoptose des CEFs est associée à la production de facteurs pro-apoptotiques dans l'environnement extracellulaire par les cellules immunitaires. L'activation des cellules NK (*Natural Killer*) entraîne la libération d'IFN γ , qui produit un effet anti-fibrogénique fort en induisant l'apoptose des CEFs (Jeong et al., 2006). Les cellules NK se lient également aux CEFs ce qui entraîne la dégranulation de peptides cytotoxiques, appelés granzymes B, dans le cytoplasme des CEFs et ainsi leur mort apoptotique. Les cellules T

mémoires CD8+ seraient également impliquées dans l'induction de l'apoptose des CEFs, contribuant ainsi à la réduction de la fibrose hépatique et à sa résolution (Koda et al., 2021).

La sénescence cellulaire est une forme d'arrêt du cycle cellulaire qui se produit lorsque les cellules atteignent une capacité finie de prolifération. Ce mécanisme contribue à limiter l'accumulation de cellules génétiquement endommagées. La sénescence médiée par la voie p53 est notamment impliquée dans la diminution de la prolifération des CEFs et la réduction de la fibrose chez la souris (Krizhanovsky et al., 2008). Les CEFs sénescents ne prolifèrent plus et perdent leur phénotype myofibroblastique. Elles expriment en général moins de protéines de la matrice et plus de protéases, ce qui se traduit par une diminution de leur fibrogénicité. L'ensemble de ces mécanismes diminue la population de cellules fibrogènes, facilitant ainsi la résolution de la fibrose hépatique.

L'inactivation des CEFs se traduit par un processus de réversion phénotypique où les CEFs activées retournent à un état proche de l'état quiescent, mais avec un phénotype et un profil d'expression génique différent. De façon remarquable, la réactivation des CEFs inactivées en réponse à de nouvelles agressions est plus rapide que celle des CEFs quiescentes (El Taghdouini et al., 2015; Kisseleva et al., 2012).

Ainsi, dans le foie, et notamment dans le contexte de fibrose hépatique, il existe une grande hétérogénéité phénotypique des CEFs et ces différents états co-existent, complexifiant l'image de la dynamique des CEFs. L'apport des récentes approches de séquençage ARN en cellule unique confirment cette grande plasticité. Krenkel et son équipe ont notamment démontré la présence de quatre clusters de myofibroblastes au sein d'un foie murin fibrosé (Krenkel et al., 2019). Une autre étude identifie plusieurs clusters avec différentes activités : un cluster de myofibroblastes fibrosants, un cluster de myofibroblastes inflammatoires, et un cluster associé à la réparation tissulaire (W. Zhang et al., 2021). D'autres études mettent en évidence les différentes trajectoires d'activation des CEFs selon le modèle murin de fibrose utilisé (W. Yang et al., 2021) et l'apparition des CEFs inactivées au cours de la réversion d'une fibrose induite par un régime type occidental (NASH) (Rosenthal et al., 2021).

Notre équipe a notamment contribué à une meilleure compréhension de cette dynamique des CEFs en développant un modèle multi-échelle intégrant les différents états des CEFs ainsi que leur production de collagène 1 (**Figure 4**) (Bouguéon et al., 2024). Ce modèle permet de mieux comprendre la plasticité des CEFs durant le développement et la réversion de la fibrose hépatique. Les prédictions du modèle montrent que le processus d'inactivation des CEFs joue un rôle essentiel dans la progression de la fibrose de par la capacité de réactivation plus rapide des CEFs inactivées, en comparaison à des cellules quiescentes. Les répétitions d'inactivation et de réactivation aboutissent de ce fait à une population de myofibroblastes plus fibrogénique.

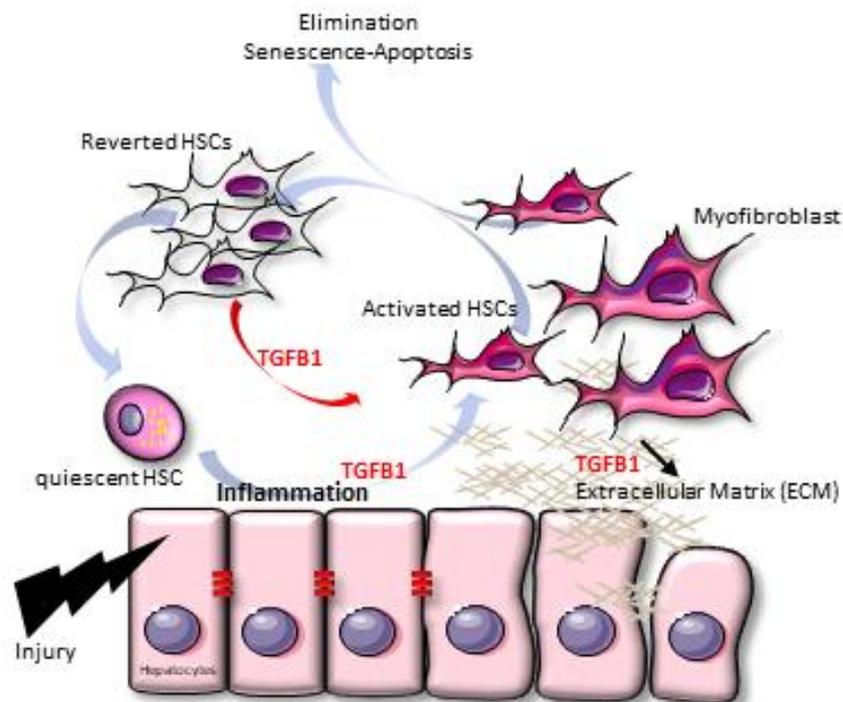


Figure 4. Dynamique des cellules étoilées hépatiques.
(Bouguéon et al., 2021).

Suite à la lésion, les hépatocytes endommagés produisent des signaux pro-inflammatoires qui induisent l'activation dépendante du TGF- β des CEFs. Les CEFs activées coordonnent la réparation tissulaire et sont éliminées par sénescence, apoptose ou inactivation pour retourner à un état proche de l'état quiescent initial et peuvent être réactivées plus rapidement. Dans le contexte de lésions répétées, les CEFs activées progressent vers un phénotype myofibroblastique contribuant ainsi au développement de la fibrose.

D. La matrice extracellulaire

L'accumulation et l'augmentation de la rigidité de la matrice extracellulaire est une des caractéristiques majeures de la fibrose hépatique. De plus, la composition biochimique de la matrice évolue au cours de la progression des MCHs.

1. Principales fonctions et principaux composants de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure tridimensionnelle dynamique et complexe caractérisée par des propriétés biophysiques, mécaniques et biochimiques, spécifiques à chaque organe. La MEC possède de nombreuses fonctions essentielles aux cellules et aux tissus :

- Un rôle structurel et de maintien des cellules au sein des tissus, notamment par des interactions avec les intégrines et les molécules d'adhésion.
- Un rôle mécanique (élasticité, tension, compression).
- Un rôle dans le stockage et la biodisponibilité des facteurs de croissance et des cytokines. Elle est impliquée dans la communication entre les cellules en médiant la présentation de ces facteurs à leurs récepteurs.
- Un rôle dans le contrôle de la migration cellulaire. En fonction de ses propriétés mécaniques et biochimiques, la MEC peut inhiber ou faciliter la migration des cellules.

On peut distinguer deux types de MEC : la matrice interstitielle et la membrane basale (**Figure 5**) (Bandzerewicz & Gadomska-Gajadhur, 2022). La matrice interstitielle forme l'échafaudage structurel pour les cellules et est principalement synthétisée par les cellules stromales, comme les fibroblastes. La membrane basale est une structure plus flexible qui forme une couche de protéines et de glycoprotéines extracellulaires principalement à la périphérie des cellules épithéliales (au pôle basal) et endothéliales. Elle joue un rôle de compartimentation et également de premier support structurel pour les cellules.

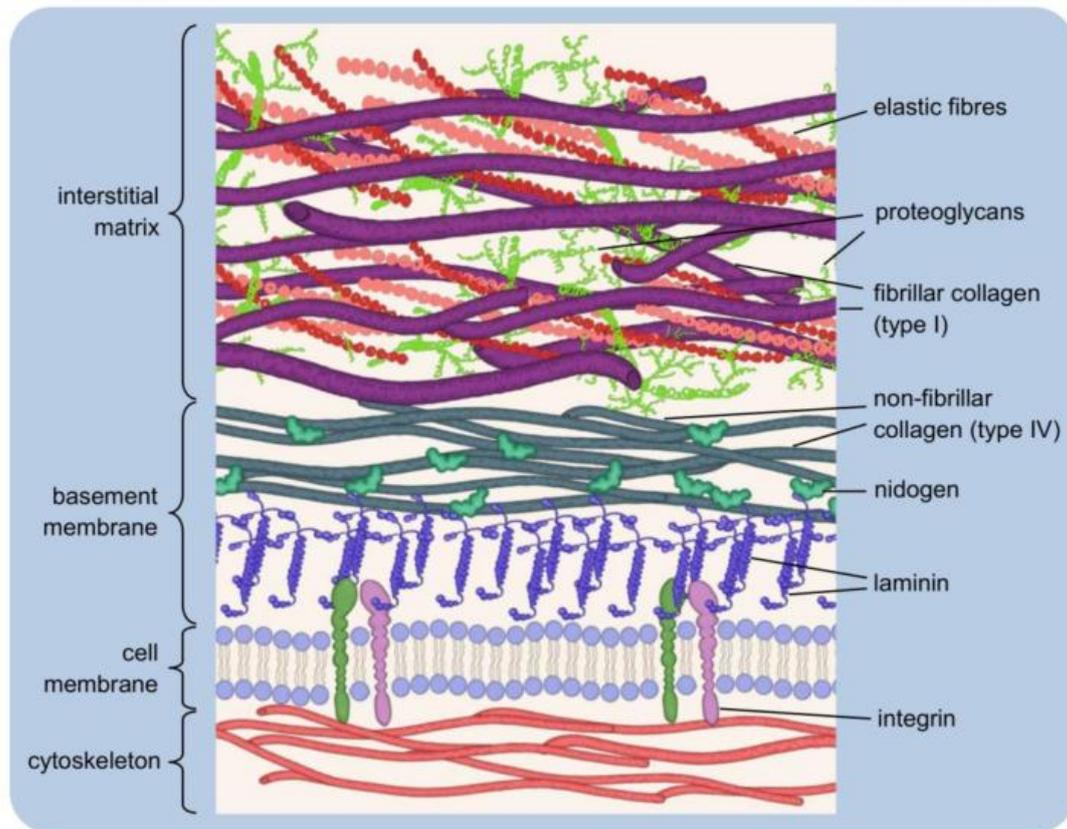


Figure 5. Représentation simplifiée de la matrice extracellulaire.
(Bandzerewicz & Gadomska-Gajadur, 2022)

La membrane basale est un assemblage de protéines extracellulaires située à la périphérie des cellules. La matrice interstitielle est un réseau conjonctif de soutien composée de protéines matricielles interstitielles. La composition de la MEC varie selon les organes et leurs besoins biochimiques et biomécaniques.

En 2012, Alexandra Naba et Richard O. Hynes définissent l'ensemble des composants de la MEC sous le terme de matrisome (Hynes & Naba, 2012). Le matrisome est constitué de quatre grandes classes de molécules :

- Les protéines fibreuses, qui forment le réseau fibrillaire de la MEC.
- Les protéoglycannes et les glycosaminoglycannes.
- Les glycoprotéines, qui participent aux interactions entre la matrice et les cellules.
- Les protéines associées à la matrice, comme les facteurs de croissance et les enzymes de remodelage.

1.1. Les protéines fibreuses

Les protéines fibreuses forment des structures fibrillaires et soutiennent le rôle structural de la matrice. En fonction des types de protéines fibreuses et de leur quantité, elles modulent les propriétés mécaniques de rigidité, de résistance et/ou d'élasticité des tissus.

Les collagènes représentent environ 30% de toutes les protéines chez les vertébrés et constituent le composant principal de la matrice. Ils forment une famille de 28 membres, dont le collagène I est le plus abondant, et peuvent être classifiés en plusieurs groupes selon leur structure moléculaire et leur mode d'assemblage :

- Les collagènes de type fibrillaire avec les types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII.
- Les collagènes de la membrane basale avec les types IV, VII et XXVIII.
- Les collagènes de chaînes courtes avec les types VI, VIII et X.
- Les collagènes avec de multiples interruptions dans leur structure avec les types IX, XII, XIV, XVI XIX, XX, XXI et XXII.

Le processus de biosynthèse et d'assemblage du collagène se réalise en plusieurs étapes (**Figure 6**) (Sorushanova et al., 2019). La molécule de collagène est composée de trois chaînes polypeptidiques, appelées chaînes α , qui forment une structure en triple-hélice (Ricard-Blum, 2011). Les chaînes α peuvent être identiques (homotrimères) ou différentes (hétérotrimères) augmentant la diversité des types et fonctions des collagènes. Chaque triple-hélice résulte de la combinaison de trois chaînes α codées par un ou plusieurs gènes. Par exemple, les gènes *COL1A1* et *COL1A2* codent pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène I, tandis que les gènes *COL5A1*, *COL5A2*, *COL5A3* et *COL5A4* codent pour celles du collagène V. La triple-hélice est ensuite sécrétée dans l'espace extracellulaire où des amino- et carboxy-protéinases clivent les extrémités globulaires, non-hélicoïdales, de la molécule. Les triple-hélices s'associent ensuite de façon spontanée pour former des fibrilles. Ces fibrilles sont liées de manière covalente et stabilisées par la formation de pontages (*crosslinking* en anglais) entre les lysines de deux polypeptides, catalysée par la Lysyl Oxydase (LOX).

Procollagen Synthesis

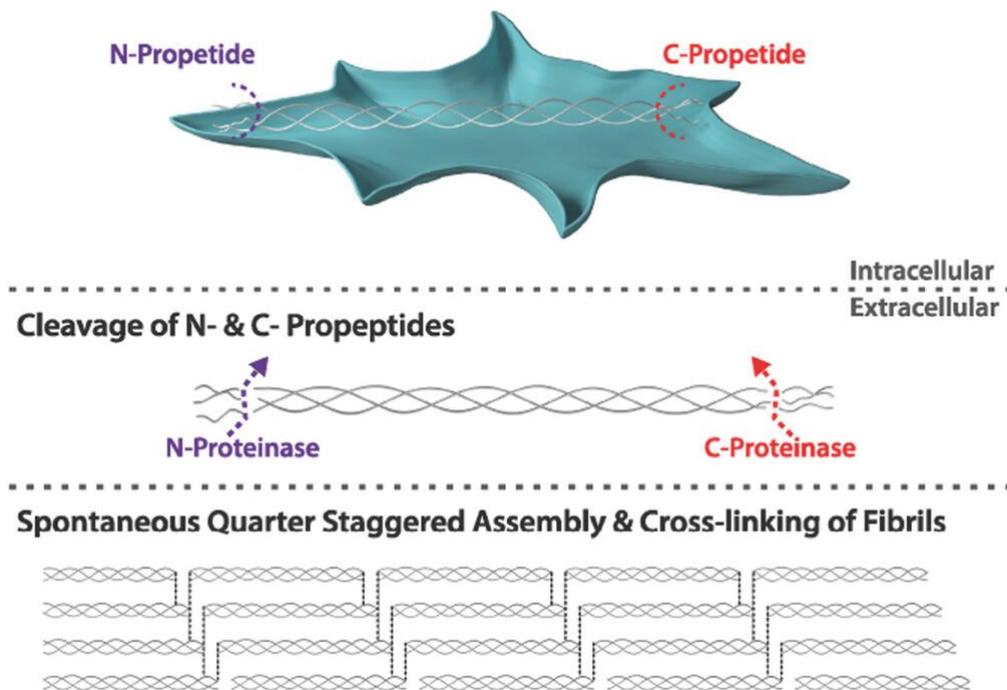


Figure 6. Les principales étapes de la formation des fibres de collagène.
(Soroushanova et al., 2019)

Après synthèse de trois chaînes α et assemblage sous forme de triple-hélice, la molécule de collagène est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Les extrémités N- et C-propeptides, non-hélicoïdales, sont clivées par des protéinases spécifiques de chaque extrémité. Les triple-hélices de collagène s'associent ensuite de manière spontanée pour former des fibrilles. Ces fibrilles sont également associées et stabilisées par le phénomène de pontage, catalysé par les enzymes lysyl oxydases (LOX).

L'élastine est retrouvée en grandes quantités dans les tissus dont la fonction requière des propriétés élastiques. Elle confère l'élasticité et l'extensibilité nécessaires à de nombreux organes et structures sujets à des contractions et étirements répétés, tels que les vaisseaux sanguins, le cœur, les poumons ou encore la peau. La formation des fibres élastiques, appelée l'élastogenèse, est un processus complexe impliquant plusieurs acteurs. Une fibre élastique est composée de 2 éléments principaux : un corps d'élastine et un échafaudage microfibrillaire (**Figure 7**). L'élastine est une protéine hydrophobe, très extensible et mécaniquement très résistante, constituée d'un polymère de tropoélastine (TE). Après synthèse et sécrétion des monomères de TE dans l'espace extracellulaire, les molécules s'assemblent de façon spontanée, formant des agrégats attachés à la surface cellulaire. Plusieurs molécules retrouvées au niveau de la membrane basale participent à ce mécanisme comme certains glycosaminoglycanes, qui accélèrent ce processus, ou la fibuline-4, qui médie l'alignement des molécules de TE. Les fibres d'élastine sont liées de manière covalente par le phénomène de pontage grâce à l'action des enzymes de la famille des Lysyl Oxydases (LOX et LOXL1-4). Brièvement, ces enzymes catalysent l'oxydation des résidus lysines de la TE. Après l'oxydation, le pontage spontané des lysines modifiées entre les molécules de TE conduit à la

formation d'acides aminés de pontage, appelés desmosine et isodesmosine, contribuant à la stabilisation de la structure. L'élastine, guidée notamment par la fibuline-5, se dépose sur un échafaudage de microfibrilles composée de plusieurs types de fibrillines, dont la fibrilline-1 est un composant majoritaire, contribuant ainsi à la formation des fibres élastiques. Des pontages supplémentaires formés par les enzymes LOX permettent de stabiliser davantage cette structure (Schmelzer & Duca, 2022).

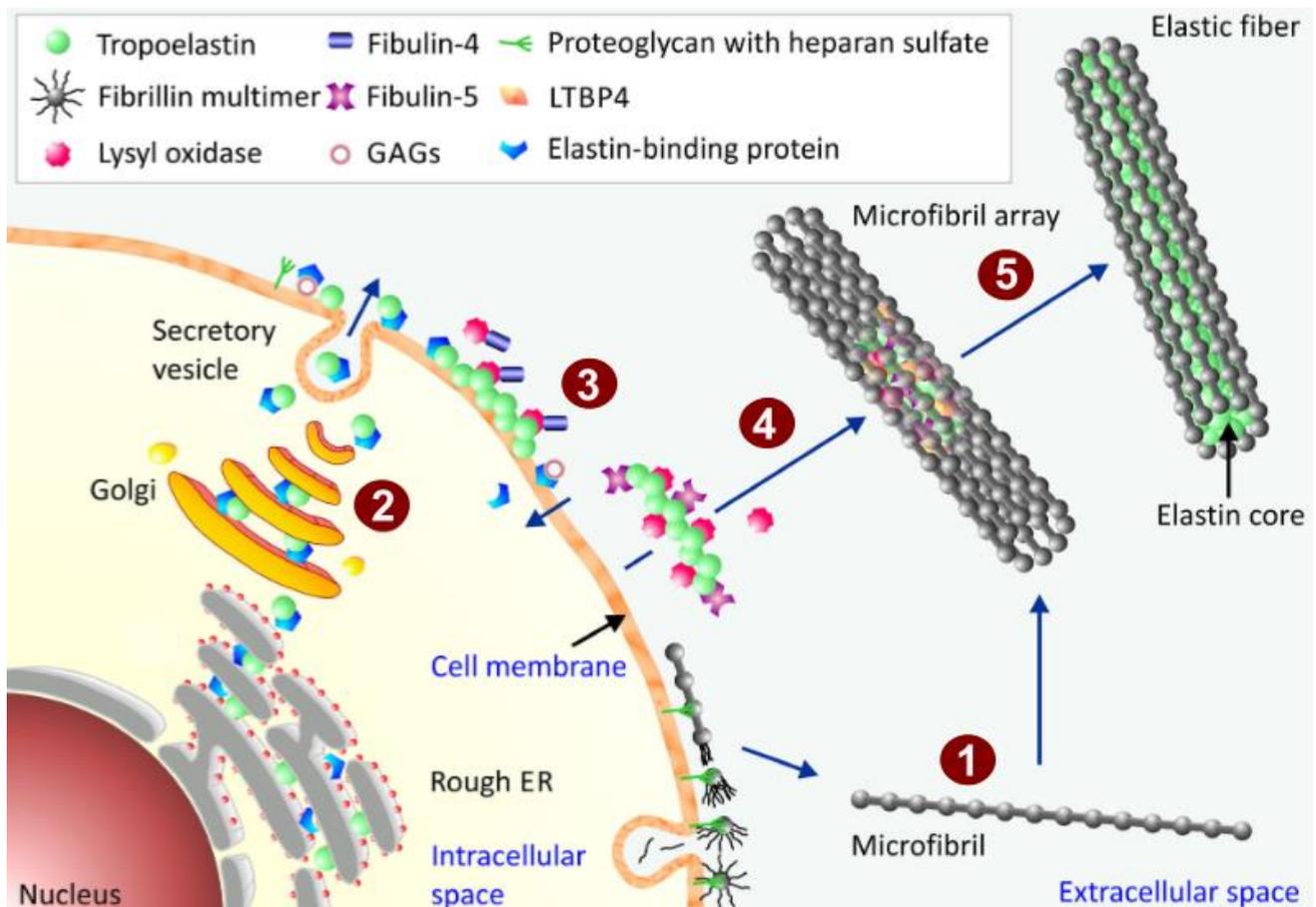


Figure 7. Les différentes étapes de l'élastogénèse.

Adaptée de (Schmelzer et Duca 2022)

1) Une fois sécrétées dans l'espace extracellulaire, les molécules de fibrillines se polymérisent pour donner des microfibrilles. Ces structures s'assemblent ensuite sous forme d'échafaudage qui permettra le dépôt d'élastine.

2) Les monomères de tropoélastine sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique rugueux, où ils s'associent à une molécule chaperone, la protéine de liaison à l'élastine (EBP), et transportés dans l'appareil de Golgi puis sécrétés à la membrane plasmique.

3) Les monomères de TE s'agrègent dans l'espace extracellulaire grâce à plusieurs molécules. La fibuline-4 contrôle l'alignement des molécules de TE et recrute les enzymes LOX. Cette étape entraîne le pontage de la TE et la stabilisation de la structure d'élastine.

4) La fixation de la fibuline-5 à l'élastine permet de guider cette dernière vers la structure microfibrillaire. La présence de LTBP4 semble également être essentielle au dépôt et à l'alignement de l'élastine sur les microfibrilles.

5) Une fois associée avec les microfibrilles, la structure d'élastine est davantage pontée par la présence des enzymes LOX, terminant ainsi la maturation de la fibre élastique.

1.2. Les protéoglycanes et glycosaminoglycanes

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules présentant une structure tridimensionnelle complexe, composée d'un corps protéique lié de façon covalente à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) (**Figure 8**) (Joshi et al., 2023). Les chaînes GAGs sont des répétitions d'unités disaccharides chargées négativement, dont la majorité contient un groupement sulfate. On distingue plusieurs types de GAGs (Schaefer, 2014) :

- Les héparane sulfates (ou héparanes) (HS)
- Les kératane sulfates (KS)
- Les dermatane sulfates (DS)
- Les chondroïtine sulfates (CS)
- Les acides hyaluroniques ou hyaluronanes (HA), qui représentent la structure la plus simple et ne contiennent pas de groupe sulfate contrairement aux autres GAGs. Des protéines de liaison permettent de lier certains PGs aux HAs (**Figure 8**).

Les PGs interagissent avec de nombreux composants de la MEC, des facteurs de croissance, des cytokines ou des récepteurs membranaires. Ils peuvent ainsi être classifiés en quatre principaux groupes en se basant sur leur localisation, leurs partenaires et la composition moléculaire des chaînes GAGs (Iozzo & Schaefer, 2015) :

- Le PG intracellulaire avec la serglycine, unique membre de ce groupe.
- Les PGs de surface cellulaire, majoritairement des PGs HS, dont le syndécan et le glypican.
- Les PGs péricellulaires, retrouvés à la membrane basale, dont le perlecan et l'agrine.
- Les PGs extracellulaires, qui représentent le groupe le plus large, avec :
 - Les hyalectanes, capables de fixer les HA, dont l'aggrecan, le versican, le neurocan et le brevican.
 - Les PGs riches en leucine (*Small leucine-rich proteoglycans*, SLRPs).
 - Les PGs SPOCK (*Secreted Protein acidic and rich in cysteine/Osteonectin CWCV and Kazal-like domain*) qui correspondent aux testicans 1 à 3.

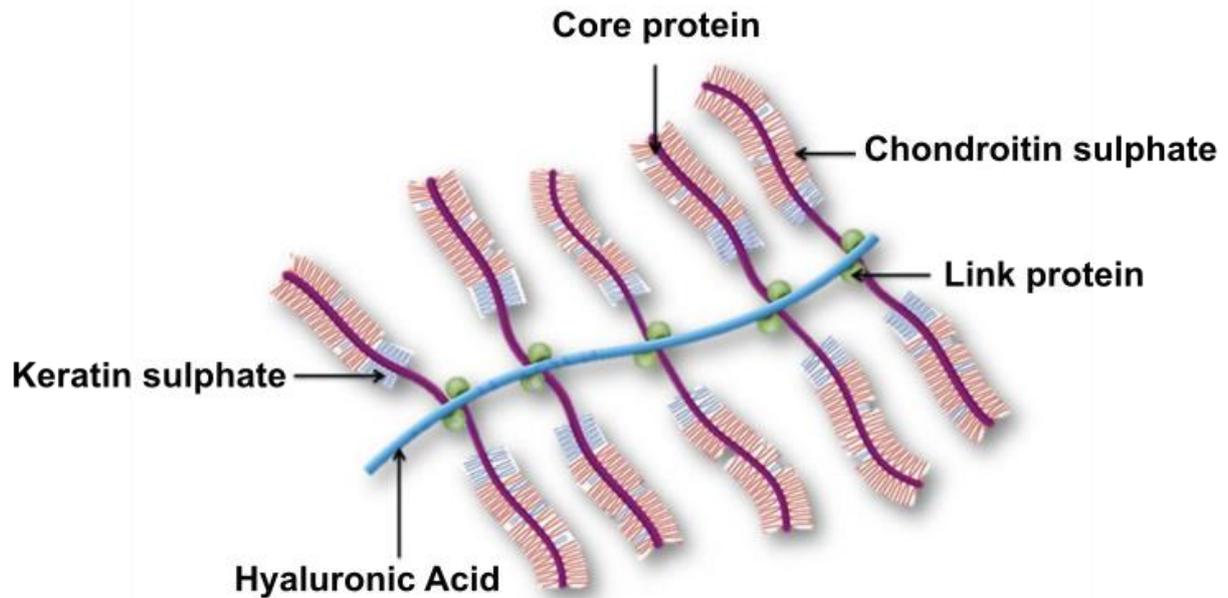


Figure 8. La structure des protéoglycanes avec des chaînes de glycosaminoglycanes.
Adaptée de (Joshi et al., 2023)

1.3. Les glycoprotéines

Les glycoprotéines sont des protéines liées de façon covalente à une ou plusieurs chaînes glucidiques. Elles sont considérées comme des connecteurs de la MEC car elles possèdent des domaines capables de se lier à d'autres protéines, facteurs de croissance et récepteurs membranaires. Les glycoprotéines sont ainsi impliquées dans divers processus biologiques comme l'adhésion cellulaire mais aussi la signalisation intracellulaire.

Une des principales glycoprotéines est la fibronectine, retrouvée généralement sous forme de réseau fibrillaire. L'assemblage des fibres de fibronectine débute par la fixation de la fibronectine, encore soluble et compacte, aux récepteurs intégrines à la surface des cellules (**Figure 9**). Cette interaction initie la réorganisation et l'extension de la fibronectine. Suite au recrutement de composants des points d'adhésion focaux, le domaine cytoplasmique des intégrines s'associe au réseau du cytosquelette d'actine et la contraction du cytosquelette stimule la formation de fibres de fibronectine. La polymérisation des molécules de fibronectine donne lieu à un réseau de fibres de fibronectine tout autour de la cellule (Spada et al., 2021).

Il existe d'autres glycoprotéines de la MEC avec par exemple la laminine, les fibulines, la tenascine, le fibrinogène ou encore la vitronectine.

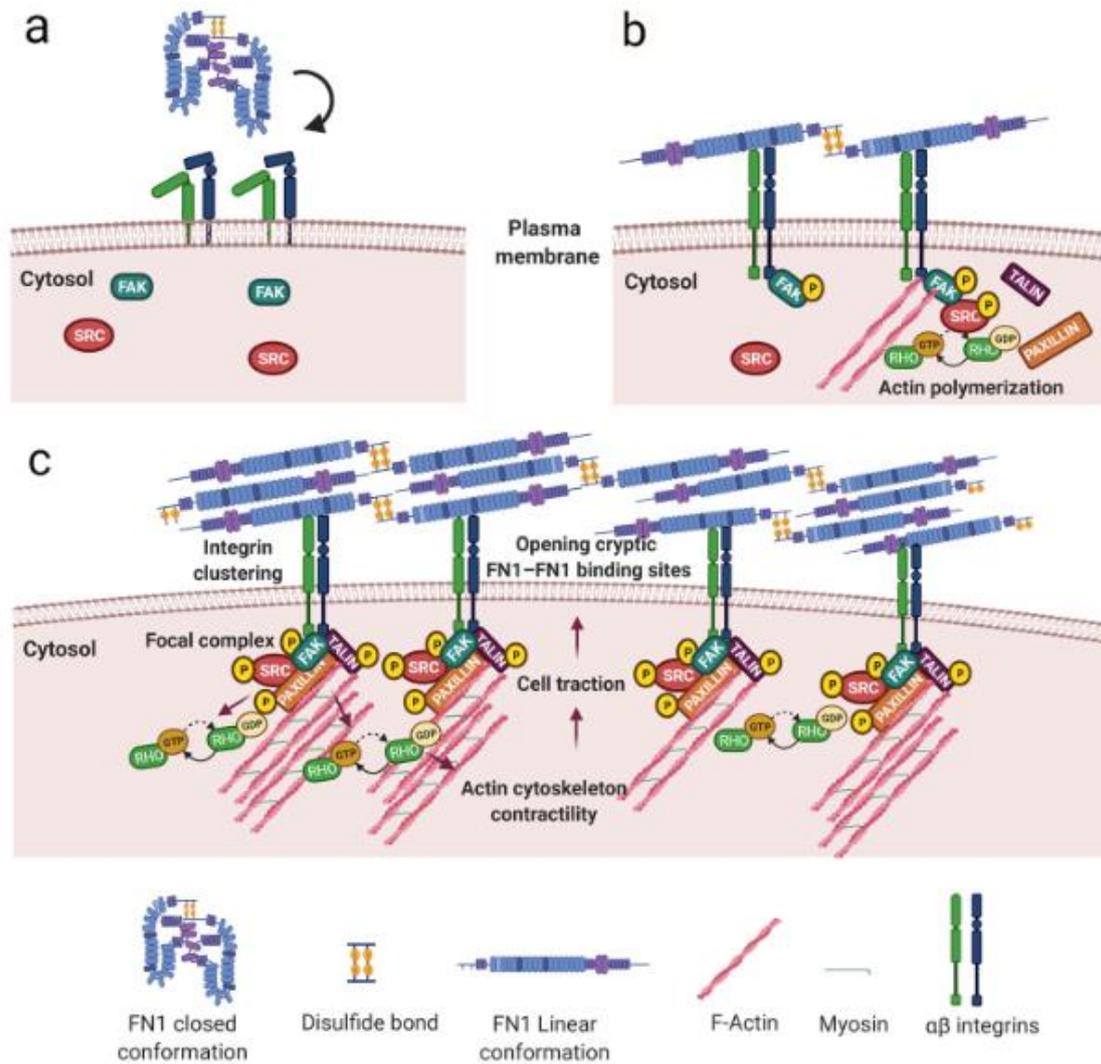


Figure 9. Principales étapes de l'assemblage de la matrice de fibronectine.
(Spada et al., 2021)

a. Les dimères de fibronectine possèdent une conformation compacte grâce à des ponts disulfures.

b. La fixation de la fibronectine aux intégrines présentes à la surface de la cellule induit un changement conformationnel de la molécule qui se déplie et s'étend le long de la membrane cellulaire. Cela entraîne un regroupement des récepteurs intégrines et active le recrutement de composants de points d'adhésion focaux dont la Focal Adhesion Kinase (FAK), la kinase Src, la paxilline, la taline et la RhoA GTPase. La formation de ce complexe d'adhésion crée un lien entre les intégrines et l'actine et induit une réorganisation du réseau du cytosquelette d'actine au sein de la cellule.

c. La contraction cellulaire via le cytosquelette d'actine favorise l'extension de la fibronectine et l'exposition de domaines de liaison fibronectine-fibronectine, permettant la formation de fibres par la polymérisation de la fibronectine autour de la cellule.

1.4. Les protéines associées à la matrice

Cette catégorie du matrisome correspond à des protéines non-structurales impliquées dans la communication cellulaire et/ou dans le remodelage de la MEC.

La MEC est considérée comme un réservoir de plusieurs types de facteurs de croissance impliqués dans la stimulation de la croissance, de la prolifération ou de la différenciation cellulaire. Ces molécules, séquestrées au sein de la matrice, peuvent être libérées par dégradation de la matrice ou par interaction avec d'autres composants. C'est notamment le cas pour le TGF- β qui est synthétisé sous forme d'un précurseur latent qui, en association avec le LAP (*Latency Associated Protein*), forme le « petit complexe du TGF- β latent ». Ce complexe est séquestré dans la matrice *via* la fixation à une protéine de liaison au TGF- β latent (*Latent TGF- β Binding protein*, LTBP) formant ainsi le « grand complexe du TGF- β latent ». Un des mécanismes principaux de l'activation du TGF- β est l'interaction de ce complexe avec les intégrines à la surface des cellules ou avec certaines protéases de la matrice comme ADAMTS1 (Bourd-Boittin et al., 2011) induisant un changement conformationnel libérant ainsi la forme active. Une action mécanique induite par une augmentation de la rigidité de la matrice est également une voie d'activation du TGF- β (Hinz, 2009; Wipff et al., 2007). Le TGF- β actif se fixe au récepteur de type I au TGF- β (T β RI) et induit la formation d'un complexe de récepteurs avec le récepteur de type II (T β RII). L'interaction de ces récepteurs avec certains composants matriciels peut moduler la signalisation du TGF- β de façon positive avec par exemple ADAM12 (Atfi et al., 2007) ou de façon négative avec la fibuline-3 (Tian et al., 2015; Xu et al., 2022). Ce mécanisme complexe, impliquant de nombreux acteurs, entraîne une signalisation intracellulaire qui permet de réguler l'expression de certains gènes (Dewidar et al., 2019).

La MEC est également une structure dynamique soumise à des changements de composition et d'organisation désignés sous le terme de remodelage. Ce remodelage résulte d'un équilibre dynamique entre, d'une part, la synthèse, le dépôt et l'assemblage des molécules de la matrice, et d'autre part, leur dégradation. Les protéines de remodelage peuvent être classées en deux principales catégories : les enzymes liantes et les enzymes dégradantes.

Les enzymes liantes (ou ligases) ont pour fonction de lier les molécules entre-elles par des liaisons covalentes (phénomène de pontage). Les Lysyl Oxydases font partie de ces enzymes. Elles permettent de stabiliser les structures fibrillaires et de les organiser à plus grande échelle.

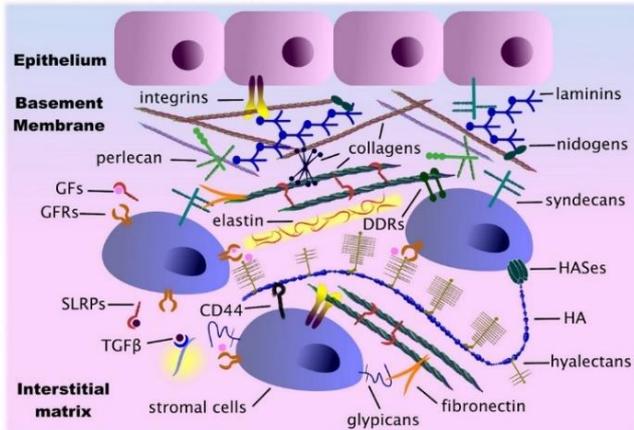
Les enzymes dégradantes (ou protéases) sont des enzymes protéolytiques qui ont pour fonction de cliver les composants de la MEC pour leur dégradation ou leur maturation. Les métalloprotéases sont les principales protéines de ce groupe, avec les metzincines qui en constituent la plus grande famille. Ces enzymes sont caractérisées par la présence d'un cation métallique dans

leur site actif. Parmi elles, on retrouve les métalloprotéases matricielles (MMPs) et les Adamalysines avec les ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinases*) et les ADAMTSs (*ADAMs with ThromboSpondin motifs*) (Apte, 2020; Mead & Apte, 2018). La dégradation matricielle est également régulée par des inhibiteurs spécifiques, les TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*). Il en existe quatre (TIMP-1 à -4), avec des actions inhibitrices des métalloprotéases, mais également des fonctions cellulaires indépendantes de cette action inhibitrice (Coates-Park et al., 2024). Outre la dégradation de la matrice, le clivage est également essentiel à la maturation de certaines protéines comme les pro-collagènes de type I, III et V par ADAMTS2 (Colige et al., 2005). En modifiant l'architecture de la MEC, les protéases peuvent moduler les interactions cellule-cellule et cellule-MEC ainsi que l'activation et la biodisponibilité des facteurs de croissance. Le clivage de certaines protéines matricielles permet également de libérer des fragments peptidiques actifs, appelés matrikines ou matricryptines, qui peuvent agir comme des cytokines pour réguler des processus physiologiques et pathologiques (Ricard-Blum & Salza, 2014).

Selon l'organe et le tissu, il existe en réalité une grande diversité de MEC avec des compositions différentes selon les besoins chimiques et mécaniques (élasticité, durabilité, transparence, ...) (Karamanos et al., 2021). Des phénotypes de MEC spécifiques façonnent les différents tissus (épithéliaux, nerveux, musculaires et conjonctifs) pour répondre aux exigences des fonctions tissulaires (**Figure 10**). La composition de la MEC évolue constamment en fonction des signaux biochimiques et mécaniques, ce qui donne lieu à un mécanisme de remodelage matriciel dynamique et finement contrôlé dans les conditions physiologiques ou dérégulé dans les conditions physiopathologiques.

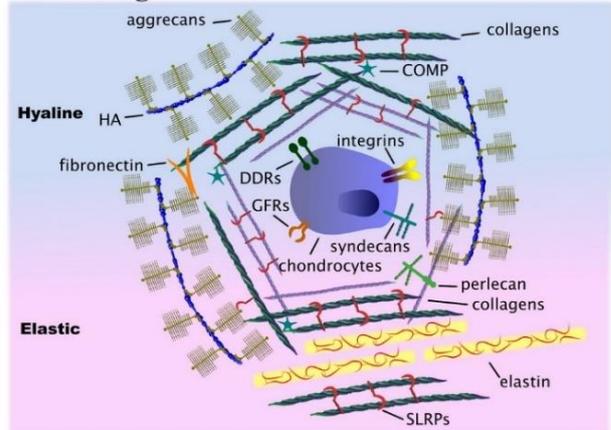


A Connective Tissue



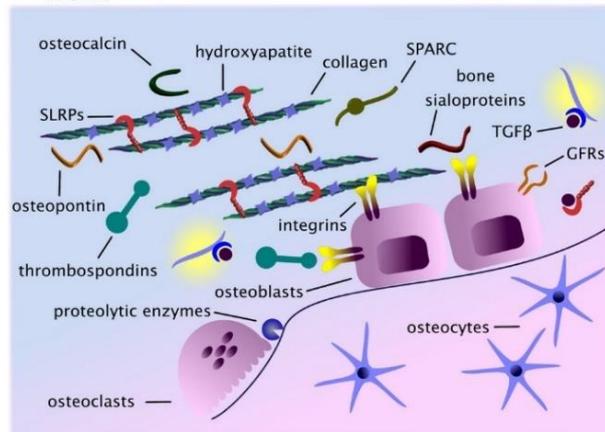
Connection, support, nourishment

B Cartilage



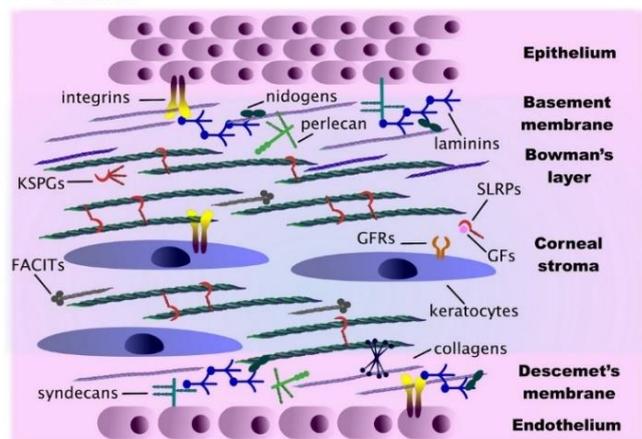
Mechanical support, viscoelasticity, lubrication

C Bone



Durable, strong, stiff structure with low elasticity for shock absorption

D Cornea



Transparency, refraction

Figure 10. Représentation de différentes compositions et architectures de MEC en fonction du tissu. (Karamanos et al., 2021)

2. Remodelage de la matrice extracellulaire au cours de la fibrose hépatique

Au cours du processus de formation de la fibrose, le dépôt et l'accumulation de protéines matricielles changent la composition et l'organisation de la MEC. En comparaison à un foie sain, le nombre de protéines de la MEC peut augmenter jusqu'à six fois dans un foie fibrosé (Roehlen et al., 2020) et jusqu'à dix fois dans un foie cirrhotique (Karsdal et al., 2017). Le remodelage de la MEC est un mécanisme complexe et très coordonné entre synthèse, sécrétion, assemblage et dégradation, s'adaptant constamment et de façon dynamique avec la progression de la pathologie. Un remodelage dérégulé peut entraîner des cicatrices étendues, une distorsion de l'architecture du foie et une altération significative de la fonction hépatique.

Presque tous les types de collagènes augmentent pendant la progression de la fibrose hépatique. La synthèse et le dépôt du collagène de type I dans le foie fibrotique peut augmenter jusqu'à huit fois en comparaison à un foie sain (Crawford & Burt, 2012) et les patients atteints d'hépatite alcoolique présentent de plus hauts niveaux de collagènes de type II, IV et V (Thiele et al., 2021). Dans un contexte cirrhotique, le collagène de type XVIII s'accumule également de façon importante le long des sinusoides (Musso et al., 1998). En comparant différents stades de fibrose, Baiocchi et son équipe suggèrent une augmentation graduelle des collagènes de type I et III (Baiocchi et al., 2016). Il a également été démontré une accumulation significative de l'élastine et des fibres élastiques aux stades tardifs de la fibrose (F4, cirrhose) (Baiocchi et al., 2016; G. Chen et al., 2019), indiquant un processus de synthèse et de dépôt des protéines fibreuses graduel et évolutif tout au long de la progression de la fibrose hépatique.

Les PGs et les GAGs sont également impliqués dans le remodelage de la MEC dans le contexte de la fibrose hépatique. Ils augmentent de façon significative dans les foies tumoraux associés à de la cirrhose, spécialement le perlecan et la décorine (Kovalszky et al., 1993), et sont associés à l'augmentation de la rigidité de la MEC (Kimura et al., 2008). La surexpression et l'accumulation du syndecan-1 sont également associées à des stades avancés de la fibrose hépatique (Charchanti et al., 2021). Par ailleurs, le HA (GAG non sulfaté) s'accumule significativement dans les stades F3-F4 (J. Kim & Seki, 2023).

L'augmentation de la rigidité des tissus hépatiques est également associée à un déséquilibre de la synthèse des protéines associées au remodelage matriciel. Par exemple, l'expression de MMP-2 augmente avec la progression de la fibrose et le développement du CHC (Théret et al., 1998, 2001). Plusieurs ADAMs et ADAMTSs sont également exprimées différenciellement dans le contexte du CHC (Théret et al., 2021). Notre équipe a notamment mis en évidence de plus hauts niveaux d'expression d'ADAM12 et d'ADAMTS12 dans les tissus de patients atteints de CHC (Le Pabic et al., 2003; Dekky et al., 2023). Plus spécifiquement, ADAMTS12 est exprimé dans les CEFs activées des tissus

tumoraux et fibrotiques adjacents des patients, lui suggérant un rôle de modulateur des CEFs dans les maladies chroniques hépatiques (Dekky et al., 2023). Par ailleurs, l'expression des TIMP-1 et -2 augmente significativement, conduisant à un défaut de dégradation de la MEC (Leroy et al., 2004). Dans le contexte de fibrose hépatique, la perte de l'expression de TIMP-3 est associée au caractère inflammatoire et à un mauvais pronostic vital dans le contexte du CHC (Azar et al., 2020). De plus, l'enzyme liante LOXL1 augmente de façon coordonnée avec la tropoélastine, associée à une plus forte activité de pontage de l'élastine au cours de la fibrose hépatique induite par un traitement CCl₄ chez la souris (W. Zhao et al., 2018).

Pour approfondir l'étude de l'évolution et des modifications de la composition et de l'architecture de la MEC au cours de la fibrose hépatique, nous avons réalisé une analyse protéomique d'échantillons de patients évalués à différents stades de fibrose (de F1 à F4) et enrichis en MEC (Naba et al., 2015). Parmi les 106 protéines présentant une expression dérégulée, nous avons identifié trois membres de la famille des fibulines, les fibulines 2, 3 et 5, associées de manière positive avec la fibrose. Cette étude protéomique suggère une implication des fibulines dans la progression et la sévérité de la fibrose hépatique encore peu décrite dans la littérature, qui sera d'ailleurs étudiée dans la première partie des résultats.

La seconde partie de cette introduction s'intéressera donc à la famille des fibulines, avec un focus particulier sur la fibuline-3 que nous avons étudiée plus en détail.

II. Les fibulines

Découvertes à la fin du XXème siècle, les fibulines représentent une famille de protéines extracellulaires de 8 membres qui exercent plusieurs fonctions au sein de la MEC, notamment dans l'assemblage de la matrice fibrillaire. Du fait de leurs implications structurelles, certaines d'entre-elles sont importantes dans l'organisation des tissus et la morphogenèse de certains organes. Les fibulines sont également impliquées dans plusieurs processus pathologiques, comme l'inflammation, la fibrose et le cancer.

A. Origine, structure, évolution et expression des fibulines

En 1989, le premier membre de la famille des fibulines est identifié par chromatographie d'affinité sur une intégrine recombinante (Argaves et al., 1989). Dénommée fibuline-1, cette protéine est tout d'abord décrite comme un partenaire des récepteurs intégrine $\beta 1$ et considérée comme un médiateur entre les récepteurs d'adhésion cellulaire et les structures du cytosquelette. Des études complémentaires ont ensuite permis de préciser sa réelle localisation et son rôle. La fibuline-1 est désormais définie comme une protéine de la matrice extracellulaire, retrouvée au niveau de la membrane basale (Kluge et al., 1990) et associée à la matrice fibrillaire autour de la cellule (Roark et al., 1995). Depuis, la famille des fibulines s'est agrandie et compte à ce jour 8 membres décrits chez l'humain, divisés en trois sous-groupes : les fibulines longues, les fibulines courtes et les hémicentines (**Figure 11**).

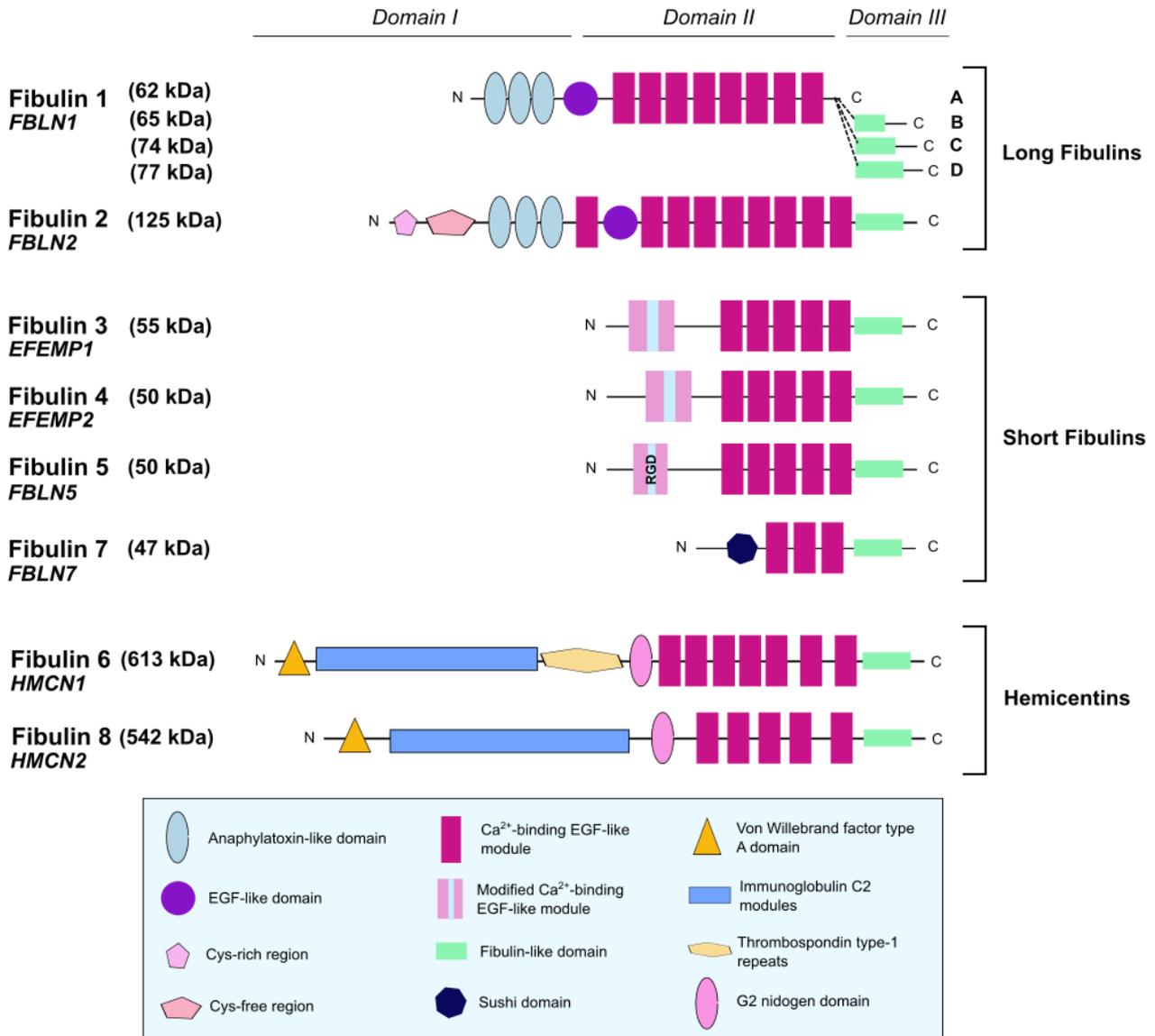


Figure 11. La famille des fibulines.
Adaptée de (Mahajan et al., 2021)

Tous les membres de cette famille partagent un arrangement similaire en multidomains. Les fibulines possèdent 3 principaux domaines : domaine I, II et III. En position N-terminale, le domaine I est le plus variable entre les différentes fibulines et n'est pas présent chez les fibulines courtes. Le domaine II consiste en une succession de modules calcium-binding epidermal growth factor-like (cbEGF). Les fibulines courtes possèdent, contrairement aux autres fibulines, un module cbEGF modifié dans cette région. Et enfin, le domaine III, en position C-terminale, est partagé par toutes les fibulines et est nommé fibulin-like. L'épissage alternatif de la fibuline-1 donne 4 variants (A, B, C et D) avec des tailles différentes de ce module.

1. Organisation structurale des fibulines

D'un point de vue structurel, les fibulines présentent un arrangement de motifs regroupés en trois domaines majeurs : I, II et III (**Figure 11**). Sur la base de leur organisation structurale, la famille est divisée en trois sous-familles : les fibulines longues (fibulines 1 et 2), les fibulines courtes (fibulines 3, 4, 5 et 7), et les hémicentines (fibulines 6 et 8), qui correspondent aux plus grosses protéines de cette famille.

Domaine I. Le premier domaine, retrouvé en position N-terminale des fibulines longues, est la région la plus variable parmi les membres de cette famille et est absente des fibulines courtes. Au sein de cette région, différents motifs sont retrouvés, spécifiques à chaque fibuline. Les fibulines 1 et 2 contiennent 3 motifs anaphylatoxine (AT) et les hémicentines possèdent des motifs caractéristiques avec un domaine homologue au facteur de Von Willebrand A (VWA) suivi d'une succession de motifs immunoglobuline. La fibuline-6 possède, de plus, des répétitions de motifs thrombospondin.

Domaine II. Le second domaine est une région commune aux fibulines. Elle consiste en une succession de multiples motifs calcium-binding epidermal growth factor (EGF)-like (cbEGF), dont le nombre varie entre les fibulines. Les fibulines courtes, sauf la fibuline-7, possèdent également un motif EGF modifié à l'extrémité N-terminale. Le motif EGF modifié de la fibuline-5 contient une séquence RGD, lui permettant notamment d'interagir avec les intégrines et, ainsi, avec les cellules (Nakamura et al., 1999). La fibuline-7 se distingue des autres fibulines courtes par un domaine Sushi, impliqué dans la régulation du système complément et la coagulation du sang (de Vega et al., 2007).

Domaine III. Le dernier domaine positionné en C-terminal est un module globulaire partagé par toutes les fibulines et appelé module fibulin-like. Ce module est également partagé en région C-terminale par les fibrillines (Giltay et al., 1999). L'épissage alternatif de la fibuline-1 donne quatre variants avec des tailles différentes de ce domaine III (Argraves et al., 1990).

2. Evolution et diversification de la famille des fibulines

Les fibulines constituent une ancienne famille de protéines très bien conservées, retrouvées dans une grande variété d'espèces distantes. Elles ont notamment été identifiées chez les vertébrés, le nématode (*Caenorhabditis elegans*), le poisson zèbre (*Danio rerio*) ou encore les insectes (*Drosophila melanogaster*).

Afin de mieux comprendre l'évolution de cette famille, Segade réalise en 2010 une analyse phylogénétique à partir des séquences des gènes des fibulines (Segade, 2010). La construction de l'arbre des relations phylogénétiques regroupe les fibulines en quatre clades majeurs : FBLN1/2, FBLN3/4/5, FBLN7/8 et HMCN1/2 (**Figure 12**). Le clade FBLN1/2 correspond aux gènes des fibulines longues, fibuline-1 (*FBLN1*) et fibuline-2 (*FBLN2*), et le clade FBLN3/4/5 correspond aux gènes des fibulines courtes, fibuline-3 (*EFEMP1*), fibuline-4 (*EFEMP2*) et fibuline-5 (*FBLN5*). La recherche d'orthologues réalisée à partir du gène de la fibuline-7 (*FBLN7*) a permis d'identifier un nouveau gène, nommé *FBLN8* dans cette étude (Segade, 2010). En revanche, ce gène, identifié chez les téléostéens et les tétrapodes, n'est pas retrouvé chez les mammifères et ne sera pas développé dans la suite de ce manuscrit. Le clade HMCN1/2 correspond aux gènes *HMCN1* et *HMCN2*, retrouvés chez l'humain, et renommés fibuline-6 et fibuline-8, respectivement. Par ailleurs, un gène unique, *CioIn3/4/5*, spécifique des Tuniciers, organismes marins anciens non-vertébrés existants depuis des millions d'années, est également identifié dans cette étude. *CioIn3/4/5* est très proche des gènes du clade FBLN3/4/5, uniquement retrouvés chez les vertébrés, indiquant que le clade FBLN3/4/5 est apparu avec les premiers Chordés. Des duplications supplémentaires dans chaque clade au cours de l'évolution ont pu spécifier et diversifier chaque gène pour aboutir aux gènes et aux protéines que nous connaissons actuellement. Au cours de l'évolution, la structure des fibulines 3, 4, 5 et 7 s'est notamment différenciée des autres fibulines au travers de 3 changements majeurs : la perte des domaines AT, la réduction du nombre de modules cbEGF et l'insertion d'un module EGF modifié (Segade, 2010).

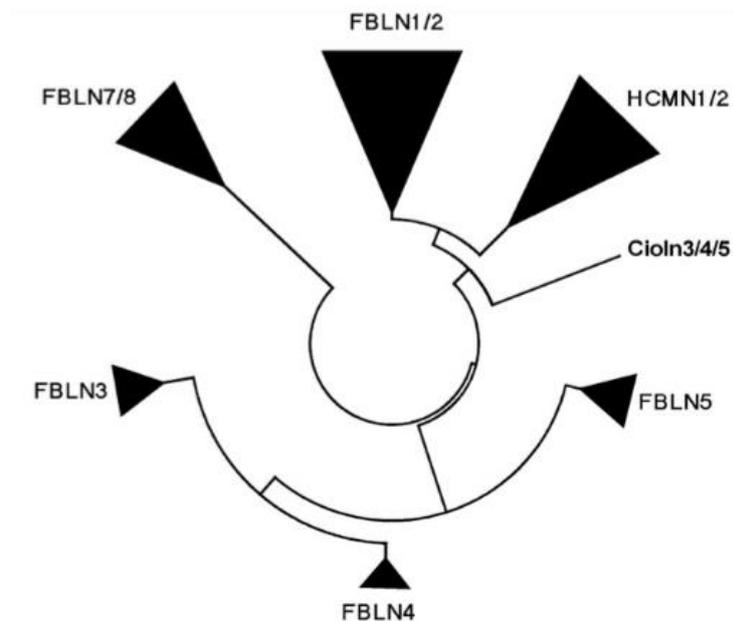


Figure 12. L'évolution des gènes des fibulines.
Adaptée de (Segade 2010)

Relations phylogénétiques de la famille des gènes des fibulines obtenues à partir de la méthode d'alignement de séquences multiples implémentée dans l'outil MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2007). Les relations sont déduites par maximum de vraisemblance des séquences protéiques. La longueur des branches est proportionnelle au nombre de substitutions observées rapporté au nombre de substitutions attendues par position d'acide aminé et la surface des triangles est proportionnelle au nombre d'espèces dans le sous-arbre.

La diversité des fibulines est également amplifiée par le phénomène d'épissage alternatif. Certaines isoformes sont spécifiques aux gènes humains. Par exemple, la fibuline-1 possède quatre variants très bien décrits, fibuline-1A, 1B, 1C et 1D, avec des tailles variables du domaine III en position C-terminale (domaine fibulin-like) (Argraves et al., 1990). Ce domaine est même complètement absent du variant A (**Figure 13**). La souris, le poisson-zèbre, le nématode, le poulet ou encore la drosophile n'expriment que les variants C et D (Barth et al., 1998; T.-C. Pan et al., 1993; H.-Y. Zhang et al., 1997) et les variants A et B semblent spécifiques à l'humain, où on les trouve à de très faibles niveaux dans le tissu placentaire. Les variants 1C et 1D interagissent avec différents types de partenaires dans la matrice (Muriel et al., 2012; Sasaki et al., 1995), impliquant des fonctions différentes entre ces isoformes (Muriel et al., 2005). Récemment, un nouveau variant nommé fibuline-1D' a été identifié, similaire au variant D mais dépourvu d'une partie de la région en position N-terminale contenant la séquence de sécrétion (**Figure 13**) (Twal et al., 2015). Sans ce domaine de sécrétion, ce variant reste intracellulaire et interagit avec le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$. La présence d'isoformes produites par épissage alternatif a également été décrit pour d'autres fibulines, comme la fibuline-2 (T. C. Pan et al., 1993), la fibuline-3 (Lecka-Czernik et al., 1995) ou encore la fibuline-4 (Gallagher et al., 2001), mais les différences fonctionnelles entre ces isoformes restent très peu documentées.

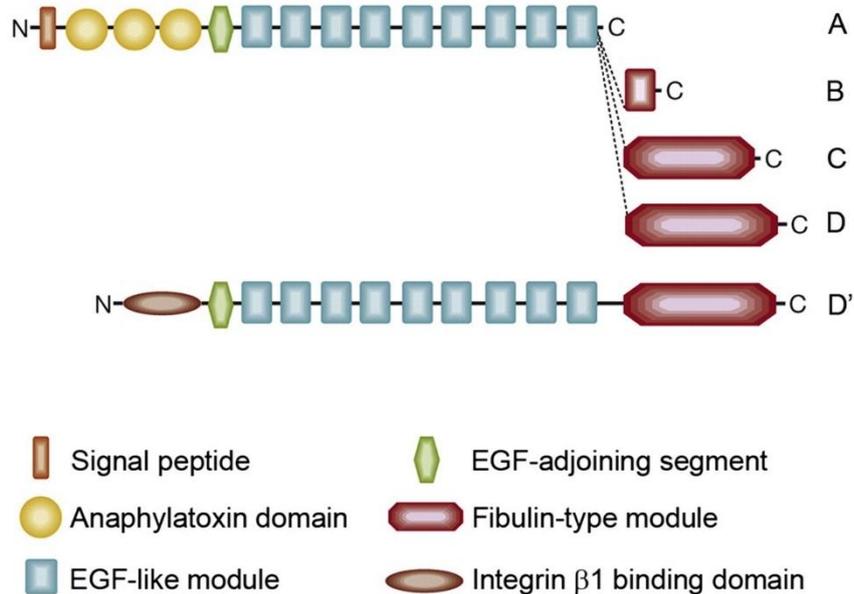


Figure 13. Représentation des isoformes de la fibuline-1.
(Twal et al., 2015)

Les 4 premières isoformes issues de l'épissage alternatif de la fibuline-1 possèdent un domaine fibulin-like différent en position C-terminale.

En position N-terminale, les modules AT de ces 4 variants sont remplacés dans le variant 1D' par un domaine de fixation à la région cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$. Les modules cbEGF-like et fibulin-like sont identiques entre les isoformes 1D et 1D'

3. Expression des fibulines chez l'humain

Les approches de séquençage à haut débit de l'ensemble des tissus permettent d'obtenir une cartographie des quantités relatives d'ARNm entre les différentes structures et régions du corps humain. En utilisant le portail GTEX, nous pouvons observer que les fibulines sont très largement exprimées chez l'humain (**Figure 14**) avec des niveaux d'expression plus élevés et un spectre plus large pour les fibulines 1 à 5 en comparaison avec les hémicentines et la fibuline-7. Ces cinq fibulines sont majoritairement exprimées dans les tissus riches en fibres élastiques, comme les vaisseaux sanguins, le cœur, les poumons ou la peau. Elles sont également fortement exprimées par le système reproducteur féminin, plus spécifiquement dans le col de l'utérus, le vagin, les trompes de Fallope et les ovaires. D'autres organes comme la vessie, le côlon, les intestins, l'estomac et le rein expriment également ces cinq fibulines. Néanmoins, à l'exception des fibulines 3 et 4, elles sont très peu exprimées dans la plupart des régions du cerveau. Contrairement aux autres fibulines, la fibuline-7 est très faiblement exprimée dans les tissus humains utilisés dans cette analyse (**Figure 14**). Les hémicentines présentent un spectre d'expression beaucoup plus restreint que les cinq premières fibulines. Elles sont principalement exprimées dans le système digestif (côlon et intestins). De récentes études réalisées chez la souris permettent également de mieux comprendre la distribution des 2 hémicentines chez les mammifères (M.-H. Lin et al., 2020; Welcker et al., 2021). La fibuline-6 et la fibuline-8 sont distribuées de façon complémentaire suggérant des fonctions mutuellement exclusives au cours du développement. Dans les tissus adultes, les hémicentines conservent cette distribution « compartiment-spécifique ». Tandis que la fibuline-6 est fortement exprimée dans les tendons sous forme de filaments, la fibuline-8 est retrouvée dans les myofibres en contact avec ces tendons (Welcker et al., 2021).

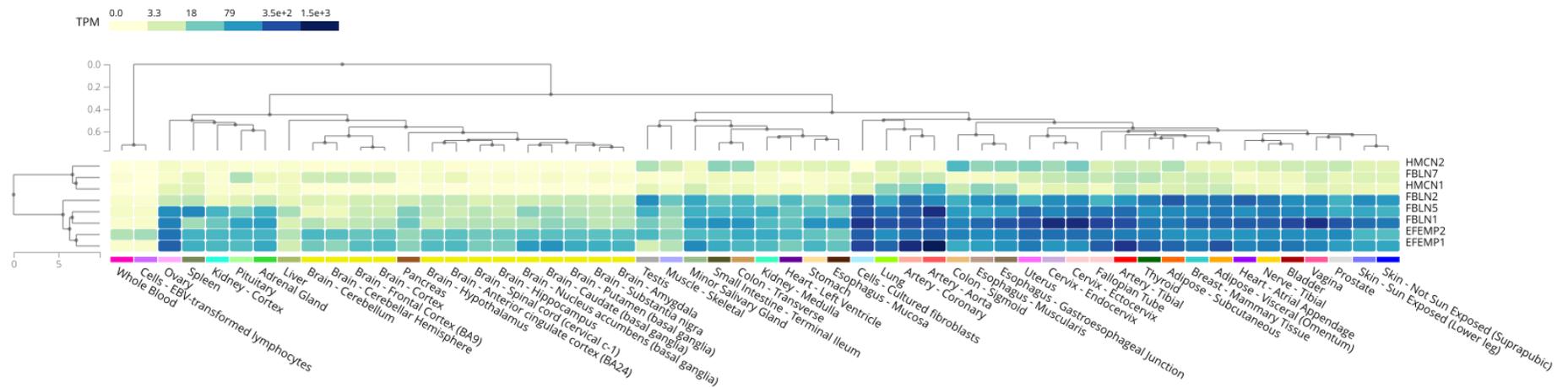


Figure 14. Expression tissulaire des fibulines chez l'humain.

Les données utilisées pour cette analyse ont été obtenues à partir du [portail GTEx](https://gtex.org/) (Adult Genotype Tissue Expression Project) le 17/04/2024. L'analyse des expressions de gènes des fibulines a été réalisée à partir de 54 tissus non-malades issus de 948 individus.

B. Principales fonctions des fibulines

Composants de la MEC, les fibulines interagissent avec de nombreuses molécules de la matrice. Elles fonctionnent principalement comme des adaptateurs ou médiateurs qui stabilisent l'organisation supramoléculaire des structures fibrillaires de la MEC, comme les fibres élastiques ou les fibres de collagène.

1. Assemblage de la matrice fibrillaire

1.1. Implications des fibulines dans l'élastogenèse

Les fibulines sont impliquées à différentes étapes de l'élastogenèse. La majorité des fibulines sont capables de se fixer à la tropoélastine (TE), mais avec des forces de liaisons différentes (Kobayashi et al., 2007). La fibuline-1, associée à l'élastine, est présente au cœur des fibres élastiques (Roark et al., 1995) et co-localisée avec la fibrilline-1 (Visconti et al., 2003). La fibuline-2 se retrouve à l'interface entre les microfibrilles et l'élastine (Reinhardt et al., 1996). Elle est capable de se lier avec l'élastine et la fibrilline-1, suggérant un rôle de stabilisation des fibres élastiques (El-Hallous et al., 2007). Contrairement aux autres fibulines, la fibuline-3 interagit très faiblement avec la TE *in vitro* (Kobayashi et al., 2007). Mais la perte de l'expression de la fibuline-3 chez la souris entraîne une altération du réseau de fibres élastiques, suggérant un rôle indirect de la fibuline-3 dans la stabilisation de cette structure (McLaughlin et al., 2007). La fibuline-4 possède un rôle très important et bien décrit dans l'élastogenèse. Elle fait partie d'un complexe ternaire avec l'enzyme LOX et la TE. La fibuline-4 médie l'alignement des molécules de TE et leur interaction avec l'enzyme LOX (Horiguchi et al., 2009). Sa présence est nécessaire à l'activation de la LOX et donc, à la stabilisation de l'élastine (McLaughlin et al., 2006; Noda et al., 2020). Une déficience en fibuline-4 induit ainsi un mauvais développement des fibres élastiques et des agrégats irréguliers d'élastine dans les tissus (McLaughlin et al., 2006). La fibuline-5 est également un élément important de la formation des fibres élastiques. Elle est capable de se lier à la TE *via* ses domaines cbEGF et à la fibrilline-1 (Freeman et al., 2005; Yanagisawa et al., 2009). En fonctionnant comme un adaptateur entre ces 2 éléments, la fibuline-5 permet ainsi de réguler le dépôt de TE sur les microfibrilles (Q. Zheng et al., 2007). Comme la fibuline-4, la fibuline-5 interagit avec des enzymes de pontage de la TE, les LOXL-1, -2 et -4, et favorise la polymérisation de l'élastine en les guidant vers les molécules de TE (Hirai et al., 2007). Une autre étude suggère que la fibuline-5 ne serait pas nécessaire aux stades précoces de la synthèse des fibres élastiques mais plutôt à leur maturation en interagissant directement avec les fibres, entraînant la formation de fibres plus larges (Freeman et al., 2005; Nakamura et al., 2002). La fibuline-7, quant à elle, ne se lie pas à la TE et ne semble pas avoir de fonctions dans l'élastogenèse (Tsunezumi et al., 2018).

1.2. Implications des fibulines dans l'assemblage des fibres de collagène

L'analyse phylogénétique de la famille des fibulines a révélé un gène ancestral, *CioIn3/4/5*, présent uniquement chez les Tuniciers, des organismes non-vertébrés (Segade, 2010). Le gène de l'élastine est un gène uniquement retrouvé chez les vertébrés (Rosenbloom et al., 1993), indiquant que les fibulines 3, 4 et 5 n'ont originellement pas évolué avec des fonctions d'élastogénèse mais les auraient acquises après des duplications successives (Nakamura, 2018). Cette analyse suggère ainsi que les fibulines auraient pu conserver d'autres fonctions que l'assemblage des fibres élastiques.

De récentes études ont mis en évidence l'importance des fibulines 3, 4 et 6 dans l'assemblage des fibres de collagène. Bien que l'implication de la fibuline-3 dans l'assemblage et le maintien des fibres de collagène ne soit pas encore bien caractérisée, elle semble néanmoins impliquée dans la stabilisation de ces structures. En effet, les cellules déficientes en fibuline-3 présentent un défaut significatif de formation des filaments de collagène VI (Woodard et al., 2022). Par ailleurs, la délétion de la fibuline-3 chez la souris réduit significativement le dépôt de collagène après un infarctus (Murtha et al., 2023). Les tissus de ces souris ne présentent pas d'altération de formation de fibres, mais plutôt un défaut d'alignement de ces fibres, indiquant une perte d'organisation de la MEC. La fibuline-4 est également importante pour le maintien de l'intégrité du collagène au niveau de l'aorte (Papke et al., 2015). La délétion de la fibuline-4 spécifiquement au niveau des muscles lisses chez la souris entraîne un défaut de formation des fibres de collagène, avec des fibres plus larges et peu organisées. Elle est notamment capable de se lier à la C-endopeptidase pro-collagène enhancer, impliquée dans le clivage du pro-collagène (Papke et al., 2015). La présence de la fibuline-4 augmente l'activité de la protéinase BMP-1 (*Bone Morphogenetic Protein-1*) et donc, la maturation du pro-collagène. De plus, son interaction avec l'enzyme LOX permet de promouvoir sa fonction d'assemblage des fibres de collagène par pontage (Sasaki et al., 2016). De façon similaire à la fibuline-3, la délétion de l'expression de la fibuline-5 chez la souris est associée à une perturbation de l'alignement des fibres de collagène au niveau du col de l'utérus (Clark-Patterson et al., 2021; Jennings et al., 2024). Concernant les hémicentines, un travail récent réalisé chez le nématode suggère que l'hémicentine 1 serait essentielle au recrutement et à l'assemblage du collagène de type IV à la membrane basale entre les cellules de l'utérus et les cellules de l'épiderme (Gianakas et al., 2023). Elle permet de stabiliser la structure et d'assurer la robustesse de la membrane basale autour des cellules.

1.3. Association des fibulines avec la fibrillogénèse de la fibronectine

Intégrées au sein de la matrice fibrillaire, les fibulines sont également associées à la fibrillogénèse de la fibronectine. La fibuline-1 est sécrétée et incorporée dans le réseau fibrillaire de fibronectine produit par les fibroblastes en culture (Argraves et al., 1990) et interagit *in vitro* avec la

fibronectine (Roman & McDonald, 1993; Tran, VanDusen, et al., 1997). La fibuline-1 n'est pas impliquée dans la régulation du réseau fibrillaire de fibronectine mais son dépôt est contrôlé par l'assemblage de cette matrice autour des fibroblastes (Godyna et al., 1995). La fibuline-2 est également associée aux microfibrilles de fibronectine produites par les fibroblastes en culture (Sasaki et al., 1996). La surexpression de la fibuline-3 dans les cellules trabéculaires (cellules particulières du trabéculum alliant des propriétés de cellules endothéliales, de myofibroblastes et de macrophages) est notamment responsable d'une diminution de l'expression de la fibronectine ainsi qu'une altération du réseau de fibronectine autour de la cellule (Tan et al., 2024). Par ailleurs, la maturation du réseau fibrillaire de fibronectine dans des conditions de culture en trois-dimensions stimule le dépôt d'élastine ainsi que de nombreuses protéines associées, telles que la fibuline-4 (Pezzoli et al., 2018).

La famille des fibulines est ainsi importante dans l'organisation et la stabilisation de la matrice fibrillaire dans le microenvironnement cellulaire (**Figure 15**). Plus spécifiquement, les fibulines courtes 3, 4 et 5 semblent être les principaux acteurs de cette famille impliqués dans la régulation de la fibrillogenèse de l'élastine et du collagène.

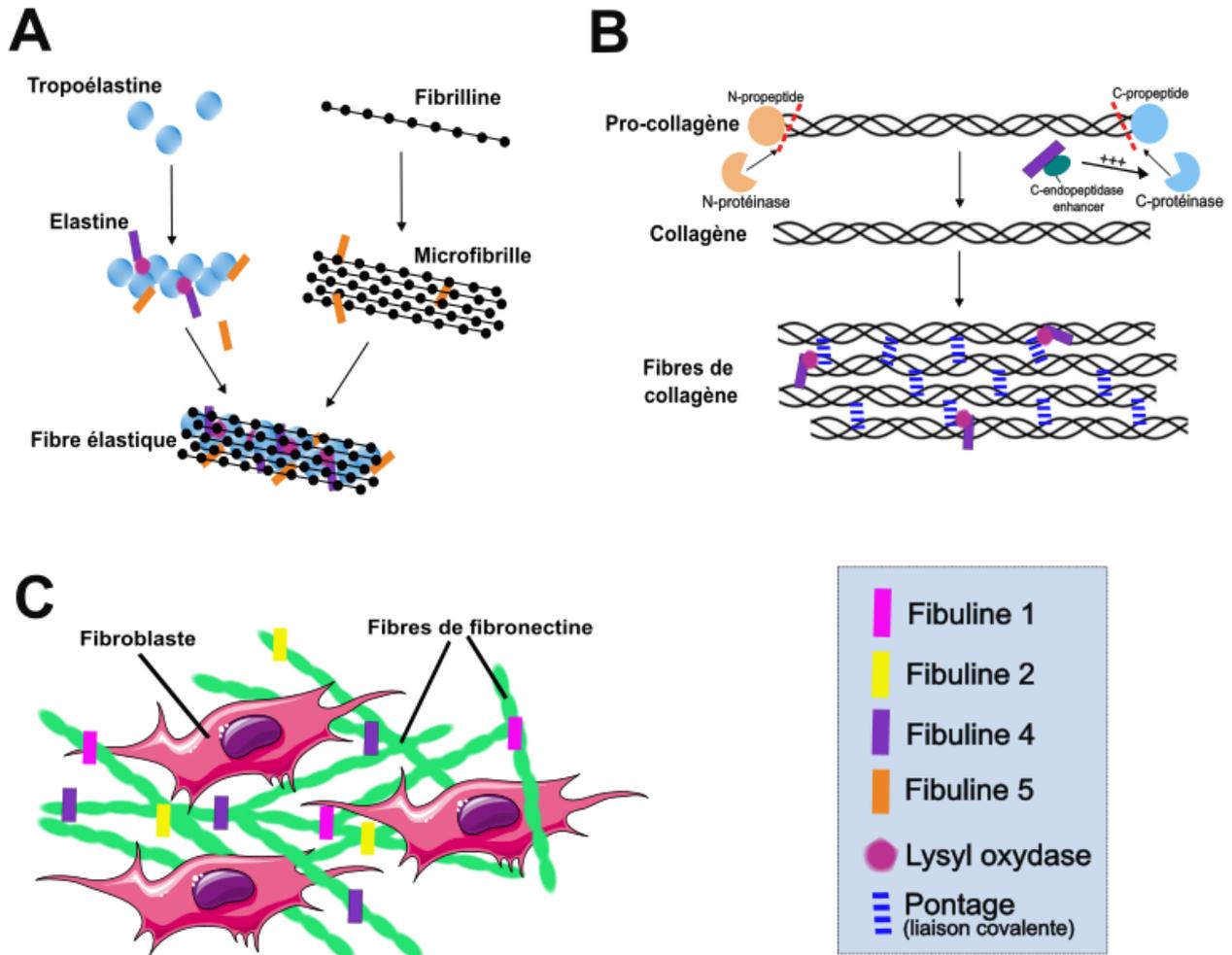


Figure 15. Implications et associations décrites des fibulines dans l'assemblage de certains composants de la matrice extracellulaire.

A. Au cours de l'élastogenèse, la fibuline-4 contrôle l'alignement des molécules de tropoélastine et recrute les enzymes LOX. Cette étape entraîne le pontage de la tropoélastine et la stabilisation de la structure d'élastine. La fixation de la fibuline-5 à la fibrilline et à l'élastine permet de guider cette dernière vers la structure microfibrillaire.

B. La liaison de la fibuline-4 à la C-endopeptidase pro-collagène enhancer augmente l'activité de la C-protéinase BMP-1 et donc le clivage et la maturation du collagène. La fibuline-4 interagit également avec l'enzyme LOX et favorise le pontage des fibres de collagène, stabilisant la structure.

C. Plusieurs fibulines (1, 2, 4) sont déposées et incorporées au sein du réseau de fibronectine, notamment produit par les fibroblastes en culture.

2. Influence des fibulines dans l'adhésion cellulaire et certaines fonctions cellulaires

L'organisation et la composition de la MEC ont des impacts significatifs sur de nombreuses fonctions cellulaires. En se fixant aux récepteurs transmembranaires à la surface des cellules, les composants de la MEC peuvent moduler des événements de signalisation qui régulent les fonctions cellulaires. Les fibulines, impliquées dans des interactions avec des composants matriciels et dans l'assemblage de la MEC fibrillaire, peuvent affecter l'adhésion des cellules à leur microenvironnement et ainsi, moduler certaines fonctions cellulaires.

La fibuline-1 n'interagit pas directement avec les cellules mais influence leur attachement à leur substrat. En effet, l'incorporation exogène de fibuline-1 dans une matrice de fibronectine inhibe l'adhésion de plusieurs types cellulaires à la fibronectine (Twal et al., 2001). Les cellules sont moins étalées et moins motiles, entraînant une diminution de la migration et de l'invasion. La modulation de l'adhésion cellulaire des fibroblastes est médiée par une liaison compétitive du domaine de fixation héparine (HepII) de la fibronectine entre la fibuline-1 et le syndecan-4, un protéoglycane transmembranaire impliqué dans l'adhésion cellule-matrice (Williams & Schwarzbauer, 2009). La fixation de la fibuline-1 sur ce domaine HepII bloque également l'activation de certaines voies de signalisation comme les voies des kinases FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). Dans ce contexte, la fibuline-1 jouerait un rôle de régulateur négatif des interactions entre la cellule et la matrice fibrillaire.

Les fibulines 2, 3 et 4 ne sont pas connues pour interagir avec les intégrines mais forment plutôt un pont entre la surface de la cellule et la MEC en interagissant avec certains composants matriciels. La fibuline-2 se fixe fortement aux protéines de la membrane basale comme la fibronectine (Gu et al., 2000), les laminines 1 et 5 (Utani et al., 1997) et le perlecan (Brown et al., 1997). Les fibulines 3 et 4 sont capables de se fixer de façon très stable à différents types cellulaires en interagissant de manière calcium-dépendante avec le sulfate d'héparane, présent sur les protéoglycanes retrouvés à la surface des cellules (Djokic et al., 2013). La présence de ces fibulines autour de la cellule suggère donc un rôle important dans la régulation des interactions de la cellule avec la matrice environnante.

Contrairement aux autres fibulines, la fibuline-5 possède un motif RGD dans son module cbEGF-like modifié (Nakamura et al., 1999). Elle est capable d'interagir avec les cellules en se fixant aux intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ via son motif RGD et $\alpha9\beta1$ indépendamment du motif RGD (Nakamura et al., 2002). Néanmoins, son interaction avec l'intégrine $\alpha\beta3$ est faible à cause de modifications post-traductionnelles (alkylation) de ce motif RGD (Kobayashi et al., 2007). Elle interagit également avec les intégrines $\alpha5\beta1$ et $\alpha4\beta1$ des cellules du muscle lisse de l'aorte (Lomas et al., 2007). Plusieurs

tests d'adhésion cellulaire démontrent une forte adhésion de différents types cellulaires sur une surface recouverte de fibuline-5 et une inhibition de leurs capacités migratoires, invasives (Albig & Schiemann, 2004) et prolifératives (Lomas et al., 2007; Furie et al., 2016). La surexpression de la fibuline-5 par les cellules endothéliales primaires humaines augmente également leur capacité d'adhésion sur une surface artificielle et inhibe la prolifération (Preis et al., 2006). A l'inverse, la culture de cellules stromales issues de l'endomètre sur une surface recouverte de fibuline-5 augmente la migration et l'invasion de ces cellules (Winship et al., 2015).

A sa découverte, la fibuline-7 est initialement décrite comme une protéine d'adhésion des cellules du mésenchyme dentaire et des odontoblastes (de Vega et al., 2007). La fixation des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (*Human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) sur la partie C-terminale de la fibuline-7 induit un regroupement des points d'adhésion, une réorganisation des fibres de stress et une altération de l'étalement des cellules (de Vega et al., 2014). Ces perturbations inhibent la morphogenèse des capillaires par les cellules endothéliales et affectent leur capacité à former de nouveaux vaisseaux *in vitro*. La fibuline-7 est également capable d'interagir avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ des monocytes humains (Sarangi et al., 2018). Elle semble perturber les interactions entre ces cellules et leur microenvironnement en empêchant la fixation des monocytes à la fibronectine et inhibant la migration des cellules immunitaires. La présence de la fibuline-7 à la surface des monocytes inhibe également leur différenciation en macrophage. Ces résultats suggèrent un mécanisme de compétition entre la fibuline-7 et le réseau de fibronectine environnant ces cellules.

Chez le nématode *C. elegans*, les hémicentines ont un rôle important au niveau des jonctions cellule-cellule et cellule-matrice. Présente au niveau de la membrane basale, l'hémicentine 1 (fibuline-6) s'associe à d'autres partenaires, la plakine-cytolinker cytosolique VAB-10A et l'intégrine α INA-1/ β PAT-3, pour former un système d'adhésion, appelé BM-LINKage (B-LINK) (Morrissey et al., 2014). Sous forme de longs et fins filaments entre les cellules, l'hémicentine 1, associée à ce système, permet de connecter les tissus *via* leur membrane basale (Vogel & Hedgecock, 2001). Cette connexion est médiée par le domaine VWA de l'hémicentine 1 (Welcker et al., 2021). Elle permet notamment de connecter les cellules de l'utérus avec les cellules de l'épiderme afin d'aider l'utérus à résister aux contraintes mécaniques exercées lors de la ponte des œufs chez le nématode (Gianakas et al., 2023). Ces structures filamenteuses stabilisent l'adhésion cellulaire et forment un échafaudage extracellulaire qui supporte également la différenciation des cellules germinales (Morrissey et al., 2014). L'organisation en filaments de l'hémicentine 1 est également conservée chez la souris et fonctionne comme un support structurel pour les cellules et les tissus (M.-H. Lin et al., 2020).

Ainsi, la présence des fibulines dans la MEC peut moduler les mécanismes d'adhésion des cellules *via* différents mécanismes : en interagissant directement avec la cellule via les intégrines ou

en se fixant à d'autres composants matriciels, comme la fibronectine. Étudiées en grandes quantités dans certaines expérimentations *in vitro*, certaines fibulines peuvent perturber les interactions entre les cellules et leur microenvironnement et ainsi, affecter leurs capacités d'adhésion et de migration. Dans les conditions physiologiques, les concentrations locales sont plus faibles et leurs mécanismes d'actions passent probablement par des interactions plus spécifiques modulant plus finement la dynamique cellulaire.

C. Implications physiopathologiques des fibulines

1. Phénotypes des souris invalidées pour les gènes des fibulines

Exprimées dans de nombreux tissus chez les mammifères, les fibulines sont essentielles à de nombreuses fonctions physiologiques. Les modèles de souris invalidées pour les différents gènes des fibulines présentent une diversité de phénotypes témoignant des différences fonctionnelles entre les fibulines ainsi que de leur importance dans la morphogenèse des tissus chez le mammifère (**Tableau 2**).

Les souris déficientes en *Fbln1* meurent en majorité juste après la naissance à la suite d'hémorragies internes très sévères (Kostka et al., 2001). Les embryons présentent un développement anormal de nombreux tissus et organes, notamment le cœur, les vaisseaux sanguins et le squelette crânio-facial, suggérant que la fibuline-1 serait essentielle à la migration dirigée des cellules de la crête neurale pendant le développement embryonnaire (Cooley et al., 2008). La perte de l'expression d'*Efemp1* chez la souris induit des symptômes associés au vieillissement avec une altération du réseau de fibres élastiques, des capacités de reproduction réduites et une durée de vie diminuée (McLaughlin et al., 2007). Les souris déficientes en *Efemp2* ne sont pas viables et meurent en majorité avant la naissance avec des défauts sévères de morphogenèse de nombreux organes (McLaughlin et al., 2006). La délétion de la *Fbln5* entraîne le développement d'un phénotype similaire à la pathologie *cutis laxa*, caractérisé notamment par des tissus conjonctifs inélastiques et plissés, résultant d'une altération de la maturation des fibres élastiques (Nakamura et al., 2002; Yanagisawa et al., 2002). Contrairement aux autres modèles, les souris déficientes en *Fbln2*, *Fbln7*, *Hmcn1* et *Hmcn2*, sont viables et ne présentent pas d'anomalies morphologiques sévères (M.-H. Lin et al., 2020; Sicot et al., 2008; Tsunozumi et al., 2018). Une compensation entre les hémicentines a été suggérée, néanmoins le modèle double « knock-out » *Hmcn1*^{-/-} et *Hmcn2*^{-/-} est également viable et fertile sans anomalies morphologiques importantes (M.-H. Lin et al., 2020).

Tableau 2. Phénotypes des souris invalidées pour les gènes de la famille des fibulines.

Gène	Phénotype	Références
Fbln1	Létalité post-natale, hémorragies, développement anormal des poumons, des reins, du cœur et des os.	(Cooley et al., 2008; Kostka et al., 2001)
Fbln2	Viable, fertile, pas d'anormalités morphologiques	(Sicot et al., 2008)
Efemp1	Altération de la fonction reproductrice, phénotype de vieillissement prématuré, réduction des fibres élastiques dans les tissus conjonctifs, protrusions, durée de vie réduite	(McLaughlin et al., 2007)
Efemp2	Létalité périnatale, développement anormal du système vasculaire, emphysème, hémorragies, défaut de formation des fibres élastiques	(McLaughlin et al., 2006)
Fbln5	Viable, maladie <i>cutis laxa</i> , développement anormal du système vasculaire, emphysème, défaut de maturation des fibres élastiques	(Nakamura et al., 2002; Yanagisawa et al., 2002)
Hmcn1	Viable, fertile, pas d'anormalités morphologiques	(M.-H. Lin et al., 2020)
Fbln7	Viable, fertile, pas d'anormalités morphologiques	(Tsunezumi et al., 2018)
Hmcn2	Viable, fertile, pas d'anormalités morphologiques	(M.-H. Lin et al., 2020)

2. Mutations et maladies génétiques chez l'humain

Plusieurs mutations retrouvées dans les gènes de la famille des fibulines, pouvant affecter leur expression et/ou leur fonctionnalité, sont associées à certaines maladies génétiques, dont les principales sont répertoriées dans le **Tableau 3**.

La substitution d'une cystéine par une phénylalanine dans le 5^{ème} module cbEGF-like de la fibuline-1 a été observée chez des patients atteints de syndactylie associée à un retard des fonctions motrices (Bohlega et al., 2014). Cette substitution affecte la structure de la protéine en inhibant la formation de ponts disulfures entre les résidus cystéines de ce module. Une autre étude démontre qu'un défaut d'épissage alternatif en défaveur du variant fibuline-1D, mais pas du variant fibuline-1C, induit par une translocation chromosomique est associé à la malformation de certains membres, suggérant des fonctions distinctes entre les variants de la fibuline-1 (Debeer et al., 2002).

Plusieurs études démontrent l'implication de certaines fibulines dans les troubles oculaires héréditaires tels que les rétinopathies ou la dégénérescence maculaire liées à l'âge. La mutation R345W dans le domaine cbEGF-like n°6 de la fibuline-3 a été identifiée chez des patients atteints de la Malattia Leventinese (Stone et al., 1999). Cette mutation entraîne un mauvais repliement de la fibuline-3 qui est difficilement sécrétée par les cellules de la rétine, ainsi responsable d'un dysfonctionnement de ces cellules (Marmorstein et al., 2002). Par ailleurs, plusieurs mutations de la fibuline-5 ont été associées à la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Stone et al., 2004), entraînant une diminution de la sécrétion de la protéine (Lotery et al., 2006). Une mutation dans le gène de l'hémicentine 1 (*HMCN1*, fibuline-6) a également été identifiée dans le contexte de la DMLA (Schultz et al., 2003), mais des observations contradictoires ne permettent pas de confirmer la véritable implication de la fibuline-6 (Fisher et al., 2007).

Des mutations retrouvées dans les gènes *FBLN4* et *FBLN5* sont également associées à la maladie *cutis laxa*, un groupe de maladies génétiques caractérisées par un défaut de maturation des fibres élastiques dans les tissus conjonctifs. La mutation retrouvée dans le gène de la fibuline-4 affecte la sécrétion de la protéine, sa stabilité ainsi que ses capacités de fixation à la matrice (Huchtagowder et al., 2006). De nombreuses mutations dans le gène de la fibuline-5 affectent également le repliement de la protéine et sa sécrétion ainsi que ses interactions, empêchant la formation des fibres élastiques (Claus et al., 2008; Loeys et al., 2002).

D'autres mutations identifiées dans le gène *FBLN5* sont associées à la maladie de Charcot-Marie-Tooth, une pathologie neuromusculaire évolutive caractérisée par la mort progressive des neurones moteurs (Auer-Grumbach et al., 2011).

Tableau 3. Principales maladies associées à des mutations dans les gènes de la famille des fibulines.
(Adapté de (de Vega et al., 2009; Mahajan et al., 2021))

Fibuline	Mutation	Région affectée	Phénotype	Références
FBLN1	Cys397Phe	cbEGF-like n°5	Syndactylie, retard des fonctions motrices, signes d'atrophie cérébrale	(Bohlega et al., 2014)
EFEMP1	Arg345Trp	cbEGF-like n°6 (région d'interaction avec TIMP-3)	Malattia Leventinese (dystrophie rétinienne Doyme Honeycomb), Dégénérescence maculaire liée à l'âge	(Marmorstein et al., 2002; Stone et al., 1999)
EFEMP2	Glu57Lys Glu126Lys Glu126Val Asp203Ala Cys267Tyr Arg279Cys Ala397Thr	cbEGF-like n°1 cbEGF-like n°2 cbEGF-like n°2 cbEGF-like n°4 (mutation létale) cbEGF-like n°5 (mutation létale) cbEGF-like n°5 (mutation létale)	Maladie <i>cutis laxa</i>	(Dasouki et al., 2007; Hoyer et al., 2009; Huchtagowder et al., 2006; Kappanayil et al., 2012; Renard et al., 2010)
FBLN5	Val60Leu Arg71Gln Pro87Ser Gln124Pro Ile169Thr Gly267Ser Arg351Trp Ala363Thr Gly412Glu	cbEGF-like n°1 cbEGF-like n°1 cbEGF-like n°3 cbEGF-like n°5 Région d'interaction avec LOXL1 Région d'interaction avec LOXL1 Région d'interaction avec LOXL1	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	(Lotery et al., 2006; Stone et al., 2004)
	Cys217Arg Ser227Pro	cbEGF-like n°4 cbEGF-like n°4	Maladie <i>cutis laxa</i>	(Claus et al., 2008) (Loeys et al., 2002)
	Thr48Ile Gly90Ser Arg373Cys	cbEGF-like n°1 Région d'interaction avec LOXL1	Maladie de Charcot-Marie-Tooth	(Auer-Grumbach et al., 2011)
HMCN1	Gln5345Arg	cbEGF-like n°6	Dégénérescence maculaire liée à l'âge (incertain)	(Fisher et al., 2007; Schultz et al., 2003)

3. Rôles des fibulines dans la cicatrisation et la fibrose

Les protéines de la matrice, dont certaines fibulines, jouent un rôle important dans la cicatrisation, et le développement de la fibrose dans le contexte d'agressions chroniques, en médiant les interactions cellule-matrice et en remodelant l'architecture et l'environnement de la MEC.

Le remodelage des poumons sous différentes conditions pathologiques peut impliquer certaines fibulines. Des niveaux élevés de fibuline-1 dans le sérum et les tissus pulmonaires de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) suggèrent l'implication de cette fibuline dans le dépôt et l'accumulation de MEC dans les voies respiratoires (Jaffar et al., 2014). Par ailleurs, la diminution de l'expression du variant fibuline-1C dans les cellules musculaires lisses des voies respiratoires réduit leur capacité de prolifération et de réparation tissulaire dans le contexte de l'asthme (Lau et al., 2010). Une cartographie de la région spécifique de l'isoforme 1C a permis d'identifier la région bioactive capable de stimuler *ex vivo* l'adhésion et la prolifération des fibroblastes pulmonaires, et le dépôt de certaines protéines matricielles (Ge et al., 2015). La perte de l'expression de ce variant 1C chez la souris est associée à une réduction de la fibrose pulmonaire accompagnée d'une diminution de l'induction de la voie pro-fibrosante du TGF- β (Liu et al., 2019). Les auteurs de cette étude décrivent notamment une interaction entre la fibuline-1C et la protéine de fixation du TGF- β latent 1 (LTBP1) qui semblerait moduler la signalisation du TGF- β , affectant ainsi la différenciation des myofibroblastes et le dépôt de collagène. Par ailleurs, une plus forte expression de la fibuline-2 est associée à la fibrose induite par l'activation du TGF- β dans les fibroblastes pulmonaires (Y. Zhang et al., 2022). Enfin, des niveaux d'expression élevés de la fibuline-5 dans les tissus pulmonaires de patients atteints de FPI (Korfei et al., 2011) et de bronchopneumopathie chronique obstructive (Brandsma et al., 2015) suggèrent une implication de cette fibuline dans le remodelage matriciel pulmonaire.

Très exprimées dans le système cardiovasculaire, certaines fibulines sont impliquées dans le remodelage de la matrice des tissus cardiaques après une lésion. La fibuline-2 participe activement à la réparation et à la cicatrisation des tissus après un infarctus du myocarde induit chez la souris (Tsuda et al., 2012). Son invalidation chez la souris est associée à une plus faible activation de la signalisation TGF- β après l'induction d'un infarctus du myocarde. Les souris déficientes en *Fbln2* développe moins de fibrose cardiaque induite par un traitement à l'angiotensine II en comparaison aux souris contrôles (H. Zhang et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la fibuline-2 serait un régulateur positif de la voie TGF- β et ainsi de l'induction d'une fibrose du myocarde médiée par cette voie (Khan et al., 2016; H. Zhang et al., 2014). La fibuline-3 est également décrite comme un acteur du remodelage de la matrice dans les tissus cardiaques (Sharma et al., 2022). En réponse à un arrêt cardiaque, l'augmentation de son expression semble nécessaire au maintien de l'intégrité de la MEC

en régulant l'expression de protéines de remodelage comme MMP9 au cours du processus de cicatrisation, pouvant ainsi prévenir une rupture des tissus cardiaques (Murtha et al., 2023). De plus, la fibuline-6 est plus fortement exprimée dans un modèle murin d'infarctus du myocarde (Chowdhury et al., 2014). Elle est abondamment sécrétée par les fibroblastes cardiaques ventriculaires murins et la diminution de son expression est associée à une réduction des capacités migratoires et contractiles induites par le TGF- β (Chowdhury et al., 2017). La fibuline-7 est également un acteur pro-fibrotique en se fixant sur les récepteurs EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) des fibroblastes cardiaques, entraînant une cascade de signalisation impliquée dans l'activation des fibroblastes et le dépôt de MEC (X. Zheng et al., 2023).

La fibuline-5 est aussi impliquée dans la cicatrisation et la fibrose de la peau. L'expression exogène de la fibuline-5 au niveau d'une lésion cutanée chez le lapin favorise la cicatrisation *in vivo*, en stimulant l'expression du collagène de type I (M. J. Lee et al., 2004). Une autre étude réalisée chez la souris suggère que la fibuline-5 serait impliquée dans les phases tardives de la cicatrisation, lorsque les fibres élastiques sont recrutées (Q. Zheng et al., 2006). La perte de l'expression de la fibuline-5 chez un modèle murin de fibrose cutanée diminue la rigidité du tissu confirmant son implication dans l'accumulation excessive de la matrice (Nakasaki et al., 2015).

Par ailleurs, les souris déficientes en *Fbln7* sont protégées du développement d'une fibrose et de la calcification des tubules rénaux induite par un régime alimentaire riche en phosphate (Tsunezumi et al., 2018). Mécaniquement, la fibuline-7 se fixe sur les particules de phosphate de calcium favorisant leur dépôt et l'induction d'une fibrose associée à une inflammation.

Plusieurs fibulines sont également associées à la fibrose hépatique ; leurs expressions et fonctions seront détaillées dans le paragraphe **III.A**.

Les fibulines sont ainsi très impliquées dans les mécanismes de remodelage matriciel au cours de la cicatrisation et/ou de la fibrose. Certaines fibulines semblent notamment médier leurs actions en modulant la voie de signalisation pro-fibrotique du TGF- β , pouvant ainsi influencer l'activation des fibroblastes localement et le dépôt de matrice extracellulaire.

4. Association des fibulines avec l'inflammation

Certaines fibulines participent à la régulation de certains processus d'inflammation contribuant au développement et à la progression de maladies inflammatoires. La fibuline-1C est très fortement exprimée chez les patients atteints d'asthme, une maladie chronique inflammatoire (Liu et al., 2017). La délétion de la *Fbln1c* dans un modèle murin d'asthme est associée à un plus faible caractère inflammatoire de la maladie avec une diminution de l'infiltration des cellules du système immunitaire et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les poumons. Dans un modèle murin de fibrose cutanée, l'inactivation de la fibuline-5 diminue la production de cytokines inflammatoires et le recrutement de certaines cellules du système immunitaire comme les macrophages, les cellules T et les mastocytes (Nakasaki et al., 2015). La fibuline-7 est également impliquée dans la régulation des monocytes et neutrophiles. Sa présence à la membrane contrôle la production de cytokines et inhibe la différenciation des monocytes (Sarangi et al., 2018). Dans un modèle *in vivo* d'endotoxémie, l'administration de fibuline-7 recombinante par injection intrapéritonéale et intraveineuse réduit significativement l'infiltration des neutrophiles au site de l'inflammation et améliore la survie des souris endotoxémiques (Chakraborty et al., 2020). Récemment, une région bioactive issue de l'extrémité C-terminale de la fibuline-7, appelée FC-10, a été identifiée et semble être responsable des fonctions régulatrices de la fibuline-7 sur les neutrophiles et les monocytes (Gupta et al., 2024). Ces études indiquent un potentiel rôle immunomodulateur de la fibuline-7 pour le traitement des maladies inflammatoires.

5. Implication des fibulines dans le cancer

Il existe de nombreuses études associant les fibulines au développement et à la progression de différents cancers (**Tableau 4**). Une augmentation de l'expression de certaines fibulines est notamment retrouvée dans différents types de cancer comme la fibuline-1 dans le cancer du sein (Forti et al., 2002) et le cancer de l'ovaire (Moll et al., 2002), la fibuline-2 dans la progression maligne du cancer des poumons (Baird et al., 2013), la fibuline-3 associée à l'adénocarcinome pancréatique (Seeliger et al., 2009) ou encore la fibuline-4 dans l'ostéosarcome (D. Zhang et al., 2017). D'autres études décrivent une plus faible expression de certaines fibulines associée à la progression tumorale dans certains contextes ; c'est notamment le cas de la fibuline-2, dont la diminution de l'expression est associée au développement du fibroadénome du sein (Yi et al., 2007), ou encore la fibuline-5 dans le contexte du cancer de l'ovaire (Heo et al., 2016).

De par la complexité et la variété des fonctions associées à cette famille, les résultats semblent parfois contradictoires. Cela peut être expliqué dans le cas de la fibuline-1 par la présence de plusieurs variants dérivés de l'épissage alternatif qui produisent des isoformes avec des fonctions bien distinctes (Obaya et al., 2012). Par ailleurs, les fibulines interagissent avec de nombreuses molécules de la MEC, dont les protéases, modulant leurs actions. Par exemple, l'interaction de la fibuline-1 avec ADAMTS-1 dans les lignées cancéreuses mammaires est associée à un effet anti-tumoral avec une réduction des capacités de prolifération et d'invasion des cellules (Mohamedi et al., 2019). L'interaction de la fibuline-2 avec ADAMTS12 est associée à une réduction du caractère pro-tumoral des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* (Fontanil et al., 2014), alors que le clivage de la fibuline-2 par ADAMTS5 est accompagné d'une accentuation de l'agressivité tumorale de ces cellules cancéreuses mammaires (Fontanil et al., 2017). De plus, l'inactivation de la fibuline-5 dans une lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire est associée à l'induction de l'expression de la MMP7, qui semble contribuer à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses en culture (Tu et al., 2014).

En résumé, dans le contexte tumoral, les fibulines peuvent présenter des activités pro- et anti-tumorales en fonction du contexte, notamment de par leurs interactions avec d'autres protéines matricielles associées à des fonctions bioactives comme les protéases. Ces interactions peuvent donc modifier le microenvironnement tumoral en modulant les propriétés biochimiques et biomécaniques de la matrice extracellulaire, affectant, par exemple, les dynamiques migratoires et prolifératives des cellules tumorales.

Tableau 4. Les fibulines dans différents types de cancer.

Adapté de (Mahajan et al., 2021).

Fibuline	Type de cancer	Rôle	Références
Fibuline-1 <i>FBLN1</i>	Cancer du sein	L'augmentation de son expression favorise la progression du cancer.	(Forti et al., 2002)
	Cancer de l'ovaire	L'augmentation de son expression favorise la progression du cancer.	(Moll et al., 2002)
	Cancer du sein	Son interaction avec ADAMTS-1 promeut des effets anti-tumoraux.	(Mohamedi et al., 2019)
	Néoplasme myéloprolifératifs à chromosome Philadelphie négatifs	L'augmentation de son expression induit l'activité du TGF- β et favorise la progression du cancer.	(Skov et al., 2019)
	Carcinome hépatocellulaire	Diminution de son expression associée à l'hyperméthylation de son promoteur.	(Kanda et al., 2011)
Fibuline-2 <i>FBLN2</i>	Carcinome nasopharyngé	Effet suppresseur de tumeur et anti-angiogénique.	(Law et al., 2012)
	Sarcome de Kaposi	Une plus faible expression stimule la prolifération dégénérée, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses.	(Alcendor et al., 2011)
	Fibroadénome du sein	Une diminution de son expression favorise la progression du cancer.	(Yi et al., 2007)
	Adénocarcinome des poumons	La fibuline-2 favorise la progression maligne du cancer des poumons.	(Baird et al., 2013)
	Cancer du sein	Son interaction avec ADAMTS-12 promeut des effets anti-tumoraux.	(Fontanil et al., 2014)
	Cancer du sein	Son clivage par ADAMTS-4 et ADAMTS-5 favorise la progression du cancer.	(Fontanil et al., 2017)
	Carcinome hépatocellulaire	L'augmentation de son expression stimule la prolifération des cellules cancéreuses et la croissance de la tumeur <i>in vivo</i> .	(X. Hu et al., 2023)
Fibuline-3 <i>EFEMP1</i>	Adénocarcinome des poumons	La fibuline-3 induit des effets inhibiteurs sur la TEM et la capacité d'auto-renouvellement.	(I. G. Kim et al., 2014)
	Cancer du sein	La fibuline-3 inhibe la TEM induite par le TGF- β et la capacité d'auto-renouvellement.	(Tian et al., 2015)
	Adénocarcinome pancréatique	La fibuline-3 promeut la progression du cancer.	(Seeliger et al., 2009)
	Carcinome hépatocellulaire	La diminution de son expression, associée à une hyperméthylation de son promoteur, est un mauvais pronostic pour les patients. Une plus faible expression stimule la migration et la prolifération des cellules cancéreuses	(Dou et al., 2016; J. Hu et al., 2019; Luo et al., 2013; Nomoto et al., 2010)
Fibuline-4 <i>EFEMP2</i>	Ostéosarcome	L'augmentation de son expression favorise les métastases et l'invasion.	(D. Zhang et al., 2017)
	Carcinome de l'endomètre	Une plus forte expression inhibe l'invasion cellulaire, la prolifération, les métastases et la TEM médiée par la voie Wnt/ β -caténine.	(T. Wang et al., 2017)
Fibuline-5 <i>FBLN5</i>	Cancer de l'ovaire et de l'endomètre	La fibuline-5 agit comme un suppresseur de tumeur.	(Heo et al., 2016; Li et al., 2020; Manders et al., 2018; A. L. Winship et al., 2016)
	Adénocarcinome pancréatique	La fibuline-5 favorise la progression tumorale en bloquant la production d'espèces réactives de l'oxygène.	(M. Wang et al., 2015)
	Carcinome hépatocellulaire	Une plus faible expression stimule l'expression de MMP7 et la migration et l'invasion des cellules cancéreuses.	(Tang et al., 2015; Tu et al., 2014)
Fibuline-7 <i>FBLN7</i>	Cancer du sein	La fibuline-7 retarde la reprogrammation des macrophages associés à la tumeur.	(Chakraborty et al., 2021)
	Tumeur astrocytaire	La fibuline-7 promeut la progression tumorale.	(de Vega et al., 2019)

D. La fibuline-3

Découverte en 1995, la fibuline-3, codée par le gène *EFEMP1* (*EGF-containing fibulin extracellular matrix protein 1*), fait partie des fibulines courtes. Elle présente des fonctions et interactions distinctes dont les mécanismes sont encore peu décrits. La fibuline-3 est également impliquée dans plusieurs processus physiopathologiques associés au vieillissement et à la dégénérescence maculaire.

1. Structure et expression de la fibuline-3

En 1995, la fibuline-3 est tout d'abord connue sous le nom de *S1-5* (numéro d'un clone d'ADN complémentaire). Son transcrite est identifié suite à un criblage de fibroblastes humains associés au syndrome de Werner, pathologie caractérisée par un vieillissement prématuré (Lecka-Czernik et al., 1995). La séquence du clone *S1-5* a permis de montrer qu'il s'agissait d'un nouveau membre de la famille des fibulines, qui a été nommé fibuline-3 (Tran, Mattei, et al., 1997). Elle est très bien conservée entre les espèces avec notamment une identité supérieure à 93% des acides aminés entre l'humain, le singe, le rat et la souris (Tan et al., 2024).

Au sein de la famille, la fibuline-3 fait partie du sous-groupe des fibulines courtes (comme les fibulines 4, 5 et 7). Dépourvue du domaine I en position N-terminale, elle est composée d'un module cbEGF-like modifié suivi de 5 motifs cbEGF-like. Ces modules sont riches en cystéines et impliquées dans la formation de ponts disulfures essentiels au repliement, à la maturation et à la sécrétion de la fibuline-3 (Woodard et al., 2022). Sa structure se termine par un domaine globulaire fibulin-like, commun à toutes les fibulines.

L'étude de la séquence ADN d'*EFEMP1* suggère 5 isoformes possibles issus de l'épissage alternatif avec des séquences N-terminales différentes (Lecka-Czernik et al., 1995). Seulement 2 isoformes ont pu être identifiées par immunoblotting (Kobayashi et al., 2007) et d'autres études complémentaires seront nécessaires afin de confirmer la présence de ces variants. La fibuline-3 présente par ailleurs des modifications post-traductionnelles (Kobayashi et al., 2007). La N-glycosylation de l'asparagine en position 249 (dans le module cbEGF-like n°3), est notamment importante pour le repliement de la fibuline-3 dans une structure secondaire stable (Hulleman & Kelly, 2015). Contrairement aux fibulines 1 et 2, la fibuline-3 n'est pas capable de s'auto-associer et est présente sous forme de monomères dans des conditions physiologiques (Kobayashi et al., 2007).

La fibuline-3 est très largement exprimée à travers les tissus adultes humains (**Figure 16**). Son expression est principalement retrouvée dans les tissus oculaires humains mais elle est également détectée dans d'autres tissus comme le cœur, les poumons, les muscles squelettiques, l'estomac, le pancréas, le foie ou encore les ovaires (Giltay et al., 1999; Livingstone et al., 2020). Dans l'œil, elle est retrouvée au niveau de la membrane de Bruch, une couche tissulaire située entre l'épithélium pigmentaire rétinien et la choriocapillaire.

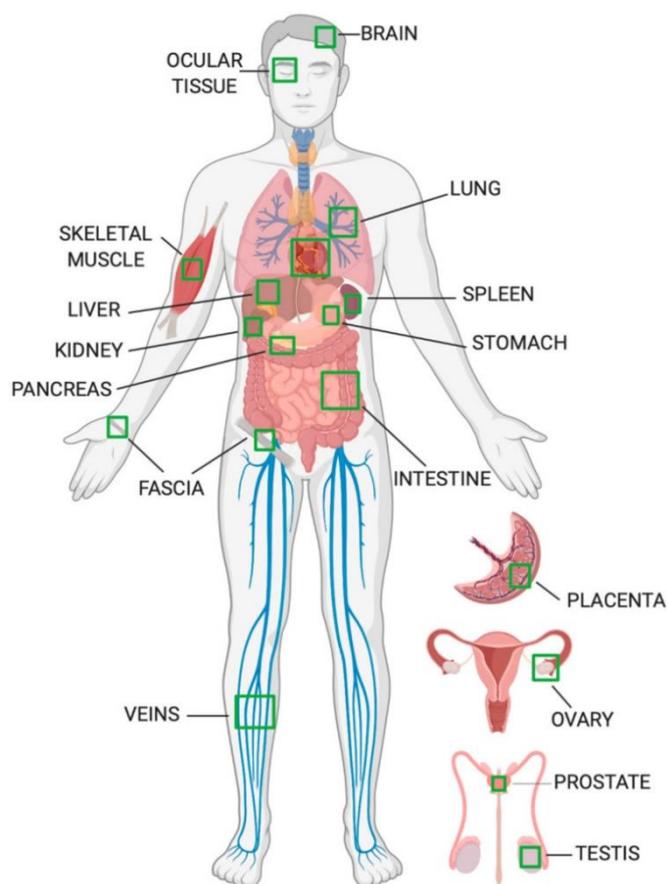


Figure 16. Distribution anatomique de l'expression de la fibuline-3 chez l'humain.
(Livingstone et al. 2020)

2. Principales interactions et fonctions associées de la fibuline-3

Malgré sa forte homologie structurelle avec les fibulines courtes, la fibuline-3 possède des affinités et des partenaires différents, suggérant des fonctions distinctes.

Le rôle des fibulines dans l'assemblage des fibres élastiques est aujourd'hui très bien décrit. La fibuline-3 est également importante pour l'organisation et l'intégrité des fibres élastiques au niveau des tissus conjonctifs *in vivo* (McLaughlin et al., 2007). Néanmoins, contrairement aux autres fibulines, l'interaction de la fibuline-3 avec la tropoélastine est très faible (Kobayashi et al., 2007) et ne semble pas suffire à expliquer son implication dans la stabilisation des fibres élastiques.

L'implication de la fibuline-3 dans le maintien de ces structures fibrillaires peut être médiée par ses interactions avec d'autres protéines impliquées dans le remodelage de la matrice, en particulier les métalloprotéases et leurs régulateurs. En effet, la fibuline-3 interagit fortement avec TIMP-3, un inhibiteur de nombreuses protéases de la matrice (Klenotic et al., 2004). Dans cette interaction, la fibuline-3 agit comme un co-facteur de TIMP-3 en renforçant son action inhibitrice sur l'activité de certaines MMPs (Albig et al., 2006). La surexpression de la fibuline-3 dans les cellules endothéliales est associée à une augmentation de l'expression de TIMP-3, entraînant une inhibition des activités des MMP2 et MMP3 (Albig et al., 2006). L'inhibition de l'activité de certaines MMPs a également été attribuée à la fibuline-3 dans des contextes différents comme l'hypertension artérielle (Z. Lin et al., 2016) ou le cancer des poumons (X. Chen et al., 2014; I. G. Kim et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la fibuline-3 pourrait protéger la matrice fibrillaire de la dégradation en antagonisant les protéases de la matrice *via* son interaction avec TIMP-3.

Par ailleurs, la fibuline-3 interagit avec le récepteur de type I au TGF- β (T β RI) (Tian et al., 2015; Xu et al., 2022). L'interaction de la fibuline-3 avec ce récepteur bloque la formation du complexe du T β RI avec le récepteur de type II au TGF- β (T β RII) et inhibe ainsi la signalisation du TGF- β induite par la fixation à ses récepteurs (**Figure 17**). Cette inhibition est responsable d'une diminution des capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses mammaires (Tian et al., 2015) et régule la différenciation des chondrocytes dans le contexte inflammatoire de l'arthrite (Xu et al., 2022).

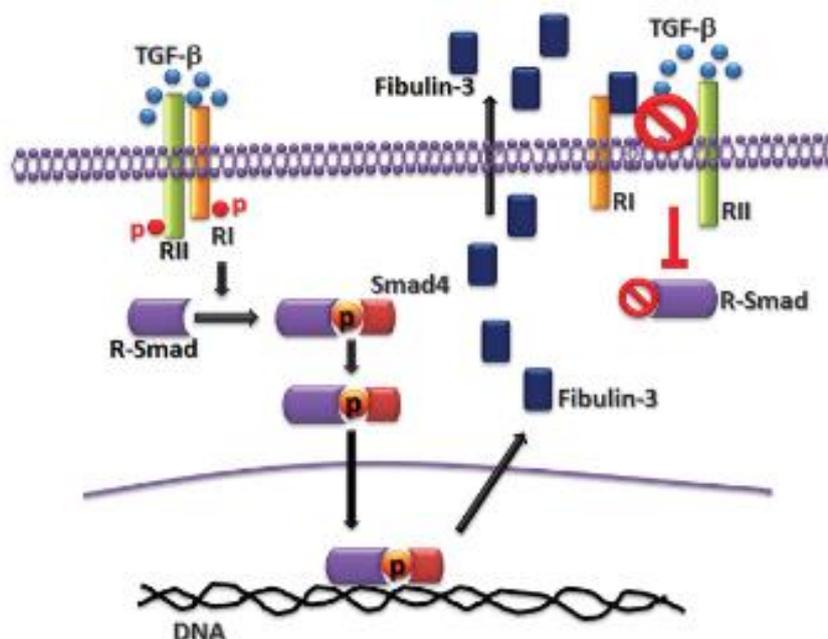


Figure 17. La régulation de la signalisation TGF- β médiée par la fibuline-3.
(Tian et al. 2015)

La fibuline-3 inhibe la signalisation TGF- β grâce à son interaction avec T β RI, bloquant la formation du complexe avec T β RII et ainsi la signalisation en aval.

3. Principales implications physiopathologiques de la fibuline-3

3.1. La mutation Arg345Trp et son implication dans la Malattia Leventinese

La fibuline-3 est notamment connue pour son implication dans les maladies rétinienne. La mutation du gène *EFEMP1* cause une dégénérescence maculaire à transmission autosomale dominante appelée Malattia Leventinese (ML), également connue sous le nom de dystrophie rétinienne de Doyme Honeycomb (Stone et al., 1999).

La ML est une maladie dégénérative héréditaire de la rétine. Les patients souffrent d'une déficience visuelle sévère qui s'intensifie avec l'âge. Elle est caractérisée par une accumulation excessive de dépôts blancs, appelés druses, entre l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et la membrane de Bruch, qui entraîne la mort des photorécepteurs et donc un déclin de l'acuité visuelle.

La ML est associée à une mutation faux-sens Arg345Trp (R345W) dans le module cbEGF-like n°6. Ce motif est essentiel au repliement de la protéine et la mutation induit une mauvaise

conformation de la fibuline-3, une altération de sa sécrétion par les cellules EPR, et une plus grande résistance à la dégradation (Marmorstein et al., 2002). La fibuline-3 mutante s'accumule alors dans les cellules et plus précisément, dans le réticulum endoplasmique (RE). Cette accumulation aberrante induit un stress du RE résultant de l'activation de la réponse aux protéines mal repliées (*Unfolded Protein Response*, UPR) (Roybal et al., 2005). Le stress du RE, induit par l'accumulation de la fibuline-3 mutante, perturbe les processus cellulaires normaux, et notamment les mécanismes de sécrétion par les cellules rétinienne, entraînant l'accumulation de druses. L'accumulation de ces dépôts est amplifiée par une perturbation du remodelage de la matrice au niveau de la rétine. En effet, la mutation de la fibuline-3 est associée à une augmentation de l'expression de TIMP-3 au niveau de l'EPR, inhibant ainsi l'activité de certaines protéases comme MMP2 et MMP9 (Zayas-Santiago et al., 2017). La réduction de l'activité des MMPs entraîne une diminution de la dégradation des protéoglycanes entre l'EPR et la membrane de Bruch. L'accumulation de protéoglycanes ainsi induite rend la membrane de Bruch plus dense et altère la diffusion des molécules à travers cette structure.

Il est à noter que la perte de la fibuline-3 chez la souris n'entraîne pas d'altération de la vision ou des structures au niveau de l'œil confirmant que l'effet de la mutation n'est pas dû à une perte de fonction de la protéine, mais plus probablement à une altération de sa conformation et de ses interactions avec d'autres protéines (Zayas-Santiago et al., 2017).

3.2. Association de la fibuline-3 avec le vieillissement

De nombreux arguments démontrent une association de la fibuline-3 avec le processus de vieillissement ; de par l'origine de sa découverte dans des fibroblastes sénescents (Lecka-Czernik et al., 1995), mais également de par le modèle murin déficient en fibuline-3 (McLaughlin et al., 2007).

Lors de sa découverte, la fibuline-3 est très vite associée au phénomène de sénescence et de vieillissement. Son transcrite *S1-5* est retrouvé surexprimé dans des fibroblastes humains issus de patients atteints du syndrome de Werner (Lecka-Czernik et al., 1995), une maladie génétique rare caractérisée par plusieurs symptômes associés au vieillissement prématuré (Oshima et al., 2017). La surexpression d'*EFEMP1* dans les fibroblastes quiescents entraîne une augmentation de la synthèse d'ADN, qui peut être interprétée par une stimulation de la réplication (Lecka-Czernik et al., 1995). Cette étude suggère également que la fibuline-3 pourrait exercer un contrôle paracrine de la sénescence cellulaire. Il est intéressant de souligner que les observations de Lecka-Czernik et al. suggèrent que différentes formes d'*EFEMP1* pourraient avoir des effets positifs ou négatifs sur la sénescence et la réplication de l'ADN.

De plus, l'invalidation de l'expression d'*Efemp1* chez la souris entraîne le développement d'un phénotype caractéristique du vieillissement prématuré (McLaughlin et al., 2007). L'absence de la fibuline-3 dans les tissus est responsable d'un défaut des fibres élastiques spécifiquement dans les tissus conjonctifs. Néanmoins, la fonctionnalité des autres organes et tissus riches en fibres élastiques et qui expriment la fibuline-3 en condition physiologique, comme les poumons ou les vaisseaux sanguins, est normale. Ces observations suggèrent une possible compensation par d'autres fibulines dans ces structures. Les souris déficientes en *Efemp1* présentent également d'autres caractéristiques associées au vieillissement avec une altération de la fonction reproductrice, une plus courte durée de vie, une masse corporelle plus faible, un défaut de courbure de la colonne vertébrale (lordose et cyphose), une réduction de la pilosité, ainsi qu'une atrophie systémique des tissus adipeux et des muscles (McLaughlin et al., 2007). Par ailleurs, ce phénotype s'intensifie avec l'âge des souris.

Une perturbation de l'expression de la fibuline-3 est également associée à d'autres maladies humaines liées au vieillissement. Elle est impliquée dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) comme décrit précédemment. Par ailleurs, son expression est spécifiquement réduite dans les tissus cartilagineux articulaires au cours du vieillissement et du développement de l'arthrite (Hasegawa et al., 2017). La fibuline-3 régule la différenciation des cellules progénitrices des chondrocytes et la diminution de son expression associée au vieillissement est un événement majeur dans la pathogénicité de l'arthrite. De plus, la dégradation de la fibuline-3 au cours du vieillissement est associée au développement de l'arthrite et les peptides générés constituent de potentiels nouveaux biomarqueurs de cette pathologie (de Visser et al., 2019; Henrotin et al., 2012; Runhaar et al., 2016; Sanchez et al., 2018).

3.3. Implications de la fibuline-3 dans le cancer

Des modifications d'expression d'*EFEMP1* ont été observées dans de nombreux cancers. La fibuline-3 est surexprimée dans le gliome (B. Hu et al., 2009), le glioblastome (Lei et al., 2017), l'ostéosarcome (Z. Wang et al., 2015) et le cancer de l'utérus (En-lin et al., 2010). En revanche, elle est plus faiblement exprimée dans le carcinome de l'endomètre (T. Yang et al., 2013), le cancer de la prostate (Y.-J. Kim et al., 2011), des poumons (X. Chen et al., 2014), du sein (Tian et al., 2015), du colon (H. Y. Mao et al., 2019), du foie (Dou et al., 2016; Luo et al., 2013; Nomoto et al., 2010) et du nasopharynx (Hwang et al., 2010). Et elle est retrouvée exprimée de façon variable dans le carcinome gastrique (Volkomorov et al., 2013; Zhu et al., 2014) et ovarien (J. Chen et al., 2013; Davidson et al., 2011). Ces résultats, parfois contradictoires, témoignent de mécanismes complexes dans lesquelles la fibuline-3 pourrait exercer des actions pro- ou anti-tumorales en fonction du contexte, suggérant que la fibuline-3 ne fonctionne pas seule, mais plutôt en association avec d'autres partenaires dans le microenvironnement.

Son interaction avec TIMP-3 permet de moduler l'expression et l'activité de plusieurs protéases de la matrice comme les MMP2, MMP9 ou encore certaines adamalysines comme ADAM17 ou ADAMTS5, favorisant l'angiogenèse, l'invasion cellulaire et ainsi la progression du gliome (Nandhu et al., 2014) et du glioblastome (B. Hu et al., 2009). Dans le cancer du sein, son activité anti-tumorale est une conséquence de son interaction avec le T β RI et de l'inhibition de la signalisation TGF- β (Tian et al., 2015). En inhibant la voie TGF- β , une forte expression de la fibuline-3 est ainsi responsable de l'inhibition du caractère agressif des cellules cancéreuses mammaires en réduisant la migration et l'invasion tumorale ainsi que la transition épithélio-mésenchymateuse.

III. Contexte et objectifs de la thèse

La majorité des maladies chroniques hépatiques (MCHs) sont associées au développement d'une fibrose qui peut évoluer sous forme de cirrhose constituant alors un facteur majeur de risque de décès ou du développement d'un carcinome hépatocellulaire. La compréhension et la caractérisation de l'environnement fibrotique sont désormais essentielles au développement de nouvelles solutions thérapeutiques, dans l'objectif d'identifier des biomarqueurs ou des cibles thérapeutiques.

Dans ce contexte, notre équipe a initié un projet qui vise à caractériser le matrisome au cours de la fibrose hépatique chez l'humain. Nous avons réalisé une étude protéomique à partir d'échantillons de foie de patients, évalués à différents stades de fibrose (F1 à F4) et enrichis en matrice extracellulaire en utilisant le protocole décrit dans (Naba et al., 2015). Nous avons identifié 16 protéines matricielles exprimées différemment entre, au minimum, deux stades de fibrose. Parmi ces protéines, nous avons identifié trois membres de la famille des fibulines : les fibulines 2, 3 et 5. Ces trois fibulines présentent des niveaux de protéines associés positivement avec les stades avancés de la fibrose (F3-F4), suggérant une implication dans la progression de la fibrose hépatique.

A. Contexte : les fibulines dans le foie, implications dans les maladies chroniques hépatiques et le carcinome hépatocellulaire

1. L'expression des fibulines dans la fibrose hépatique

Les premières études d'immunodétection ont montré que les fibulines sont faiblement exprimées dans le foie sain (Knittel et al., 1999; Piscaglia et al., 2009; Tateaki et al., 2004). Les fibulines 1 et 2 ont une distribution restreinte et sont généralement retrouvées autour des vaisseaux ; elles sont détectées dans les parois des artères hépatiques et des veines centrales. Leur rôle dans ces structures est probablement de contribuer à l'élasticité des artères et vaisseaux sanguins.

Comme de nombreux composants de la matrice, les niveaux de certaines fibulines augmentent au cours du développement de la fibrose hépatique. Dans les modèles murins de fibrose hépatique, la présence des fibulines 1 et 2 augmente significativement. Elles se localisent dans les septa fibrotiques, avec une localisation plus étendue pour la fibuline-2 (Itou et al., 2019; Piscaglia et al., 2009; Tateaki et al., 2004). Avec la progression de la fibrose, la fibuline-2 s'accumule sur toute l'épaisseur des cicatrices et est co-localisée avec des marqueurs myofibroblastiques comme la desmine ou l'alpha-actine du muscle lisse (α -SMA) (Knittel et al., 1999). Dans un contexte cirrhotique, la fibuline-4 est retrouvée au niveau des cellules des canaux biliaires, et est généralement exprimée près des régions fibrosées (Kumagai et al., 2024). Dans les foies atteints d'hypertension portale idiopathique, la fibuline-5 est co-localisée avec les fibres élastiques (Sato et al., 2008).

Les études de criblage transcriptomique et protéomique ont également permis d'apporter de nouvelles informations dans le contexte de la fibrose hépatique. L'expression de la fibuline-3 est notamment plus forte dans les foies malades ; les analyses de puce à ADN démontrent l'association entre l'augmentation de l'expression d'*EFEMP1* et les stades avancés de fibrose associée à l'hépatite B chronique (Furuta et al., 2008) et aux NAFLD (He et al., 2021). Dans l'atrésie biliaire, une augmentation de son expression est détectée dans les échantillons de fibrose avancée (Y. Chen et al., 2018). Le criblage protéomique des biopsies de patients atteints d'hépatite B ou C révèle également une association entre l'expression de *FBLN5* et le stade de fibrose (Bracht et al., 2015). Parmi les protéines les plus abondantes dans les structures cirrhotiques décellularisées, plusieurs fibulines sont détectées, dont les fibulines 1, 2, 3 et 5 (Mazza et al., 2019). Elles sont retrouvées à tous les stades de fibrose (Daneshgar et al., 2020) mais certaines fibulines sont associées à des stades très avancés comme les fibulines 3, 5 et 6 (Baicocchi et al., 2016).

Plus récemment, des analyses protéomiques de vésicules extracellulaires issues de sérums de patients proposent les fibulines 3 et 4 comme de nouveaux biomarqueurs des maladies chroniques hépatiques compte tenu de leur accumulation associée au degré de fibrose (Kumagai et al., 2024; Sakane et al., 2024).

2. Les sources cellulaires des fibulines dans le foie

La fibuline-1 est exprimée par les myofibroblastes et les CEFs complètement activées, et est absente dans les CEFs quiescentes ou aux stades précoces de leur activation (Piscaglia et al., 2009).

La fibuline-2 est la fibuline la plus étudiée dans le contexte de la fibrose hépatique. En 1999, Knittel fut le premier à identifier la fibuline-2 dans les myofibroblastes hépatiques murins et à confirmer son absence dans les CEFs quiescentes (Knittel et al., 1999) ; une observation également confirmée

par la suite dans d'autres études (Kinnman et al., 2003; Piscaglia et al., 2009; Ramadori et al., 2002). Sa co-localisation tissulaire avec les myofibroblastes actifs (marqués avec l' α -SMA) suggère des fonctions pro-fibrosantes dans le foie (Ramadori et al., 2002). A partir de ces observations, la fibuline-2 fut rapidement considérée comme un marqueur des myofibroblastes portaux. Par ailleurs, une étude de séquençage d'ARN sur cellules uniques (scRNA-seq) a mis en évidence une sous-population de CEFs murins exprimant la fibuline-2 et présentant des caractéristiques pro-fibrotiques et pro-inflammatoires (Balog et al., 2023). L'expression de *Fbln2* dans cette population de CEFs est associée à une plus forte expression de gènes pro-fibrotiques comme *Lox*, *Timp1*, *Acta2*, *Tgfb1*, *Tgfb1* et *Mmp2* en comparaison à la population qui n'expriment pas la fibuline-2. Ces cellules *Fbln2*-positives sont plus nombreuses dans les foies issus des modèles d'hépatite alcoolique en comparaison aux souris contrôles, et pourraient contribuer de façon importante aux toutes premières étapes de la cicatrisation.

La localisation des autres fibulines est peu décrite dans la littérature. Cependant, l'expression d'*EFEMP1* a été détectée dans les cholangiocytes et les myofibroblastes portaux α -SMA positifs (Y. Chen et al., 2018), suggérant une association de la fibuline-3 avec la progression de la fibrose hépatique.

3. Les fibulines dans le carcinome hépatocellulaire

Au sein des tissus tumoraux de patients atteints de CHC, on retrouve une plus faible expression de la fibuline-1 (Kanda et al., 2011), de la fibuline-3 (J. Hu et al., 2019; Luo et al., 2013; Nomoto et al., 2010) et de la fibuline-5 (Tang et al., 2015; Tu et al., 2014) associée à un profil plus agressif des cellules cancéreuses et un mauvais pronostic pour les patients. Cette diminution d'expression est notamment liée à une hyperméthylation du promoteur de *FBLN1* (Kanda et al., 2011) et d'*EFEMP1* (Nomoto et al., 2010) dans ces tissus cancéreux. Une étude plus récente présente des résultats contradictoires concernant la fibuline-1 avec une augmentation de l'ARNm *FBLN1* dans les tissus et sérums de patients atteints de CHC (Gong et al., 2020). Par ailleurs, la fibuline-2 est également plus exprimée dans les tissus cancéreux développés dans un contexte cirrhotique (X. Hu et al., 2023).

A l'échelle cellulaire, l'inhibition de l'expression de la fibuline-1 (Gong et al., 2020), comme celle de la fibuline-2 (X. Hu et al., 2023), restreint la capacité des cellules cancéreuses à former des tumeurs *in vivo* dans un modèle de tumeur sous-cutanée, leur suggérant une implication pro-tumorale. A l'inverse, la fibuline-3 est considérée comme un suppresseur de tumeur car la baisse de son expression dans une lignée de cellules CHC est associée à une augmentation de la migration et de la prolifération cellulaire *in vitro* (Dou et al., 2016; Luo et al., 2013). Et la surexpression de la

fibuline-3 augmente le phénomène d'apoptose des cellules cancéreuses associé à une induction de l'expression de la sémaphorine 3B, impliquée dans l'induction de l'apoptose (J. Hu et al., 2019). La surexpression de la fibuline-5 inhibe l'invasion et la migration des cellules du CHC grâce à un mécanisme d'adhésion dépendant des intégrines (Tang et al., 2015; Tu et al., 2014).

Ainsi, dans la littérature, les fibulines 2, 3 et 5, identifiées dans notre étude protéomique, sont peu étudiées dans le contexte des MCHs. Bien que nos données confirment de précédents criblages protéomiques, il n'existe à ce jour aucune étude mécanistique permettant de mieux comprendre leurs implications dans la fibrose hépatique.

B. Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, mes travaux de thèse avaient pour objectif de **caractériser l'implication des fibulines 2, 3 et 5 dans le développement de la fibrose hépatique.**

Mes contributions seront présentées en deux parties :

- Dans la première partie (pages 83-156), nous avons étudié ces trois fibulines et comparé leur implication fonctionnelle au cours de la fibrose hépatique. Tout d'abord, en étudiant leurs réseaux d'interactions protéine-protéine (PPI), nous avons mis en évidence des fonctions spécifiques pour chacune de ces fibulines, suggérant des rôles différents dans l'organisation matricielle mais également dans la communication cellulaire. Nous avons également montré que les CEFs, acteurs majeurs de la fibrose hépatique, constituent la principale source cellulaire de ces trois fibulines dans le foie. En investiguant leurs fonctions au sein de cette population de cellules grâce à la lignée LX-2, dérivée de CEFs humains, nous avons pu mettre en évidence le rôle spécifique de la fibuline-3 dans la régulation de l'adhésion et de la migration des cellules étoilées du foie. Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis au journal *Matrix Biology* : « *Proteomic analysis of liver fibrosis reveals EFEMP1 as a new modulator of adhesion and migration of hepatic stellate cells* », Thomas C., Bouezzedine F., Bonnier D., Legagneux V., Théret N.

Ces résultats ont également été présentés lors de plusieurs congrès internationaux et conférences, détaillés dans la partie Annexes sous forme de communications orales et posters.

- Dans la seconde partie (pages 157-169), nous avons poursuivi la caractérisation de la fibuline-3 en investiguant un potentiel partenaire, ADAMTS5. De nombreuses associations entre certains membres de la famille des ADAMTSs, protéases de la matrice, et certaines fibulines ont déjà été décrites dans la littérature (Fontanil et al., 2019). Une étude réalisée dans le contexte du gliome a notamment suggéré l'association de la fibuline-3 avec ADAMTS5 (B. Hu et al., 2009). Nous nous sommes donc intéressés à la relation fonctionnelle entre ces protéines matricielles en réalisant tout d'abord une étude mécanistique par surexpression de la fibuline-3 et d'ADAMTS5 dans la lignée cellulaire COS7. Les observations obtenues *in vitro* ont ensuite été testées dans le contexte de la fibrose hépatique en étudiant l'expression de ces deux protéines dans les tissus hépatiques à différents stades de fibrose ainsi que dans les cellules LX-2.



Matériels et Méthodes

Echantillons de tissus humains

Cinquante échantillons de foies non-tumoraux ont été prélevés chez des patients ayant subi une hépatectomie pour un carcinome hépatocellulaire (CHC), dont 18 ont été utilisés pour les analyses protéomiques. Les patients comptent 4 femmes (âge moyen 61.5 ± 11 ans) et 46 hommes (âge moyen 67.2 ± 11.3 ans). Les stades histologiques de fibrose sont classés selon le score METAVIR : F1, fibrose portale sans septa ; F2, fibrose portale avec de rares septa ; F3, nombreux septa sans cirrhose ; et F4, cirrhose. Toutes les coupes de tissus ont été systématiquement analysées après coloration à l'hématoxyline-éosine-safran et au rouge Sirius. Les échantillons proviennent du Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Rennes. L'accès à ce matériel est conforme à la réglementation française et respecte les exigences du comité d'éthique local.

Analyse protéomique de la matrice extracellulaire à partir d'échantillons fibrotiques humains

La préparation des tissus et l'enrichissement des protéines de la MEC ont été effectués comme décrit précédemment (Azar et al., 2020). Les échantillons de tissus (stades F1 à F4) ont été homogénéisés mécaniquement et extraits séquentiellement selon le protocole de Naba (Naba et al., 2015). La digestion des protéines et les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par la Plateforme de protéomique du Centre de recherche du CHU de Québec (Québec, Qc, Canada) en utilisant la LC-MS/MS sur Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific). Les spectres de masse ont été interprétés avec MaxQuant/Andromeda et les spectres MS/MS ont été analysés grâce à la base de données UniprotKB Homo sapiens (CP_Homo-Sapiens) avec la modification fixe : carbamidométhyl (C) et les modifications variables : oxydation (M), oxydation (K), oxydation (P). Les identifications de peptides ont été filtrées avec un taux de fausse découverte de 1 %.

Réseaux d'interactions protéine-protéine

Les symboles des gènes de chaque fibuline ont été utilisés pour interroger les bases de données d'interactions moléculaires à l'aide de Proteomics Standard Initiative Common QUery InterfaCe (PSICQUIC) (Aranda et al., 2011). Cette spécification a été créée par la Human Proteome Organization Proteomics Standards Initiative (HUPO-PSI) pour normaliser l'accès aux bases de données d'interactions moléculaires. Dans cette étude, les analyses ont été effectuées le 22 février 2024 et les données brutes sont fournies dans **les tableaux supplémentaires 2, 3 et 4 de l'article**.

Culture cellulaire

Les hépatocytes humains primaires (HH) et les CEFs ont été obtenus après isolement à partir de régions histologiquement normales d'hépatectomies partielles de patients subissant une résection hépatique pour des métastases hépatiques. Les HH et les CEFs ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Minimal Essential (DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose, du pyruvate, de la glutamine, de la pénicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (100 mg/mL) et complété par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF ; Lonza). La lignée cellulaire LX-2 a été maintenue dans du DMEM contenant 4,5 g/L de glucose, du pyruvate, de la glutamine, de la pénicilline (100UI/mL)-streptomycine (100mg/mL) et 10% de SVF (Eurobio). Lorsque cela est indiqué, les cellules ont été traitées avec IL-1 β (5 ng/mL) ou TGF- β (5 ng/mL) pour les durées indiquées dans des milieux contenant 2% de SVF.

Immunofluorescence

Pour la détection de l'actine fibrillaire (F-actine), les cellules LX-2 ont étéensemencées dans des plaques 12-puits, non-recouvertes (surface plastique) ou recouvertes de collagène I, 24h après la transfection des siRNAs et cultivées pendant 72 heures supplémentaires. Les cellules transfectées ont été fixées pendant 10 minutes dans du paraformaldéhyde à 4%, puis perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,1% pendant 10 minutes et lavées trois fois au PBS. La F-actine a été colorée à l'aide de la sonde phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa-488 (1/40 ; #8878, Cell Signaling). Les cellules fixées ont été contre-colorées avec du Hoechst-33342 et observées au microscope à épifluorescence. Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope Zeiss Axio Vert A1 et ont été analysées avec le logiciel ImageJ/Fiji. Pour l'analyse de la taille des noyaux, des régions d'intérêt (ROI) correspondant aux zones projetées des noyaux (signal Hoechst) ont été définies par seuillage automatique. Pour chaque ROI et chaque canal, la surface, la valeur moyenne du signal et la valeur intégrée du signal ont été collectées. Les analyses des tableaux de mesures ont été réalisées en R.

Pour les autres immunomarquages, les cellules LX-2 ont étéensemencées dans des μ -slide 8-puits IbiTreat (#80806, Ibidi) 24h après la transfection du siRNA et cultivées pendant 72 heures supplémentaires. Les cellules transfectées ont été fixées pendant 10 minutes dans du paraformaldéhyde à 4% et lavées trois fois au PBS. Pour la détection de la paxilline, les cellules ont été perméabilisées avec Triton X-100 à 0.1% pendant 10 minutes. Les cellules fixées ont été incubées pendant 2 heures à température ambiante dans du PBS contenant 1% de BSA, suivies d'une nuit d'incubation à 4°C avec un anticorps primaire anti-Paxilline (1/100 ; Souris ; #612405, BD Transduction Laboratories), anti-Fibronectine (1/40 ; Lapin ; #PA5-29578, Invitrogen), ou anti-Intégrine β 1 (1/25 ; Souris ; #sc-13590, Santa Cruz Biotechnology) dilué dans du PBS-1%BSA. Les anticorps liés ont été détectés à l'aide d'un anticorps secondaire IgG anti-souris conjugué au Cy3 (1/100 ; #715-165-150, Jackson Immunoresearch) ou d'un anticorps IgG anti-lapin (1/100, #711-165-

152, Jackson Immunoresearch). Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal TCS SP8 (Leica) avec la Leica Application Suite Advanced Fluorescence et analysées avec le logiciel ImageJ/Fiji. La quantification du nombre et de la taille de la longueur de la fibronectine a été effectuée comme décrit précédemment (R.-M. Zhang et al., 2020).

Analyse des complexes d'adhésion focaux

Les complexes d'adhésion focaux ont été détectés sur la base de l'immunomarquage de la paxilline et imagées avec un microscope confocal SP8 (Leica). Les analyses d'images ont été réalisées avec le logiciel ImageJ/Fiji. Les tranches optiques contenant des signaux de paxilline ont été projetées en Z et additionnées, puis seuillées à l'aide de l'algorithme d'Otsu. Les particules de plus de 1 μm^2 ont été considérées comme des foyers de paxilline et comptées par rapport au nombre de noyaux (objets supérieurs à 100 μm^2 dans le canal DAPI).

Interférence ARN

Les transfections de siRNA ont été réalisées avec le réactif Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Les cellules LX-2 ont été transfectées avec les siRNAs dirigés contre les gènes FBLN2, EFEMP1 ainsi qu'un siRNA contrôle pendant les temps indiqués. Les séquences de siRNA (Eurogentec) utilisées sont :

siEFEMP1 si1 (sense): GUGUGUCAACCACUAUGGAdTdT

siEFEMP1 si2 (sense): GGAAACACAACCAGCAGAAAdTdT

siEFEMP1 si3 (sense): GACAUUGAUGAAUGCAGAAAdTdT

siFBLN2 (sense): GAGUUUCAGAGGCAGAGAUdTdT

siCTRL (negative control): Eurogentec reference SR-CL000-005

Après validation, le siEFEMP1 si2 a été sélectionné pour la suite des expérimentations.

Isolation des ARNs et RT-qPCR

Les ARNs totaux des biopsies hépatiques et des cellules cultivées ont été extraits en utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen) d'après les instructions du fournisseur. La transcription inverse a été réalisée à partir de 1 μg d'ARN total grâce au kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). La PCR quantitative en temps réel (RT-PCR) a été effectuée dans le thermocycleur CFX384 OPUS (Biorad) avec le kit Power-Sybr-Green PCR master (Applied Biosystems). Les conditions de PCR sont les suivantes : une dénaturation à 95°C pendant 30 minutes, suivie de 45

cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, d'appariement à 58°C pendant 30 secondes et d'élongation à 72°C pendant 30 secondes. Les niveaux des transcrits sont normalisés selon l'expression du gène GAPDH. Les séquences des primers utilisées dans la première partie de résultats sont décrites dans le **tableau supplémentaire 6 de l'article** et les séquences de primers utilisées dans la seconde partie des résultats sont listées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Liste des couples de primers utilisés en RT-qPCR.

Gène	Espèce	Sens (5'-3')	Antisens (3'-5')
<i>ADAMTS5</i>	<i>H. sapiens</i>	TCGGGAGATTTATGTGGGC	GGAATCGTCATGGGAGAGGC
<i>EFEMP1</i>	<i>H. sapiens</i>	CAAAGTGAACACAACGTGTGC	TGCTCCCCTCGCTTCTGAT
<i>GAPDH</i>	<i>H. sapiens</i>	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT

Analyses en western blot

Les protéines ont été extraites à partir des cellules transfectées en utilisant un tampon d'extraction RIPA (Tris pH8.0, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton, 0.5% NaDOC, 0.1% SDS) supplémenté d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (AEBSF, PIC, Anti-Phosphatase). Les lysats cellulaires (20 µg) ont été déposés dans un gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) à 10% et transférés sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, UK). Les membranes ont été ensuite incubées 1 heure dans un tampon TBS (Tris-Buffered Saline) contenant 0.1% de Tween20 et 5% de lait ou 1% de BSA (Bovine Serum Albumin) suivi d'une incubation pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires. Les anticorps ont ensuite été détectés avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (HRP) anti-IgG lapin (P0448, Dako) et anti-IgG souris (P0447, Dako), puis révélés avec le kit Clarity Western ECL Substrate (Biorad). La quantification des bandes a été réalisée sur le logiciel Image J/Fiji et les analyses statistiques sur R.

Les anticorps primaires utilisés au cours de la première partie des résultats sont détaillés dans le **tableau supplémentaire 7 de l'article** et ceux utilisés au cours de la seconde partie sont les suivants : anti-ADAMTS5 (1/1000 ; ab41037, abcam), anti-Fibulin3 (1/1000 ; sc-33722, Santa Cruz), anti-Flag M2 couplé HRP (1/1000 ; A8592, Sigma-Aldrich), anti-Actin couplé HRP (1/10000 ; A3854, Sigma-Aldrich).

Etude de la prolifération cellulaire

L'analyse de la prolifération des cellules a été réalisée à l'aide du système IncuCyte S3 (Sartorius). Les cellules LX-2 transfectées ont étéensemencées à une densité de 4×10^3 cellules/puits dans des plaques à 96-puits 24h après la transfection du siRNA. Après 6h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu contenant le colorant Nuclight Rapid Red dilué à 1/1000 (NRR ; 4717,

Sartorius) et les plaques ont été analysées. La prolifération des cellules a été visualisée toutes les 4h pendant 72h à l'aide d'un objectif 10x. En utilisant le logiciel IncuCyte S3 Live-Cell analysis system, les cellules ont été comptées sur la base de la coloration NRR et un indice de prolifération a été calculé en divisant le nombre de cellules à chaque temps avec le nombre de cellules au début de la mesure, pour chaque condition.

Etude de la migration cellulaire

80h après la transfection du siRNA, les cellules ont été cultivées pendant 16h dans un milieu réduit en sérum (2%). Ensuite, 8×10^4 cellules LX-2 transfectées ont été ajoutées dans le compartiment supérieur des chambres de Boyden dans un milieu réduit en sérum (2%). Le compartiment inférieur contient du milieu complet (10% SVF). Les cellules ont migré pendant 6 heures à 37°C. Pour quantifier la migration, les cellules ont été retirées mécaniquement de la face supérieure de la membrane à l'aide d'un coton-tige, et les cellules de la face inférieure ont été fixées avec de l'éthanol à 70 % et colorées avec du Hoechst-33342. Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Cinq images représentatives ont été prises pour chaque insert et chaque réplicat biologique a été réalisée en double.

Analyse xCELLigence

L'analyse de l'étalement cellulaire a été réalisée à l'aide du système d'analyse cellulaire en temps réel (RTCA) xCELLigence (ACEA Biosciences). 96h après la transfection du siRNA, les cellules LX-2 ont étéensemencées à une densité de 2×10^4 cellules/puits dans une E-plate 16-puits (Agilent). Les mesures de l'indice cellulaire ont été réalisées toutes les 5 minutes sur une période de 6h. Les valeurs de cet index ont été normalisées par rapport à la moyenne des valeurs des index des cellules siCTRL à 6h.

Identification des cellules sénescents par marquage de l'activité de la β -galactosidase

Les cellules primaires ont été cultivées dans une plaque 12-puits et fixées 96h après la transfection par une solution de fixation provenant du kit (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, Sigma Aldrich). En suivant les recommandations du fournisseur, les cellules sont ensuite incubées à 37°C sans CO₂ pendant 4h dans une solution de marquage de l'activité de la β -galactosidase contenant le substrat X-gal. Chaque réplicat biologique a été réalisé en deux réplicats techniques et les cellules sénescents (bleues) sont observées par microscope à lumière blanche. L'analyse des images a été réalisée à partir de dix champs par condition, recouvrant la totalité du puits, à l'aide du logiciel

ImageJ/Fiji. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écart-type du nombre de cellules sénescentes rapporté au nombre de cellules ensemencées.

Transfection de plasmides dans les cellules COS7

La lignée cellulaire COS7 a été cultivée dans un milieu Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) contenant 4.5g/L Glucose, Pyruvate, et supplémentée avec un mix Pénicilline (100 IU/ml)-Streptomycine (100 mg/ml) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Eurobio). Les cellules COS7 ont été transfectées avec des plasmides d'expression (**Tableau 6**) en utilisant le réactif Lipofectamine 2000® (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Le plasmide pcDNA-DEST40_3xFlag_EFEMP1_WT nous a généreusement été offert par J.D. Hulleman. 48h après la transfection, les milieux conditionnés ont été collectés et les cellules ont été lysées pour en extraire les protéines. Les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 6. Liste des plasmides utilisés pour la surexpression dans les cellules COS7.

Plasmides	Taille (kb)
pcDNA-DEST40_3xFlag_EFEMP1_WT	6.9
pCMV6_ADAMTS5_myc_Flag	7.7
pCMV6_ADAMTS12_myc_Flag	9.4
pCMV6_ADAMTSL1_myc_Flag	6.4
pcDNA3_empty	5.4

Hybridation *in situ* sur cellules LX-2

Les transcrits *EFEMP1* et *ADAMTS5* ont été détectés dans la lignée LX-2 par hybridation *in situ*. Après culture des cellules LX-2 sur lames Lab-Tek (Thermo Scientific), les lames ont été fixées avec 4% paraformaldéhyde (PFA). Nous avons ensuite détecté les transcrits avec le kit d'hybridation *in situ* RNAscope® 2.5 HD Duplex Detection Chromogenic (Advanced Cell Diagnostics Inc) avec les sondes *EFEMP1* (#433161) et *ADAMTS5* (#427611) en suivant les instruction du fabricant. Les images ont été acquises avec le microscope Nikon eclipse Ni direct et analysées grâce au logiciel Image J/Fiji.

Analyses statistiques

Les graphiques et analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel R. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées par des analyses paramétriques ou non-paramétriques comme indiqué dans les légendes des figures.

Résultats

I. Caractérisation des fibulines 2, 3 et 5 dans la fibrose hépatique

A. Article

Proteomic analysis of liver fibrosis reveals EFEMP1 as a new modulator of adhesion and migration of hepatic stellate cells.

Célia Thomas, Fidaa Bouezzedine, Dominique Bonnier, Vincent Legagneux, Nathalie Théret

Soumis à Matrix Biology (le 11 juillet 2024)

Les maladies chroniques hépatiques (MCHs) sont fréquemment associées au développement d'une fibrose hépatique, pouvant évoluer sous forme de cirrhose, qui représente une des principales causes de décès à travers le monde (Devarbhavi et al., 2023) et constitue le majeur facteur de risque d'un développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). Les étiologies sont multiples : hépatite virale (B ou C), consommation excessive d'alcool ou encore stéatose hépatique non-alcoolique (NASH). La fibrose est caractérisée par une accumulation excessive de matrice extracellulaire (MEC), modifiant l'architecture du foie et entraînant des dysfonctionnements hépatiques. Les cellules étoilées du foie (CEFs) activées possèdent un rôle critique dans la fibrose hépatique et représentent la source principale de MEC.

Comprendre et caractériser le microenvironnement fibrotique est donc un prérequis pour le développement d'approches thérapeutiques efficaces, que ce soit pour l'identification de nouveaux biomarqueurs, de nouvelles cibles thérapeutiques ou pour faciliter l'administration de médicaments. Ces dernières années, des approches protéomiques ont été développées pour améliorer la caractérisation de la MEC dans les lésions chroniques hépatiques. Les méthodes de décellularisation et d'enrichissement matriciel utilisées pour purifier les échantillons issus de tissus fibrotiques ont permis de dresser plusieurs signatures protéiques associées à la fibrose hépatique en fonction de l'étiologie (Baiocchini et al., 2016; Daneshgar et al., 2020; Mazza et al., 2019). Bien que ces études apportent d'importantes données, elles mettent néanmoins en évidence les difficultés à obtenir un profil représentatif de la dynamique de la MEC au cours de la progression de la fibrose hépatique, en raison de la diversité des échantillons utilisés et des méthodes d'enrichissement employées. Utiliser un protocole commun et standardisé permettra donc d'homogénéiser les résultats et de faciliter les comparaisons entre les études.

Dans ce contexte, notre équipe a réalisé un criblage protéomique d'échantillons hépatiques enrichis en MEC en suivant un protocole de décellularisation standardisé (Naba et al., 2015).

Principaux résultats :

- L'analyse de nos données de criblage protéomique a permis d'identifier **16 protéines du matrisome associées à une expression différentielle entre au moins deux stades de fibrose**. Cette analyse recouvre partiellement de précédentes signatures protéomiques de fibrose hépatique.
- Notre étude protéomique a permis d'identifier **l'association de trois membres de la famille des fibulines, les fibulines 2, 3 et 5, avec la progression de la fibrose**. A l'échelle des transcrits, seule l'expression de l'ARNm *EFEMP1* était néanmoins significativement plus

élevée dans les échantillons de fibrose avancée en comparaison aux échantillons de fibrose précoce.

- L'analyse comparative des réseaux d'interactions protéine-protéine de ces trois fibulines suggère des **fonctions diverses** : les réseaux des fibulines 2 et 5 sont associés à des processus biologiques relatifs à l'assemblage et à l'organisation de la MEC, tandis que le réseau de partenaires de la fibuline-3 est associé aux processus de régulation du stress du réticulum endoplasmique et de la communication cellulaire.
- Les **fibulines 2, 3 et 5 sont fortement exprimées par les cellules étoilées du foie** humaines en culture et très faiblement exprimées dans les hépatocytes humains.
- En utilisant la lignée cellulaire LX-2, dérivée de CEFs humaines, nos expériences d'interférence ARN (siRNA) ciblant l'expression des fibulines 2 et 3 ont révélé que :
 - L'inhibition de l'expression de *FBLN2* et d'*EFEMP1* n'affecte pas la voie de signalisation du TGF- β dépendante des protéines Smad.
 - L'inhibition de l'expression d'*EFEMP1*, mais pas de *FBLN2*, induit un défaut d'organisation des fibres de stress.
 - L'inhibition de l'expression de *FBLN2* et d'*EFEMP1* affecte différemment l'adhésion cellulaire, notamment la formation des complexes d'adhésion focaux, et la migration cellulaire.
 - L'inhibition de l'expression d'*EFEMP1*, mais pas de *FBLN2*, perturbe le réseau de fibronectine à la surface des cellules LX-2, suggérant que la fibuline-3 serait impliquée dans la stabilisation du réseau de fibronectine et dans les interactions cellule-matrice.

En conclusion, notre étude a mis en évidence pour la première fois le rôle spécifique de la fibuline-3 dans la dynamique des adhésions focales, et ainsi dans l'adhésion et la motilité des CEFs. Nos résultats suggèrent que la fibuline-3 serait impliquée dans la régulation du remodelage matriciel à la surface des cellules, altérant ainsi les interactions cellule-matrice.

Proteomic analysis of liver fibrosis reveals EFEMP1 as a new modulator of adhesion and migration of hepatic stellate cells.

Célia Thomas¹, Fidaa Bouezzedine¹, Dominique Bonnier¹, Vincent Legagneux¹ and Nathalie Théret¹

¹Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) -UMR_S 1085, Rennes, France

Author email addresses:

Célia Thomas : celia.thomas@univ-rennes.fr

Fidaa Bou Ezzeddine : fidaa.bouezzedine@univ-rennes.fr

Dominique Bonnier : dominique.bonnier@univ-rennes.fr

Vincent Legagneux : vincent.legagneux@univ-rennes.fr

Nathalie Théret : nathalie.theret@inserm.fr

Corresponding author:

Nathalie Théret, INSERM U1085-IRSET, 2 Avenue Pr. Léon. Bernard, 35043 Rennes. France. Phone: 33(2)2 323 4811. E-mail: nathalie.theret@inserm.fr

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; HCC, hepatocellular carcinoma; HSC, hepatic stellate cell; NAFLD, non-alcoholic fatty acid liver disease; EFEMP1/FBLN3, EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1/Fibulin-3; FBLN2, Fibulin-2 ; FBLN5, Fibulin-5; FAK, Focal Adhesion Kinase; PAX, Paxillin; ITGB1, Integrin Subunit Beta 1 ; HCV, Hepatitis C virus ; HBV, Hepatitis B virus ; MFAP1, MFAP2, MFAP3, MFAP4, MFAP5 microfibril-associated protein 1,2,3,4,5 ; Col5A3, Collagen Type V Alpha 3 Chain ; Col4A1, Collagen Type IV Alpha 1 Chain ; Col18A1, Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain ; INHBE, Inhibin Subunit Beta E ; LTBP4 , Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 4 ; VWF, Von Willebrand factor; CTSB, Cathepsin B; LAMA4, Laminin Subunit Alpha 4 ; VTN, Vitronectin ; FBN1, fibrillin-1 ; FBN2, Fibrillin-2 ; ELN, Elastin ; EMILIN, Elastin Microfibril Interfacer 1 ; ANXA5, Annexin A5 ; ERdj5, DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C10 ; PDIA4, Protein Disulfide Isomerase Family A Member 4 ; P4HB, Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Beta. ; PDIA6, Protein Disulfide Isomerase Family A Member 6 ; RCN1, Reticulocalbin 1 ; SDF2L1, Stromal Cell Derived Factor 2 Like 1 ; TXNDC5, Thioredoxin Domain Containing 5 ; RPE, Reticulum Pigment Epithelium ; cDC2, conventional dendritic cell ; NK, Natural Killer cell, NKT, Natural Killer T cell ; TGF- β , Tumor Growth

factor Beta ; MMP9, Matrix Metalloprotease-9 ; PAI-1, Plasminogen activator inhibitor-1 ; FN1, fibronectin ; GO, Gene Ontology ; PPI, protein protein interaction. ;

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Rennes, la Ligue Nationale Contre le Cancer and the Région Bretagne.

Abstract:

Liver fibrosis is characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) leading to liver dysfunction. Proteomic approaches help to decipher ECM alterations during fibrosis progression. Using a standardized decellularization method, we performed proteomic analyses of 18 fibrotic human liver samples and identified 106 deregulated ECM proteins. Three members of the fibulin protein family (fibulin-2, -3, and -5) expressed by hepatic stellate cells were significantly associated with fibrosis progression. Integrative analyses of protein-protein interaction networks highlighted different functional annotations for these three fibulins. Gene silencing studies showed that unlike fibulin-2 (FBLN2), fibulin-3 (*EFEMP1*) depletion impaired focal adhesions, FAK phosphorylation, the fibronectin network, and cell migration. These findings are the first to demonstrate the critical involvement of fibulin-3 in the regulation of hepatic stellate cell focal adhesions and migration, emphasizing the intricate link between chronic liver disease progression and remodeling of the microenvironment.

Keywords: liver fibrosis, proteomics, fibulin, *EFEMP1*, focal adhesion, migration, hepatic stellate cell

INTRODUCTION

Most chronic liver diseases are associated with the development of fibrosis, of which cirrhosis is the end-stage and the main risk factor for hepatocellular carcinoma. Liver diseases, mainly caused by viral hepatitis B or C (HBV, HCV), alcohol consumption and non-alcoholic fatty liver (NAFLD), and cirrhosis is recognized as a major cause of morbidity worldwide [1,2]. Understanding and characterizing the fibrotic microenvironment has the potential to enable the identification of novel biomarkers and therapeutic targets, or methods to facilitate drug delivery.

Fibrosis is characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix (ECM), resulting in liver dysfunction. Hepatic stellate cells play a critical role in liver fibrosis as a main source of ECM and remodeling activity. The ECM is defined as a complex molecular network comprising collagen, glycoproteins, proteoglycans, all of which constitute the core of the matrisome that is complemented by ECM-associated proteins such as matrix remodeling regulators and growth factors [3,4]. The ECM is a dynamic structure with various compositions and mechanical properties, constituting a wide variety of cellular microenvironments that evolve over the course of development of liver fibrosis and with its etiologies. In recent years, proteomic approaches have been used to characterize the alteration of the ECM in chronic liver lesions. Analyses of fibrotic tissues from patients with viral hepatitis C have shown global alterations in the parenchymal proteome [5,6] while the microdissection of cirrhotic areas identified 24 proteins, including the cirrhosis-associated human microfibril-associated protein 4 (MFAP-4) [7].

Using a label-free discovery approach, Bracht et al [8] identified 60 proteins differentially up-regulated in a high fibrosis group of patients with HBV and HCV viral hepatitis. More recently, decellularization methods used to purify ECM scaffolds from fibrotic tissues have revealed protein signatures for the HCV-related liver fibrotic stages based on the differential detection of 47 proteins [6]. Similarly, Mazza et al [9] identified 51 proteins significantly enriched in cirrhotic ECM scaffolds (compared to healthy ECM) prepared from human liver tissues and Daneshgar et al identified 59 differentially expressed proteins in various fibrotic ECM scaffolds [10]. Decellularization and ECM-enrichment protocols have also been successfully applied to tissue samples from fibrosis-induced mice models to characterize ECM changes upon acute and chronic injuries [11–13]. Although instructive, these studies highlight the difficulties of obtaining a representative picture of the changes of the ECM composition during liver fibrosis, due to the diversity of samples and methods employed. Here we performed proteomic analyses of 18 human fibrotic liver samples using the standardized

decellularization procedure described by Naba et al [14] to extract ECM-enriched proteins. Among the deregulated proteins, we showed that the amounts of three members of the fibulin protein family (fibulin-2, -3 and -5) were associated with fibrosis progression. Furthermore, an Integrative analysis of protein-protein interaction networks revealed different functional annotations. Using an hepatic stellate cell line, we showed that gene silencing of *EFEMP1* (fibulin-3) but not *FBLN2* (fibulin-2) impaired focal adhesions, FAK phosphorylation and cell migration. Our data demonstrate the specific function of fibulin-3 in modulating hepatic stellate cell adhesion and migration.

RESULTS

Characterization of an ECM-enriched signature associated with fibrosis.

To characterize the matrisome in human liver fibrosis, we conducted an enrichment of extracellular matrix (ECM) proteins from human patient samples using the method previously described in [14]. Proteomic analyses identified 1131 proteins within 18 adjacent non tumor tissue samples from patients with hepatocellular carcinoma. Using the NABA_MATRISOME_GSEA gene set (1020 genes) we identified 198 proteins present in the matrisome, corresponding to 182 genes (supplementary Table 1). Among them, 16 exhibited differential expression across at least two fibrosis stages (supplementary Fig. 1). With the exception of COL5A3, these proteins have all been previously detected in healthy liver using a similar extraction protocol [15]. The protein levels were either decreased or increased between F1 and F4 fibrosis stages. Three collagen proteins, COL4A1, COL5A3, and COL18A1, were found to decrease, consistent with a previous study using decellularization approaches [6]. Although increased expression of type XVIII collagen has been previously associated with liver fibrosis [16,17], we observed its decrease with progression of fibrosis in the ECM-enriched preparations. Using a comparable ECM purification approach, Baiocchini *et al.* also reported a reduction in COL18A1 in F4 stage [6]. Conversely, a group of proteins comprising INHBE, LTBP4 and VWF were increased in F4 stage. Some proteins such as CTSB and LAMA4 showed a transient increase in F2 or F3 stages while FBN1 displayed a transient decrease in F3 samples. Remarkably, we observed an increase in the amounts of three members of the fibulin protein family, fibulin2, -3 and -5 which were associated with fibrosis progression (Fig. 1A). An accumulation of fibulin-5 protein levels was previously reported in HBV/HCV-associated hepatic fibrosis [8]. Additionally, increased mRNA expression of *FBLN5* and *EFEMP1* has recently been associated with liver fibrosis in patients with NAFLD [18,19]. Upon analyzing mRNA expression of *FBLN2*, *EFEMP1* and *FBLN5* in non-malignant tissue adjacent to tumor from patients with hepatocellular carcinoma (n=50), only *EFEMP1* mRNA expression was significantly increased in F4 compared to F1 samples (Fig. 1B).

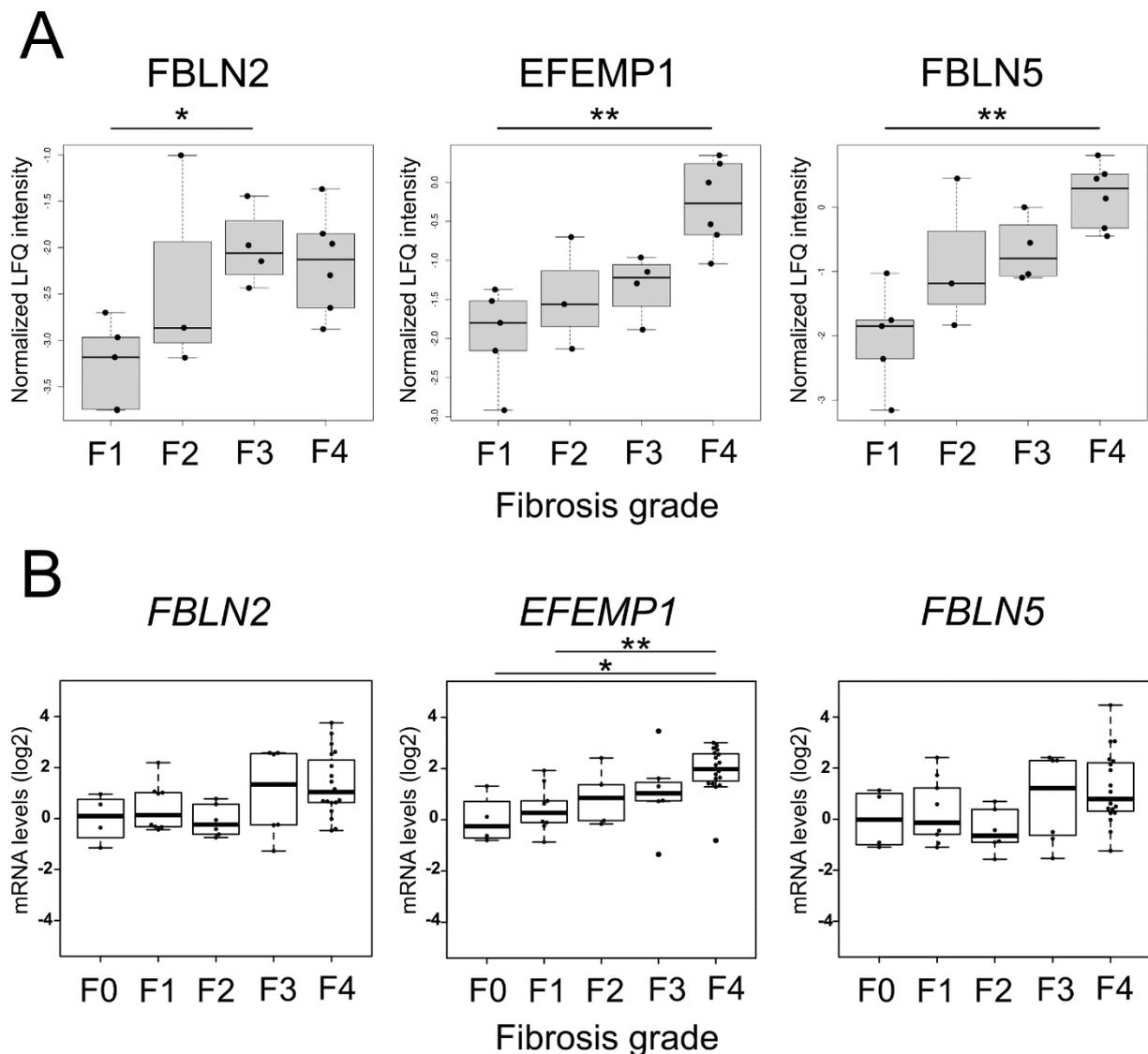


Figure 1. Expression of fibulins in human liver fibrosis.

(A) Relative levels of fibulin-2, -3 and -5 proteins in the ECM-enriched extracts from human liver tissues at various fibrotic stages: F1 (n=5), F2 (n=3), F3 (n=4), F4 (n=6). Extracellular matrix extraction was performed according to the standardized method of Naba [14] and extracts were analyzed by mass spectrometry. Statistical significances were calculated using a non-parametric Mann-Whitney test. (B) FBLN2, EFEMP1 and FBLN5 gene expression measured by RT-qPCR in human liver samples (n=50) at different fibrotic states: F0 (n=4), F1 (n=10), F2 (n=7), F3 (n=7), F4 (n=22)). Statistical differences were evaluated using a non-parametric Dunn test with an adjusted p-value. *p<0.05, **p<0.01.

Analysis of Protein-Protein Interactions suggests functional specificities for fibulin-2, -3 and -5.

To compare the potential functions of the three fibulins, we analyzed their protein partners using the Proteomics Standard Initiative Common Query Interface (PSICQUIC) webservice developed by the European Bioinformatics Institute [20]. As shown in supplementary information (Supplementary tables 2, 3 and 4), fibulin queries using gene names (*FBLN2*, *EFEMP1* and *FBLN5*) resulted in 104, 377 and 305 interactions, respectively. Manual curation was required to eliminate redundant annotations and to select unique human protein-protein interactions (PPIs). The final list contains 43, 129 and 158 proteins for *FBLN2*, *EFEMP1* and *FBLN5*, respectively. As shown in Fig. 2A and B, each fibulin is characterized by a specific PPI repertoire, with only 16 proteins being shared by all three fibulins. Among these 16 common proteins, 10 belong to the core matrisome. In addition to vitronectin (VTN), they comprise nine proteins contributing to the formation of elastic fibers involved in liver fibrosis [21] including five members of Microfibrillar Associated Proteins family (MFAP1, MFAP2, MFAP3, MFAP4, MFAP5), the two fibrillins (FBN1 and FBN2), Elastin (ELN) and Elastin Microfibril Interfacer EMILIN1. To further explore each PPI network, we analyzed the over-representation of biological_process Gene Ontology (GO) terms associated with the network proteins. Although the three protein networks shared general GO terms such as *extracellular matrix organization* (supplementary Fig. 2), clustering of ontologies using the affinity propagation method highlighted over-represented GO terms specific for each fibulin network (Fig. 2C): *elastic fiber assembly* for *FBLN5*, *collagen-activated tyrosine kinase receptor signaling pathway* for *FBLN2* and *response to endoplasmic reticulum stress* for *EFEMP1*. The critical role of *FBLN5* in elastic fiber development has been previously demonstrated [22] while *FBLN2* was associated with basement membrane stability [23,24] mediating cell adherence to collagen [25]. The association of *EFEMP1* PPI network with *response to endoplasmic reticulum stress* was accounted for by a set of proteins including ANXA5, DNAJC10, PDIA4, P4HB, RCN1, SDF2L1, and TXNDC5. These proteins have been previously identified in a screen based on overexpression of *EFEMP1* in the adenovirus-infected retinal pigment epithelium (RPE) cell line [26]. Since overexpression of ECM proteins is known to be associated with RE stress [27] due to the mobilization of quality control in secretory pathways [28], such a screen could therefore artificially over-represent interactions with specialized proteins involved in this quality control. Besides the GO term *response to endoplasmic reticulum stress*, our analysis revealed another interesting GO term that is *negative regulation of cell signaling and communication* suggesting specific functions for *EFEMP1* PPI network (Fig. 2C).

Together our data demonstrate that even if fibulin-2, -3 and -5 are closely associated with ECM organization, functional annotations of their respective PPI networks suggest they have different roles. In order to explore these functional differences, we first investigated the cellular source of these fibulins in the liver.

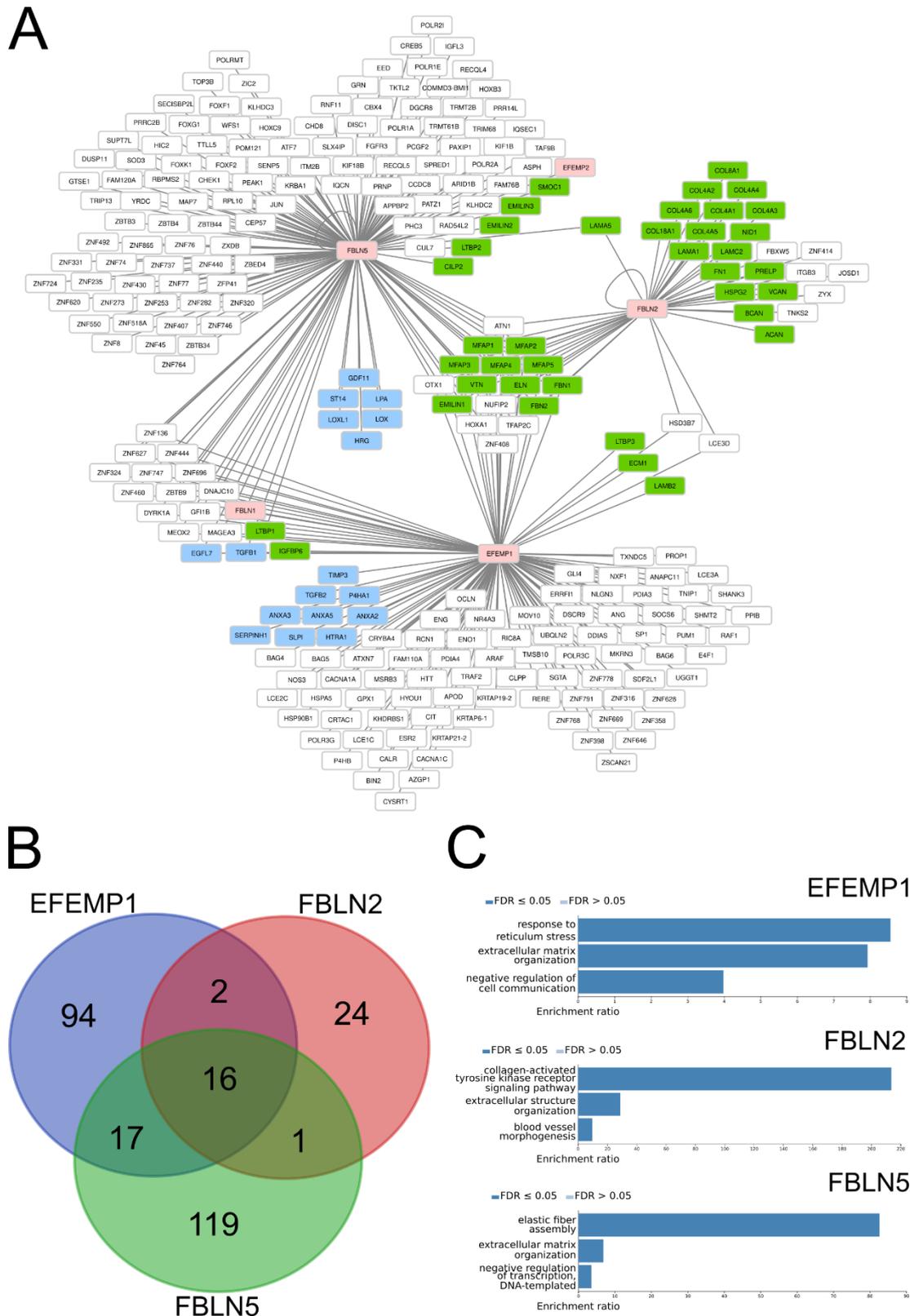


Figure 2. Comparative analysis of protein-protein interaction (PPI) networks of fibulin-2 (FBLN2), fibulin-3 (EFEMP1) and fibulin-5 (FBLN5).

(A) Graph representation of shared PPI networks for FBLN2, EFEMP1 and FBLN5 (pink nodes) using Cytoscape software. Proteins from the core matrisome are colored as green nodes and matrisome associated proteins as blue nodes. (B) Venn diagram of PPIs. (C) Over-representation analysis of biological processes using the WEB-based Gene Set Analysis Toolkit (we selected the affinity propagation tool that uses the R package apcluster to cluster gene sets).

***FBLN2*, *EFEMP1* and *FBLN5* are expressed in hepatic stellate cells.**

Taking advantage of single cell RNA-sequencing datasets from the liver Cell Atlas web site [29], we analyzed cellular sources of *FBLN2*, *EFEMP1* and *FBLN5* mRNA in the human liver. As shown in Fig. 3A, *FBLN2* and *FBLN5* mRNAs exhibit a broader distribution among liver cells compared to *EFEMP1*. *FBLN2* mRNA is mainly expressed by stromal and endothelial cells, but is also present in immune cells, particularly dendritic cells, cDC2 and macrophages. Similarly, *FBLN5* expression is mainly associated with stromal cells, however, it is also weakly present in endothelial cells. *FBLN5* is also expressed in the two major liver cell types hepatocytes and cholangiocytes (biliary epithelial cells) and in immune cells including Natural Killers (NK and NKT) and T cells. Like *FBLN5*, *EFEMP1* is also expressed by stromal cells and cholangiocytes, but it is not present in immune cells or endothelial cells. Collectively, *FBLN2*, *EFEMP1* and *FBLN5* transcripts are enriched in stromal cells containing hepatic stellate cells (HSCs). Due to the critical role of HSCs in liver fibrosis, we studied the expression of *FBLN2*, *EFEMP1* and *FBLN5* in primary cultures of human HSCs and in the human HSC cell line, LX-2. Compared to human hepatocytes, cultured human HSCs express higher levels of *FBLN2*, *EFEMP1* and *FBLN5* mRNA (Fig. 3B). Using LX-2 cells, we observed high levels of *FBLN2* and *EFEMP1* mRNA expression compared with *FBLN5* mRNA (Fig. 3C). When LX-2 cells were treated with TGF- β or IL-1 β , we observed a strong induction of *FBLN5* expression upon TGF- β stimulation and a marked decrease in *EFEMP1* expression upon IL-1 β stimulation, indicating differential regulation of the three fibulins in LX-2 cells (Fig. 3D). As controls, we confirmed that expression levels of *MMP9* and *COL1A2* were upregulated by IL-1 β and TGF- β , respectively, as previously described [30,31].

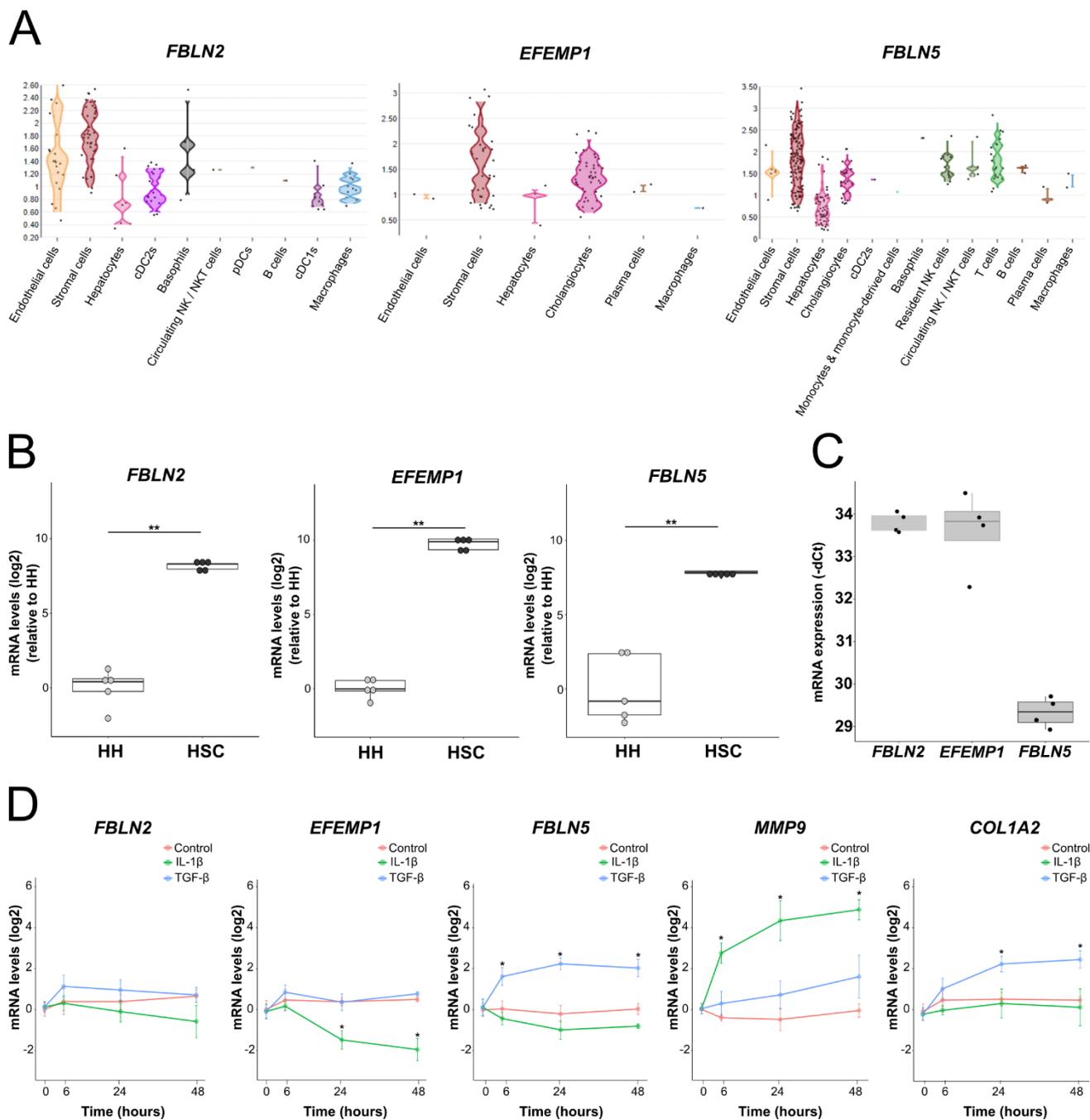


Figure 3. FBLN2, EFEMP1 and FBLN5 expression in hepatic stellate cells.

(A) Analysis of RNAseq data from the Liver Cell Atlas (<https://livercellatlas.org/>; [29]). Expression levels are represented as Log₂(Transcripts Per Million). (B) Fibulin gene expression measured by RT-qPCR in cultured primary human hepatocytes (HH) and hepatic stellate cells (HSC) (n=5), (C) Gene expression of fibulins measured by RT-qPCR in the human HSC cell line, LX-2 (n=4), and (D) Gene expression of fibulins measured by RT-qPCR in cultured LX-2 cells stimulated with TGF-β (5 ng/ml) or IL-1β (5 ng/ml) compared to untreated cells (Control) (n=4). Results are expressed as the mean of five (B) or four (C) independent experiments. Statistical differences were evaluated using a non-parametric Mann-Whitney test. *p<0.05, **p<0.01.

Silencing of *EFEMP1* does not affect TGF- β response in hepatic stellate cells.

Among GO terms associated with *EFEMP1* PPI networks (Supplementary Fig. 2), we identified *negative regulation of cell signaling*. Consistently, the negative effect of fibulin-3 on TGF- β signaling has been previously reported through inhibition of its interaction with TGF- β receptor 1 (TGFBR1) [32,33]. Of note, TGFBR1 was not identified as a member of the *EFEMP1* PPI network using PSICQUIC, suggesting that the databases are incomplete (Supplementary Table 3). Due to the critical role of TGF- β in liver fibrosis, we analyzed the effect of *EFEMP1* knock-down on the cell response to TGF- β and compared results to those of *FBLN2* knockdown. From three different siRNAs, we selected si*EFEMP1* number 2 as the most efficient and specific on *EFEMP1* expression (Supplementary Fig. 3). As shown in Fig. 4, transfection of si*EFEMP1* and si*FBLN2* in LX-2 cells reduced protein amounts of fibulin-3 and fibulin-2, respectively. Despite efficient depletion of both *FBLN2* and *EFEMP1* mRNAs by their corresponding siRNAs (Supplementary Fig. 3) the lesser effect of fibulin-3 reduction at the protein level could possibly be due to greater stability of the protein.

To analyze the effect of *EFEMP1* silencing on the cellular response to TGF- β , we measured the expression of TGF- β -targeted genes including *FBLN5* and *PAI1*. As shown in Fig. 5A, after 96h of *EFEMP1* and *FBLN2* silencing in LX-2 cells, the induction of TGF- β responsive genes was not affected. Consistent with this absence of effect of *EFEMP1* and *FBLN2* silencing on the induction of TGF- β -dependent gene expression, we observed no changes in activation of TGF- β -dependent signaling pathways. Specifically, phosphorylation of SMAD2 and SMAD3 (Fig. 5B) induced by TGF- β stimulation were unchanged in silenced cells compared to controls, suggesting that SMAD-dependent TGF- β signaling pathways were unaffected.

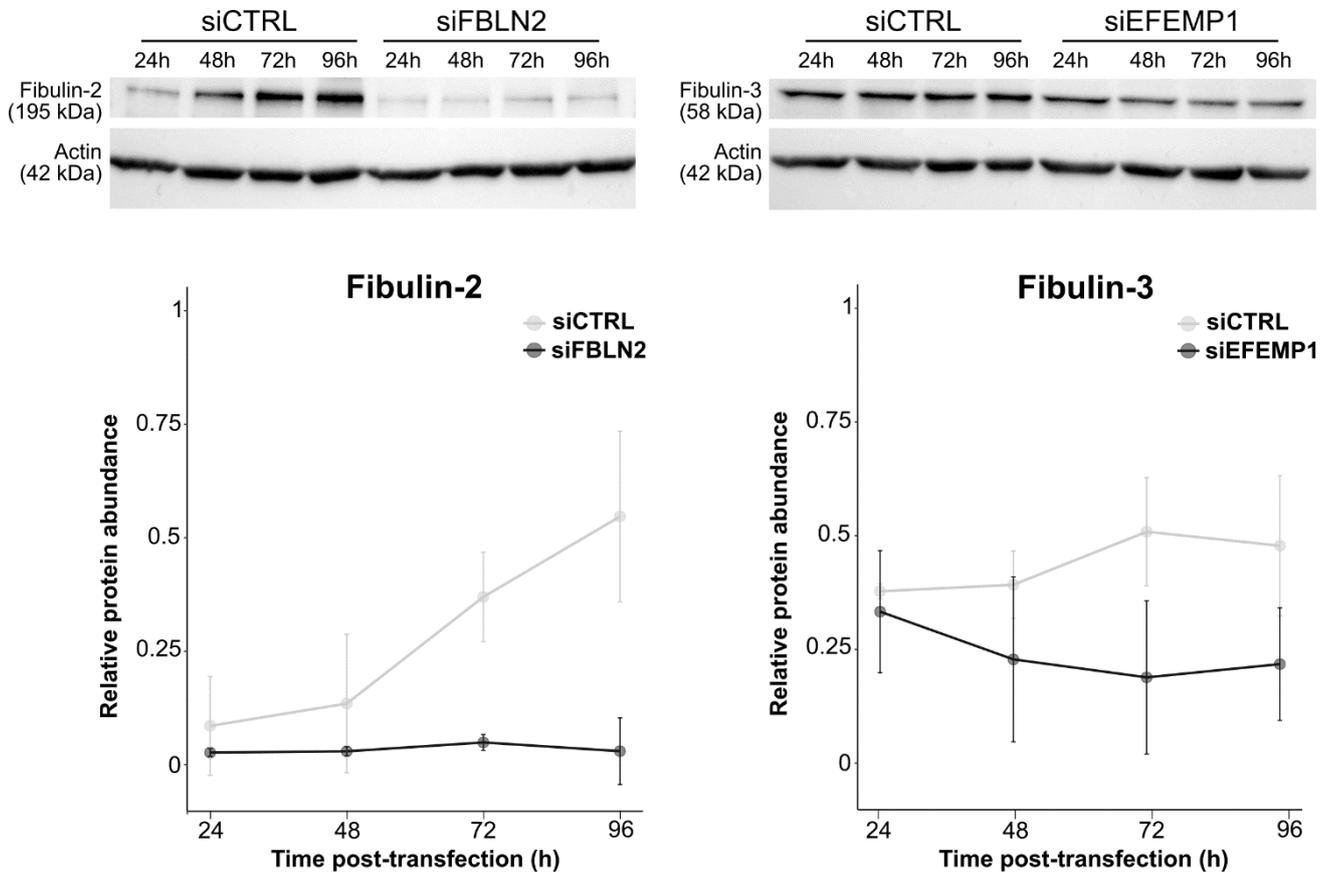


Figure 4. Silencing of FBLN2 and EFEMP1 in LX-2 cells.

LX-2 cells were transfected with a control siRNA (siCTRL), or an siRNA against EFEMP1 (siEFEMP1) or FBLN2 (siFBLN2) for the indicated times (24h to 96h). The efficiency of RNA interference was measured by western blotting. Results are expressed as the mean of three independent experiments.

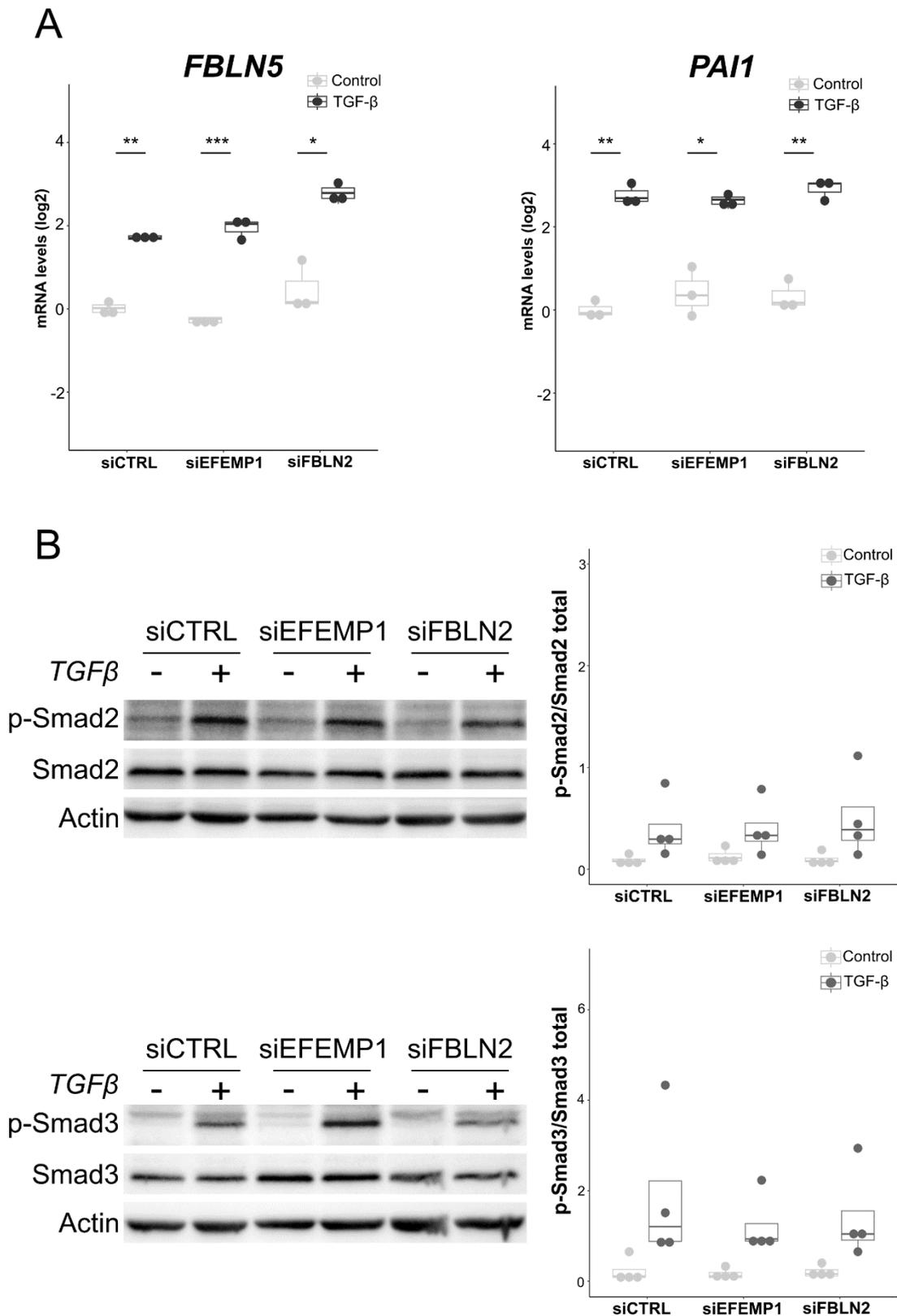


Figure 5. Silencing of EFEMP1 does not affect TGF- β dependent cell signaling in LX-2 cells.

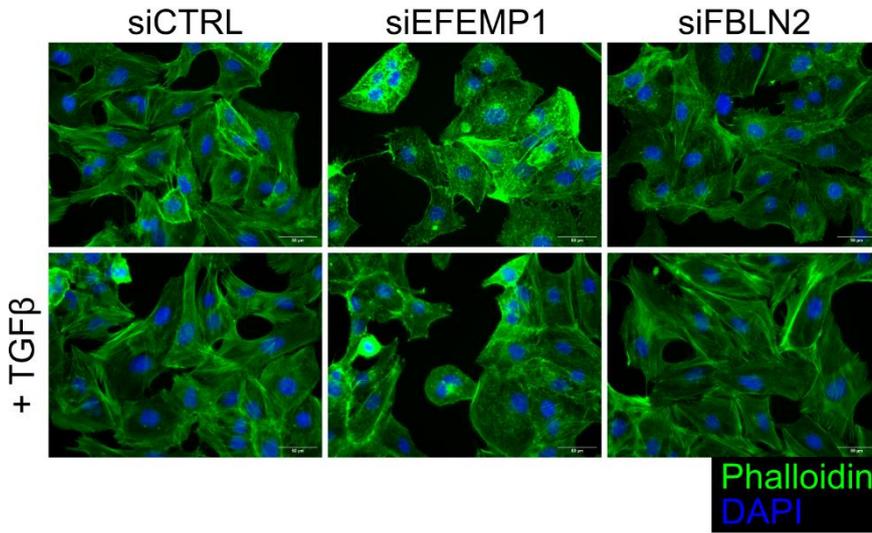
(A) Expression levels of TGF- β -dependent genes were measured by RT-qPCR in LX-2 cells transfected with the indicated siRNAs and treated or not with TGF- β (5ng/ml) for 16h (n=3). (B) Analysis of TGF- β -induced SMAD activation by Western blot, after 16 hours of stimulation (n=4). Results are expressed as the mean of three (A) or four (B) independent experiments and statistical differences were evaluated using a parametric paired t-test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Silencing of *EFEMP1* but not *FBLN2* induces a default in the organization of stress fibers.

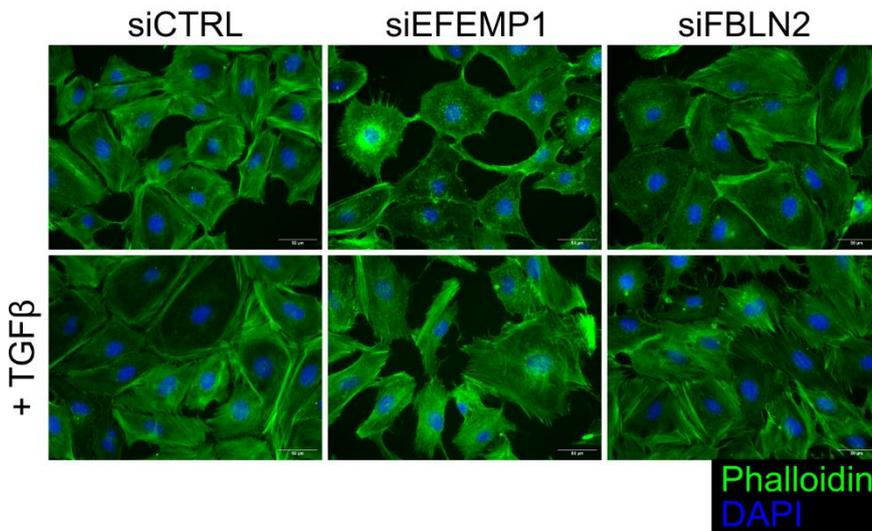
EFEMP1-silenced cells cultured for 96h, displayed progressive changes in their phenotype compared to control cells (supplementary Fig. 4). In addition, staining of F-actin using phalloidin showed that the organization of actin filaments was dramatically altered in *EFEMP1* silenced cells while *FBLN2*-silenced cells were less affected (Fig. 6A). Stress fibers exert direct mechanical tensions on the nuclei [34–36] and measurement of nuclear projected areas can be used to assess the effects of actin disorganization on stress fiber tension. TGF- β treatment is known to induce stress fibers which can be appreciated by phalloidin staining (Fig. 6A) and by quantification of nucleus projected areas (Fig. 6B). Nuclei areas were markedly reduced in *EFEMP1*-silenced cells regardless of the nature of the surface on which the cells were cultured (plastic or collagen-coated dishes) while we observed no significant changes in *FBLN2*-silenced cells. Importantly, nuclear areas were increased by TGF- β treatment in both control and silenced cells, in line with the observation that the response to TGF- β per se was not affected by *EFEMP1* or *FBLN2* silencing in LX-2 cells (Fig. 5). Of note, the effect of TGF- β on nuclear sizes was more marked when cells were cultured on collagen-coated surfaces (Figure 6B, lower panel). As a control, we checked that the total DNA content was not affected indicating that the changes in nuclei projected areas reflected mainly changes in nuclear shape (supplementary Fig. 5). Together these results demonstrate that *EFEMP1* silencing reduces tensions exerted by the actin cytoskeleton on the nuclei.

A

Plastic



Collagen



B

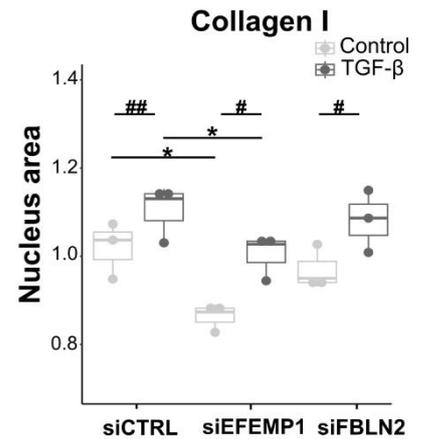
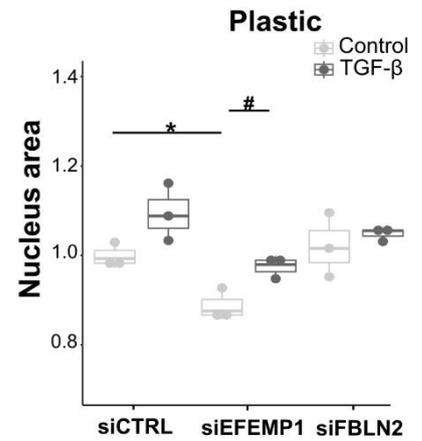


Figure 6. Silencing of EFEMP1, but not FBLN2, impairs the organization of stress fibers.

LX-2 cells transfected with the indicated siRNAs, and treated or not with TGF-β (5ng/ml for 16h) were cultured on uncoated (plastic) or type I collagen (Collagen I) coated plates. (A) After 96h of culture, cells were fixed and stained with phalloidin-Alexa-Fluor-488 for F-actin detection. Nuclei were counterstained with Hoechst-33342. Representative fields of three independent experiments are shown. (B) Average projected areas of nuclei from three independent experiments were measured and used to compare nuclear sizes. Statistical significances were evaluated using a parametric paired t-test, * $p < 0.05$; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$.

Silencing of *EFEMP1* and *FBLN2* differentially affects focal adhesions, FAK phosphorylation and cell migration.

Given the functional link between stress fibers and focal adhesions [37], we investigated whether the observed disorganization of the actin network in *EFEMP1*-silenced cells was associated with changes in the organization of focal adhesions. To this end, we performed immunostaining of the focal adhesion component paxillin in LX-2 cells. As shown in Fig. 7A, the number of paxillin-positive foci per cell was lower in *EFEMP1*-silenced cells when compared with control cells. By contrast, we observed an increase in the number of paxillin-positive focal adhesions in *FBLN2*-silenced cells. In line with these observations, phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (FAK) was diminished in *EFEMP1*-silenced cells compared with control and *FBLN2*-silenced cells (Fig. 7B). In addition we observed that TGF- β treatment induced FAK phosphorylation in both *EFEMP1*- and *FBLN2*-silenced cells in line with the known effect of TGF- β on FAK activation in HSCs [38].

Focal adhesions are involved in both cell adhesion and migration [39]. Using xCELLigence real-time cell analysis, we showed that *EFEMP1* silencing did not affect the early stages of cell spreading and attachment, whereas the impedance signal was significantly higher at 6 hours after seeding of *FBLN2*-silenced cells when compared with control cells (supplementary Fig. 6). Consistent with the role of focal adhesions and FAK signaling in cell migration, we further observed a decrease in migration of *EFEMP1*-silenced cells compared with control and *FBLN2*-silenced cells (Fig. 7C). Finally, using real-time live-cell imaging, we found that cell proliferation was not affected by either *EFEMP1* or *FBLN2* siRNA (supplementary Fig. 7).

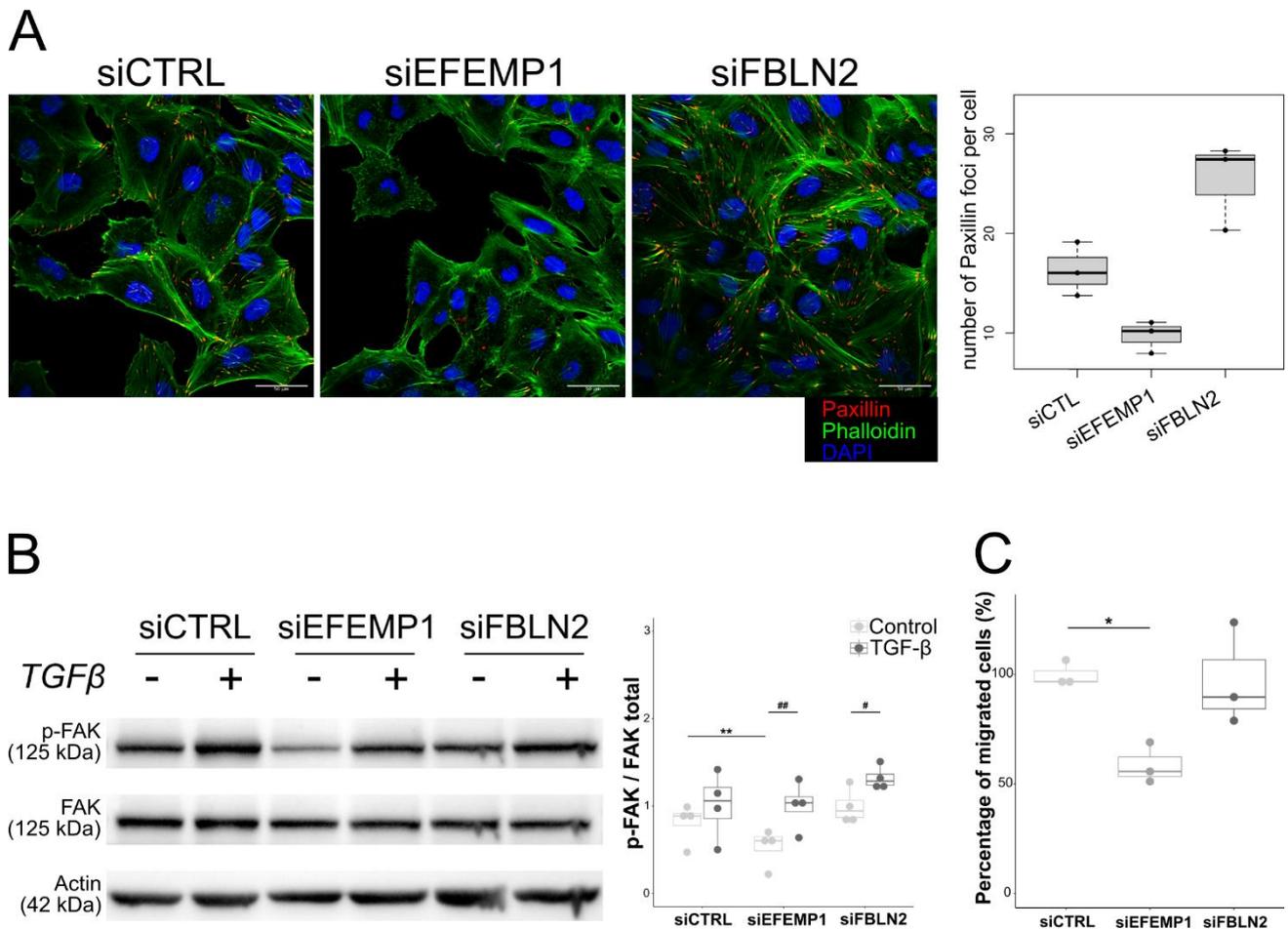


Figure 7. Silencing of EFEMP1 and FBLN2 differentially affects focal adhesion, FAK phosphorylation and cell migration.

(A) LX-2 cells transfected with the indicated siRNA were cultured on uncoated (plastic) plates. After 96h of culture, cells were fixed and immunostained with anti-Paxillin. F-actin was stained using phalloidin-Alexa-Fluor-488 and nuclei were counterstained with Hoechst-33342 (n=3). Average numbers of Paxillin-positive foci per cell were scored from at least 5 representative fields per experiment. Representative fields of one of three independent experiments are shown. Scale bar: 50 μ m. (B) FAK phosphorylation (relative to total FAK protein) was measured by Western blot in control or silenced cells treated or not by TGF- β (5ng/ml) for 16h (n=4). Results are expressed as the mean of four independent experiments and statistical differences were evaluated using a parametric paired t-test. (C) Migration was measured using a transwell assay. Cells that have migrated are shown as a percentage relative to siCTRL cells. Statistical significances were evaluated using a non-parametric Mann-Whitney test. *p<0.05, **p<0.01, #p<0.05 and ##p<0.01.

Silencing of *EFEMP1* modulates fibronectin network integrity.

FAK activation plays an essential role in cell migration mediated by $\beta 1$ integrin signaling [40,41] and previous studies evidenced reciprocal cross-talk between spatial distribution of focal adhesions and fibronectin organization, mediated by $\beta 1$ integrin [42]. We therefore studied the behavior of both integrin $\beta 1$ and fibronectin in *EFEMP1*-silenced cells.

Neither *ITGB1* mRNA levels nor immunostaining for integrin $\beta 1$ were altered in *EFEMP1*-silenced cells compared with control cells (data not shown). However, we observed significant changes in the organization of the fibronectin network at the cell surface of *EFEMP1*-silenced cells (Fig. 8A) consistent with the known role of FAK in fibronectin (*FN1*) matrix allocation and organization [43]. Compared to control cells and *FBLN2*-silenced cells, both the length (Fig. 8B) and number (Fig. 8C) of fibronectin fibers were decreased in *EFEMP1*-silenced cells. Since the cells were cultured on uncoated plastic dishes, these changes can be attributed to fibronectin produced by the LX-2-cells. We therefore analyzed *FN1* mRNA expression and found no significant alteration in *FN1* expression in both *EFEMP1*- and *FBLN2*-silenced cells (supplementary Fig. 8) suggesting that fibronectin deposition and/or organization, rather than expression, was impaired in *EFEMP1*-silenced cells.

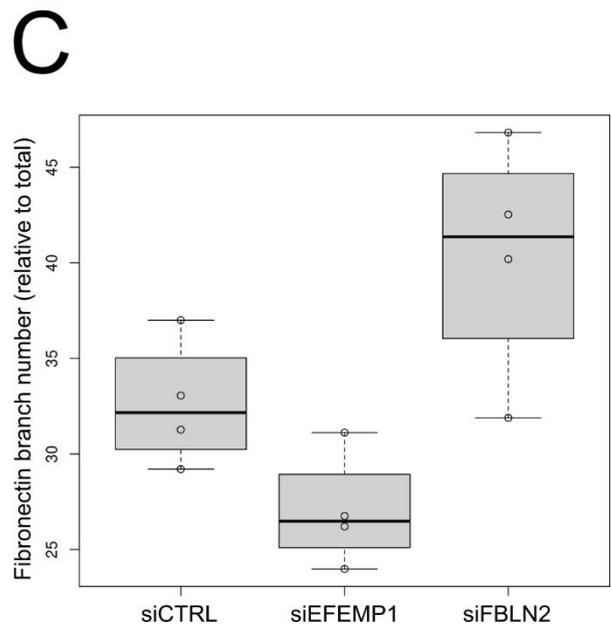
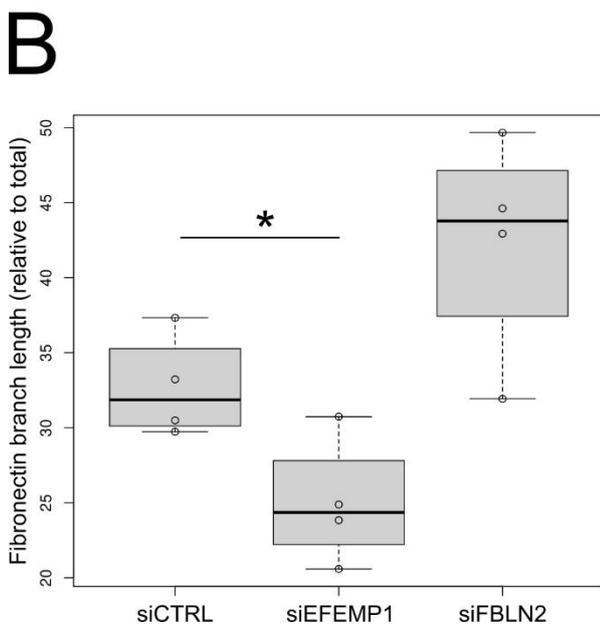
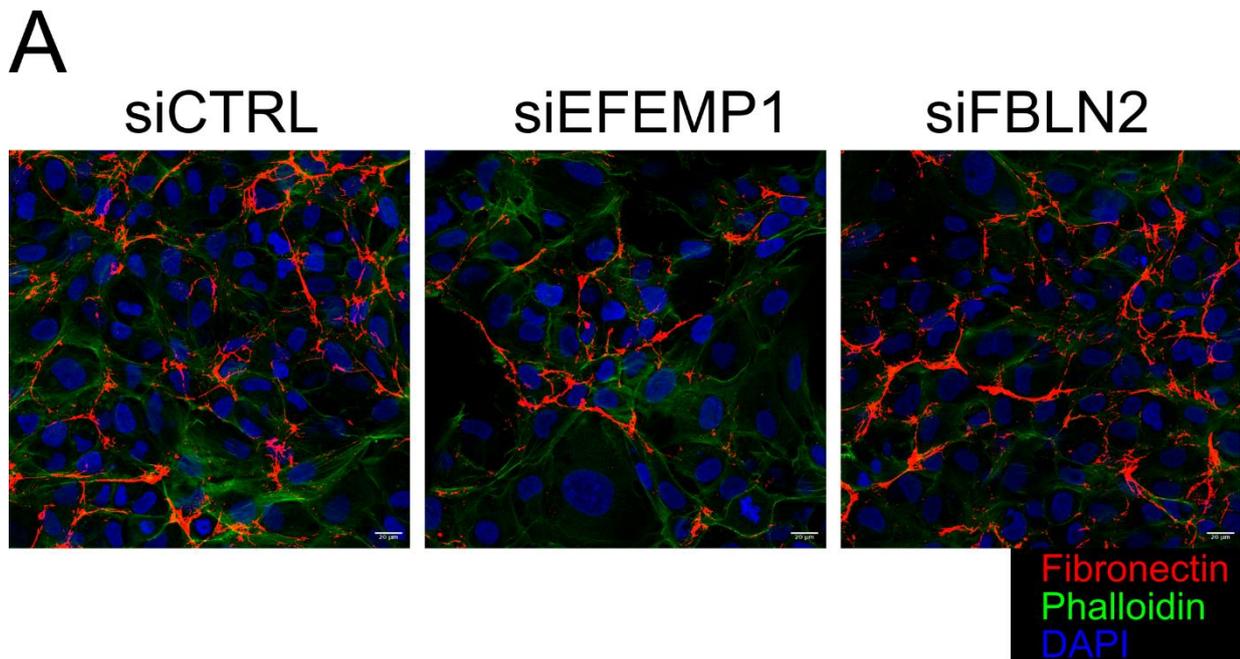


Figure 8. Fibulin-3 silencing alters the integrity of the fibronectin network.

LX-2 cells transfected with the indicated siRNAs were cultured on uncoated (plastic) plates. (A) After 96h of culture, cells were fixed and immunostained with an anti-Fibronectin antibody. Actin fibers were stained using phalloidin-Alexa-Fluor-488 and nuclei with Hoechst-33342. Fields representative of three independent experiments are shown. Scale bar: 20 μ m. Average length (B) and number (C) of fibronectin fibers were calculated from at least 10 representative fields per experiment. Statistical significances were evaluated using a parametric paired t-test for branch lengths and a non-parametric Mann-Whitney test for branch numbers. * $p < 0.05$.

DISCUSSION

As described by A. Naba in a recent review, proteomic analyses of the extracellular matrix face a number of challenges, mainly related to the biochemical properties of its components and their complex assembly [44]. Although there are commonalities between ECM enrichment by sequential purification and decellularization protocols, each of these approaches results in slightly different proteomic profiles, which may also vary with the biological samples analyzed [45]. In the present study, we used the enrichment protocol developed by Naba et al [14], which has previously been used for human liver samples [15] and has proven to be more appropriate for studying the liver matrisome [45]. In line with this, our results show partial overlap with previous liver fibrosis proteomes. We have identified three members of the fibulin family of proteins that have previously been reported in proteomic analyses of liver fibrosis. Based on decellularized methods, increased amounts of fibulin-2, -3 and -5 were reported in human cirrhotic structures compared to healthy scaffolds [9] and fibulin-3 and -5 were increased in advanced liver fibrosis from patients with HCV [6]. Of note a label-free proteomics discovery study identified an association of fibulin-5 with liver fibrosis in biopsied tissue samples from patients with hepatitis B or C [8]. Whatever the experimental approach, these three fibulins have commonly been identified as markers of fibrosis but their role in liver fibrosis is poorly documented. Fibulin-2 was initially identified as a marker of portal myofibroblasts [46,47]. However, a recent study identified a new sub-population of highly profibrotic and proinflammatory HSC that strongly express *Fbln2* in an alcoholic hepatitis mice model [48] suggesting that fibulin-2 is involved in both portal and sinusoidal fibrosis. Through binding to elastin, fibulin-5 has been shown to be a major regulator of elastic fiber assembly [22] and to contribute to the deposition of elastic fibers in cirrhotic liver [21]. Fibulin 3 was recently identified as a seric marker of fibrosis in the context of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease [49]. Unlike fibulin-2 and fibulin-5, fibulin-3 does not interact with basement membrane components such as type IV collagen or tropoelastin [50] and our own analysis of PPI networks clearly demonstrates that fibulin-3 is involved in different biological processes (Fig. 2). In chronic liver diseases, *EFEMP1* overexpression was shown to inhibit the growth and migration of hepatocellular carcinoma cells [51,52], however, the role of fibulin-3 in liver fibrosis was never explored.

In the present work, we showed that fibulin-3 plays a critical role in HSC migration and adhesion signaling, thereby contributing to regulate HSC functions. Unlike *FBLN2*-silenced cells, *EFEMP1*-silenced cells exhibited a default in stress fiber maturation associated with the loss of focal adhesions.

Cells are known to use their focal adhesions to apply traction forces on the ECM and migrate [53]. Consistent with this, we also observed a decrease in migration of *EFEMP1*-silenced cells. Interestingly, silencing of fibulin-3 did not affect the early step of cell spreading suggesting compensation by other adhesion systems. Immunofluorescence experiments demonstrated that silencing *EFEMP1* in LX-2 cells altered the fibronectin network at the cell surface suggesting that fibulin-3 is involved in stabilization of the fibronectin network and interactions with the cell-matrix.

Consistent with an implication in the organization of the matrix network, depletion of *EFEMP1* expression has been shown to reduce formation of collagen VI filaments in retinal pigmented epithelial cells [54], and *Efemp1* null mice subjected to myocardial infarction exhibit less collagen deposition post-injury, associated with abnormal collagen fiber-alignment [55]. Overexpression of *EFEMP1* in trabecular meshwork cells disturbs the fibronectin network at the cell surface, affecting their morphology by reducing intracellular actin stress fibers formation [56]. As suggested by Livingstone et al. [57], influence of fibulin-3 on fibrillar matrix integrity might be indirect, through interaction with other molecules such as TIMP-3 [58]. Of note, overexpression of *EFEMP1* in endothelial cells is associated with both an increase in expression of TIMP-3 and an inhibition of metalloprotease activities, leading to an alteration of matrix integrity and cell migration [59]. We also analyzed *TIMP-3* expression in LX-2 cells after siRNA transfection and observed decreased TIMP-3 mRNA levels in *EFEMP1*-silenced cells compared to control and *FBLN2*-silenced cells (Supplementary Fig. 8), suggesting a role for fibulin-3 in the control of fibronectin remodeling through the regulation of proteases.

In conclusion, our proteomic analysis, in line with previous studies, confirmed an association of fibulin-2, -3 and -5 with liver fibrosis. While the functional role of fibulin-3 in liver fibrosis has remained unclear, our study is the first to demonstrate its impact on focal adhesion dynamics in hepatic stellate cells, impairing interactions with the cell-matrix through alteration and modulation of ECM networks. This interaction crucial for cell adhesion and motility, thereby, highlighting a new dimension of fibulin-3's role in liver fibrosis.

MATERIALS & METHODS

Human Samples

Fifty non-tumor liver samples were taken from patients who had undergone hepatectomy for hepatocellular carcinoma (HCC), 18 of which were used for proteomic analyses. (Supplementary Table 5). Histological stages of fibrosis were graded according to the METAVIR score: F1, portal fibrosis without septa; F2, portal fibrosis with rare septa; F3, numerous septa without cirrhosis; and F4, cirrhosis. All tissue sections were routinely analyzed after staining with hematoxylin-eosin-saffron and Sirius red. Liver samples were from the Biological Resources Center (BRC) at Rennes University Hospital. Access to this material was in agreement with French laws and satisfied the requirements of the local Ethics Committee.

Proteomic analyses of ECM from human fibrotic tissue samples

Tissue preparation and ECM protein enrichment were performed as previously described [55]. Briefly, tissue samples (stages F1 to F4) were mechanically homogenized and extracted sequentially using Naba's protocol [14]. Protein digestion and mass spectrometry analyses were performed by the Proteomics Platform of the CHU de Québec Research Center (Quebec, Qc, Canada) using LC-MS/MS on Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific). Mass spectra were interpreted with MaxQuant/Andromeda and MS/MS spectra were searched against the UniprotKB Homo sapiens (CP_Homo-Sapiens) database with fixed modification: carbamidomethyl(C), variable modifications: oxidation (M), oxidation (K), oxidation (P). Peptide identifications were filtered at 1% false discovery rate.

Protein-Protein Interaction networks

Gene symbols for each fibulin were used to query molecular interaction databases using the Proteomics Standard Initiative Common QUery InterfaCe (PSICQUIC) [20]. This specification was created by the Human Proteome Organization Proteomics Standards Initiative (HUPO-PSI) to standardize the access to molecular interaction databases [56]. In this study, queries were performed on February 22, 2024 and raw data are provided as supplementary tables 2, 3 and 4.

Cell culture

Primary human hepatocytes (HH) and HSCs were obtained after isolation from histologically normal regions of partial hepatectomies from patients undergoing hepatic resection for liver metastases as previously described [66]. HH and HSCs were cultured in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose, pyruvate, glutamine, penicillin (100 IU/mL)-streptomycin (100 mg/mL) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza). The LX-2 cell line was maintained in DMEM with 4.5 g/L glucose, pyruvate, glutamine, penicillin (100IU/mL)-streptomycin (100mg/mL) and 10% FBS (Eurobio). When indicated, cells were treated with IL-1 β (5 ng/mL) or TGF- β (5 ng/mL) for the indicated durations in media containing 2% FBS.

Immunofluorescence

For F-actin staining, LX-2 cells were seeded in 12-well plates Collagen I coated or uncoated (plastic surface) 24h after siRNA transfection and cultured for another 72 hours. Transfected cells were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde followed by permeabilization with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min and washed three times in PBS. F-actin was stained using phalloidin coupled with Alexa-488 (1/40; #8878, Cell Signaling). Fixed cells were counterstained with Hoechst-33342 and observed under epifluorescence microscopy. Images were obtained using a Zeiss Axio Vert A1 microscope and were analyzed with ImageJ/Fiji software. For nuclear size analysis, regions of interest (ROIs) corresponding to the projected areas of nuclei (Hoechst signal) were defined by automatic thresholding. For each ROI and channel, area, average signal value and integrated signal value were collected. Analyses of measurement tables were performed in R.

For other immunostainings, LX-2 cells were seeded in μ -slide 8 well IbiTreat (#80806, Ibidi) 24h after siRNA transfection and cultured for another 72 hours. Transfected cells were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde and washed three times in PBS. For Paxillin detection, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min. Fixed cells were incubated for 2h at room temperature in PBS containing 1% BSA followed by overnight incubation at 4°C with primary antibody anti-Paxillin (1/100; Mouse; #612405, BD Transduction Laboratories), anti-Fibronectin (1/40; Rabbit; #PA5-29578, Invitrogen), or anti-Integrin β 1 (1/25; Mouse; #sc-13590, Santa Cruz Biotechnology) diluted in PBS-1% BSA. Bound antibodies were detected with a secondary Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (1/100; #715-165-150, Jackson ImmunoResearch) or donkey anti-rabbit IgG antibody (1/100, #711-165-152, Jackson ImmunoResearch). Images were obtained using a TCS SP8 confocal microscope (Leica) with the Leica Application Suite Advanced Fluorescence and analyzed with

ImageJ/Fiji software. Quantification of the number and size of fibronectin length was done as previously described [60].

Focal Adhesion analysis

Focal adhesions were detected based on Paxillin immunostaining and imaged with a SP8 confocal microscope (Leica). Image analyses were performed with ImageJ/Fiji software. Optical slices containing paxillin signals were Z-projected and summed, then thresholded using the Otsu algorithm. Particles larger than $1 \mu\text{m}^2$ were considered as Paxillin foci and counted with respect to the number of nuclei (objects greater than $100 \mu\text{m}^2$ in the DAPI channel).

Gene silencing by RNA-interference

siRNA transfections were performed with Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. LX-2 cells were transfected with *EFEMP1*, *FBLN2* or control siRNAs for the indicated times. The following siRNAs (Eurogentec) sequences were used:

siEFEMP1 si1 (sense): GUGUGUCAACCACUAUGGAdTdT

siEFEMP1 si2 (sense): GGAAACACAACCAGCAGAAAdTdT

siEFEMP1 si3 (sense): GACAUUGAUGAAUGCAGAAAdTdT

siFBLN2 (sense): GAGUUUCAGAGGCAGAGAUdTdT

siCTRL (negative control): Eurogentec reference SR-CL000-005

After validation, siEFEMP1 si2 was selected for *EFEMP1* knockdown experiments.

RNA isolation and real-time quantitative PCR

Total RNA of liver samples and cultured cells was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNAs were obtained by reverse transcription from $1 \mu\text{g}$ of total RNA using High-Capacity the cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) and quantified by real-time quantitative PCR using the Power-SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Transcript abundance was normalized using the GAPDH reference gene. Primer sequences used are described in supplementary Table 6.

Western blotting

Proteins were extracted from cultured cells using RIPA lysis buffer (Tris pH8.0, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton, 0.5%NaDOC, 0.1%SDS) supplemented with a mix of protease inhibitors including AEBSF (30827-99-7, Sigma-Aldrich), PIC (05056489001, Roche) and anti-phosphatase (PhosSTOP,

04906837001, Roche). Cell lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred on nitrocellulose membrane (GE Healthcare, UK). Membranes were blocked by incubation in Tris-Buffered Saline (TBS) buffer containing 0.1% Tween-20 and 5% non-fat dry milk or 1% Bovine Serum Albumin (BSA) and further incubated overnight at 4°C with the primary antibodies described in supplementary Table 7. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated-mouse (P0447, Dako) or -rabbit (P0448, Dako) IgG and revealed with the Clarity Western ECL Substrate Kit (Biorad). Protein amounts were normalized with actin. Quantification and analyses were performed using ImageJ/Fiji software and R.

Cell proliferation assay

Analysis of live cell proliferation was performed using the IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (Sartorius). Transfected LX-2 cells were seeded at a density of 4×10^3 cells/well in 96-well plates 24h after siRNA transfection. After 6h of incubation, culture media was replaced with fresh medium containing Nuclight Rapid Red Dye diluted at 1/1000 (NRR; 4717, Sartorius) and plates were analyzed. Live cell proliferation was visualized every 4h for 72h using a 10x objective. Using the IncuCyte S3 Live-Cell analysis system software, cells were counted based on NRR staining and a proliferation index was calculated by dividing the cell number at each time point with the cell number at the beginning of the time course for each condition.

Migration assay

80h after siRNA transfection, cells were cultured for 16h in low serum (2%)-containing medium. Next, 8×10^4 transfected LX-2 cells were added in the top compartment of Boyden chambers in low serum (2%)-containing medium. The bottom compartment was filled with complete growth medium (10% FBS). Cells were allowed to migrate for 6h at 37°C. To quantify migration, cells were mechanically removed from the upper side of the membrane using a cotton swab, and migrating cells on the lower side were fixed with 70% ethanol and stained with Hoechst-33342. Images were obtained using a TCS SP8 confocal microscope (Leica) and visualized and five representative pictures were taken for each insert. Each experiment was performed in duplicate.

xCELLigence assay

Cell spreading analysis was performed using the real-time cell analysis (RTCA) xCELLigence instrument (ACEA Biosciences). 96h after siRNA transfection, LX-2 cells were seeded at a density of

2×10^4 cells/well in a 16-well E-Plate (Agilent) Measures of Cell Index (CI) were realized every 5 minutes over a period of 6h. CI values were normalized to the mean of CI values of siCTRL cells at 6h.

Statistical analyses

Statistical analyses and graphs were performed using R. Statistical significances between groups were assessed by non-parametric or parametric tests as indicated in figure legends.

Acknowledgments: The authors thank the Centre de Ressources Biologiques de Rennes (CHRU Pontchaillou) for providing human tissue samples, and Dr Bruno Turlin for clinical pathology analyses. Histopathological analyses were performed at the HistoPathology of High Precision facility (H2P2) and cell analyses at the Imaging for Analysis of Cell Content facility (ImPACCell), hosted at UMS Biosit (Inserm UMS 018, CNRS UMS3480). The authors thank Dr Alexandra Naba for fruitful discussion and Dr Catherine Lavau (Inserm U1085, University of Rennes) for proofreading the manuscript.

BIBLIOGRAPHY

- [1] H. Devarbhavi, S.K. Asrani, J.P. Arab, Y.A. Narthey, E. Pose, P.S. Kamath, Global burden of liver disease: 2023 update, *J Hepatol* 79 (2023) 516–537. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.017>.
- [2] GBD 2017 Cirrhosis Collaborators, The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017, *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5 (2020) 245–266. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30349-8](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30349-8).
- [3] A. Naba, K.R. Clauser, S. Hoersch, H. Liu, S.A. Carr, R.O. Hynes, The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices, *Mol Cell Proteomics* 11 (2012) M111.014647. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>.
- [4] R.O. Hynes, A. Naba, Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (2012) a004903–a004903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>.
- [5] D.L. Diamond, J.M. Jacobs, B. Paeper, S.C. Proll, M.A. Gritsenko, R.L. Carithers, A.M. Larson, M.M. Yeh, D.G. Camp, R.D. Smith, M.G. Katze, Proteomic profiling of human liver biopsies: hepatitis C virus-induced fibrosis and mitochondrial dysfunction, *Hepatology* 46 (2007) 649–657. <https://doi.org/10.1002/hep.21751>.
- [6] A. Baiocchi, C. Montaldo, A. Conigliaro, A. Grimaldi, V. Correani, F. Mura, F. Ciccocanti, N. Rotiroti, A. Brenna, M. Montalbano, G. D’Offizi, M.R. Capobianchi, R. Alessandro, M. Piacentini, M.E. Schininà, B. Maras, F. Del Nonno, M. Tripodi, C. Mancone, Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution, *PLoS One* 11 (2016) e0151736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151736>.
- [7] C. Möllegen, B. Sitek, C. Henkel, G. Poschmann, B. Sipos, S. Wiese, B. Warscheid, C. Broelsch, M. Reiser, S.L. Friedman, I. Tornøe, A. Schlosser, G. Klöppel, W. Schmiegel, H.E. Meyer, U. Holmskov, K. Stühler, Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis, *Hepatology* 49 (2009) 1257–1266. <https://doi.org/10.1002/hep.22764>.
- [8] T. Bracht, V. Schweinsberg, M. Trippler, M. Kohl, M. Ahrens, J. Padden, W. Naboulsi, K. Barkovits, D.A. Megger, M. Eisenacher, C.H. Borchers, J.F. Schlaak, A.-C. Hoffmann, F. Weber, H.A. Baba, H.E. Meyer, B. Sitek, Analysis of disease-associated protein expression using quantitative proteomics—fibulin-5 is expressed in association with hepatic fibrosis, *J Proteome Res* 14 (2015) 2278–2286. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00053>.
- [9] G. Mazza, A. Telese, W. Al-Akkad, L. Frenguelli, A. Levi, M. Marrali, L. Longato, K. Thanapirom, M.G. Vilia, B. Lombardi, C. Crowley, M. Crawford, M.A. Karsdal, D.J. Leeming, G. Marrone, K. Bottcher, B. Robinson, A. Del Rio Hernandez, D. Tamburrino, G. Spoletini, M. Malago, A.R. Hall, J. Godovac-Zimmermann, T.V. Luong, P. De Coppi, M. Pinzani, K. Rombouts, Cirrhotic Human Liver Extracellular Matrix 3D Scaffolds Promote Smad-Dependent TGF- β 1 Epithelial Mesenchymal Transition, *Cells* 9 (2019) E83. <https://doi.org/10.3390/cells9010083>.
- [10] A. Daneshgar, O. Klein, G. Nebrich, M. Weinhart, P. Tang, A. Arnold, I. Ullah, J. Pohl, S. Moosburner, N. Raschzok, B. Strücker, M. Bahra, J. Pratschke, I.M. Sauer, K.H. Hillebrandt, The human liver matrisome - Proteomic analysis of native and fibrotic human liver extracellular matrices for organ engineering approaches, *Biomaterials* 257 (2020) 120247. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120247>.
- [11] V.L. Massey, C.E. Dolin, L.G. Poole, S.V. Hudson, D.L. Siow, G.N. Brock, M.L. Merchant, D.W. Wilkey, G.E. Arteel, The hepatic “matrisome” responds dynamically to injury: Characterization of transitional changes to the extracellular matrix in mice, *Hepatology* 65 (2017) 969–982.

<https://doi.org/10.1002/hep.28918>.

[12] M. Klaas, T. Kangur, J. Viil, K. Mäemets-Allas, A. Minajeva, K. Vadi, M. Antsov, N. Lapidus, M. Järvekülg, V. Jaks, The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue, *Sci Rep* 6 (2016) 27398. <https://doi.org/10.1038/srep27398>.

[13] Y. Wu, Y. Cao, K. Xu, Y. Zhu, Y. Qiao, Y. Wu, J. Chen, C. Li, R. Zeng, G. Ge, Dynamically remodeled hepatic extracellular matrix predicts prognosis of early-stage cirrhosis, *Cell Death Dis* 12 (2021) 163. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03443-y>.

[14] A. Naba, K.R. Clauser, R.O. Hynes, Enrichment of Extracellular Matrix Proteins from Tissues and Digestion into Peptides for Mass Spectrometry Analysis, *J Vis Exp* (2015) e53057. <https://doi.org/10.3791/53057>.

[15] A. Naba, K.R. Clauser, C.A. Whittaker, S.A. Carr, K.K. Tanabe, R.O. Hynes, Extracellular matrix signatures of human primary metastatic colon cancers and their metastases to liver, *BMC Cancer* 14 (2014) 518. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-518>.

[16] J.D. Jia, M. Bauer, N. Sedlacek, H. Herbst, M. Ruehl, E.G. Hahn, E.O. Riecken, D. Schuppan, Modulation of collagen XVIII/endostatin expression in lobular and biliary rat liver fibrogenesis, *J Hepatol* 35 (2001) 386–391. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00134-9](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00134-9).

[17] O. Musso, M. Rehn, J. Saarela, N. Théret, J. Li  tard, null Hintikka, D. Lotrian, J.P. Campion, T. Pihlajaniemi, B. Clément, Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver, *Hepatology* 28 (1998) 98–107. <https://doi.org/10.1002/hep.510280115>.

[18] L. Pantano, G. Agyapong, Y. Shen, Z. Zhuo, F. Fernandez-Albert, W. Rust, D. Knebel, J. Hill, C.M. Boustany-Kari, J.F. Doerner, J.F. Rippmann, R.T. Chung, S.J. Ho Sui, E. Simon, K.E. Corey, Molecular characterization and cell type composition deconvolution of fibrosis in NAFLD, *Sci Rep* 11 (2021) 18045. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96966-5>.

[19] W. He, C. Huang, X. Zhang, D. Wang, Y. Chen, Y. Zhao, X. Li, Identification of transcriptomic signatures and crucial pathways involved in non-alcoholic steatohepatitis, *Endocrine* 73 (2021) 52–64. <https://doi.org/10.1007/s12020-021-02716-y>.

[20] B. Aranda, H. Blankenburg, S. Kerrien, F.S.L. Brinkman, A. Ceol, E. Chautard, J.M. Dana, J. De Las Rivas, M. Dumousseau, E. Galeota, A. Gaulton, J. Goll, R.E.W. Hancock, R. Isserlin, R.C. Jimenez, J. Kerssemakers, J. Khadake, D.J. Lynn, M. Michaut, G. O'Kelly, K. Ono, S. Orchard, C. Prieto, S. Razick, O. Rigina, L. Salwinski, M. Simonovic, S. Velankar, A. Winter, G. Wu, G.D. Bader, G. Cesareni, I.M. Donaldson, D. Eisenberg, G.J. Kleywegt, J. Overington, S. Ricard-Blum, M. Tyers, M. Albrecht, H. Hermjakob, PSICQUIC and PSISCORE: accessing and scoring molecular interactions, *Nat Methods* 8 (2011) 528–529. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1637>.

[21] J. Kanta, Elastin in the Liver, *Front Physiol* 7 (2016) 491. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00491>.

[22] H. Yanagisawa, E.C. Davis, B.C. Starcher, T. Ouchi, M. Yanagisawa, J.A. Richardson, E.N. Olson, Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo, *Nature* 415 (2002) 168–171. <https://doi.org/10.1038/415168a>.

[23] A.M. Ibrahim, S. Sabet, A.A. El-Ghor, N. Kamel, S.E. Anis, J.S. Morris, T. Stein, Fibulin-2 is required for basement membrane integrity of mammary epithelium, *Sci Rep* 8 (2018) 14139. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32507-x>.

[24] W.M. Longmate, R. Monichan, M.-L. Chu, T. Tsuda, M.G. Mahoney, C.M. DiPersio, Reduced fibulin-2 contributes to loss of basement membrane integrity and skin blistering in mice lacking integrin $\alpha 3\beta 1$ in the epidermis, *J Invest Dermatol* 134 (2014) 1609–1617. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.10>.

[25] B.N. Baird, M.J. Schliekelman, Y.-H. Ahn, Y. Chen, J.D. Roybal, B.J. Gill, D.K. Mishra, B. Erez,

- M. O'Reilly, Y. Yang, M. Patel, X. Liu, N. Thilaganathan, I.V. Larina, M.E. Dickinson, J.L. West, D.L. Gibbons, D.D. Liu, M.P. Kim, J.M. Hicks, I.I. Wistuba, S.M. Hanash, J.M. Kurie, Fibulin-2 is a driver of malignant progression in lung adenocarcinoma, *PLoS One* 8 (2013) e67054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067054>.
- [26] J.D. Hulleman, J.C. Genereux, A. Nguyen, Mapping wild-type and R345W fibulin-3 intracellular interactomes, *Exp Eye Res* 153 (2016) 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.10.017>.
- [27] R.B. Kasetti, P. Maddineni, J.C. Millar, A.F. Clark, G.S. Zode, Increased synthesis and deposition of extracellular matrix proteins leads to endoplasmic reticulum stress in the trabecular meshwork, *Sci Rep* 7 (2017) 14951. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14938-0>.
- [28] Z. Sun, J.L. Brodsky, Protein quality control in the secretory pathway, *J Cell Biol* 218 (2019) 3171–3187. <https://doi.org/10.1083/jcb.201906047>.
- [29] M. Williams, J. Bonnardel, B. Haest, B. Vanderborght, C. Wagner, A. Remmerie, A. Bujko, L. Martens, T. Thoné, R. Browaeys, F.F. De Ponti, B. Vanneste, C. Zwicker, F.R. Svedberg, T. Vanhalewyn, A. Gonçalves, S. Lippens, B. Devriendt, E. Cox, G. Ferrero, V. Wittamer, A. Willaert, S.J.F. Kaptein, J. Neyts, K. Dallmeier, P. Geldhof, S. Casaert, B. Deplancke, P. Ten Dijke, A. Hoorens, A. Vanlander, F. Berrevoet, Y. Van Nieuwenhove, Y. Saeys, W. Saelens, H. Van Vlierberghe, L. Devisscher, C.L. Scott, Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches, *Cell* 185 (2022) 379–396.e38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.018>.
- [30] S. Robert, T. Gicquel, A. Bodin, V. Lagente, E. Boichot, Characterization of the MMP/TIMP Imbalance and Collagen Production Induced by IL-1 β or TNF- α Release from Human Hepatic Stellate Cells, *PLoS ONE* 11 (2016) e0153118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153118>.
- [31] L. Xu, A.Y. Hui, E. Albanis, M.J. Arthur, S.M. O'Byrne, W.S. Blaner, P. Mukherjee, S.L. Friedman, F.J. Eng, Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis, *Gut* 54 (2005) 142–151. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.042127>.
- [32] H. Tian, J. Liu, J. Chen, M.L. Gatza, G.C. Blobe, Fibulin-3 is a novel TGF- β pathway inhibitor in the breast cancer microenvironment, *Oncogene* 34 (2015) 5635–5647. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.13>.
- [33] X. Xu, C. Yang, X. Yu, J. Wang, Fibulin-3 regulates the inhibitory effect of TNF- α on chondrocyte differentiation partially via the TGF- β /Smad3 signaling pathway, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1869 (2022) 119285. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119285>.
- [34] A.J. Maniotis, C.S. Chen, D.E. Ingber, Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 849–854. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.849>.
- [35] N. Wang, J.D. Tytell, D.E. Ingber, Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (2009) 75–82. <https://doi.org/10.1038/nrm2594>.
- [36] C.H. Thomas, J.H. Collier, C.S. Sfeir, K.E. Healy, Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 1972–1977. <https://doi.org/10.1073/pnas.032668799>.
- [37] K. Burridge, C. Guilluy, Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension, *Exp Cell Res* 343 (2016) 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.029>.
- [38] X.-K. Zhao, L. Yu, M.-L. Cheng, P. Che, Y.-Y. Lu, Q. Zhang, M. Mu, H. Li, L.-L. Zhu, J.-J. Zhu, M. Hu, P. Li, Y.-D. Liang, X.-H. Luo, Y.-J. Cheng, Z.-X. Xu, Q. Ding, Focal Adhesion Kinase Regulates Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis, *Sci Rep* 7 (2017) 4032. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04317-0>.
- [39] K. Legerstee, A.B. Houtsmuller, A Layered View on Focal Adhesions, *Biology (Basel)* 10 (2021)

1189. <https://doi.org/10.3390/biology10111189>.
- [40] J.T. Parsons, Focal adhesion kinase: the first ten years, *J Cell Sci* 116 (2003) 1409–1416. <https://doi.org/10.1242/jcs.00373>.
- [41] X.-K. Zhao, Y. Cheng, M. Liang Cheng, L. Yu, M. Mu, H. Li, Y. Liu, B. Zhang, Y. Yao, H. Guo, R. Wang, Q. Zhang, Focal Adhesion Kinase Regulates Fibroblast Migration via Integrin beta-1 and Plays a Central Role in Fibrosis, *Sci Rep* 6 (2016) 19276. <https://doi.org/10.1038/srep19276>.
- [42] S. Huvneers, H. Truong, R. Fässler, A. Sonnenberg, E.H.J. Danen, Binding of soluble fibronectin to integrin alpha5 beta1 - link to focal adhesion redistribution and contractile shape, *J Cell Sci* 121 (2008) 2452–2462. <https://doi.org/10.1242/jcs.033001>.
- [43] D. Ilić, B. Kovacic, K. Johkura, D.D. Schlaepfer, N. Tomasević, Q. Han, J.-B. Kim, K. Howerton, C. Baumbusch, N. Ogiwara, D.N. Streblow, J.A. Nelson, P. Dazin, Y. Shino, K. Sasaki, C.H. Damsky, FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions, *J Cell Sci* 117 (2004) 177–187. <https://doi.org/10.1242/jcs.00845>.
- [44] A. Naba, Ten Years of Extracellular Matrix Proteomics: Accomplishments, Challenges, and Future Perspectives, *Mol Cell Proteomics* 22 (2023) 100528. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2023.100528>.
- [45] L. Krasny, A. Paul, P. Wai, B.A. Howard, R.C. Natrajan, P.H. Huang, Comparative proteomic assessment of matrisome enrichment methodologies, *Biochem J* 473 (2016) 3979–3995. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160686>.
- [46] T. Knittel, D. Kobold, F. Piscaglia, B. Saile, K. Neubauer, M. Mehde, R. Timpl, G. Ramadori, Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair, *Histochem Cell Biol* 112 (1999) 387–401. <https://doi.org/10.1007/s004180050421>.
- [47] T. Knittel, D. Kobold, B. Saile, A. Grundmann, K. Neubauer, F. Piscaglia, G. Ramadori, Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential, *Gastroenterology* 117 (1999) 1205–1221. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70407-5](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70407-5).
- [48] S. Balog, R. Fujiwara, S.Q. Pan, K.B. El-Baradie, H.Y. Choi, S. Sinha, Q. Yang, K. Asahina, Y. Chen, M. Li, M. Salomon, S.W.-K. Ng, H. Tsukamoto, Emergence of highly profibrotic and proinflammatory Lrat+Fbln2+ HSC subpopulation in alcoholic hepatitis, *Hepatology* 78 (2023) 212–224. <https://doi.org/10.1002/hep.32793>.
- [49] S. Sakane, H. Hikita, K. Shirai, T. Sakamoto, R. Narumi, J. Adachi, N. Kakita, Y. Yamada, H. Toyoda, H. Takahashi, G. Suda, M. Kai, Y. Tahata, R. Sakamori, S. Kumazaki, K. Fukumoto, Y. Myojin, K. Murai, T. Kodama, T. Tatsumi, T. Tomonaga, N. Sakamoto, E. Morii, T. Takehara, Proteomic analysis of serum extracellular vesicles reveals Fibulin-3 as a new marker predicting liver-related events in MASLD, *Hepatol Commun* 8 (2024) e0448. <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000448>.
- [50] N. Kobayashi, G. Kostka, J.H.O. Garbe, D.R. Keene, H.P. Bächinger, F.-G. Hanisch, D. Markova, T. Tsuda, R. Timpl, M.-L. Chu, T. Sasaki, A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization, *J Biol Chem* 282 (2007) 11805–11816. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611029200>.
- [51] C.-Y. Dou, C.-J. Cao, Z. Wang, R.-H. Zhang, L.-L. Huang, J.-Y. Lian, W.-L. Xie, L.-T. Wang, EFEMP1 inhibits migration of hepatocellular carcinoma by regulating MMP2 and MMP9 via ERK1/2 activity, *Oncol Rep* 35 (2016) 3489–3495. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4733>.
- [52] J. Hu, B. Duan, W. Jiang, S. Fu, H. Gao, L. Lu, Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) suppressed the growth of hepatocellular carcinoma cells by promoting Semaphorin 3B(SEMA3B), *Cancer Med* 8 (2019) 3152–3166.

<https://doi.org/10.1002/cam4.2144>.

[53] S.V. Plotnikov, A.M. Pasapera, B. Sabass, C.M. Waterman, Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration, *Cell* 151 (2012) 1513–1527. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.034>.

[54] D.R. Woodard, S. Daniel, E. Nakahara, A. Abbas, S.M. DiCesare, G.E. Collier, J.D. Hulleman, A loss-of-function cysteine mutant in fibulin-3 (EFEMP1) forms aberrant extracellular disulfide-linked homodimers and alters extracellular matrix composition, *Hum Mutat* 43 (2022) 1945–1955. <https://doi.org/10.1002/humu.24452>.

[55] L.A. Murtha, S.A. Hardy, N.S. Mabotuwana, M.J. Bigland, T. Bailey, K. Raguram, S. Liu, D.T. Ngo, A.L. Sverdlow, T. Tomin, R. Birner-Gruenberger, R.D. Hume, S.E. Iismaa, D.T. Humphreys, R. Patrick, J.J.H. Chong, R.J. Lee, R.P. Harvey, R.M. Graham, P.P. Rainer, A.J. Boyle, Fibulin-3 is necessary to prevent cardiac rupture following myocardial infarction, *Sci Rep* 13 (2023) 14995. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41894-9>.

[56] J. Tan, S. Cai, X. Luo, Q. Li, Y. Chen, Z. Chen, Y. Mao, G. Liu, M. Yang, X. Liu, Stop codon variant in EFEMP1 is associated with primary open-angle glaucoma due to impaired regulation of aqueous humor outflow, *Exp Eye Res* 241 (2024) 109859. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109859>.

[57] I. Livingstone, V.N. Uversky, D. Furniss, A. Wiberg, The Pathophysiological Significance of Fibulin-3, *Biomolecules* 10 (2020) 1294. <https://doi.org/10.3390/biom10091294>.

[58] P.A. Klenotic, F.L. Munier, L.Y. Marmorstein, B. Anand-Apte, Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is a binding partner of epithelial growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1). Implications for macular degenerations, *J Biol Chem* 279 (2004) 30469–30473. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403026200>.

[59] A.R. Albig, J.R. Neil, W.P. Schieman, Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo, *Cancer Res* 66 (2006) 2621–2629. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4096>.

[60] R.-M. Zhang, H. Kumra, D.P. Reinhardt, Quantification of Extracellular Matrix Fiber Systems Related to ADAMTS Proteins, *Methods Mol Biol* 2043 (2020) 237–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9698-8_19.

Proteomic analysis of liver fibrosis reveals EFEMP1 as a new modulator of adhesion and migration of hepatic stellate cells.

Célia Thomas¹, Fidaa Bouezzedine¹, Dominique Bonnier¹, Vincent Legagneux¹ and Nathalie Théret¹

¹Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) -UMR_S 1085, Rennes, France

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplementary Table 1: List of the 182 matrisome proteins identified in fibrosis samples. 29 were upregulated and 77 downregulated in at least one grade of fibrosis when compared with liver without fibrosis

Supplementary Table 2: List of proteins interacting with FBLN2, using PSICQUIC web interface

Supplementary Table 3: List of proteins interacting with FBLN3, using PSICQUIC web interface

Supplementary Table 4: List of proteins interacting with FBLN5, using PSICQUIC web interface

Supplementary Table 5: Clinical parameters of patients with liver fibrosis

Supplementary Table 6: List of primer sequences

Supplementary Table 7: Description of antibodies

Supplementary Fig. 1: Comparison of matrisome protein amounts in liver fibrosis samples. Proteins exhibiting differential expression across at least two fibrosis stages are shown. (A) Proteins whose distribution showed an increase between F1 and F4 grades. (B) Proteins whose distribution showed a decrease between F1 and F4 grades. (C) Proteins showing more complex fluctuations among fibrosis grades.

Supplementary Fig.2: Gene Ontology Enrichment analysis of proteins interacting with fibulins using the WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit. The top 10 enriched GO terms are represented.

Supplementary Fig. 3: siRNA transfection efficiently decreases *FBLN2* and *EFEMP1* mRNA expression levels in cultured LX-2 cells. (A) LX-2 cells were treated with a control siRNA (siCTRL) or three different siRNAs against *EFEMP1* (si1, si2 and si3). (B) LX-2 cells were treated with a control siRNA (siCTRL), or an siRNA against *EFEMP1* (siEFEMP1; si2) or *FBLN2* (siFBLN2). mRNAs were extracted 48h after siRNA transfection and analyzed by RT-qPCR. mRNA levels are represented as log₂ (-ΔΔCt) and expressed as the mean of three independent experiments. Statistical significances were evaluated using parametric paired t-test. *p<0.05; **p<0.01.

Supplementary Fig. 4: Progressive phenotypic changes following *EFEMP1* knockdown by siRNA. LX-2 cells transfected with indicated siRNAs were cultured on uncoated (plastic) plates for the indicated time (24h to 96h). Cells were fixed and stained for F-actin detection using phalloidin-Alexa-Fluor-488. Nuclei were counterstained with Hoechst-33342. Representative fields are shown. Scale bar: 50 μm.

Supplementary Fig. 5: *EFEMP1* or *FBLN2* knockdown does not affect total nuclear DNA content. LX-2 cells transfected with the indicated siRNAs and treated or not with TGF-β (5ng/ml for 16h) were cultured on uncoated (plastic) or collagen type I (Collagen I) coated plates. Nuclei were counterstained with Hoechst-33342. Total DNA content was measured by integrated Hoechst staining density. Results from three biological replicates are represented.

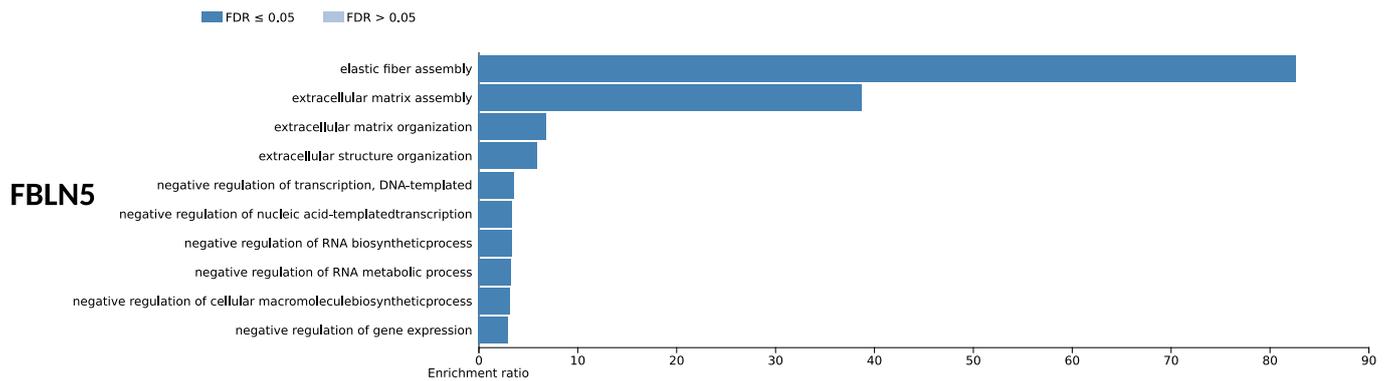
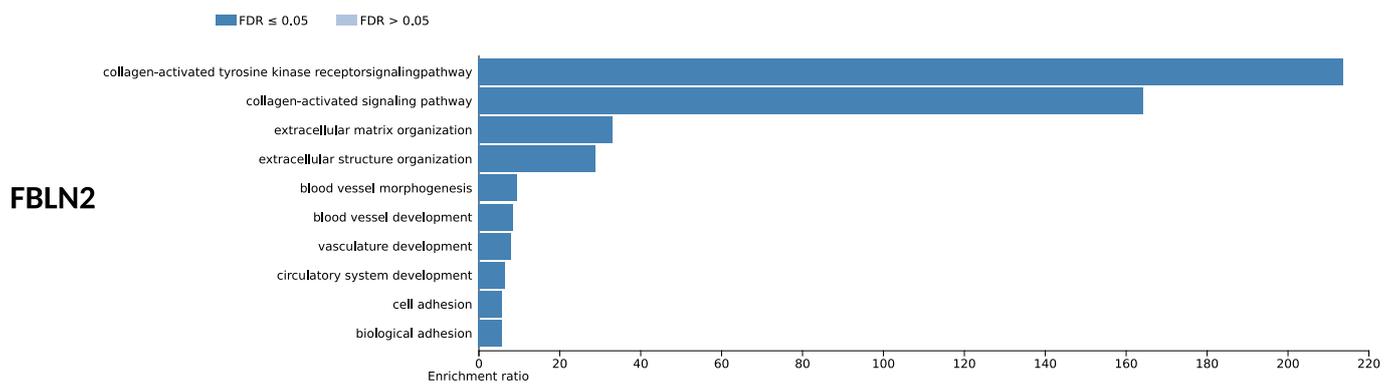
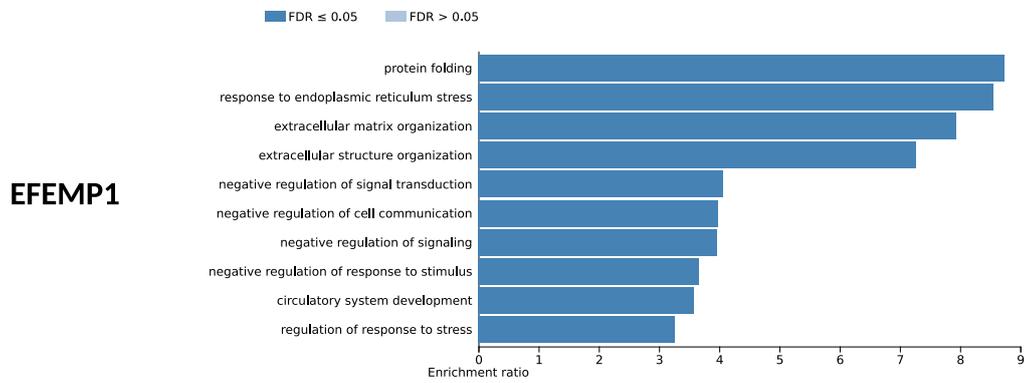
Supplementary Fig. 6: Silencing of *EFEMP1* does not affect the early steps of cell spreading attachment whereas silencing of *FBLN2* increases the occupied surface. Cell spreading was measured using the real-time cell analysis xCELLigence system. 96h after transfection with the indicated siRNAs, LX-2 cells were plated onto E-Plates and cell Index was measured for another 6h. Statistical significances of the relative cell index at 6h were evaluated using a parametric paired t-test. *p<0.05.

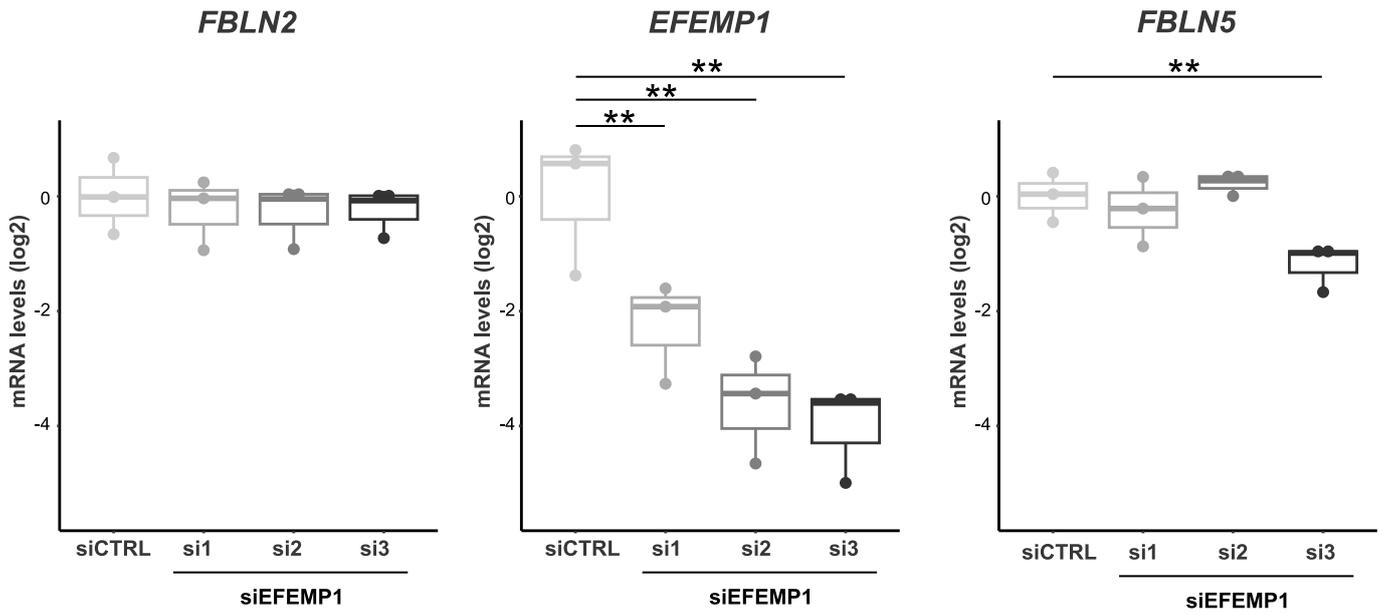
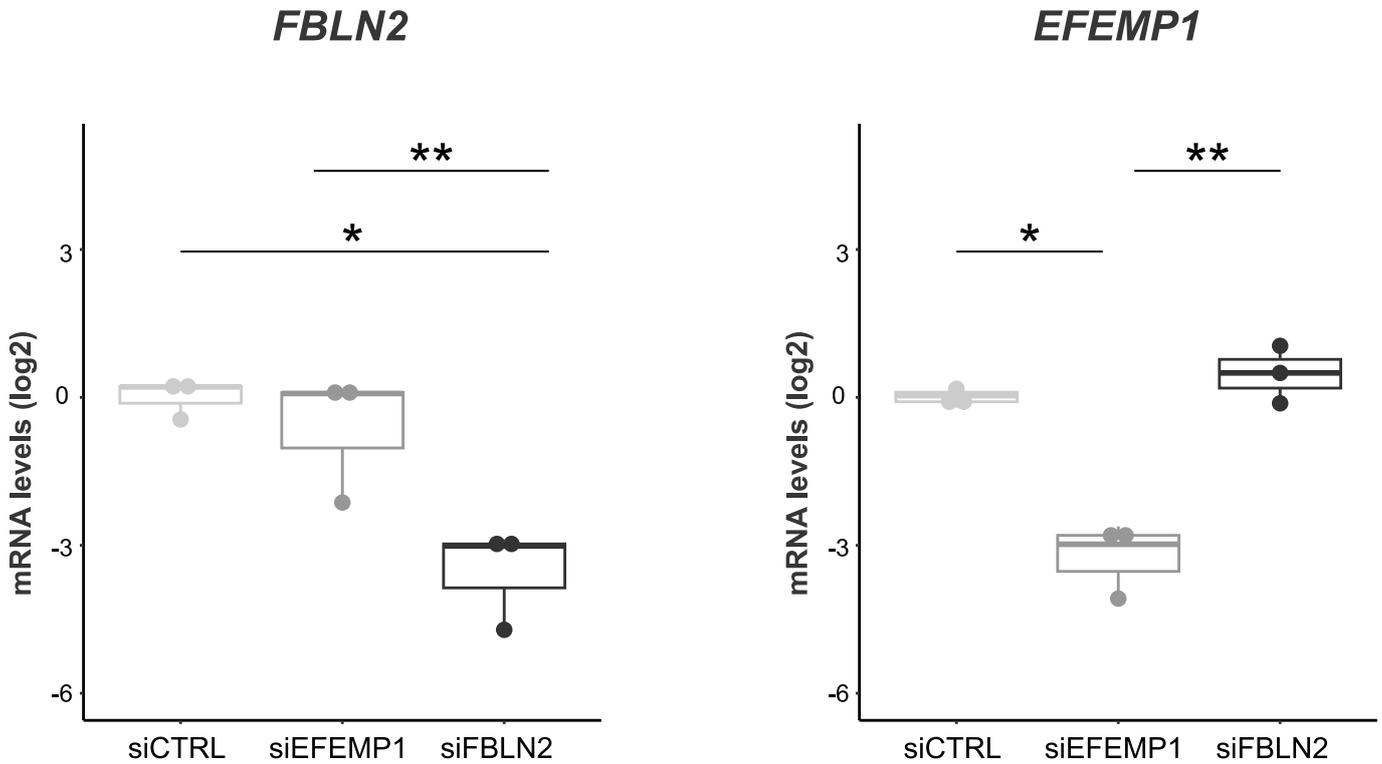
Supplementary Fig. 7: Silencing of *EFEMP1* and *FBLN2* does not affect cell proliferation. Live cell proliferation was evaluated using the IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System every 4h for 72h (n=3). Using the system software, cells were counted and a proliferation index was calculated by dividing the cell number at each time point with the cell number at the beginning of the time course (T₀). The small insert represents the regression profile of the proliferation index.

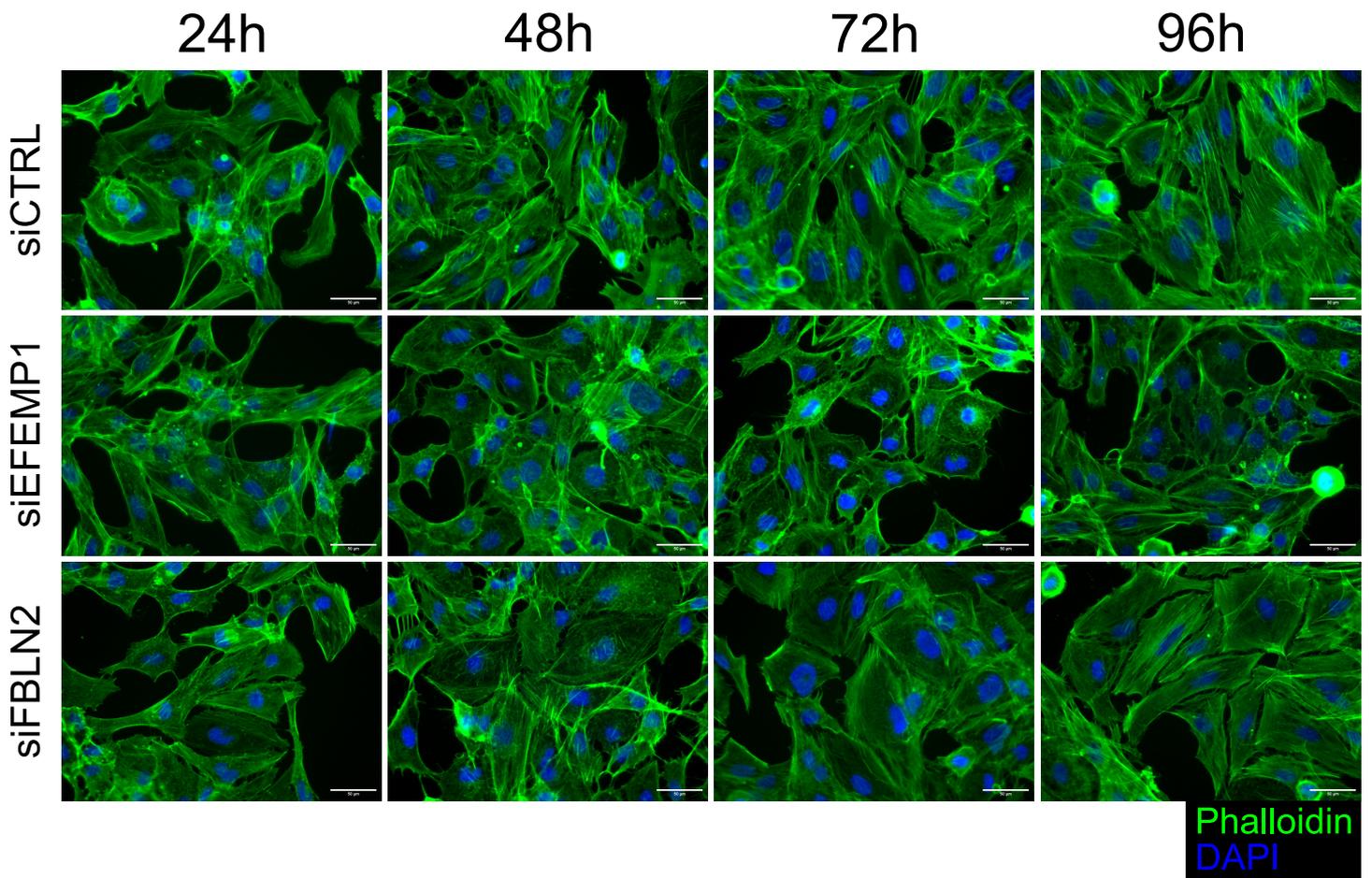
Supplementary Fig. 8: Effect of *EFEMP1* and *FBLN2* knockdown on *FN1* and *TIMP3* expression. LX-2 cells were transfected with the indicated siRNAs and cultured on uncoated (plastic) plates. Gene expression levels of (A) *FN1* and (B) *TIMP3* were measured by RT-qPCR (n=3). Statistical significances were evaluated using a parametric paired t-test. * $p < 0.05$.



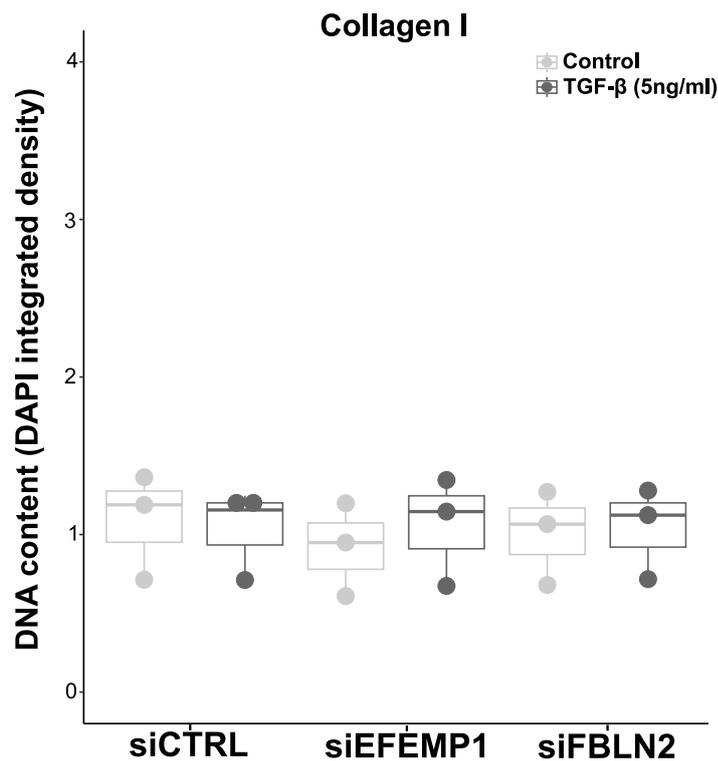
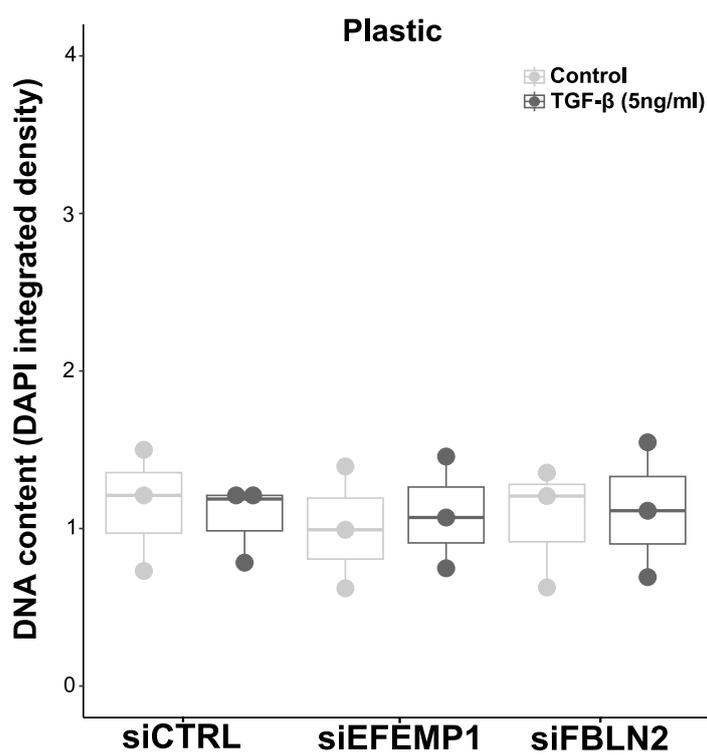
Supplementary Figure 1



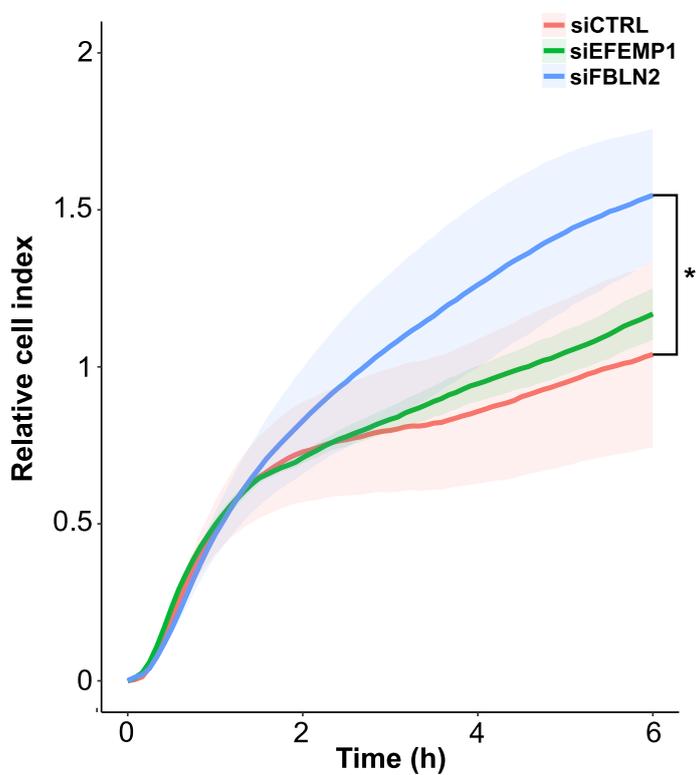
A**B**



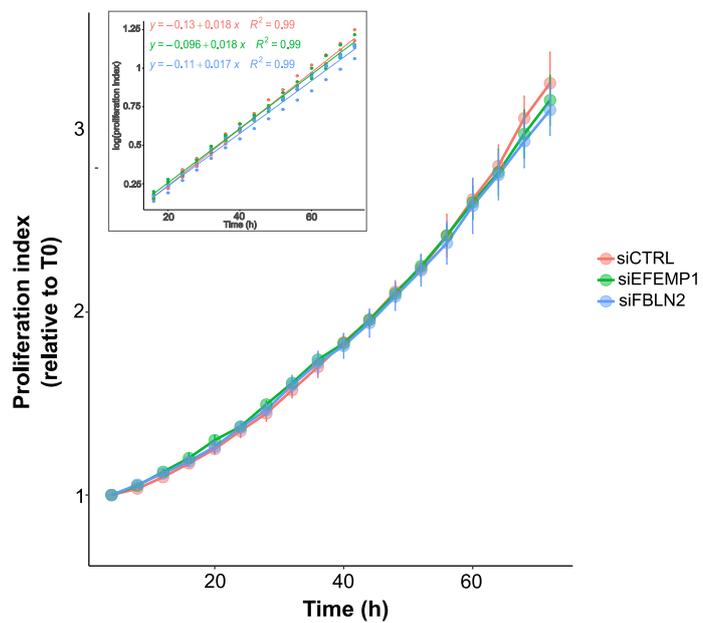
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5

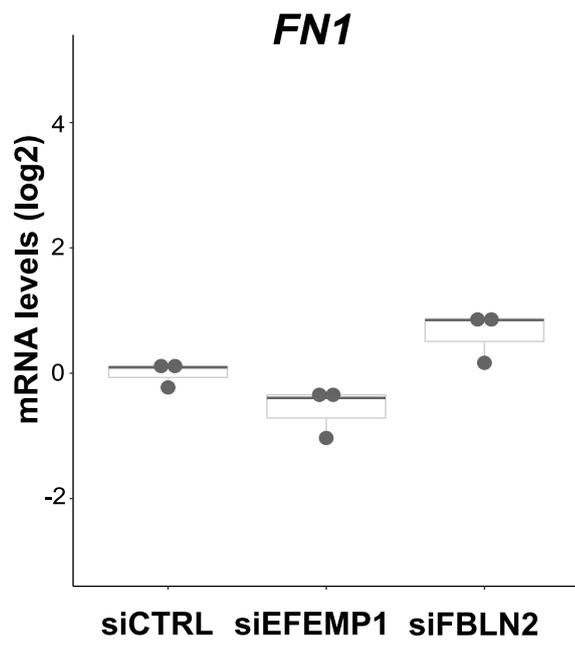


Supplementary Figure 6

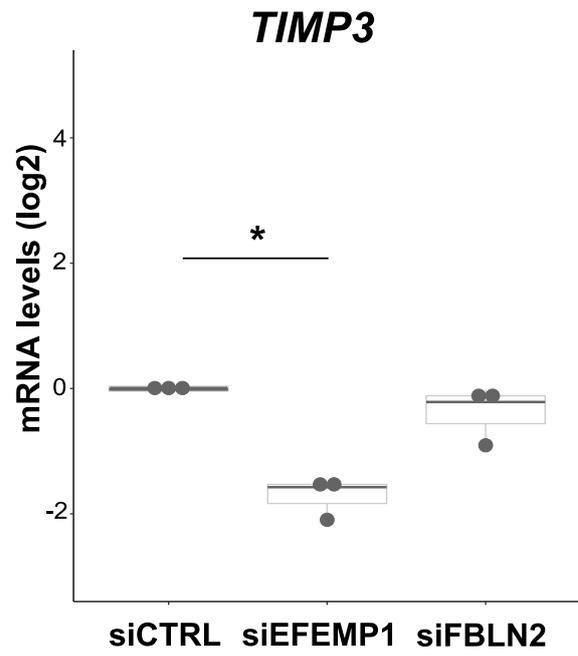


Supplementary Figure 7

A



B



Supplementary Table 1: List of matrisome proteins identified in liver fibrosis samples. This table is the intersection between the genes associated with the protein groups from our analysis (MS_proteinGroups_values.csv) and the GSEA. NABA ECM gene sets. The table comprises 198 rows corresponding to 198 protein groups but to only 182 genes, as some genes are annotated in several protein groups.

Majority.protein.IDs	Gene.names	LFQ intensity																		
		F1_11NT	F1_17NT	F1_38NT	F1_42NT	F1_7NT	F2_15NT	F2_36NT	F2_45NT	F3_10NT	F3_30NT	F3_46NT	F3_9NT	F4_12NT	F4_19NT	F4_23NT	F4_47NT	F4_48NT	F4_5NT	
A0A024R6I7;P01009;A0A0G2JRN3;P01009-2	SERPINA1	3970000	3131200	0	11967000	3573000	3574800	4039400	4356000	50923000	3942000	2901000	4950200	99014000	5910600	2810400	0	0	8183300	
A0A087WTA8;P08123	COL1A2	1.0456e+11	7.899e+10	6.7054e+10	7.7322e+10	7.7043e+10	7.02e+10	4.8784e+10	1.2272e+11	1.0315e+11	8.5372e+10	1.0163e+11	8.651e+10	1.0762e+11	6.565e+10	7.2893e+10	6.6129e+10	8.8668e+10	7.8614e+10	
A0A087WVA5	TNXB	0	9518700	8304700	0	0	15826000	0	0	9798000	9395000	8881000	0	0	0	9225500	11823000	0	0	
A0A087WYF1;A0A087WX80;P24043	LAMA2	0	0	0	0	3973100	0	0	5826800	8808700	0	4942100	3749100	0	0	3617600	6177500	3692200	0	2920600
A0A087WXXW9;P20908	COL5A1	2136500000	1390500000	1514900000	1213600000	1431500000	1180500000	1171800000	2098600000	1571200000	1351300000	1748700000	1698300000	1497400000	2530500000	1966600000	1563300000	2460900000	1600300000	
A0A087WVY8;P35556;D6RJJ3;P35556-2	FBN2	110430000	256910000	106250000	0	0	98352000	127480000	0	0	49181000	0	64444000	16370000	155340000	0	0	0	221070000	
F5H3Q5;A0A087WZY5;A8MXH5;Q14031-2;Q14031;F5	COL4A6	319350000	0	330300000	263140000	0	387480000	166870000	0	178120000	0	441010000	219920000	0	171370000	0	0	0	0	0
A0A087X0D5;P09668	CTSH	0	0	0	0	0	12310000	0	0	0	0	0	21473000	0	0	0	0	0	0	0
A0A087X0S5;P12109	COL6A1	2.236e+09	9711400000	4108700000	4316700000	2709700000	3061600000	5874600000	8241900000	4334500000	4136900000	2811100000	1844700000	2352600000	3575100000	3223300000	6486300000	5398700000	2996400000	
A0A0A0MTC7;A0A0A0MQS9;Q16363-2;Q16363	LAMA4	59934000	103770000	78916000	59991000	41169000	69528000	97200000	18408000	104920000	88357000	101890000	77069000	38463000	57007000	78812000	70774000	66337000	61356000	
A0A0A0MSA0;Q16787-3;Q16787	LAMA3	15419000	0	143600000	142640000	120660000	0	145830000	322360000	190210000	92503000	124180000	171350000	0	134310000	239740000	971740000	183330000	212190000	
A0A0A0MSD0;Q4LDE5-2;Q4LDE5-4;Q4LDE5	SVEP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27274000	0	0	0	0	
A0A0A0MSV6;D6R934;P02746	C1QB	0	6898800	0	73142000	66682000	71348000	126620000	0	55494000	0	0	0	80901000	116210000	0	61493000	0	187060000	
A0A0A0MT20;Q9Y6C2-2	EMILIN1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20080000	
A0A140T9I7;H0YI51;A0A140TA54;Q4VXY6;A0A140T9N	COL11A2	0	0	8253600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A0A0C4DFX3;Q9Y6C2	EMILIN1	2836200000	3501700000	2566300000	3194900000	2271600000	1592500000	3032500000	3741200000	2656400000	1823400000	1836400000	2134200000	2414600000	2915900000	3902900000	3083900000	3965800000	3316700000	
A0A0C4DGV8;Q13214-2;Q13214;B4DEK9	SEMA3B	117010000	5572800	46913000	149070000	108400000	209400000	112050000	0	86792000	0	51963000	90218000	0	59324000	92734000	116030000	0	88914000	
C9JMH6;A0A0I9YY65;A0A0G2JPA8;P08697-2;P08697	SERPINF2	0	35840000	0	49129000	35297000	46045000	45811000	0	0	0	0	90980000	0	0	0	51162000	0	0	
A0A0U1RR20;Q92954-5;Q92954-4;Q92954-3;Q92954-4	PRG4	332440000	628660000	229380000	296010000	846340000	575610000	1417000000	272000000	335640000	278740000	318940000	574250000	337140000	389490000	316790000	697940000	292320000	105390000	
A0A140TA52;P22105;P22105-3;P22105-4;A0A140T8Y	TNXB	655740000	2938300000	2.35e+08	2748000000	7274500000	5382600000	2440500000	3640500000	4104300000	3860700000	4217000000	2068100000	2768300000	2155100000	3746500000	3810700000	4666800000	3861300000	
A0A180GW44;A0A180GVDS;A0A180GVWE8;P07339;A1	CTSD	453120000	513000000	950480000	688940000	812420000	1035500000	556790000	459990000	846520000	708200000	846630000	1143700000	275570000	389900000	269660000	306740000	0	522020000	
A1KZ92-2;A1KZ92	PXN1L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11720000	
A6NMZ7;A6NMZ7-2	COL6A6	2134500000	1816000000	2279300000	2149300000	730950000	1179500000	2544400000	2002900000	9738200000	2735100000	2252800000	7254000000	1723800000	1407700000	6831700000	1194600000	1086900000	7157900000	
A6XND1;A6XND0;P17936;P17936-2	IGFBP3	0	0	0	0	84002000	0	0	0	0	0	0	69580000	0	54903000	0	48493000	0	97826000	
H0Y6W4;B0QYK5;Q96A84-2;Q96A84;Q96A84-3;B0QYI	EMID1	0	0	0	0	0	0	85091000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B1AJZ6;H0Y663;P56705-2;P56705	WNT4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	723980	
B3KW70;F5GYX4;H0YG03;Q13361-2;Q13361;H0YGS3;MFAP5	MFAP5	567160000	963320000	654000000	555620000	119590000	418690000	838750000	312620000	360880000	414080000	0	339180000	395450000	1028600000	678890000	482760000	1693300000	612440000	
B7ZKJ8;Q14624-3;Q14624-2;Q14624;Q14624-4;H7COL	ITIH4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33208000	0	91914000	0	0	0	0	0	
C9JEU5;C9JC84;P02679-2;P02679	FGG	1.488e+09	1.254e+09	9980900000	22185000000	40462000000	15269000000	8368900000	9608100000	11564000000	10828000000	11954000000	51047000000	60495000000	49071000000	18555000000	13258000000	15859000000	25847000000	
C9JJPQ9;C9JU00	FGG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6041300	
CON__P20930;P20930	FLG	0	0	119930000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26705000	0	0	0	0	
CON__Q5D862;Q5D862	FLG2	0	0	412520000	0	0	0	85539000	0	0	0	0	0	0	53983000	0	0	0	0	
CON__Q86YZ3;Q86YZ3	HRNR	24502000	62389000	2559600000	85955000	70256000	19588000	41581000	0	20012000	18420000	0	53906000	0	287760000	19566000	0	150990000	0	
D6RC73;Q9NRJ3	CCL28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1207400	
E7EN65;P15502-2;P15502-1;P15502-4;F8WAH6;P15502	ELN	7315900000	5002000000	2002300000	10228000000	9967300000	7238400000	6080500000	5951400000	7987200000	4505000000	10294000000	6980900000	9234300000	4885500000	6626600000	6773400000	3492000000	6930600000	
E7ENL6;P12111-4	COL6A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	279620000	0	
E7ENM0;P15502-7;P15502-6;P15502-5;P15502-12;B3	ELN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8582400	
E7EQH8	ELN	392090000	553920000	0	0	643090000	0	351370000	0	681650000	332510000	472970000	410890000	0	396410000	440350000	488330000	0	664650000	
E7ESX1;Q9H2X0-5;Q9H2X0	CHRD	0	0	0	0	0	10162000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
E9PF17;P13611-4;P13611-3;P13611-2;P13611-5;P136	VCAN	69064000	64091000	93378000	190080000	0	48477000	118110000	193480000	86195000	102190000	79968000	84377000	86282000	225600000	313230000	137330000	126760000	9292500	
H9KV48;E9PGN7;P05155-2;P05155;P05155-3	SERPING1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	633210	
E9PIT3;P00734	FZ	0	0	0	0	0	0	0	0	97747000	0	0	73454000	116710000	0	0	0	0	4778900	
F5GZK2;Q96P44-3;Q96P44;Q96P44-2	COL21A1	982740000	675330000	302670000	677460000	727510000	489920000	408890000	882070000	612910000	452910000	743440000	675010000	509350000	327080000	666030000	676620000	473520000	534200000	
H0YKS8;X6R3G6;F5GZN3;Q08431-2;Q08431-3;Q08431	MFGE8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71759000	0	0	0	0	0	
F5H8B0;P08709-2;P08709	F7	0	0	0	0	0	0	0	0	1065700000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G3V511;G3V3X5;Q14767	LTBP2	47128000	0	0	12411000	53233000	26159000	0	0	45262000	32997000	0	0	43847000	0	97170000	0	0	5308400	
G3V4U0;Q9UBX5;G3XA98	FBLN5	988260000	452120000	179740000	589570000	555840000	430680000	723460000	2641700000	1036200000	633880000	1389400000	884180000	1467600000	2718300000	3253700000	1612700000	851370000	2946400000	
G3XAI2;P07942	LAMB1	519290000	557710000	541050000	616540000	589170000	243620000	569550000	1311500000											

O00187-2;O00187	MASP2	0	0	0	0	0	0	0	0	29335000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O00339-3;O00339-2;O00339;HOYBJ4;O00339-4	MATN2	0	1642100	0	2197900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O00468-6;O00468-7;O00468-3;O00468-5;O00468-4;O	AGRN	8176900	5069000	9088100	5070600	3733700	4491300	14689000	16300000	10850000	12830000	9038300	5747400	4634600	10149000	5756700	10871000	4713900	10806000
Q5VZ73;O00585	CCL21	0	4714800	1761000	0	0	3275000	18208000	2023100	3929800	0	0	0	0	21959000	0	14149000	0	0
O15230	LAMAS	931850000	771900000	1110300000	762550000	493610000	624320000	1064200000	1319400000	912550000	787490000	926920000	641410000	481780000	770820000	987930000	847770000	1360600000	938860000
O43927	CXCL13	0	0	0	0	4448900	0	0	0	4414200	0	5805800	0	0	0	0	0	0	7693300
O75095;H7C557;O75095-2	MEGF6	22032000	0	0	0	11903000	0	0	0	0	0	0	0	16510000	17491000	0	0	0	11380000
O75462;MOQZL6	CRLF1	0	1790400	0	3168800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O76076;O76076-2	WISP2	14042000	11346000	0	13114000	12116000	12653000	10516000	0	0	0	0	0	9268800	0	12721000	15109000	0	10833000
O95428-6;O95428-5;O95428;G3V5P6;O95428-4;B5M1	PAPLN	0	0	0	0	0	0	2579500	0	0	0	0	0	0	1940000	0	0	2846500	0
O95967;E9PRU1;HOYEU0;E9PI47;HOYET5	EFEMP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3646900	0	3880000	0	2989800	0
O96014;H8YS97	WNT11	0	0	0	0	0	4279900	0	0	0	0	0	0	5892200	0	2489700	0	0	0
P00740-2;P00740	F9	8656100	7998400	3261300	15818000	3114100	12572000	5109400	0	16518000	2337700	7338500	6589600	3353400	3951300	6282800	5453400	0	0
P00747	PLG	65214000	53547000	37956000	80596000	151030000	52314000	44294000	0	56765000	73307000	73899000	70325000	163410000	64580000	89560000	13280000	0	108760000
P01008;Q8TCE1	SERPINC1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1035800	0	0	0	0	0
P01011;G3V3A0	SERPINA3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12565000	0	0	0	0	0
P01019	AGT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2883300	0	0	0	0	0
P01023	A2M	27982000	15473000	2014800	14475000	49678000	32430000	25488000	37461000	33067000	14047000	34220000	44597000	356090000	20842000	38513000	36153000	5955100	87766000
P01042-2;P01042;P01042-3	KNG1	7405800	4317700	2248100	6124700	7837600	0	3861500	0	4482300	5172500	7143000	4468600	6362000	3711700	6247600	6671900	0	4478900
P01137	TGFB1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2903800	0	0	0	0	0
P02452	COL1A1	1.7165e+11	1.2344e+11	1.2331e+11	1.3656e+11	1.4056e+11	1.1427e+11	9.3014e+10	2.0388e+11	1.781e+11	1.4475e+11	1.6638e+11	1.3704e+11	1.6989e+11	1.1535e+11	1.2109e+11	1.0677e+11	1.456e+11	1.3079e+11
P02458;P02458-1	COL2A1	7.16e+08	417150000	392100000	670590000	614290000	584820000	387860000	919810000	914190000	706220000	1053400000	778460000	1036300000	380580000	770650000	631400000	455110000	726860000
P02461	COL3A1	1.0703e+11	8.7583e+10	8.6522e+10	7.0871e+10	7.8135e+10	6.8551e+10	6.2625e+10	1.0747e+11	9.506e+10	8.6013e+10	8.9593e+10	1.016e+11	7.7061e+10	8.7776e+10	8.1658e+10	7.4264e+10	9.8693e+10	7.2544e+10
P02461-2	COL3A1	0	0	0	0	0	0	1435800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P02462;P02462-2	COL4A1	1916500000	3409800000	2988500000	4245600000	1851300000	1565100000	1655800000	1.837e+09	2066300000	1513300000	1577800000	1781900000	1218200000	1738100000	1585500000	2.381e+09	1403900000	1649300000
P02671;P02671-2	FGA	1147800000	927210000	791830000	1377400000	3192400000	936350000	690150000	702250000	881040000	782630000	725180000	3587200000	3554900000	415360000	1174800000	828280000	1558400000	1523600000
P02675;D6REL8	FBG	1391500000	1109200000	1116700000	2.353e+09	3225100000	1658300000	990370000	1102700000	1311800000	1192300000	1406400000	4947600000	5149800000	7110600000	1705900000	1596800000	1617800000	2491400000
P02747	C1QC	17238000	18538000	12020000	14222000	18301000	11406000	20816000	0	14338000	17115000	14230000	18052000	15579000	21786000	18580000	16149000	17442000	30166000
P02751-3;P02751;P02751-14;P02751-8;P02751-17;P0	FN1	1908700000	3428300000	1413100000	2476300000	4474100000	2043800000	1629200000	2003100000	1798300000	1809100000	2580300000	1538600000	2402300000	1058800000	2254100000	2.297e+09	2695200000	2.345e+09
P02760;S4R3V4;S4R471	AMPB	219880000	283670000	864440000	289410000	2147400000	1621400000	1621400000	193900000	145630000	106250000	91482000	195920000	130770000	224620000	186590000	186050000	57825000	389770000
P02790;Q9B519	HPX	2764800	0	0	4805100	3707900	5155900	3239200	0	4635400	3510500	3000800	7386100	25235000	4429700	6030200	5523600	0	8890900
P03973	SLPI	33883000	20120000	6930500	29724000	95433000	54084000	50794000	6552400	19546000	7424900	0	32929000	11018000	17248000	17956000	11382000	0	32895000
P04004	VTN	1.728e+09	924600000	385300000	1212800000	1886300000	1247900000	1.8e+09	1125700000	1043700000	861930000	824650000	1739100000	1244900000	1302100000	1167300000	1486500000	449230000	2693900000
P04196	HRG	7840300	2.6e+07	20801000	16159000	5600800	8761200	16725000	27686000	33746000	11132000	14766000	13968000	0	14797000	7464100	18365000	11106000	12898000
P04275	VWF	17094000	16683000	11158000	16372000	20245000	14441000	13310000	19264000	28272000	10056000	11244000	19721000	24655000	20162000	29616000	20716000	21150000	27683000
P05109	S100A8	0	0	4992000	5266700	0	0	3609300	0	11473000	0	0	24390000	0	0	7953700	0	0	10245000
P05997;AOA087WYX9	COL5A2	3036300000	2074800000	2240200000	1868800000	2165600000	1.786e+09	1770900000	2942200000	2607100000	1974700000	2317300000	2556600000	1979400000	2721400000	2459100000	2161100000	2948900000	2217400000
P06702	S100A9	5034700	0	14435000	10959000	8251500	5775500	7363900	4752800	25947000	8130200	0	32772000	4642600	8523400	4756000	2282100	0	7639000
P07093-2;P07093;P07093-3	SERPINE2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1151600
P07585;F8VXZ8;F8VUF6;F8VWU0;F8VX58;P07585-4	DCN	57759000	27219000	10485000	37218000	86056000	40223000	18129000	30685000	35796000	36051000	34147000	30927000	82657000	37945000	33666000	37477000	21556000	41778000
P07858	CTS5	84038000	74770000	211490000	124730000	435970000	153170000	131040000	76644000	158990000	198450000	128500000	226930000	52378000	22546000	129320000	40572000	30054000	75045000
P08133;P08133-2;E7EMC6;E5RK69	ANXA6	3794100	2286600	6926000	3799500	4683100	9800400	10318000	0	3816300	5219800	6013700	5780700	3943700	9825200	6045200	3360000	0	2683600
P08246	ELANE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5042300	0	0	0	0
P08311	CTS5G	14136000	8635000	6161200	18922000	16484000	12372000	20705000	32312000	36840000	18036000	7963900	29992000	17552000	26300000	27525000	37545000	5215200	51622000
P08572	COL4A2	2248100000	4.173e+09	3490100000	4737800000	2.487e+09	1889800000	1850200000	2.899e+09	2751700000	1849800000	2328700000	2.027e+09	2031300000	2166300000	2446200000	2891400000	2028200000	2775700000
P09382	LGALS1	28556000	71670000	45563000	61761000	38149000	27234000	116330000	72046000	81259000	49476000	101630000	59059000	68873000	96393000	48200000	81381000	90438000	0
P11047	LAMC1	587930000	472830000	683260000	481660000	331800000	363500000	664850000	812080000	532050000	468970000	614540000	430050000	339560000	497380000	588390000	562880000	768370000	629390000
P12107-4;P12107-3;P12107;P12107-2;AOA0U1RRA7	COL11A1	0	14375000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17985000
P12110;P12110-3	COL6A2	1885100000	6658900000	2859200000	3153100000	2850400000	1978100000	3911200000	5417400000	3069700000	2845200000	2096300000	1522500000	1876400000	2463100000	2487200000	4111300000	3802700000	2259300000
P12110-2	COL6A2	56626000	207520000	58373000	75240000	93209000	70680000	74788000	129740000	80704000	77982000	76472000	55143000	69698000	17287000	66999000	101030000	56207000	70649000
P12111;P12111-2	COL6A3	6946300000	1.7703e+10	7954900000	8087500000	9890200000	8004500000	1.2864e+10	2.1553e+10	1.024e+10	1.1106e+10	9.698e+09	5188200000	7043700000	4993600000	9551700000	1.0807e+10	1.4902e+10	1712100000
P13727;P13727-2	PRG2	61613000	25328000	35306000	60770000	37649000	39063000	36255000	37781000	122050000	73433000	11678000	170170000	23223000	39164000	138910000	40901000	29964000	43157000
P14543;P14543-2	NID1	302230000	282770000	467730000	271910000	172010000	196610000	498040											

P21810;C9JKG1	BGN	257140000	254870000	91481000	217400000	342700000	194360000	151790000	194120000	165270000	145940000	188680000	158660000	136020000	147520000	110020000	209920000	68325000	137570000
P21980;P21980-2	TGM2	415150000	284540000	214700000	343860000	635290000	457190000	373720000	356160000	477690000	555040000	428830000	351100000	564830000	241730000	829170000	485390000	485960000	401720000
P23142;P23142-2;P23142-3;CON__ENSEMBL:ENSBT	FBLN1	111720000	58141000	16211000	18701000	294890000	27623000	389050000	46468000	26776000	235930000	57107000	14747000	18866000	63962000	38917000	46502000	25313000	39606000
P23142-4;B1AHL2	FBLN1	0	8736800	0	2586100	3682000	3485500	11566000	0	0	0	8709200	0	0	12512000	6788700	8300700	0	0
P24821-4;P24821;J3QUS6;E9PC84;P24821-2;F5H7V9;J;	TNC	210840000	436980000	159650000	155740000	223420000	124470000	132970000	187190000	135620000	173030000	177170000	194660000	195400000	874190000	123630000	116640000	101590000	136760000
P25067;E9PP49	COL8A2	37441000	0	0	0	26905000	0	0	0	0	0	23627000	20965000	0	0	22120000	0	0	0
P25774-2;P25774;U3KPS4;U3KQE7	CTSS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P25940	COL5A3	116630000	212980000	204010000	186580000	73345000	142440000	81472000	107620000	72742000	90242000	112370000	103880000	73125000	58504000	98798000	86328000	59697000	69982000
P27658	COL8A1	118060000	58665000	12579000	55909000	69888000	16800000	17364000	10831000	24887000	11339000	32921000	48586000	12824000	34067000	52446000	20387000	0	16537000
P28300	LOX	4447700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3715500	0	0	0	0	0	0	5840400
P29400;P29400-2	COL4A5	29929000	22738000	0	31856000	17298000	24542000	0	26589000	0	0	0	22708000	28523000	25044000	27937000	39763000	0	35354000
P35555	FBN1	98799000000	1.2844e+10	5641700000	7088900000	5661900000	5767600000	6804700000	3369600000	3.138e+09	3541900000	984720000	4619300000	9406600000	8810200000	1.2248e+10	8501100000	9256400000	1.3317e+10
P35625	TIMP3	193020000	347150000	93492000	321290000	242380000	333660000	256730000	75183000	236620000	84358000	119420000	222220000	108120000	131200000	171220000	192490000	31474000	154570000
P35858;P35858-2	IGFALS	0	0	0	0	0	2146700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P39060-2;P39060-1;P39060	COL18A1	105170000	222820000	93742000	245110000	58018000	50277000	54220000	47059000	461400000	54860000	81301000	53889000	37575000	25422000	19002000	44732000	9914000	56611000
P48061-2;P48061-5;P48061;P48061-6;P48061-3;P480	CXCL12	186610000	39320000	16713000	99070000	986440000	69589000	65858000	25234000	78813000	24258000	25911000	143060000	51284000	74270000	75356000	66096000	17913000	166690000
P50454;HOYEP8;E9PKH2	SERPINH1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P50995-2;P50995	ANXA11	0	0	1165300	1483500	0	0	0	1380700	0	0	0	0	0	1488000	0	0	0	0
P51884	LUM	143410000	122550000	93743000	83466000	106150000	88513000	97143000	193810000	117860000	107080000	120910000	95457000	128200000	165830000	142760000	155970000	136900000	132680000
P51888	PRELP	139170000	162180000	94201000	111710000	105860000	105430000	97155000	157300000	117940000	110530000	131550000	108600000	122280000	191060000	136500000	463250000	117370000	119420000
P53420	COL4A4	130810000	114380000	77111000	156900000	77883000	113400000	102140000	139830000	182790000	164520000	147450000	158960000	0	86625000	64295000	143190000	106410000	70376000
P55001-3;P55001-2;P55001	MFPAP2	113060000	180060000	74623000	74106000	52160000	75876000	114280000	64718000	85709000	75429000	0	119600000	95906000	120180000	166540000	97260000	242170000	115720000
P55103	INHBC	0	6301800	3274400	3822500	0	7131100	52100000	5967400	0	0	0	0	0	24620000	0	12090000	4947300	0
P55268	LAMB2	690740000	591810000	871970000	596010000	331590000	481830000	840210000	971700000	662380000	602750000	731250000	510330000	299370000	577440000	623180000	618970000	930610000	637660000
P56470;MOQZ93	LGALS4	21243000	18540000	14001000	58050000	24041000	25452000	40761000	27026000	21228000	41591000	76556000	33366000	26135000	74605000	23800000	96795000	61838000	26672000
P58166;F8VNP4	INHBE	668610000	195790000	161680000	353230000	187550000	291740000	165030000	809110000	356280000	547930000	386920000	498860000	464960000	116150000	641700000	927650000	659980000	965830000
P60903	S100A10	0	0	0	0	5207200	0	0	0	0	3179500	0	3293800	0	0	0	0	0	0
P78539-3;P78539-5;P78539-2;P78539;P78539-4	SRPX	61851000	31236000	12311000	59028000	79730000	97190000	53376000	28421000	63168000	29205000	32176000	65989000	42959000	45791000	77587000	66151000	12771000	63325000
P98095;P98095-2	FBLN2	25777000	17204000	11972000	32704000	20701000	16883000	22601000	96717000	34373000	25078000	51116000	46311000	51738000	52778000	29626000	41118000	15810000	55764000
P98160	SPG2	2067500000	4625500000	2383200000	4167500000	2053600000	2552700000	2649300000	2754700000	2410600000	2189100000	2021800000	1836700000	1794600000	1857900000	1959400000	2640300000	1846600000	2569600000
Q02388-2;Q02388	COL7A1	187780000	1401400000	553170000	1.532e+09	797610000	980660000	868020000	568160000	1192100000	1928400000	2528500000	1531900000	872900000	696490000	1079700000	617400000	2147600000	403220000
Q03692	COL10A1	5361900	9475900	0	39887000	21519000	14888000	16188000	83132000	38329000	79101000	27208000	100370000	36844000	54810000	152370000	22662000	29025000	85095000
Q05707-2;Q05707;Q05707-3	COL14A1	775560000	452580000	557870000	441750000	389920000	356680000	455470000	1074800000	515620000	442220000	539120000	321030000	523860000	576410000	579890000	751140000	773480000	561510000
Q06033-2;Q06033;E7ET33	ITI13	9557800	13016000	8606400	15608000	14070000	16736000	22669000	0	7775400	0	6699500	16188000	13236000	23185000	7894700	12527000	8061800	36788000
Q07092;Q07092-2	COL16A1	375070000	241820000	168630000	278560000	383470000	195670000	297090000	388870000	306690000	172590000	317060000	397320000	290600000	295850000	207430000	279250000	255410000	344460000
Q07507	DPT	100690000	141410000	102640000	108400000	66667000	143580000	188230000	185670000	132560000	108590000	24561000	98992000	117550000	335510000	125910000	236860000	140840000	171480000
Q08397;H3BUV8	LOXL1	334370000	15094000	0	211040000	15505000	11568000	31786000	62772000	31890000	16192000	22996000	109580000	31583000	69047000	94728000	25609000	12530000	91804000
Q12805-2;Q12805-4;Q12805-3;Q12805;Q12805-5;AO/	EFEMP1	70389000	66724000	21292000	47741000	72525000	35108000	55832000	119170000	78019000	36726000	62833000	74198000	92004000	189390000	235850000	98246000	72909000	255140000
Q13201;E7EPG1	MMRN1	7643300	14417000	11643000	4652400	5307900	12745000	4796700	7158800	4177100	3822600	5649400	8309000	5540500	2382900	6304700	5699100	0	4447300
Q13753-2;Q13753	LAMC2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1137200	0	0	0	0
Q14112-2;Q14112;AOA087WZP6;HOYIV3	NID2	9311900	14318000	17692000	17474000	7431000	12203000	18395000	29989000	15744000	23475000	20552000	10673000	11010000	16591000	19278000	26581000	18022000	26338000
Q14213	EBI3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12322000
Q14766;Q14766-4;E7EV71;Q14766-2;Q14766-5	LTBP1	215220000	353390000	96442000	210410000	207940000	173500000	167290000	186340000	202550000	112740000	139150000	231220000	182710000	320500000	373670000	213200000	214890000	325510000
Q14766-3;C9JD84	LTBP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3260000
Q15063-3;B1A8D9;Q15063-5;Q15063;Q15063-7;Q150	POSTN	88031000	97431000	190810000	119110000	59372000	154400000	134720000	261400000	65981000	97388000	148630000	77585000	84357000	53191000	99013000	88129000	64541000	143160000
Q15063-4;Q15063-2	POSTN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3827400
Q15582;HOY8L3	TGFBI	1.097e+09	1424900000	776060000	729370000	717230000	1491100000	966900000	1494500000	997180000	849720000	833990000	641370000	531800000	645890000	1019100000	1463900000	2054300000	981300000
Q16270-2;Q16270	IGFBP7	145290000	14568000	39878000	56879000	19021000	9532400	11391000	23960000	24200000	10657000	14961000	11080000	20226000	15750000	24970000	16259000	31422000	24964000
Q16610;Q16610-4;Q16610-2	ECM1	28581000	38951000	22774000	33345000	48829000	22879000	22159000	29831000	30708000	19761000	13300000	23477000	27839000	14499000	25352000	37353000	22379000	29034000
Q2UY09	COL28A1	0	0	0	0	0	11229000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q5VZ75;Q99731	CCL19	11386000	0	0	0	2359100	0	23048000	8489700	25574000	0	0	18480000	0	10417000	11954000	20892000	0	0

Q8N135	LGI4	0	0	0	0	0	0	3929900	0	7446600	0	0	5133700	2823300	0	0	0	0	4342200
Q8N251-2;A0A0C4DH07;Q8N251-3;Q8N251	LTBP4	66533000	69896000	35370000	53378000	78644000	43031000	35831000	78503000	71580000	33390000	20618000	49215000	63085000	71821000	200590000	54425000	86634000	95603000
Q8N6G6;Q8N6G6-6	ADAMTSL1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3550600	0	0	0	0
Q8N8U9	BMPER	0	0	0	7731700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q8NI99;K7EKF6	ANGPTL6	220130000	560530000	199600000	777830000	239120000	321660000	367620000	456920000	174190000	251520000	126690000	329270000	367820000	430110000	93378000	437040000	212090000	559360000
Q8WUA8	TSKU	0	0	0	0	648140	0	0	0	0	0	0	1211000	0	0	0	0	0	0
Q92626;H7C1W1;Q92626-2	PXDN	0	0	0	1816200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1191000	0	0	0	0
Q92743;H0Y7G9	HTRA1	7867800	4370000	0	6166400	3620700	5143300	0	0	4530300	1127300	2224400	5885900	0	0	3334100	3942600	0	3017900
Q93097-2;Q93097;Q5TEH8	WNT2B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2604400	0	0	0	0	0
Q96A83-2;Q96A83	COL26A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	425430000
Q96P63;Q96P63-2	SERPINB12	0	0	840810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q96RW7-2;Q96RW7	HMCN1	935470	0	0	0	813230	0	1789400	0	2190300	0	0	0	0	1188200	970050	1520200	2119100	0
Q99715;D6RGG3;Q99715-4;A0A087X0A8;Q99715-2	COL12A1	264310000	186980000	98202000	124920000	188280000	102780000	98918000	1.64e+08	89301000	130160000	156860000	160140000	121530000	122810000	236680000	194910000	178540000	192510000
Q9BXN1	ASPN	29324000	21159000	10165000	22982000	16428000	23176000	18349000	38013000	15033000	29494000	17575000	16820000	14519000	21191000	16690000	28634000	0	13560000
Q9BXX0	EMILIN2	17914000	20719000	16388000	34679000	25469000	11679000	24675000	41026000	20819000	18484000	18678000	18647000	51863000	17905000	27703000	18086000	28343000	40798000
Q9BY76;Q9BY76-3;Q9BY76-2	ANGPTL4	0	0	0	0	3652800	3465700	3793000	0	4042900	0	0	4813200	4724900	5472200	0	3847600	0	6567400
Q9GZM7;F6SDV2;Q9GZM7-3	TINAGL1	89111000	279830000	180060000	255470000	169200000	127250000	234590000	232730000	105530000	141390000	118140000	68551000	131290000	145090000	185410000	236870000	106420000	243950000
Q9GZP0-2;Q9GZP0	PDGFD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1543400
Q9GZT5;H7BZB8	WNT10A	9970800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q9H239;B3KV06;C0H5X0	MMP28	4107800	0	0	4189300	0	3681700	0	0	0	4515500	0	4848200	0	0	0	0	0	0
Q9H8L6	MMRN2	5575200	8403600	5454500	6022100	5905600	5092200	5023900	6423900	0	5257800	10193000	3813200	7248900	4206800	4496400	5336300	0	4156200
Q9NS15-2;Q9NS15;E9PKW1;H0YCX6;H0YC99	LTBP3	7070000	9415300	4023500	0	7786100	5429600	0	0	0	0	0	5858200	4853200	9641300	16641000	0	10070000	9230700
Q9NT22	EMILIN3	2501300	1639900	2441000	0	2176400	0	0	0	4111500	1767400	0	1878400	0	1453200	0	0	0	0
Q9UBR2	CTS2	0	13729000	58752000	12092000	30628000	29805000	15451000	0	0	26088000	0	85428000	0	0	0	0	0	0
Q9UHF1	EGFL7	52665000	63757000	52933000	47318000	47896000	31285000	72323000	71957000	68342000	49211000	49828000	53606000	37649000	46830000	73062000	59537000	76326000	83430000
Q9UKU9;Q9UKU9-2	ANGPTL2	0	2925700	0	0	0	0	2542400	0	8509300	0	0	2721400	0	4965700	0	3069700	0	3960900
Q9Y6F9	WNT6	8264300	0	0	7166300	0	4424900	8029000	0	6304000	0	0	11871000	0	5584800	7816900	6801100	0	9388300
Q9Y6N6	LAMC3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1462100	0

Supplementary Table 2: List of protein interacting with FBLN2, using PSICQUIC web interface

From	To	Species	David Gene Name
ACAN	176	Homo sapiens	aggrecan(ACAN)
ATN1	1822	Homo sapiens	atrophin 1(ATN1)
BCAN	63827	Homo sapiens	brevican(BCAN)
COL18A1	80781	Homo sapiens	collagen type XVIII alpha 1 chain(COL18A1)
COL4A1	1282	Homo sapiens	collagen type IV alpha 1 chain(COL4A1)
COL4A2	1284	Homo sapiens	collagen type IV alpha 2 chain(COL4A2)
COL4A3	1285	Homo sapiens	collagen type IV alpha 3 chain(COL4A3)
COL4A4	1286	Homo sapiens	collagen type IV alpha 4 chain(COL4A4)
COL4A5	1287	Homo sapiens	collagen type IV alpha 5 chain(COL4A5)
COL4A6	1288	Homo sapiens	collagen type IV alpha 6 chain(COL4A6)
COL8A1	1295	Homo sapiens	collagen type VIII alpha 1 chain(COL8A1)
ELN	2006	Homo sapiens	elastin(ELN)
EMILIN1	11117	Homo sapiens	elastin microfibril interfacier 1(EMILIN1)
FBLN2	2199	Homo sapiens	fibulin 2(FBLN2)
FBN1	2200	Homo sapiens	fibrillin 1(FBN1)
FBN2	2201	Homo sapiens	fibrillin 2(FBN2)
FBXW5	54461	Homo sapiens	F-box and WD repeat domain containing 5(FBXW5)
FN1	2335	Homo sapiens	fibronectin 1(FN1)
HOXA1	3198	Homo sapiens	homeobox A1(HOXA1)
HSD3B7	80270	Homo sapiens	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7(HSD3B7)
HSPG2	3339	Homo sapiens	heparan sulfate proteoglycan 2(HSPG2)
ITGB3	3690	Homo sapiens	integrin subunit beta 3(ITGB3)
JOSD1	9929	Homo sapiens	Josephin domain containing 1(JOSD1)
LAMA1	284217	Homo sapiens	laminin subunit alpha 1(LAMA1)
LAMA5	3911	Homo sapiens	laminin subunit alpha 5(LAMA5)
LAMC2	3918	Homo sapiens	laminin subunit gamma 2(LAMC2)
LCE3D	84648	Homo sapiens	late cornified envelope 3D(LCE3D)
MFAP1	4236	Homo sapiens	microfibril associated protein 1(MFAP1)
MFAP2	4237	Homo sapiens	microfibril associated protein 2(MFAP2)
MFAP3	4238	Homo sapiens	microfibril associated protein 3(MFAP3)
MFAP4	4239	Homo sapiens	microfibril associated protein 4(MFAP4)
MFAP5	8076	Homo sapiens	microfibril associated protein 5(MFAP5)
NID1	4811	Homo sapiens	nidogen 1(NID1)
NUFIP2	57532	Homo sapiens	nuclear FMR1 interacting protein 2(NUFIP2)
OTX1	5013	Homo sapiens	orthodenticle homeobox 1(OTX1)
PRELP	5549	Homo sapiens	proline and arginine rich end leucine rich repeat protein(PRELP)
TFAP2C	7022	Homo sapiens	transcription factor AP-2 gamma(TFAP2C)
TNKS2	80351	Homo sapiens	tankyrase 2(TNKS2)
VCAN	1462	Homo sapiens	versican(VCAN)
VTN	7448	Homo sapiens	vitronectin(VTN)
ZNF408	79797	Homo sapiens	zinc finger protein 408(ZNF408)
ZNF414	84330	Homo sapiens	zinc finger protein 414(ZNF414)
ZYX	7791	Homo sapiens	zyxin(ZYX)

Supplementary Table 3: List of protein interacting with EFEMP1, using PSICQUIC web interface

From	To	Species	David Gene Name
ANAPC11	51529	Homo sapiens	anaphase promoting complex subunit 11(ANAPC11)
ANG	283	Homo sapiens	angiogenin(ANG)
ANXA2	302	Homo sapiens	annexin A2(ANXA2)
ANXA3	306	Homo sapiens	annexin A3(ANXA3)
ANXA5	308	Homo sapiens	annexin A5(ANXA5)
APOD	347	Homo sapiens	apolipoprotein D(APOD)
ARAF	369	Homo sapiens	A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase(ARAF)
ATN1	1822	Homo sapiens	atrophin 1(ATN1)
ATXN7	6314	Homo sapiens	ataxin 7(ATXN7)
AZGP1	563	Homo sapiens	alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding(AZGP1)
BAG4	9530	Homo sapiens	BAG cochaperone 4(BAG4)
BAG5	9529	Homo sapiens	BAG cochaperone 5(BAG5)
BAG6	7917	Homo sapiens	BAG cochaperone 6(BAG6)
BIN2	51411	Homo sapiens	bridging integrator 2(BIN2)
CACNA1A	773	Homo sapiens	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A(CACNA1A)
CACNA1C	775	Homo sapiens	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C(CACNA1C)
CALR	811	Homo sapiens	calreticulin(CALR)
CIT	11113	Homo sapiens	citron rho-interacting serine/threonine kinase(CIT)
CLPP	8192	Homo sapiens	caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit(CLPP)
CRTAC1	55118	Homo sapiens	cartilage acidic protein 1(CRTAC1)
CRYBA4	1413	Homo sapiens	crystallin beta A4(CRYBA4)
CYSRT1	375791	Homo sapiens	cysteine rich tail 1(CYSRT1)
DDIAS	220042	Homo sapiens	DNA damage induced apoptosis suppressor(DDIAS)
DNAJC10	54431	Homo sapiens	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C10(DNAJC10)
DSCR9	257203	Homo sapiens	Down syndrome critical region 9(DSCR9)
DYRK1A	1859	Homo sapiens	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A(DYRK1A)
E4F1	1877	Homo sapiens	E4F transcription factor 1(E4F1)
ECM1	1893	Homo sapiens	extracellular matrix protein 1(ECM1)
EGFL7	51162	Homo sapiens	EGF like domain multiple 7(EGFL7)
ELN	2006	Homo sapiens	elastin(ELN)
EMILIN1	11117	Homo sapiens	elastin microfibril interfacier 1(EMILIN1)
ENG	2022	Homo sapiens	endoglin(ENG)
ENO1	2023	Homo sapiens	enolase 1(ENO1)
ERRFI1	54206	Homo sapiens	ERBB receptor feedback inhibitor 1(ERRFI1)
ESR2	2100	Homo sapiens	estrogen receptor 2(ESR2)
FAM110A	83541	Homo sapiens	family with sequence similarity 110 member A(FAM110A)
FBLN1	2192	Homo sapiens	fibulin 1(FBLN1)
FBN1	2200	Homo sapiens	fibrillin 1(FBN1)
FBN2	2201	Homo sapiens	fibrillin 2(FBN2)
GFI1B	8328	Homo sapiens	growth factor independent 1B transcriptional repressor(GFI1B)
GLI4	2738	Homo sapiens	GLI family zinc finger 4(GLI4)
GPX1	2876	Homo sapiens	glutathione peroxidase 1(GPX1)
HOXA1	3198	Homo sapiens	homeobox A1(HOXA1)
HSD3B7	80270	Homo sapiens	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7(HSD3B7)
HSP90B1	7184	Homo sapiens	heat shock protein 90 beta family member 1(HSP90B1)
HSPA5	3309	Homo sapiens	heat shock protein family A (Hsp70) member 5(HSPA5)
HTRA1	5654	Homo sapiens	HtrA serine peptidase 1(HTRA1)
HTT	3064	Homo sapiens	huntingtin(HTT)
HYOU1	10525	Homo sapiens	hypoxia up-regulated 1(HYOU1)
IGFBP6	3489	Homo sapiens	insulin like growth factor binding protein 6(IGFBP6)
KHDRBS1	10657	Homo sapiens	KH RNA binding domain containing, signal transduction associated 1(KHDRBS1)
KRTAP19-2	337969	Homo sapiens	keratin associated protein 19-2(KRTAP19-2)
KRTAP21-2	337978	Homo sapiens	keratin associated protein 21-2(KRTAP21-2)
KRTAP6-1	337966	Homo sapiens	keratin associated protein 6-1(KRTAP6-1)
LAMB2	3913	Homo sapiens	laminin subunit beta 2(LAMB2)
LCE1C	353133	Homo sapiens	late cornified envelope 1C(LCE1C)
LCE2C	353140	Homo sapiens	late cornified envelope 2C(LCE2C)
LCE3A	353142	Homo sapiens	late cornified envelope 3A(LCE3A)
LCE3D	84648	Homo sapiens	late cornified envelope 3D(LCE3D)

LTBP1 [4052](#) Homo sapiens latent transforming growth factor beta binding protein 1(LTBP1)
 LTBP3 [4054](#) Homo sapiens latent transforming growth factor beta binding protein 3(LTBP3)
 MAGEA3 [4102](#) Homo sapiens MAGE family member A3(MAGEA3)
 MEOX2 [4223](#) Homo sapiens mesenchyme homeobox 2(MEOX2)
 MFAP1 [4236](#) Homo sapiens microfibril associated protein 1(MFAP1)
 MFAP2 [4237](#) Homo sapiens microfibril associated protein 2(MFAP2)
 MFAP3 [4238](#) Homo sapiens microfibril associated protein 3(MFAP3)
 MFAP4 [4239](#) Homo sapiens microfibril associated protein 4(MFAP4)
 MFAP5 [8076](#) Homo sapiens microfibril associated protein 5(MFAP5)
 MKRN3 [7681](#) Homo sapiens makorin ring finger protein 3(MKRN3)
 MOV10 [4343](#) Homo sapiens Mov10 RNA helicase(MOV10)
 MSRB3 [253827](#) Homo sapiens methionine sulfoxide reductase B3(MSRB3)
 NLGN3 [54413](#) Homo sapiens neuroligin 3(NLGN3)
 NOS3 [4846](#) Homo sapiens nitric oxide synthase 3(NOS3)
 NR4A3 [8013](#) Homo sapiens nuclear receptor subfamily 4 group A member 3(NR4A3)
 NUFIP2 [57532](#) Homo sapiens nuclear FMR1 interacting protein 2(NUFIP2)
 NXF1 [10482](#) Homo sapiens nuclear RNA export factor 1(NXF1)
 OCLN [100506658](#) Homo sapiens occludin(OCLN)
 OTX1 [5013](#) Homo sapiens orthodenticle homeobox 1(OTX1)
 P4HA1 [5033](#) Homo sapiens prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1(P4HA1)
 P4HB [5034](#) Homo sapiens prolyl 4-hydroxylase subunit beta(P4HB)
 PDIA3 [2923](#) Homo sapiens protein disulfide isomerase family A member 3(PDIA3)
 PDIA4 [9601](#) Homo sapiens protein disulfide isomerase family A member 4(PDIA4)
 POLR3C [10623](#) Homo sapiens RNA polymerase III subunit C(POLR3C)
 POLR3G [10622](#) Homo sapiens RNA polymerase III subunit G(POLR3G)
 PPIB [5479](#) Homo sapiens peptidylprolyl isomerase B(PPIB)
 PROP1 [5626](#) Homo sapiens PROP paired-like homeobox 1(PROP1)
 PUM1 [9698](#) Homo sapiens pumilio RNA binding family member 1(PUM1)
 RAF1 [5894](#) Homo sapiens Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase(RAF1)
 RCN1 [5954](#) Homo sapiens reticulocalbin 1(RCN1)
 RERE [473](#) Homo sapiens arginine-glutamic acid dipeptide repeats(RERE)
 RIC8A [60626](#) Homo sapiens RIC8 guanine nucleotide exchange factor A(RIC8A)
 SDF2L1 [23753](#) Homo sapiens stromal cell derived factor 2 like 1(SDF2L1)
 SERPINH1 [871](#) Homo sapiens serpin family H member 1(SERPINH1)
 SGTA [6449](#) Homo sapiens small glutamine rich tetratricopeptide repeat co-chaperone alpha(SGTA)
 SHANK3 [85358](#) Homo sapiens SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3(SHANK3)
 SHMT2 [6472](#) Homo sapiens serine hydroxymethyltransferase 2(SHMT2)
 SLPI [6590](#) Homo sapiens secretory leukocyte peptidase inhibitor(SLPI)
 SOCS6 [9306](#) Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 6(SOCS6)
 SP1 [6667](#) Homo sapiens Sp1 transcription factor(SP1)
 TFAP2C [7022](#) Homo sapiens transcription factor AP-2 gamma(TFAP2C)
 TGFB1 [7040](#) Homo sapiens transforming growth factor beta 1(TGFB1)
 TGFB2 [7042](#) Homo sapiens transforming growth factor beta 2(TGFB2)
 TIMP3 [7078](#) Homo sapiens TIMP metalloproteinase inhibitor 3(TIMP3)
 TMSB10 [9168](#) Homo sapiens thymosin beta 10(TMSB10)
 TNIP1 [10318](#) Homo sapiens TNFAIP3 interacting protein 1(TNIP1)
 TRAF2 [7186](#) Homo sapiens TNF receptor associated factor 2(TRAF2)
 TXNDC5 [81567](#) Homo sapiens thioredoxin domain containing 5(TXNDC5)
 UBQLN2 [29978](#) Homo sapiens ubiquilin 2(UBQLN2)
 UGGT1 [56886](#) Homo sapiens UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1(UGGT1)
 VTN [7448](#) Homo sapiens vitronectin(VTN)
 ZBTB9 [221504](#) Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 9(ZBTB9)
 ZNF136 [7695](#) Homo sapiens zinc finger protein 136(ZNF136)
 ZNF316 [100131017](#) Homo sapiens zinc finger protein 316(ZNF316)
 ZNF324 [25799](#) Homo sapiens zinc finger protein 324(ZNF324)
 ZNF358 [140467](#) Homo sapiens zinc finger protein 358(ZNF358)
 ZNF398 [57541](#) Homo sapiens zinc finger protein 398(ZNF398)
 ZNF408 [79797](#) Homo sapiens zinc finger protein 408(ZNF408)
 ZNF444 [55311](#) Homo sapiens zinc finger protein 444(ZNF444)
 ZNF460 [10794](#) Homo sapiens zinc finger protein 460(ZNF460)
 ZNF627 [199692](#) Homo sapiens zinc finger protein 627(ZNF627)
 ZNF628 [89887](#) Homo sapiens zinc finger protein 628(ZNF628)

ZNF646 [9726](#) Homo sapiens zinc finger protein 646(ZNF646)
ZNF669 [79862](#) Homo sapiens zinc finger protein 669(ZNF669)
ZNF696 [79943](#) Homo sapiens zinc finger protein 696(ZNF696)
ZNF747 [65988](#) Homo sapiens zinc finger protein 747(ZNF747)
ZNF768 [79724](#) Homo sapiens zinc finger protein 768(ZNF768)
ZNF778 [197320](#) Homo sapiens zinc finger protein 778(ZNF778)
ZNF791 [163049](#) Homo sapiens zinc finger protein 791(ZNF791)
ZSCAN21 [7589](#) Homo sapiens zinc finger and SCAN domain containing 21(ZSCAN21)

Supplementary Table 4: List of protein interacting with FBLN5, using PSICQUIC web interface

From	To	Species	David Gene Name
APPBP2	10513	Homo sapien	amyloid beta precursor protein binding protein 2(APPBP2)
ARID1B	57492	Homo sapien	AT-rich interaction domain 1B(ARID1B)
ASPH	444	Homo sapien	aspartate beta-hydroxylase(ASPH)
ATF7	11016	Homo sapien	activating transcription factor 7(ATF7)
ATN1	1822	Homo sapien	atrophin 1(ATN1)
CBX4	8535	Homo sapien	chromobox 4(CBX4)
CCDC8	83987	Homo sapien	coiled-coil domain containing 8(CCDC8)
CEP57	9702	Homo sapien	centrosomal protein 57(CEP57)
CHD8	57680	Homo sapien	chromodomain helicase DNA binding protein 8(CHD8)
CHEK1	1111	Homo sapien	checkpoint kinase 1(CHEK1)
CILP2	148113	Homo sapien	cartilage intermediate layer protein 2(CILP2)
COMMD3-BN	100532731	Homo sapien	COMMD3-BMI1 readthrough(COMMD3-BMI1)
CREB5	9586	Homo sapien	cAMP responsive element binding protein 5(CREB5)
CUL7	9820	Homo sapien	cullin 7(CUL7)
DGCR8	54487	Homo sapien	DGCR8 microprocessor complex subunit(DGCR8)
DISC1	27185	Homo sapien	DISC1 scaffold protein(DISC1)
DNAJC10	54431	Homo sapien	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C10(DNAJC10)
DUSP11	8446	Homo sapien	dual specificity phosphatase 11(DUSP11)
DYRK1A	1859	Homo sapien	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A(DYRK1A)
EED	8726	Homo sapien	embryonic ectoderm development(EED)
EFEMP2	30008	Homo sapien	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 2(EFEMP2)
EGFL7	51162	Homo sapien	EGF like domain multiple 7(EGFL7)
ELN	2006	Homo sapien	elastin(ELN)
EMILIN1	11117	Homo sapien	elastin microfibril interfacier 1(EMILIN1)
EMILIN2	84034	Homo sapien	elastin microfibril interfacier 2(EMILIN2)
EMILIN3	90187	Homo sapien	elastin microfibril interfacier 3(EMILIN3)
FAM120A	23196	Homo sapien	family with sequence similarity 120 member A(FAM120A)
FAM76B	143684	Homo sapien	family with sequence similarity 76 member B(FAM76B)
FBLN1	2192	Homo sapien	fibulin 1(FBLN1)
FBLN5	10516	Homo sapien	fibulin 5(FBLN5)
FBN1	2200	Homo sapien	fibrillin 1(FBN1)
FBN2	2201	Homo sapien	fibrillin 2(FBN2)
FGFR3	2261	Homo sapien	fibroblast growth factor receptor 3(FGFR3)
FOXF1	2294	Homo sapien	forkhead box F1(FOXF1)
FOXF2	2295	Homo sapien	forkhead box F2(FOXF2)
FOXG1	2290	Homo sapien	forkhead box G1(FOXG1)
FOKK1	221937	Homo sapien	forkhead box K1(FOKK1)
GDF11	10220	Homo sapien	growth differentiation factor 11(GDF11)
GFI1B	8328	Homo sapien	growth factor independent 1B transcriptional repressor(GFI1B)
GRN	2896	Homo sapien	granulin precursor(GRN)
GTSE1	51512	Homo sapien	G2 and S-phase expressed 1(GTSE1)
HIC2	23119	Homo sapien	HIC ZBTB transcriptional repressor 2(HIC2)
HOXA1	3198	Homo sapien	homeobox A1(HOXA1)
HOXB3	3213	Homo sapien	homeobox B3(HOXB3)
HOXC9	3225	Homo sapien	homeobox C9(HOXC9)
HRG	3273	Homo sapien	histidine rich glycoprotein(HRG)
IGFL3	388555	Homo sapien	IGF like family member 3(IGFL3)
IQCN	80726	Homo sapien	IQ motif containing N(IQCN)
IQSEC1	9922	Homo sapien	IQ motif and Sec7 domain ArfGEF 1(IQSEC1)
ITM2B	9445	Homo sapien	integral membrane protein 2B(ITM2B)
JUN	3725	Homo sapien	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit(JUN)
KIF18B	146909	Homo sapien	kinesin family member 18B(KIF18B)
KIF1B	23095	Homo sapien	kinesin family member 1B(KIF1B)

KLHDC2 [23588](#) Homo sapien kelch domain containing 2(KLHDC2)
KLHDC3 [116138](#) Homo sapien kelch domain containing 3(KLHDC3)
KRBA1 [84626](#) Homo sapien KRAB-A domain containing 1(KRBA1)
LAMA5 [3911](#) Homo sapien laminin subunit alpha 5(LAMA5)
LOX [4015](#) Homo sapien lysyl oxidase(LOX)
LOXL1 [4016](#) Homo sapien lysyl oxidase like 1(LOXL1)
LPA [4018](#) Homo sapien lipoprotein(a)(LPA)
LTBP1 [4052](#) Homo sapien latent transforming growth factor beta binding protein 1(LTBP1)
LTBP2 [4053](#) Homo sapien latent transforming growth factor beta binding protein 2(LTBP2)
MAGEA3 [4102](#) Homo sapien MAGE family member A3(MAGEA3)
MAP7 [9053](#) Homo sapien microtubule associated protein 7(MAP7)
MEOX2 [4223](#) Homo sapien mesenchyme homeobox 2(MEOX2)
MFAP1 [4236](#) Homo sapien microfibril associated protein 1(MFAP1)
MFAP2 [4237](#) Homo sapien microfibril associated protein 2(MFAP2)
MFAP3 [4238](#) Homo sapien microfibril associated protein 3(MFAP3)
MFAP4 [4239](#) Homo sapien microfibril associated protein 4(MFAP4)
MFAP5 [8076](#) Homo sapien microfibril associated protein 5(MFAP5)
NUFIP2 [57532](#) Homo sapien nuclear FMR1 interacting protein 2(NUFIP2)
OTX1 [5013](#) Homo sapien orthodenticle homeobox 1(OTX1)
PATZ1 [23598](#) Homo sapien POZ/BTB and AT hook containing zinc finger 1(PATZ1)
PAXIP1 [22976](#) Homo sapien PAX interacting protein 1(PAXIP1)
PCGF2 [7703](#) Homo sapien polycomb group ring finger 2(PCGF2)
PEAK1 [79834](#) Homo sapien pseudopodium enriched atypical kinase 1(PEAK1)
PHC3 [80012](#) Homo sapien polyhomeotic homolog 3(PHC3)
POLR1A [25885](#) Homo sapien RNA polymerase I subunit A(POLR1A)
POLR1E [64425](#) Homo sapien RNA polymerase I subunit E(POLR1E)
POLR2A [5430](#) Homo sapien RNA polymerase II subunit A(POLR2A)
POLR2I [5438](#) Homo sapien RNA polymerase II subunit I(POLR2I)
POLRMT [5442](#) Homo sapien RNA polymerase mitochondrial(POLRMT)
POM121 [9883](#) Homo sapien POM121 transmembrane nucleoporin(POM121)
PRNP [5621](#) Homo sapien prion protein (Kanno blood group)(PRNP)
PRR14L [253143](#) Homo sapien proline rich 14 like(PRR14L)
PRRC2B [84726](#) Homo sapien proline rich coiled-coil 2B(PRRC2B)
RAD54L2 [23132](#) Homo sapien RAD54 like 2(RAD54L2)
RBPMS2 [348093](#) Homo sapien RNA binding protein, mRNA processing factor 2(RBPMS2)
RECQL4 [9401](#) Homo sapien RecQ like helicase 4(RECQL4)
RECQL5 [9400](#) Homo sapien RecQ like helicase 5(RECQL5)
RNF11 [26994](#) Homo sapien ring finger protein 11(RNF11)
RPL10 [6134](#) Homo sapien ribosomal protein L10(RPL10)
SECISBP2L [9728](#) Homo sapien SECIS binding protein 2 like(SECISBP2L)
SEN5 [205564](#) Homo sapien SUMO specific peptidase 5(SEN5)
SLX4IP [128710](#) Homo sapien SLX4 interacting protein(SLX4IP)
SMOC1 [64093](#) Homo sapien SPARC related modular calcium binding 1(SMOC1)
SOD3 [6649](#) Homo sapien superoxide dismutase 3(SOD3)
SPRED1 [161742](#) Homo sapien sprouty related EVH1 domain containing 1(SPRED1)
ST14 [6768](#) Homo sapien ST14 transmembrane serine protease matriptase(ST14)
SUPT7L [9913](#) Homo sapien SPT7 like, STAGA complex subunit gamma(SUPT7L)
TAF9B [51616](#) Homo sapien TATA-box binding protein associated factor 9b(TAF9B)
TFAP2C [7022](#) Homo sapien transcription factor AP-2 gamma(TFAP2C)
TGFB1 [7040](#) Homo sapien transforming growth factor beta 1(TGFB1)
TKTL2 [84076](#) Homo sapien transketolase like 2(TKTL2)
TOP3B [8940](#) Homo sapien DNA topoisomerase III beta(TOP3B)
TRIM68 [55128](#) Homo sapien tripartite motif containing 68(TRIM68)
TRIP13 [9319](#) Homo sapien thyroid hormone receptor interactor 13(TRIP13)
TRMT2B [79979](#) Homo sapien tRNA methyltransferase 2 homolog B(TRMT2B)
TRMT61B [55006](#) Homo sapien tRNA methyltransferase 61B(TRMT61B)

TLL5 [23093](#) Homo sapien tubulin tyrosine ligase like 5(TLL5)
VTN [7448](#) Homo sapien vitronectin(VTN)
WFS1 [7466](#) Homo sapien wolframin ER transmembrane glycoprotein(WFS1)
YRDC [79693](#) Homo sapien yrdC N6-threonylcarbamoyltransferase domain containing(YRDC)
ZBED4 [9889](#) Homo sapien zinc finger BED-type containing 4(ZBED4)
ZBTB3 [79842](#) Homo sapien zinc finger and BTB domain containing 3(ZBTB3)
ZBTB34 [403341](#) Homo sapien zinc finger and BTB domain containing 34(ZBTB34)
ZBTB4 [57659](#) Homo sapien zinc finger and BTB domain containing 4(ZBTB4)
ZBTB44 [29068](#) Homo sapien zinc finger and BTB domain containing 44(ZBTB44)
ZBTB9 [221504](#) Homo sapien zinc finger and BTB domain containing 9(ZBTB9)
ZFP41 [286128](#) Homo sapien ZFP41 zinc finger protein(ZFP41)
ZIC2 [7546](#) Homo sapien Zic family member 2(ZIC2)
ZNF136 [7695](#) Homo sapien zinc finger protein 136(ZNF136)
ZNF235 [9310](#) Homo sapien zinc finger protein 235(ZNF235)
ZNF253 [56242](#) Homo sapien zinc finger protein 253(ZNF253)
ZNF273 [10793](#) Homo sapien zinc finger protein 273(ZNF273)
ZNF282 [8427](#) Homo sapien zinc finger protein 282(ZNF282)
ZNF320 [162967](#) Homo sapien zinc finger protein 320(ZNF320)
ZNF324 [25799](#) Homo sapien zinc finger protein 324(ZNF324)
ZNF331 [55422](#) Homo sapien zinc finger protein 331(ZNF331)
ZNF407 [55628](#) Homo sapien zinc finger protein 407(ZNF407)
ZNF408 [79797](#) Homo sapien zinc finger protein 408(ZNF408)
ZNF430 [80264](#) Homo sapien zinc finger protein 430(ZNF430)
ZNF440 [126070](#) Homo sapien zinc finger protein 440(ZNF440)
ZNF444 [55311](#) Homo sapien zinc finger protein 444(ZNF444)
ZNF45 [7596](#) Homo sapien zinc finger protein 45(ZNF45)
ZNF460 [10794](#) Homo sapien zinc finger protein 460(ZNF460)
ZNF492 [57615](#) Homo sapien zinc finger protein 492(ZNF492)
ZNF518A [9849](#) Homo sapien zinc finger protein 518A(ZNF518A)
ZNF550 [162972](#) Homo sapien zinc finger protein 550(ZNF550)
ZNF620 [253639](#) Homo sapien zinc finger protein 620(ZNF620)
ZNF627 [199692](#) Homo sapien zinc finger protein 627(ZNF627)
ZNF696 [79943](#) Homo sapien zinc finger protein 696(ZNF696)
ZNF724 [440519](#) Homo sapien zinc finger protein 724(ZNF724)
ZNF737 [100129842](#) Homo sapien zinc finger protein 737(ZNF737)
ZNF74 [7625](#) Homo sapien zinc finger protein 74(ZNF74)
ZNF746 [155061](#) Homo sapien zinc finger protein 746(ZNF746)
ZNF747 [65988](#) Homo sapien zinc finger protein 747(ZNF747)
ZNF76 [7629](#) Homo sapien zinc finger protein 76(ZNF76)
ZNF764 [92595](#) Homo sapien zinc finger protein 764(ZNF764)
ZNF77 [58492](#) Homo sapien zinc finger protein 77(ZNF77)
ZNF8 [7554](#) Homo sapien zinc finger protein 8(ZNF8)
ZNF865 [100507290](#) Homo sapien zinc finger protein 865(ZNF865)
ZXDB [158586](#) Homo sapien zinc finger X-linked duplicated B(ZXDB)

Supplementary Table 5: clinical paramaters (M, Male ; F, Female)

Samples	Sexe	Age	N AP	Etiology	Fibrose
1	M	49	P13029010		0
2	F	51	P14026829		0
3	M	53	P15009478		0
4	M	75	P15010587	Hemochromatose	0
5	M	66	P12034400		1
6 (Proteomic analysis)	M	71	P12034931		1
7 (Proteomic analysis)	M	61	P13005715	Alcohol	1
8	M	68	P13009179	Metaolic dosease	1
9 (Proteomic analysis)	M	83	P13017635		1
10	M	61	P14024403	Alcohol	1
11	M	82	P14034574	metabolic disease	1
12. (Proteomic analysis)	M	36	P15001904		1
13 (Proteomic analysis)	F	77	P15007824		1
14	M	83	P15025049	metabolic disease	1
15	M	68	P12014371	metabolic disease	2
16 (Proteomic analysis)	M	76	P13009557	Hemochromatosis	2
17	M	70	P14028363	Alcohol	2
18	M	73	P14029788	metabolic disease	2
19 (Proteomic analysis)	M	79	P14036268	metabolic disease	2
20 (Proteomic analysis)	M	63	P15013065	metabolic disease	2
21	M	62	P15026792	metabolic disease	2
22	M	77	P12001503		3
23 (Proteomic analysis)	M	65	P13003548	HBV	3
24 (Proteomic analysis)	M	74	P13004912		3
25 (Proteomic analysis)	M	76	P14029734		3
26	M	79	P15000181	metabolic disease	3
27	M	51	P15007373	HCV and Hemochromatosis	3
28 (Proteomic analysis)	M	66	P15014084	metabolic disease	3
29	M	75	P12009381	metabolic disease	4
30	M	65	P12025627		4
31 (Proteomic analysis)	M	78	P12025732	metabolic disease	4
32	M	74	P13000845	metabolic disease	4
33 (Proteomic analysis)	M	63	P13007385		4
34	M	78	P13007706		4
35	M	60	P13017146	metabolic disease and Alcohol	4
36	M	61	P13019435		4
37 (Proteomic analysis)	M	63	P13019853	metabolic disease and Alcohol	4
38	M	62	P13028220	metabolic disease and Alcohol	4
39	F	59	P13028903	HCV	4
40 (Proteomic analysis)	M	71	P14012334	metabolic disease	4
41	M	67	P14017011		4
42	F	59	P14019161	HCV	4
43	M	66	P14023922	metabolic disease and Alcohol	4
44	M	68	P14031173	metabolic disease	4
45	M	64	P14034140	metabolic disease	4
46	M	29	P14035553	HBV	4
47	M	86	P15004469		4
48	M	62	P15005382	Alcohol	4
49 (Proteomic analysis)	M	62	P15014383	metabolic disease	4
50 (Proteomic analysis)	M	71	P15015688	metabolic disease	4

Supplementary Table 6. Primary antibodies used for western blotting.

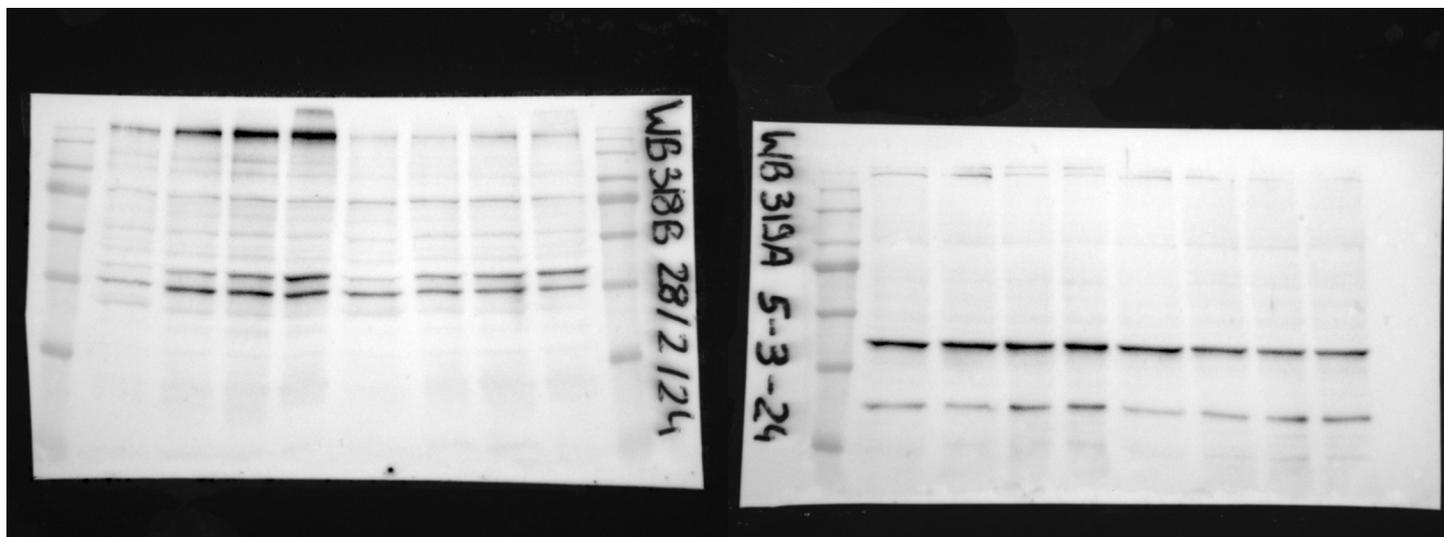
Antibody	Isotype	Dilution	Reference	Manufacturer
Anti Fibulin-2	Mouse	1/1000	sc-271843	Santa Cruz
Anti Fibulin-3	Mouse	1/1000	sc-33722	Santa Cruz
Anti p-Smad2	Rabbit	1/1000	#3101	Cell Signaling
Anti Smad2	Rabbit	1/1000	#3122	Cell Signaling
Anti p-Smad3	Rabbit	1/1000	#9520	Cell Signaling
Anti Smad3	Rabbit	1/1000	#9513	Cell Signaling
Anti p-FAK	Rabbit	1/1000	#3283	Cell Signaling
Anti FAK	Rabbit	1/1000	#3285	Cell Signaling
Anti Actin-HRP	Mouse	1/10000	A3854	Millipore Sigma

Supplementary Table 7: qRT-PCR primer sequences.

Gene	Species	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')
GAPDH	H. sapiens	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT
COL1A1	H. sapiens	GGTGGTGGTTATGACTTTGG	ATACAGGTTTCGCCAGTAGA
EFEMP1	H. sapiens	CAAAGTGAACACAACGTGTGC	TGCTCCCCTCGCTTCTGAT
FBLN2	H. sapiens	CAGGTGGCCTCTAACACCATC	CTGCTTGCAGGGTCCATTGT
FBLN5	H. sapiens	TCGCCAGTCAGGACAGTGT	AGTAGGGGTTTCGAGTAGGGC
FN1	H. sapiens	GAAGAGCGAGCCCCTGAT	GGGGTCTTTTGAAGTGTGGA
MMP9	H. sapiens	GGTGATTGACGACGCCTTTGC	CGCGACACCAAAGTGGATGAC
SERPINE1 (PAI1)	H. sapiens	CAACTTGCTTGGGAAAGGAG	GGCGTGGTGAAGTCAAGTAT
TIMP3	H. sapiens	TGGGTTGTAAGTCAAGATCAAG	GGTCCAGAGACTCGTTCT

siCTRL siFBLN2
24h 48h 72h 96h 24h 48h 72h 96h

siCTRL siEFEMP1
24h 48h 72h 96h 24h 48h 72h 96h

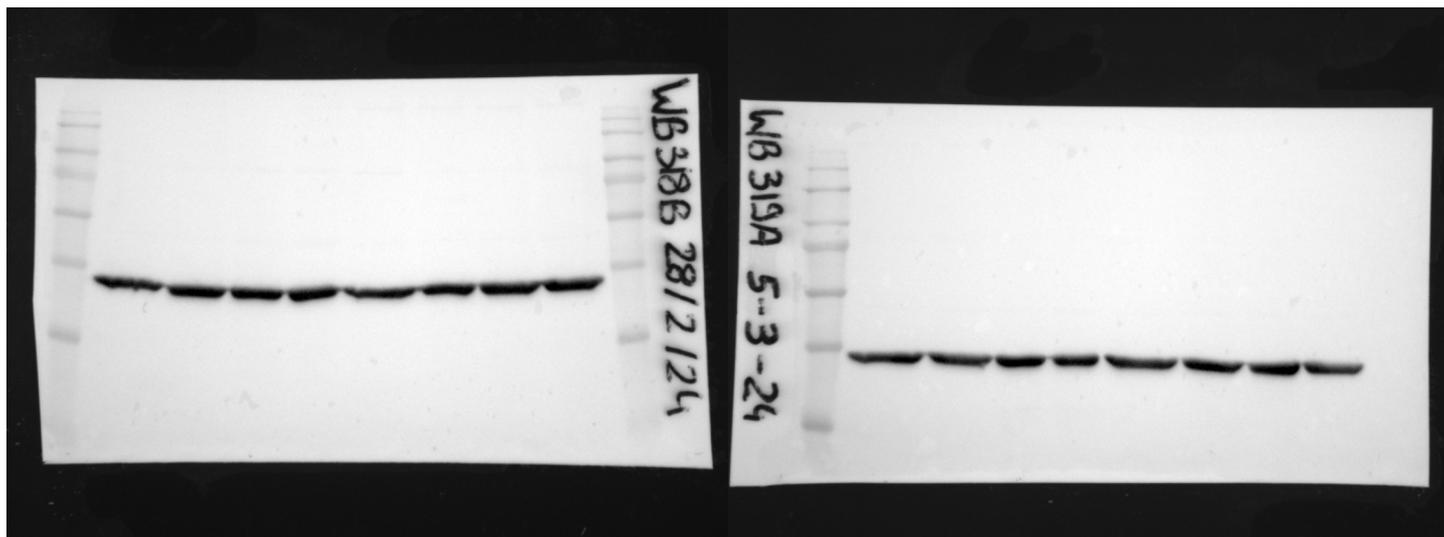


Fibulin-2

Fibulin-3

siCTRL siFBLN2
24h 48h 72h 96h 24h 48h 72h 96h

siCTRL siEFEMP1
24h 48h 72h 96h 24h 48h 72h 96h

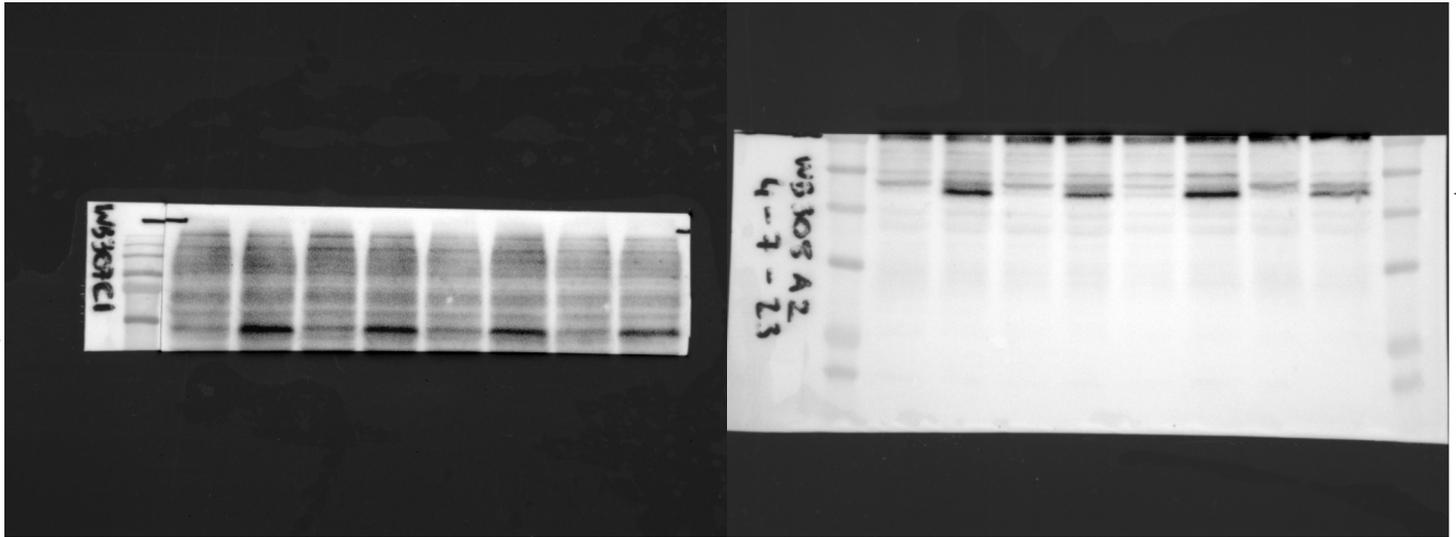


Actin

Actin

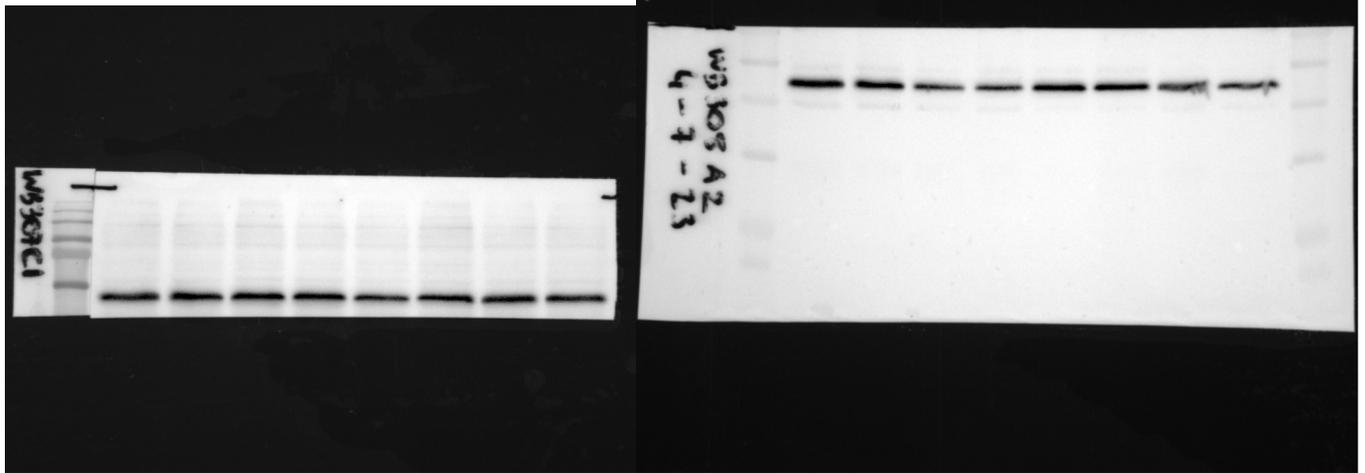
Figure 4 - uncut blots

Non Treated siCTRL siEFEMP1 siFBLN2 Non Treated siCTRL siEFEMP1 siFBLN2
 TGFβ - + - + - + - + TGFβ - + - + - + - +



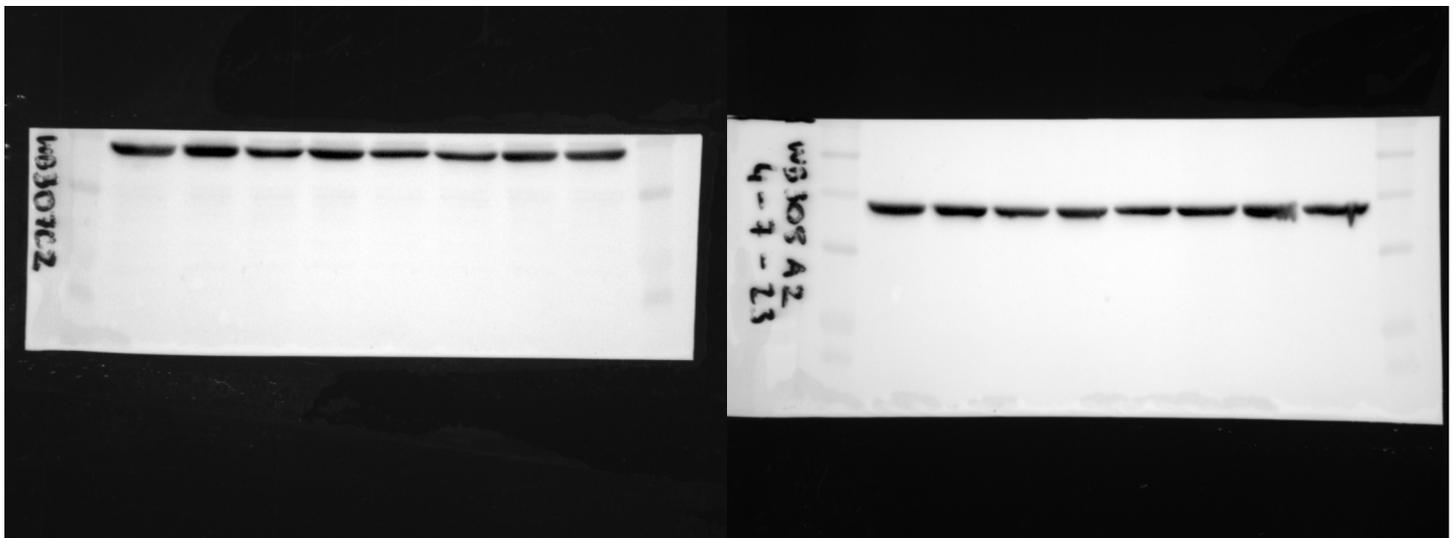
p-SMAD2

p-SMAD3



SMAD2

SMAD3



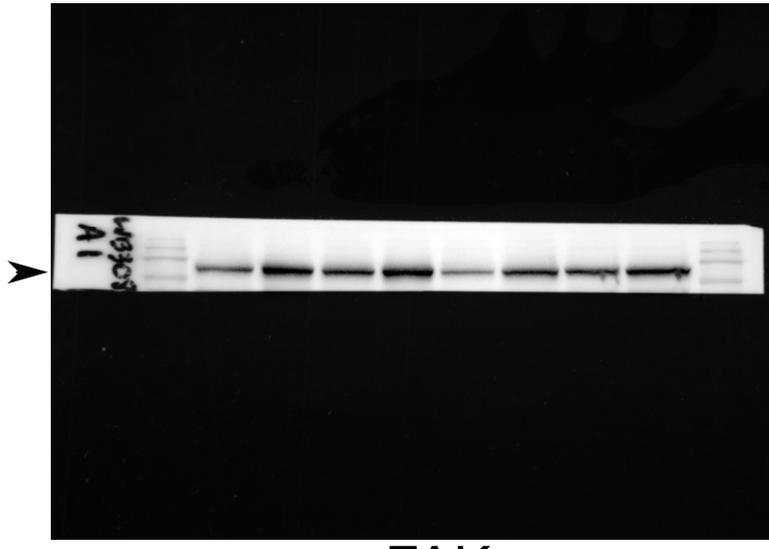
Actin

Actin

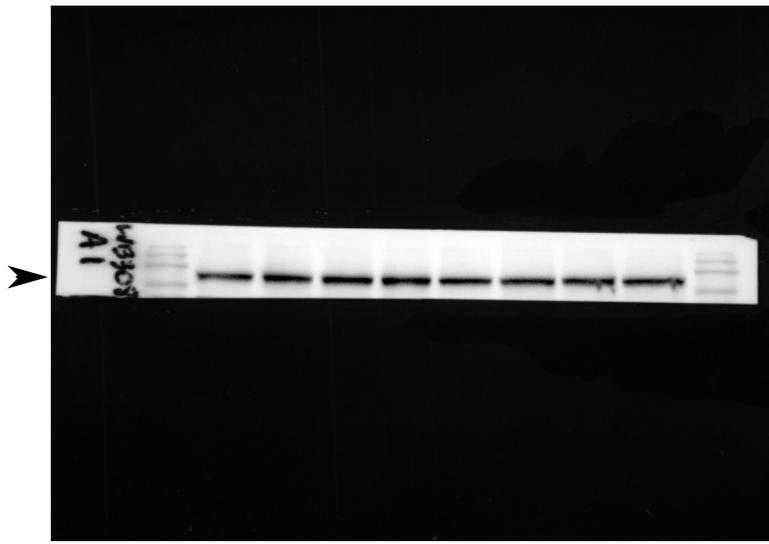
Figure 5 - uncut blots

Non
 Treated
 siCTRL
 siEFEMP1
 siFBLN2

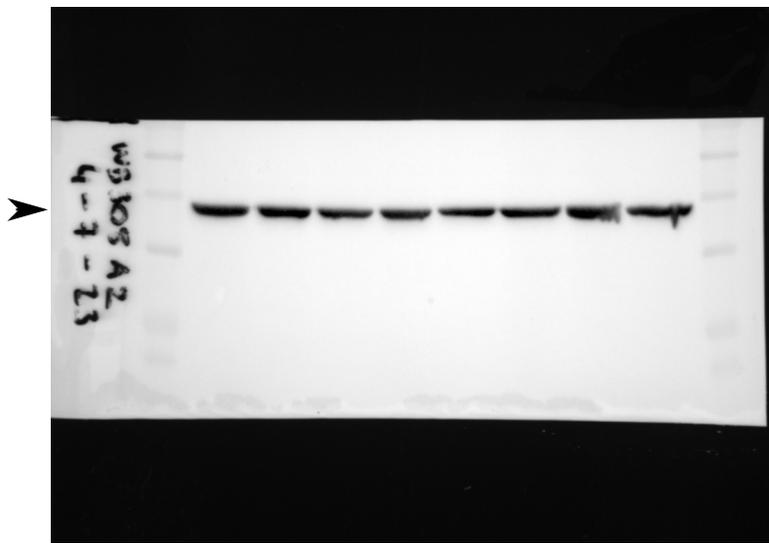
TGFβ - + - + - + - +



p-FAK



FAK



Actin

Figure 7 - uncut blots

B. Résultats supplémentaires

1. Tests d'immunolocalisation de la fibuline-3

Afin de localiser la fibuline-3 dans l'espace extracellulaire des cellules étoilées, nous avons réalisé plusieurs essais d'immunodétection de la protéine en cytologie. Pour ce faire, nous avons testé différents paramètres :

- Nous avons testé deux anticorps issus de deux fournisseurs différents aux concentrations recommandées :
 - Anti Fibulin-3 (mab3-5) #sc-33722 (Santa Cruz Biotechnology).
 - Anti Fibulin-3 (ou Anti EFEMP1) #HPA070841 (Atlas Antibodies).

- Nous avons également utilisé des protocoles d'immunomarquages différents :
 - Un protocole classique comprenant une étape de fixation au paraformaldéhyde à 4%, un blocage à l'albumine sérique bovine à 1%, une incubation à 4°C pendant environ 16h avec l'anticorps primaire et une incubation à température ambiante pendant 2h avec un anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome.
 - Un protocole de démasquage par la chaleur (recommandé par le fournisseur Atlas Antibodies) appelé *Heat-Induced Epitope Retrieval* (HIER). Après fixation des cellules, les lames sont immergées dans une solution acide de démasquage (10 mM acide citrique, 0.05% Tween-20, pH 6.0) à environ 95°C pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite lavées à l'eau déionisée et au PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Nous avons ensuite procédé aux étapes de blocage et d'incubation avec les anticorps.

- Nous avons testé ce marquage sur différentes cellules :
 - Les cellules COS7 surexprimant la fibuline-3 grâce à la transfection d'un vecteur d'expression (OE-EFEMP1), comparées à des cellules contrôles transfectées avec un vecteur vide (CTRL) (les vecteurs sont présentés dans la partie II des résultats).
 - Les cellules de la lignée LX-2.
 - Les cellules primaires CEFs.

Quels que soient les paramètres testés, nous n'avons pas réussi à visualiser de façon spécifique la fibuline-3 (**Figure 18**). Les essais réalisés avec l'anticorps HPA070841 présentent un marquage dans des structures intracellulaires. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à détecter des marquages dans le milieu extracellulaire des cellules étoilées du foie. Dans la littérature, il n'existe que très peu d'immunomarquages de la fibuline-3 en cytologie. Cette difficulté à visualiser la fibuline-3 peut s'expliquer par la qualité des anticorps actuellement commercialisés, une structure secondaire de la protéine spécifique empêchant l'accès aux épitopes ou encore une trop faible quantité de la protéine dans les échantillons.

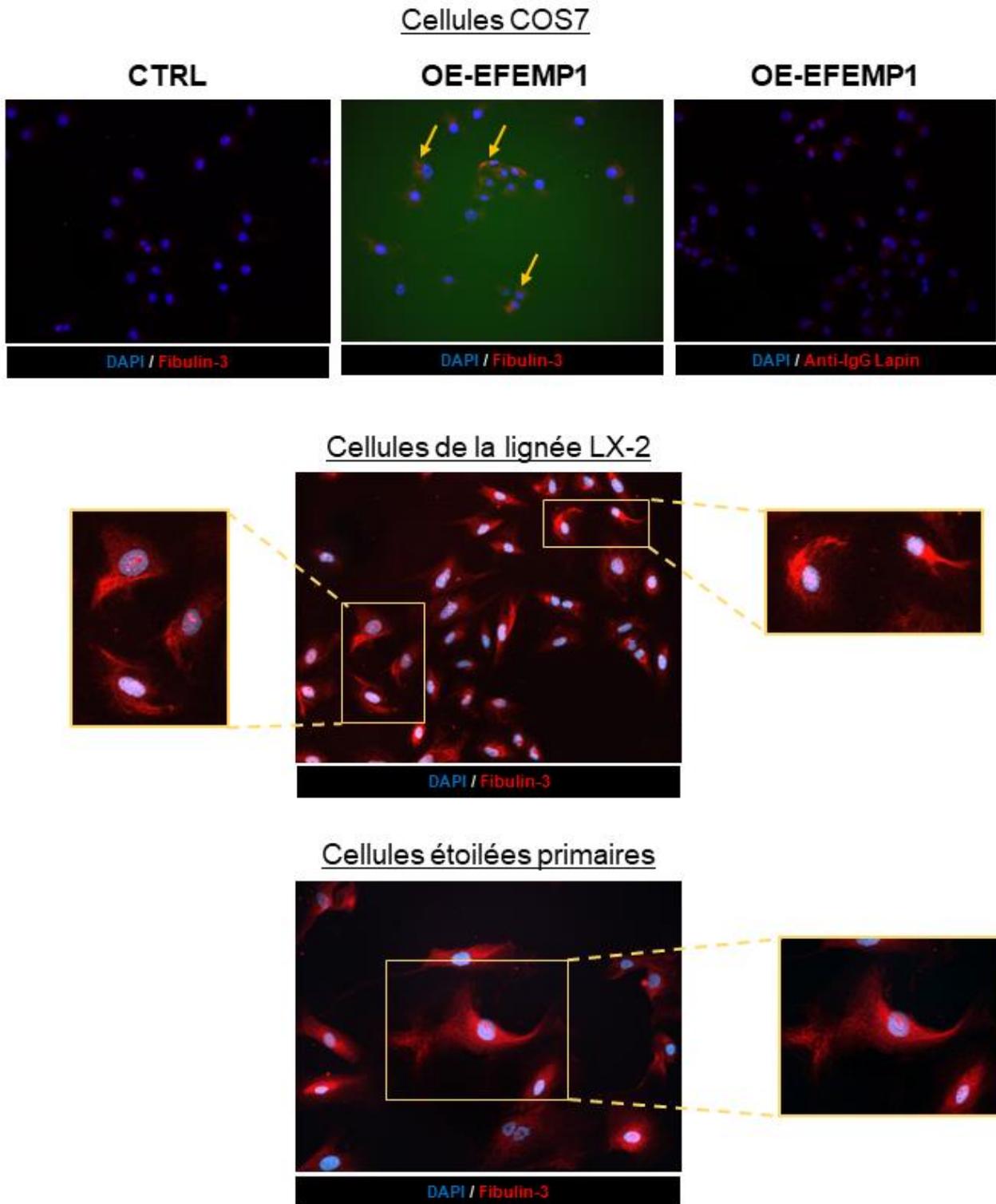


Figure 18. Tests d'immunolocalisation de la fibuline-3 avec l'anticorps HPA070841.

L'anticorps anti Fibulin-3 (HPA070841 ; Atlas Antibodies) a été testé sur différents types de cellules : les cellules de la lignée COS7 après transfection d'un vecteur de surexpression d'EFEMP1 (OE-EFEMP1) ou un vecteur vide (CTRL), les cellules de la lignée LX-2 et les cellules étoilées du foie humaines primaires. Après fixation, les échantillons ont subi un protocole de démasquage par la chaleur (HIER) afin de faciliter l'exposition des épitopes de la fibuline-3. L'anti-IgG Lapin a été utilisé comme contrôle négatif.

2. Expérimentations dans les CEFs primaires

Nous avons réalisé des expérimentations visant à valider dans des cultures primaires de cellules étoilées du foie humaines, les observations faites dans la lignée LX-2 dérivée de CEFs primaires humaines. Nous avons de plus tiré parti de ces expérimentations pour tester l'effet de la réduction de l'expression de la fibuline-3 sur le processus de sénescence.

Résultats

Validation de l'efficacité des transfections des siEFEMP1 et siFBLN2 dans la culture primaire de CEFs.

En suivant le même protocole de transfection réalisé dans les cellules LX-2, les CEFs primaires ont été transfectées avec des siRNAs dirigés contre les gènes *EFEMP1* ou *FBLN2* puis stimulées par un traitement au TGF- β (5ng/ml) pendant 16h. Les analyses ont ensuite été réalisées 96h après la transfection. L'efficacité de la transfection a été validée par western blot : la transfection du siFBLN2 réduit de façon significative la quantité de protéine fibuline-2, tandis que la diminution des niveaux protéiques de la fibuline-3 observable de façon qualitative avec le siEFEMP1 n'est pas significative (**Figure 19A**).

Il est intéressant de noter les effets du traitement au TGF- β sur l'expression des deux fibulines. Après stimulation des cellules, la quantité de fibuline-2 augmente de façon significative dans la condition siEFEMP1 en comparaison aux cellules non-traitées. Par ailleurs, l'expression de la fibuline-3 augmente après traitement au TGF- β dans toutes les conditions mais de façon non-significative.

De façon remarquable, des changements phénotypiques importants sont à noter après les transfections des siRNAs. Dans nos trois réplicats biologiques, nous avons pu observer au microscope que les CEFs siEFEMP1 présentent un phénotype plus arrondi et se décollent (**Figure 19B**). En prenant en compte les observations faites avec les cellules LX-2, ces résultats peuvent être interprétés par une perte d'adhésion importante suite à la diminution de l'expression de la fibuline-3 dans les cellules primaires. Les cellules siFBLN2 se démarquent également des cellules contrôles par un étalement plus important et un contour moins réfringent.

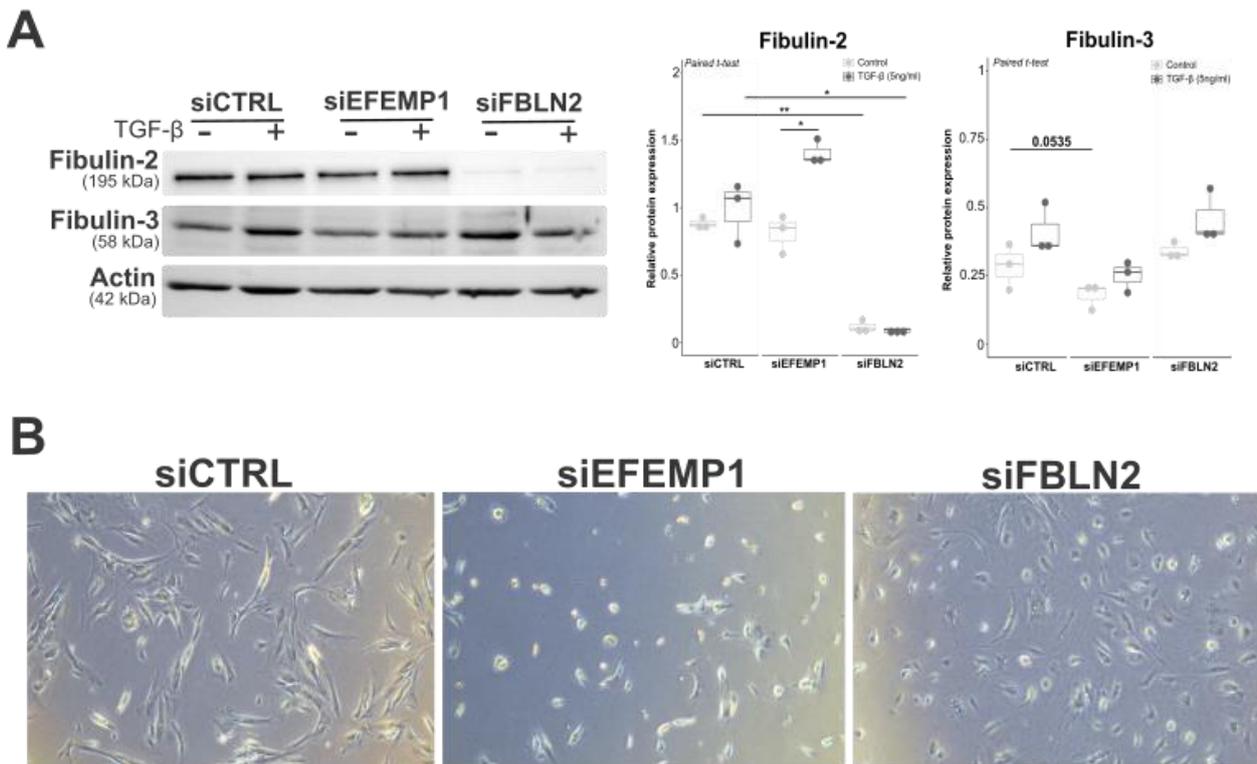


Figure 19. Transfection de siRNA dans les cellules étoilées primaires.

A. Panel de gauche. Analyse en western blot des CEFs primaires transfectées par les siRNA contrôles (siCTRL), siEFEMP1 ou siFBLN2. Les extraits protéiques ont été récupérés 96h après la transfection et 20 μ g de protéines ont été déposés dans un gel SDS-PAGE à 10%.

Panel de droite. Quantifications des niveaux des protéines fibuline-2 et fibuline-3 réalisées à partir des western blot issus de trois expérimentations indépendantes. Les différences statistiques ont été évaluées avec un test païré paramétrique de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

B. Culture des CEFs primaires 96h après la transfection. Images obtenues en contraste de phase à un grossissement de 4X représentatives de trois expérimentations indépendantes.

Effets de la diminution de l'expression des fibulines 2 et 3 dans les CEFs primaires sur le réseau de fibres de stress.

Comme observé dans la lignée LX-2, la diminution de l'expression de la fibuline-3 dans les CEFs primaires cultivées sur plastique impacte l'organisation du cytosquelette d'actine. Les cellules siEFEMP1 sont plus petites et moins étalées que les cellules siCTRL, avec un marquage d'actine plus dense en périphérie (**Figure 20A**, panel gauche). Néanmoins, l'altération du réseau des fibres d'actine induit par la transfection du siEFEMP1 semble moins importante que celle observée précédemment dans la lignée LX-2. Bien que non-significative, la mesure de l'aire des noyaux indique une diminution de la taille des noyaux des cellules invalidées pour *EFEMP1* en comparaison aux noyaux des cellules contrôles (**Figure 20A**, panel droit). La stimulation des cellules par le traitement TGF- β induit la formation et la maturation des fibres de stress dans les cellules contrôles ainsi que dans les cellules siEFEMP1, de façon similaire aux résultats obtenus dans les cellules LX-2. Les CEFs siFBLN2 présentent un phénotype plus étalé que les cellules contrôles avec des fibres de stress organisées et des noyaux légèrement plus grands (différence non significative).

Contrairement aux précédentes observations obtenues dans les cellules LX-2, la culture des cellules primaires sur collagène de type I semble prévenir des différences phénotypiques observées sur plastique (**Figure 20B**). Les cellules des conditions contrôle, siEFEMP1 et siFBLN2 présentent des réseaux de fibres de stress similaires avec peu d'impact sur la taille des noyaux. Il est probable que l'adhésion des cellules primaires sur le collagène de type I induit une activation des systèmes d'adhésion, notamment par les intégrines, plus forte en comparaison aux cellules de la lignée LX-2, entraînant la formation de fibres de stress et prévenant l'apparition des changements phénotypiques.

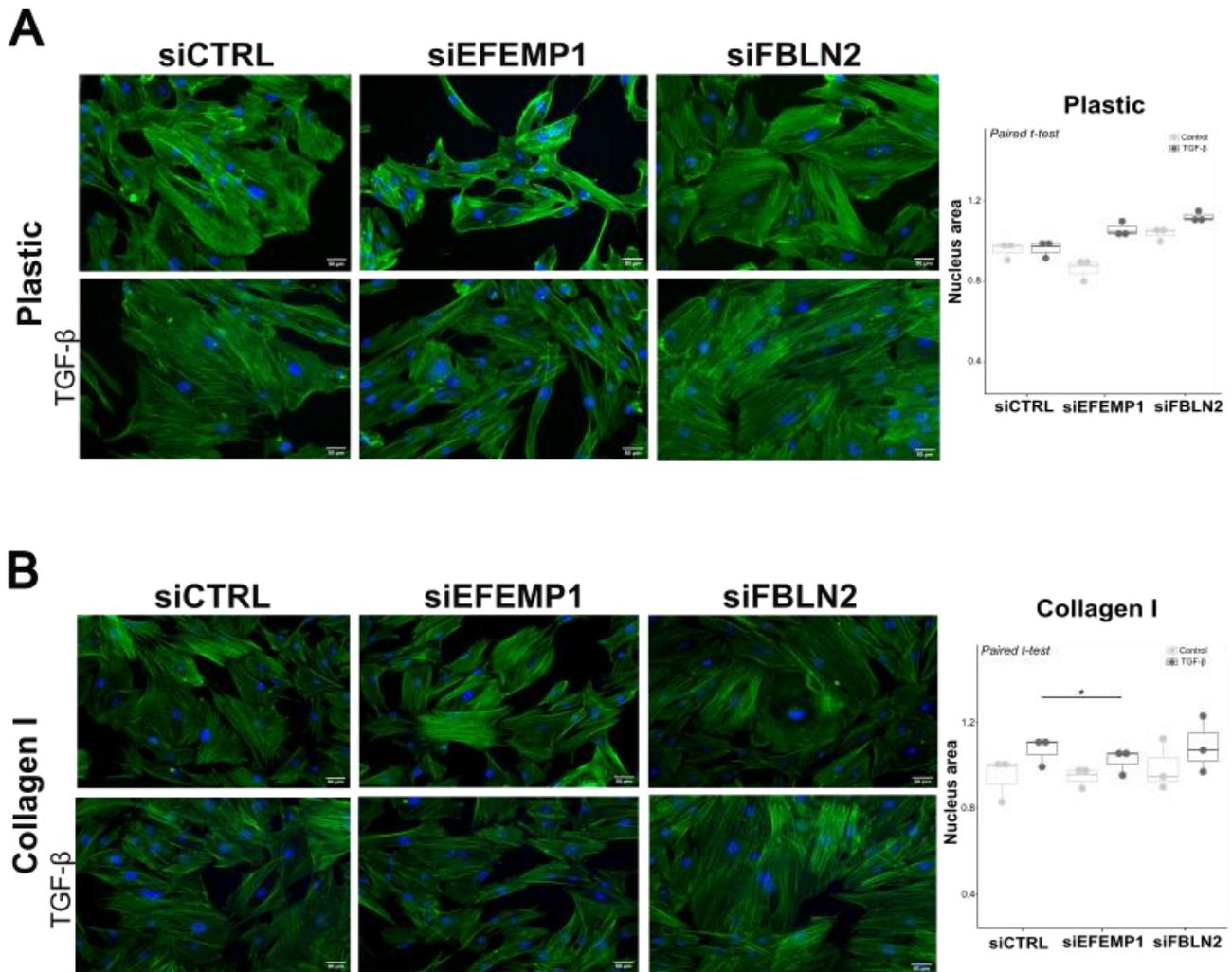


Figure 20. Effet de l'inactivation des fibulines 2 et 3 sur le réseau de fibres de stress des CEFs primaires.

Panels de gauche. Marquage des CEFs primaires transfectées par siCTRL, siEFEMP1 ou siFBLN2 cultivées sur plastique (A) ou sur collagène de type I (B) et traitées ou non avec 5 ng/ml de TGF- β pendant 16h. La détection de l'actine fibrillaire est réalisée grâce à la Phalloïdine - Alexa Fluor 488 (vert) et les noyaux sont colorés par le Hoechst-33342 (bleu). Des champs représentatifs de trois expérimentations indépendantes sont présentés. Barre d'échelle = 50 μ m.

Panels de droite. Moyennes des aires projetées des noyaux calculées à partir de trois expérimentations indépendantes et utilisées pour comparer la taille des noyaux. Les différences statistiques ont été évaluées avec un test païré paramétrique de Student (* $p < 0.05$).

La diminution de l'expression de la fibuline-3 semble stimuler la sénescence dans les CEFs primaires.

La fibuline-3 a initialement été identifiée comme un marqueur de la sénescence cellulaire dans les fibroblastes issus d'un patient atteint du syndrome de Werner (Lecka-Czernik et al., 1995). Comme nous l'avons exposé dans l'introduction, le phénomène de sénescence des CEFs est un processus important dans la résolution de la fibrose hépatique. Nous avons ainsi testé l'effet de la déficience en fibuline-3 dans les cellules étoilées sur le processus de sénescence cellulaire. Sachant que les cellules de la lignée immortalisée LX-2 n'entrent pas spontanément en sénescence répliquative, elles ne constituent donc pas un modèle judicieux pour étudier la sénescence ; nous avons tiré parti du modèle de cellules primaires pour réaliser cette analyse.

Compte tenu du décollement de cellules observé après l'inactivation de l'expression d'*EFEMP1*, nous avons mesuré le pourcentage de cellules sénescents en fonction du nombre de cellules ensemencées au départ, qui est ainsi le même pour toutes les conditions. Dans la condition si*EFEMP1*, nous observons une plus grande proportion de cellules sénescents cultivées sur plastique en comparaison avec la condition contrôle (**Figure 21A**). Dans la condition si*FBLN2*, le pourcentage de cellules sénescents est similaire à celui observé dans les cellules contrôles. En cohérence avec les observations faites précédemment, la proportion de cellules sénescents est moins importante lorsque les cellules sont cultivées sur collagène de type I mais cette proportion reste plus élevée dans la condition si*EFEMP1* (**Figure 21B**). Néanmoins, ces résultats restent préliminaires car nous n'avons pas pu analyser la totalité des cellules (dont certaines se sont décollées) dans la condition si*EFEMP1* nous empêchant de conclure sur une potentielle implication de la fibuline-3 dans la sénescence des CEFs.

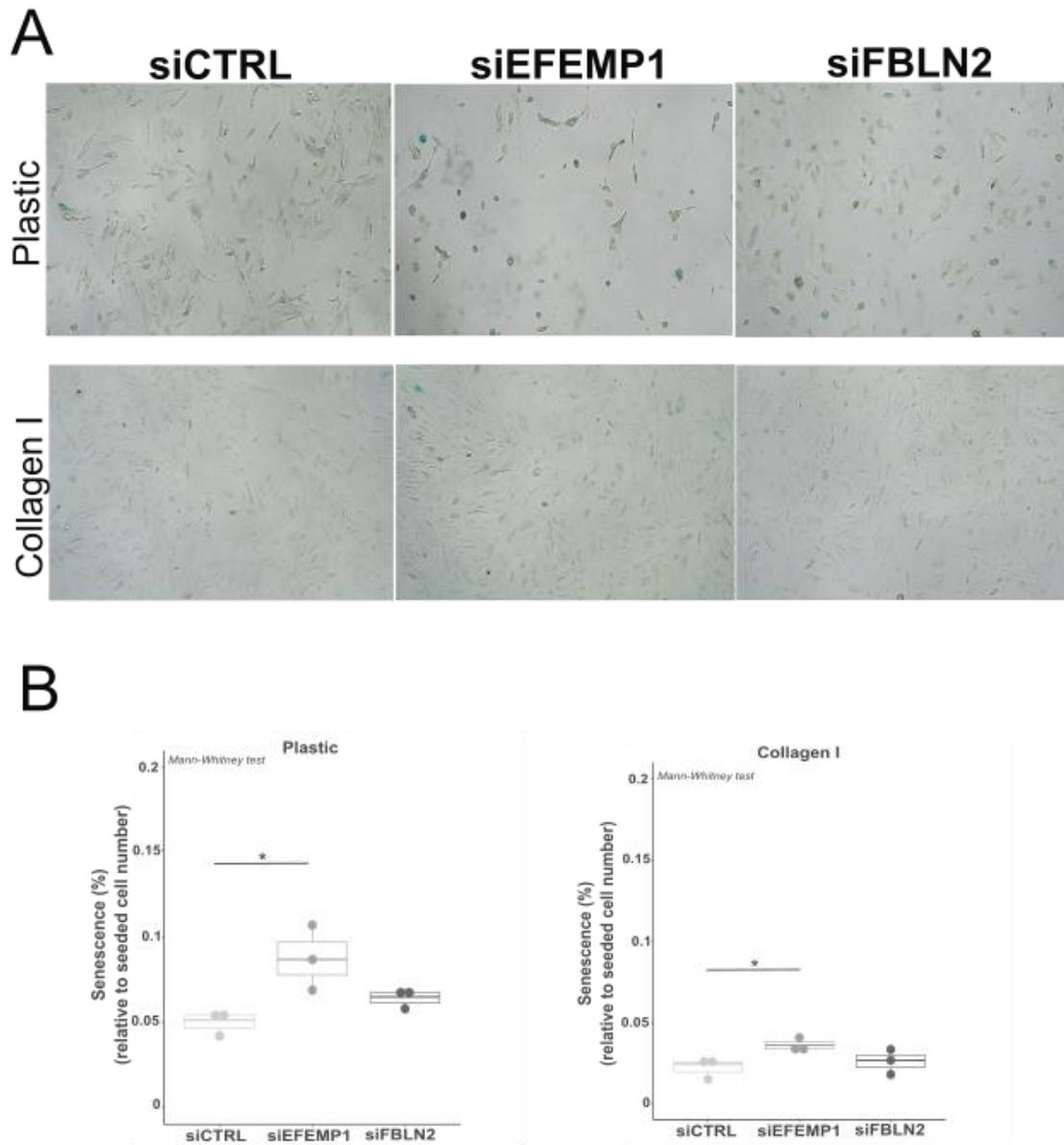


Figure 21. La diminution de la fibuline-3 semble induire la sénescence dans les CEFs primaires.

A. Après culture sur plastique ou sur collagène de type I, les CEFs primaires sont fixées puis marquées avec une solution de β -galactosidase contenant le substrat X-gal. La visualisation des cellules sénescents (bleues) est réalisée au microscope à contraste de phase à un grossissement de 4X.

B. Quantification du pourcentage de cellules sénescents, exprimant la β -galactosidase (cellules bleues), relatif au nombre de cellules ensemencées. Le comptage des cellules sénescents a été réalisé à partir de dix champs par condition, recouvrant la totalité du puits. Les différences statistiques ont été évaluées avec un test non-paramétrique de Mann-Whitney (* $p < 0.05$).

Discussion

Au cours de nos expérimentations sur les CEFs humaines primaires, nous avons observé l'apparition de changements phénotypiques avec notamment un décollement des cellules dans la condition siEFEMP1. Il serait nécessaire d'évaluer ce décollement en quantifiant les cellules dans le milieu de culture par exemple, nous permettant ainsi de mesurer l'impact réel de l'invalidation de la fibuline-3 sur la totalité des CEFs primaires. Par ailleurs, l'extraction protéique des cellules encore adhérentes indiquent une faible efficacité de la transfection. Pour rappel, la réduction de l'expression de la fibuline-3 dans la lignée LX-2 perturbe les complexes d'adhésion focaux des cellules. Ainsi, il est possible que la perte de la fibuline-3 dans la culture primaire altère de façon plus significative l'adhésion des cellules étoilées, entraînant leur décollement. Nous émettons l'hypothèse que les cellules où l'efficacité de la transfection est moindre et où l'expression de la fibuline-3 est encore importante sont donc les cellules adhérentes analysées dans cette partie de l'étude. Cette hypothèse pourrait ainsi expliquer les différences observées sur le réseau de fibres de stress dans la culture primaire avec notre étude dans la lignée LX-2.

Il est intéressant de noter que la culture des CEFs invalidées sur collagène de type I semble prévenir l'apparition de changements phénotypiques et notamment, le décollement des cellules siEFEMP1. Notre hypothèse est que, dans les cellules primaires, les modes d'adhésion dépendants du collagène de type I seraient suffisamment forts pour contrer les effets de l'invalidation de la fibuline-3 et prévenir le décollement des cellules.

Bien que l'interprétation de nos résultats soient compliqués de par le décollement des cellules, nos résultats préliminaires suggèrent que la diminution de l'expression de la fibuline-3 est associée à une plus forte sénescence. Cette observation peut paraître incohérente avec la publication princeps qui a identifié une plus forte expression d'*EFEMP1* dans des fibroblastes sénescents (Lecka-Czernik et al., 1995). Cependant, les auteurs démontrent également que la surexpression de certaines isoformes d'*EFEMP1* promeut la réplication de l'ADN, suggérant une induction de la prolifération, avec, de façon très intéressante, un effet paracrine sur les cellules voisines. Cette publication montre aussi que la combinaison de certaines formes, synthétisées à partir de différents codons d'initiation, peut neutraliser cette régulation négative de la sénescence. Nos résultats devront donc être confirmés en analysant la population cellulaire totale, y compris les cellules décollées présentes dans les milieux des cultures, ce qui nous permettra de réellement caractériser le rôle de la fibuline-3 dans la sénescence des CEFs.

II. Caractérisation de la relation entre la fibuline-3 et ADAMTS5

A. Introduction

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau de molécules complexe et tridimensionnel, essentiel au maintien de l'homéostasie tissulaire et cellulaire. Sa structure et sa composition évoluent en fonction des besoins des tissus et cellules qu'elle entoure, mais également sous l'influence de certains processus cellulaires (Karamanos et al., 2021). Ce remodelage met en œuvre un équilibre dynamique entre la production, la dégradation et la modification post-traductionnelle de ses composants, contribuant ainsi à la morphogenèse des organes, à la réparation tissulaire ou à la progression de certaines pathologies (Bonnans et al., 2014). Le remodelage de la MEC permet la modulation de ses propriétés chimiques et mécaniques. Les mécanismes de remodelage sont notamment médiés par une large variété d'enzymes, impliquées dans l'assemblage, la maturation, le clivage et la dégradation des protéines de la matrice. Parmi ces enzymes, les protéases sont impliquées dans le clivage et la maturation des protéines de la MEC, ainsi que dans leur dégradation.

Les Adamalysines font partie de la superfamille des metzincines et représentent une grande famille de protéases matricielles impliquées dans le clivage de nombreuses molécules de la MEC (Seals & Courtneidge, 2003). Cette famille, très conservée au cours de l'évolution, regroupe actuellement 20 protéines ADAMs (*A Disintegrin and Metalloproteinase*), 19 ADAMTSs (*ADAMs with Thrombospondin motifs*) et 7 ADAMTSLs (*ADAMTS-Like*) chez l'humain. Elles partagent une organisation en multi-domaines avec un peptide signal, un prodomaine, un domaine métalloprotéinase, un domaine désintégrine et une région riche en cystéines (**Figure 22**) (Théret et al., 2021). Contrairement aux ADAMs trans-membranaires, les ADAMTSs sont toutes sécrétées dans le milieu extracellulaire et possèdent un domaine auxiliaire en position C-terminal constitué de répétitions de domaines Thrombospondines de type 1 et d'un module spacer (Apte, 2020; Kelwick et al., 2015; Mead & Apte, 2018). Les ADAMTSLs sont dépourvues de domaine catalytique et ne possèdent pas d'activité enzymatique connue. La sous-famille des ADAMTSs est divisée en sous-groupes selon leurs fonctions et leurs substrats : les aggrécánases et protéoglycanases (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15 et 20), les N-propeptidases pro-collagénases (ADAMTS2, 3 et 14), les protéinases COMP (*Cartilage Oligomeric Matrix Proteinase*) (ADAMTS7 et 12) et la protéinase du facteur de von Willebrand (ADAMTS13). Les autres ADAMTSs (6, 10, 16, 17, 18 et 19) ont historiquement été

rassemblées dans un sous-groupe nommé « orphelin » mais certaines ont récemment été associées au clivage de la fibrilline et de la fibronectine (Rose et al., 2021). Le domaine auxiliaire des ADAMTSs est essentiel pour leur activité enzymatique ainsi que pour assurer la spécificité de leur liaison avec leur substrat. L'activité de clivage de ces enzymes peut être inhibée par la famille des protéines TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) (Murphy, 2011), parmi lesquelles TIMP-3 est l'inhibiteur le plus spécifique de la majorité des ADAMTSs (Hashimoto et al., 2001; W.-M. Wang et al., 2006). L'inhibition de l'activité aggrécanease d'ADAMTS4 et 5 par TIMP-3 est médiée par son interaction avec leur domaine auxiliaire (Wayne et al., 2007). Les ADAMTSs peuvent également être internalisées et dégradées, modulant ainsi leur activité dans la matrice (Yamamoto et al., 2013, 2014).

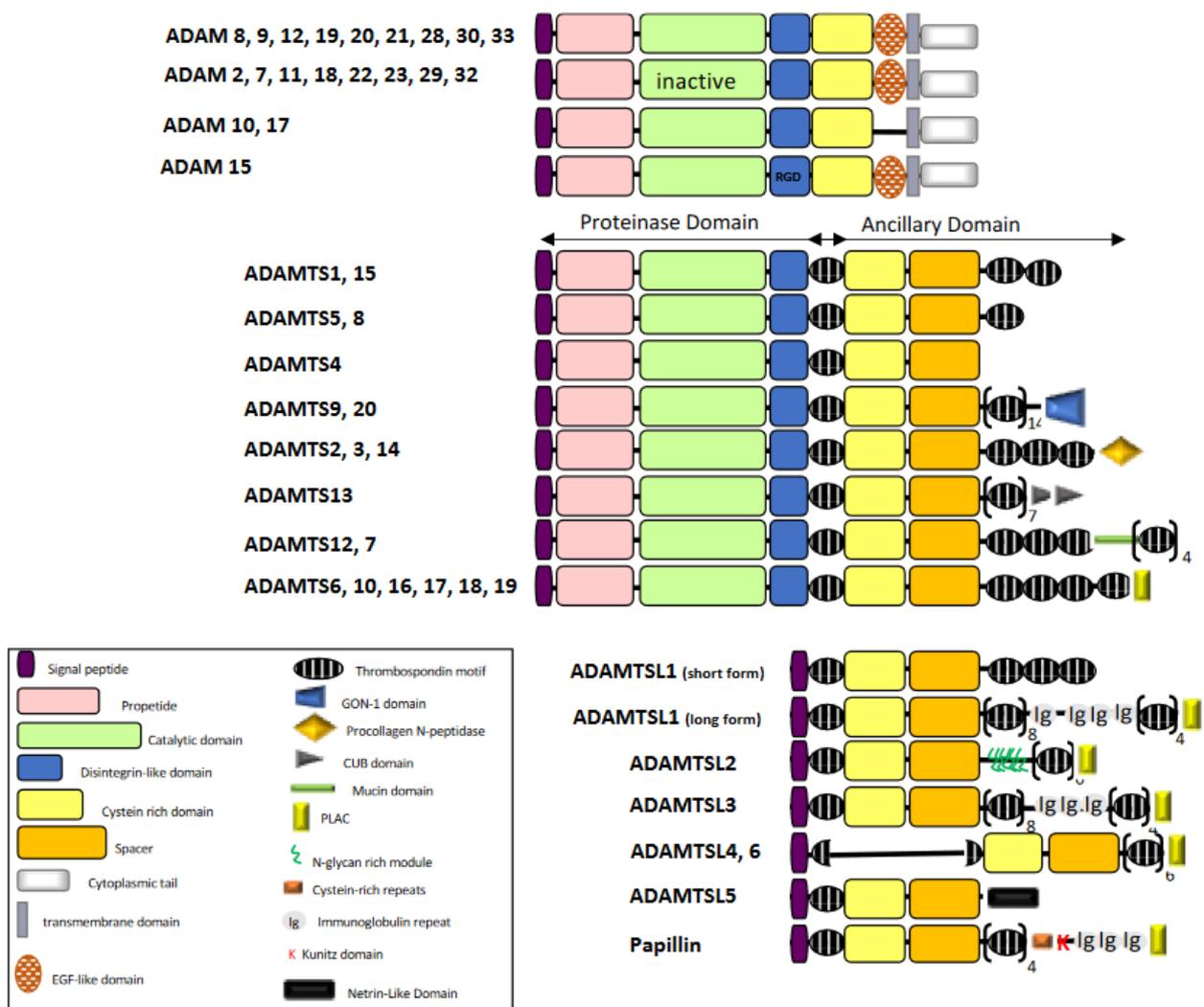


Figure 22. La famille des Adamalysines. (Théret et al., 2021)

Les Adamalysines présentent une organisation en multidomaines, avec, à l'extrémité N-terminale, un peptide signal, suivi d'un prodomaine, d'un domaine métalloprotéase à Zinc, d'un domaine désintégrine et d'un domaine riche en cystéines. Les ADAMs sont des protéines transmembranaires et possèdent un domaine transmembranaire à l'extrémité C-terminale. Les ADAMTSs et ADAMTSLs sont sécrétées et possèdent une région Spacer suivie de motifs Thrombospondin Type 1 en C-terminal. Les ADAMTSLs ne possèdent pas de domaine protéinase et sont dépourvus d'activité catalytique.

Depuis quelques années, plusieurs études ont démontré des associations fonctionnelles entre la famille des ADAMTSs et celle des fibulines (Fontanil et al., 2019). Ces interactions modulent les activités de certaines de ces protéines au sein de la MEC, avec des conséquences sur certains processus physiologiques et pathologiques. En 2005, plusieurs approches biochimiques ont permis de mettre en évidence une interaction entre la fibuline-1 et ADAMTS1 (N. V. Lee et al., 2005). La fibuline-1 n'est pas un substrat d'ADAMTS1 mais agit plutôt comme un co-facteur en altérant la conformation de son substrat, l'aggrecan, facilitant ainsi son clivage par ADAMTS1. Dans le contexte pathologique du cancer du sein, la surexpression d'ADAMTS1 dans les cellules cancéreuses mammaires est associée au développement d'un phénotype agressif, et son interaction avec la fibuline-1 semble être responsable de la diminution de ces effets, soulignant une véritable interaction fonctionnelle (Mohamedi et al., 2019). La fibuline-1 est également un co-facteur d'une autre ADAMTS, l'ADAMTS5. Bien qu'il n'ait pas été démontré que les deux protéines interagissent directement entre elles, la présence de la fibuline-1 augmente l'activité protéolytique d'ADAMTS5 dans la régression du tissu interdigital (McCulloch et al., 2009). Cette contribution a pour effet d'amplifier le clivage du versican et ainsi, l'apoptose des cellules interdigitales essentielle à la régression du tissu. Dans le contexte du cancer du sein, l'interaction entre la fibuline-2 et ADAMTS12 module l'activité promotumorale d'ADAMTS12 dans les cellules cancéreuses (Fontanil et al., 2014). En effet, la présence de la fibuline-2 inhibe les capacités migratoires et invasives promues par la surexpression d'ADAMTS12. Contrairement au couple ADAMTS1-fibuline-1, la fibuline-2 n'est pas un co-facteur d'ADAMTS12. Par ailleurs, le clivage de la fibuline-2 par ADAMTS5 accentue l'agressivité tumorale des cellules cancéreuses mammaires (Fontanil et al., 2017). Enfin, la présence d'ADAMTS12 dans ce réseau d'interactions protège la fibuline-2 de sa dégradation par ADAMTS5. Une récente étude a également évalué les implications fonctionnelles *in vivo* de ce réseau d'interactions en générant des souris déficientes en *Fbln2* et *Adamts12* (Mohamedi et al., 2024). Les souris « double knock-out » présentent des tumeurs pulmonaires plus développées que les souris contrôles et un phénotype inflammatoire exacerbé dans les poumons. Néanmoins, dans cette étude *in vivo*, l'absence de comparaison avec les modèles murins « simple knock-out » ne permet pas de conclure sur les véritables implications de l'interaction ADAMTS12-fibuline-2 à l'échelle d'un individu. Dans le modèle *C. elegans* (nématode), l'hémicentine 1 (fibuline-6) joue un rôle important dans la formation du système d'adhésion B-LINK qui permet de connecter les tissus *via* leur membrane basale (Vogel & Hedgecock, 2001). Ce système requiert notamment le recrutement du collagène de type IV médié par l'hémicentine 1 associée à l'ADAMTS9/20 (GON-1) (Gianakas et al., 2023). Ces deux protéines agissent comme des co-facteurs dans l'assemblage du collagène de type IV et la formation du système B-LINK.

Les recherches de nouveaux substrats de certaines ADAMTSs ont révélé la fibuline-3 comme une cible d'ADAMTS3 (Bekhouche et al., 2016) et d'ADAMTS7 (MacDonald et al., 2022). La fibuline-

3 est effectivement clivée par ADAMTS7 générant deux fragments d'environ 35 et 18 kDa (MacDonald et al., 2022). Dans le contexte du glioblastome, l'expression de la fibuline-3, associée à des tumeurs moins compactes et plus diffuses, est corrélée avec l'expression de certaines protéases matricielles, dont ADAMTS5 (B. Hu et al., 2009). Une possible interaction entre ces deux protéines pourrait ainsi moduler le microenvironnement tumoral et promouvoir la propagation de la tumeur. Cependant, aucune étude à ce jour ne démontre directement une interaction entre la fibuline-3 et ADAMTS5.

Nous avons donc étudié ces deux protéines matricielles avec pour objectif de caractériser leurs possibles régulations et interactions.

B. Résultats

1. Etude mécanistique : Quelle relation entre fibuline-3 et ADAMTS5 ?

Pour comprendre la relation fonctionnelle entre la fibuline-3 et ADAMTS5, nous avons réalisé des transfections de vecteurs d'expression tagués afin de surexprimer ces deux protéines dans la lignée cellulaire COS7 (**Figure 23**). Quatre conditions sont comparées : 1) les cellules COS7 transfectées avec 2.5 µg de plasmide vide (CTRL) ; 2) les cellules COS7 transfectées avec 1.25 µg de plasmide EFEMP1 et 1.25 µg de plasmide vide (OE-EFEMP1) ; 3) les cellules COS7 transfectées avec 1.25 µg de plasmide ADAMTS5 et 1.25 µg de plasmide vide (OE-ADAMTS5) ; et 4) les cellules COS7 transfectées avec 1.25 µg de plasmide EFEMP1 et 1.25 µg de plasmide ADAMTS5 (OE-EFEMP1+ADAMTS5). Les extraits protéiques sont analysés 48h après la transfection. Dans un premier temps, la surexpression de la fibuline-3 (63kDa) et d'ADAMTS5 (102kDa) taguées est validée par western blot avec l'anticorps anti-Flag (**Figure 24A**). Lorsque les deux protéines sont surexprimées (condition OE-EFEMP1+ADAMTS5), nous observons des niveaux de fibuline-3 plus faibles en comparaison avec la condition où seule la fibuline-3 est surexprimée (OE-EFEMP1) (**Figure 24A et B**). L'expression d'ADAMTS5 n'est, quant à elle, pas modifiée lorsque les deux protéines sont surexprimées (condition OE-EFEMP1+ADAMTS5) en comparaison avec la condition où seule ADAMTS5 est surexprimée (OE-ADAMTS5). La fibuline-3 et ADAMTS5 sont des protéines sécrétées dans la MEC ; nous avons donc également recherché ces protéines dans le milieu de culture des cellules transfectées. Dans les conditions de surexpression simple, nous retrouvons la fibuline-3 ou ADAMTS5 dans les milieux conditionnés (**Figure 24C**). A l'instar de ce qui est observé dans les lysats cellulaires, la quantité de fibuline-3 dans le milieu est plus faible lorsque les deux protéines sont surexprimées par rapport à la quantité de fibuline-3 dans le milieu de culture des cellules où seule *EFEMP1* est surexprimée.

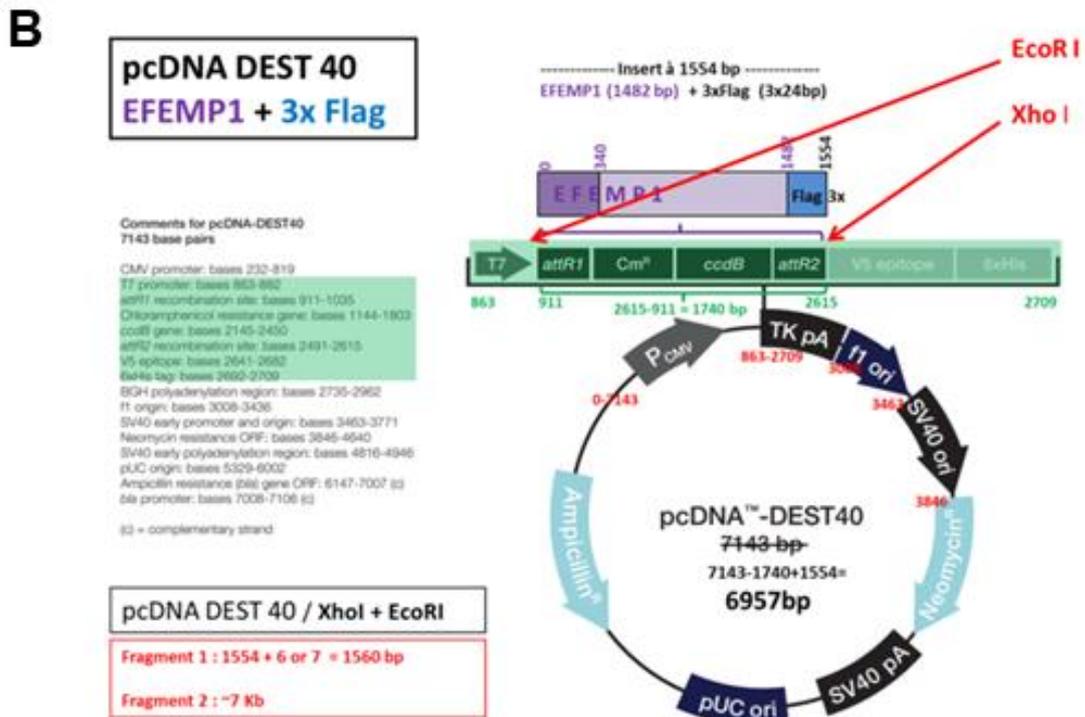
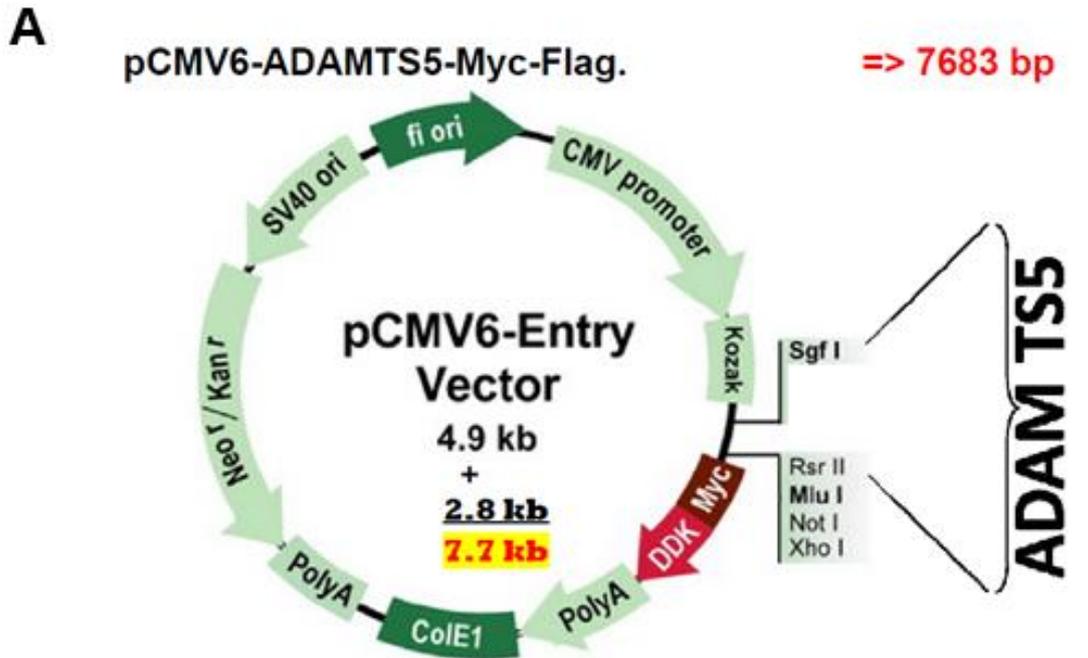


Figure 23. Représentation schématique des plasmides pour la surexpression d'ADAMTS5 (A) et de la fibuline-3 (B).

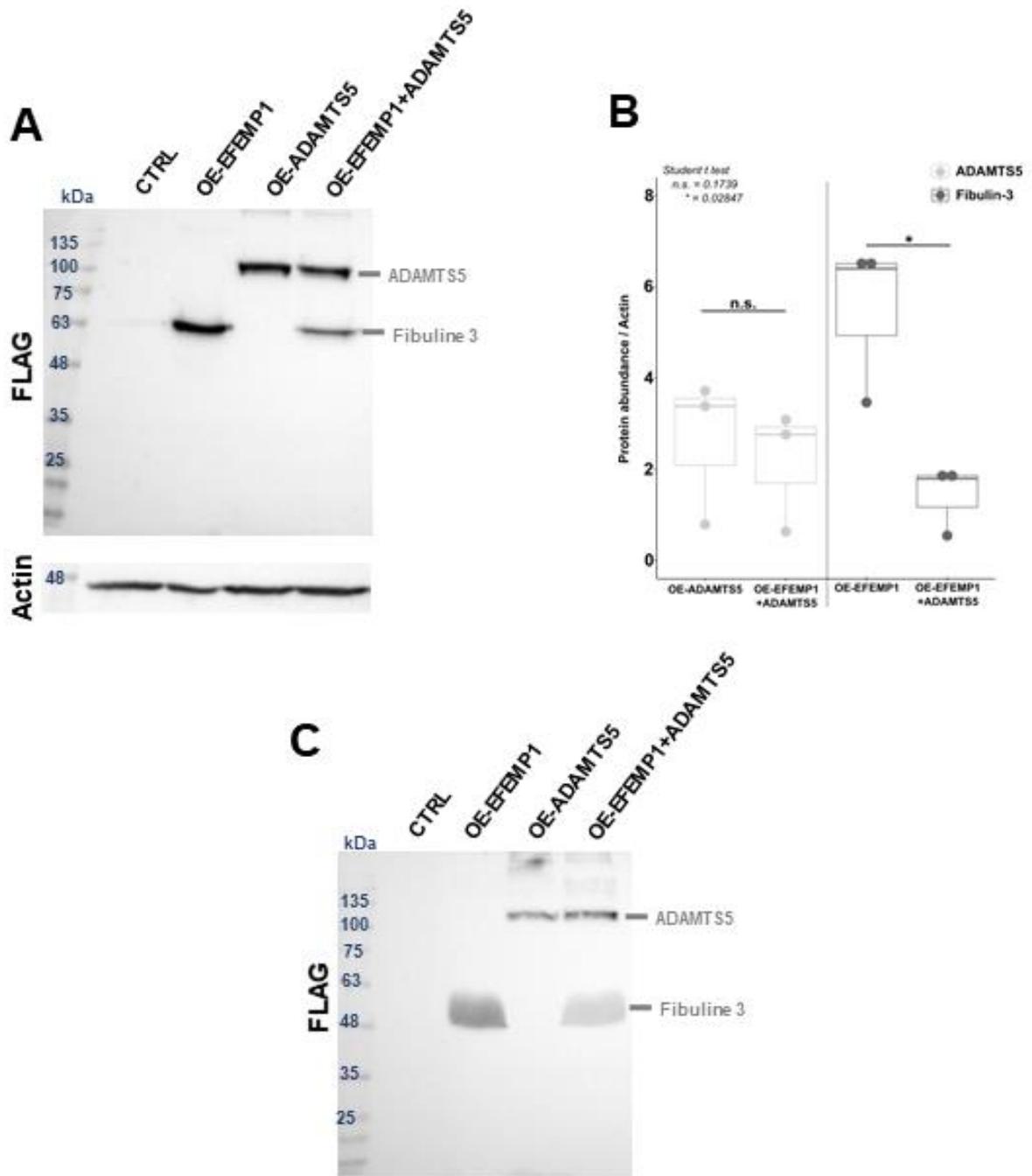


Figure 24. La surexpression d'ADAMTS5 diminue la quantité de fibuline-3 dans les cellules COS7.

A. Analyse en western blot des cellules COS7 transfectées représentant les niveaux de protéines ADAMTS5 et fibuline-3 dans les lysats cellulaires. 20µg de protéines ont été déposées et les protéines taguées Flag ont été détectées avec un anticorps anti-Flag.

B. Quantification des niveaux de protéines ADAMTS5 (gris clair) et fibuline-3 (gris foncé) à partir des western blots anti-Flag de trois expérimentations indépendantes. Les différences statistiques ont été évaluées avec un test paillé paramétrique de Student (* : $P < 0.05$).

C. Analyse en western blot des milieux conditionnés des cellules COS7 transfectées représentant les niveaux de protéines ADAMTS5 et fibuline-3. 50µl de milieux sont déposées et les protéines taguées Flag ont été détectées avec un anticorps anti-Flag.

Pour mieux caractériser l'incidence d'ADAMTS5 sur la fibuline-3, nous avons étudié les effets d'une concentration croissante de plasmide ADAMTS5 (0 à 4µg/ml) sur l'expression de la fibuline-3, avec une quantité constante de plasmide EFEMP1 transfectée (4µg/ml) dans les cellules COS7 ; la quantité totale d'ADN transfecté étant maintenue constante en ajustant la quantité de vecteur vide. De façon remarquable, la quantité de fibuline-3 diminue et est inversement associée à celle d'ADAMTS5 suggérant un effet inhibiteur d'ADAMTS5 sur la quantité de fibuline-3 (**Figure 25**).

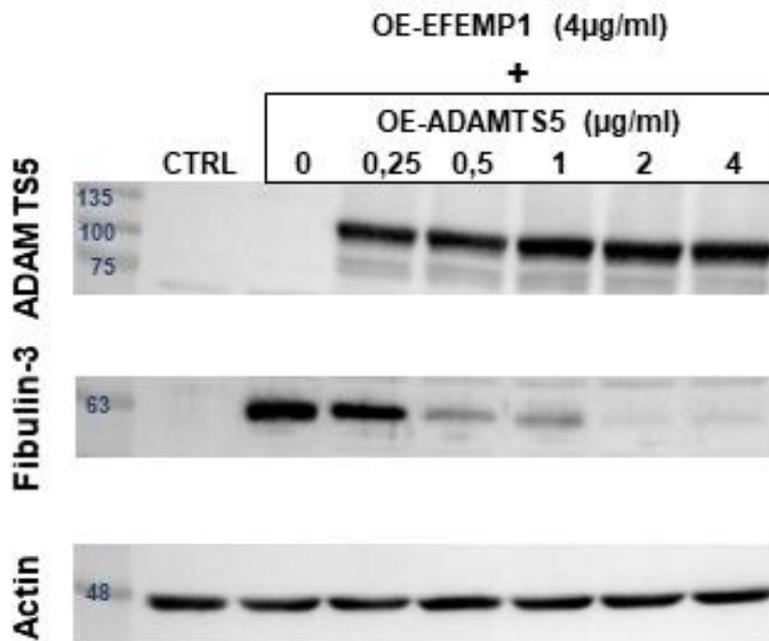


Figure 25. L'expression de la fibuline-3 est inhibée par celle d'ADAMTS5 de façon dose-dépendante.

Analyse en western blot des cellules COS7 transfectées représentant les niveaux de protéines ADAMTS5 et fibuline-3 dans les lysats cellulaires. 20µg de protéines ont été déposées et les protéines ont été détectées avec un anticorps anti-ADAMTS5 ou anti-Fibulin-3. Résultats préliminaires (n=1).

Afin de s'assurer que cet effet est spécifique d'ADAMTS5, nous avons testé l'effet de l'expression d'autres ADAMTSs sur l'expression de la fibuline-3 : ADAMTS12 (178 kDa), connue également pour interagir avec la fibuline-2 (Fontanil et al., 2014), et ADAMTSL1 (58 kDa), qui ne possède pas de fonction catalytique. Nous avons tiré parti de la présence d'un tag FLAG commun à ces vecteurs d'expression afin de valider la transfection par western blot (**Figure 26A**). Nous avons cependant noté une très faible expression d'ADAMTS12 (flèches bleues) en comparaison aux autres ADAMTSs. Comme attendu, après co-transfection avec le plasmide ADAMTS5, la quantité de fibuline-3 est plus faible que dans les cellules OE-EFEMP1. Lorsque le plasmide EFEMP1 est co-transfecté avec le plasmide ADAMTS12 (OE-EFEMP1+ADAMTS12), une bande d'intensité légèrement plus faible est observable pour la fibuline-3 en comparaison à la condition OE-EFEMP1. Dans la condition OE-EFEMP1+ADAMTSL1, la bande à environ 60 kDa est similaire à celle retrouvée pour les cellules OE-EFEMP1, cependant, ADAMTSL1 est une protéine de 58 kDa, ce qui ne nous permet pas de la différencier de la fibuline-3 ; nous n'avons donc pas poursuivi avec le plasmide ADAMTSL1. Pour vérifier l'effet de l'expression d'ADAMTS12 sur la quantité de fibuline-3, nous avons co-transfecté une concentration croissante du plasmide ADAMTS12 (0 à 4µg/ml) avec une concentration constante du plasmide EFEMP1 (4µg/ml). Tandis que l'expression d'ADAMTS12 augmente avec la concentration de plasmide transfecté, celle de la fibuline-3 n'est pas modifiée, contrairement à ce qui est observé avec une concentration croissante d'ADAMTS5 (**Figure 26B**). Ainsi, l'effet d'ADAMTS5 sur la quantité de fibuline-3 semble spécifique, mais de nombreuses questions restent à éclaircir, notamment sur les mécanismes impliqués et l'existence d'une interaction physique entre ces deux protéines.

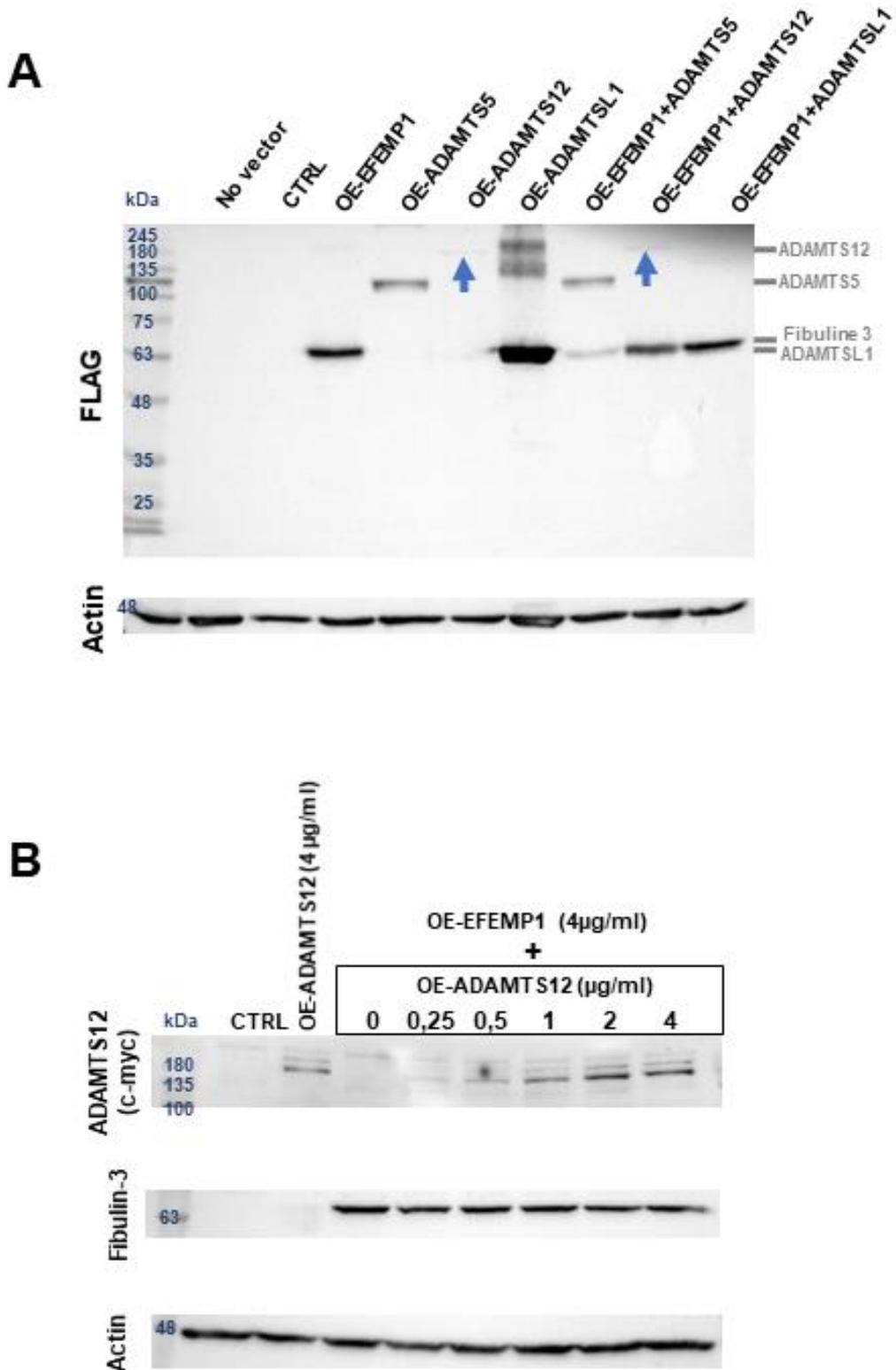


Figure 26. L'inhibition de la fibuline-3 est spécifique d'ADAMTS5.

A. Analyse en western blot des cellules COS7 transfectées. Les protéines taguées Flag ont été détectées par l'anticorps anti-Flag. La pointe des flèches bleues désigne la bande correspondant à la protéine ADAMTS12.

B. Analyse en western blot des cellules COS7 transfectées. La protéine ADAMTS12 a été détectée par un anticorps anti-c-myc et la protéine fibuline-3 par un anticorps anti-Fibuline-3.

Résultats préliminaires (n=1).

2. Etude des niveaux d'expression de la fibuline-3 et d'ADAMTS5 dans la fibrose hépatique

Certaines études ont démontré l'association d'ADAMTS5 avec la fibrose hépatique (Bauters et al., 2016; Bukong et al., 2016). Compte tenu de nos observations sur les implications de la fibuline-3 dans la fibrose hépatique et plus spécifiquement dans le phénotype des CEFs, nous avons initié une étude pour comparer de l'expression de la fibuline-3 et d'ADAMTS5 dans ce contexte. Dans un premier temps, nous avons comparé par RT-qPCR les niveaux des ARNm d'*EFEMP1* et d'*ADAMTS5* à différents stades de fibrose à partir d'échantillons humains de foies adjacents non-tumoraux. Comme observé précédemment dans ce manuscrit, la fibuline-3 est associée de façon positive avec la sévérité de la fibrose, avec une expression plus importante dans les échantillons de foie à des stades les plus avancés (F3-4 ; **Figure 27A**). En revanche, aucune association significative entre l'expression d'*ADAMTS5* et la progression de la fibrose hépatique n'a été observé dans nos échantillons.

Pour mieux caractériser ces deux protéines dans le contexte hépatique, nous avons poursuivi l'étude comparative au sein des CEFs, acteurs majeurs au cours de la fibrose hépatique. Nous avons analysé l'expression des gènes (quantités d'ARNm) dans chaque cellule par hybridation *in situ* (RNAscope®, Advanced Cell Diagnostics Inc) (F. Wang et al., 2012). Dans cette expérimentation, les cellules LX-2, dérivées de CEFs humaines, ont été cultivées, fixées, puis marquées avec des sondes ciblant l'ARNm *EFEMP1* (Turquoise) et des sondes ciblant l'ARNm *ADAMTS5* (Fast-Red). L'analyse des images obtenues révèle une légère association entre les 2 ARNm ($R^2 = 0.29$) mais pas de réelle corrélation (**Figure 27B**). En effet, nous avons pu mettre en évidence des cellules qui expriment majoritairement *ADAMTS5* (en rose), d'autres qui expriment majoritairement *EFEMP1* (en bleu) et certaines qui expriment les 2 gènes de façon similaire, témoignant d'une hétérogénéité au sein de la culture cellulaire.

Ainsi, l'étude comparative de la fibuline-3 et d'ADAMTS5 dans le contexte de fibrose hépatique ne suggère pas d'association d'expression dans les conditions endogènes.

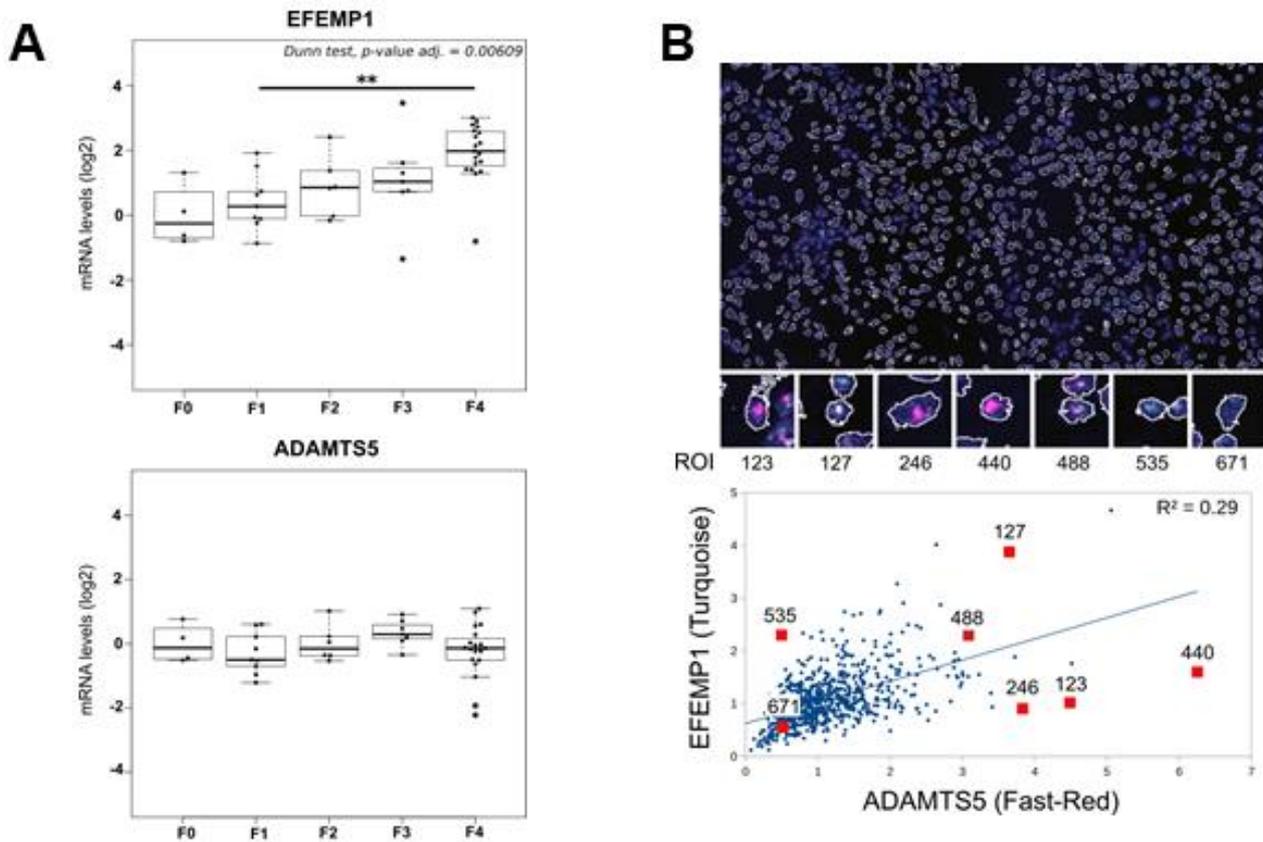


Figure 27. Etude comparative de l'expression d'ADAMTS5 et de la fibuline-3 dans le contexte de la fibrose hépatique.

A. Boxplots représentant les niveaux d'ARNm (relatifs aux échantillons F0) d'EFEMP1 et d'ADAMTS5 dans les échantillons humains de foies à différents stades de fibrose (4 F0, 10 F1, 7 F2, 7 F3, 22 F4). Les différences statistiques ont été calculées avec un test non-paramétrique de Dunn (** : $p < 0.01$).

B. Détection des ARNm EFEMP1 et ADAMTS5 dans les cellules LX-2 fixées. L'expression d'EFEMP1 et d'ADAMTS5 a été détectée par hybridation in situ grâce à la méthode RNAscope®. Les transcrits EFEMP1 sont marqués en bleu et les transcrits ADAMTS5 en rose. Résultats préliminaires ($n=1$).

C. Discussion

Bien que préliminaires, ces premiers résultats suggèrent une relation fonctionnelle complexe entre la fibuline-3 et ADAMTS5. En effet, nos expériences de co-expression dans les cellules COS7 démontrent qu'en présence de la protéine ADAMTS5, la forme entière d'environ 63 kDa de la fibuline-3 est moins présente. Cet effet, dépendant de la concentration en ADAMTS5, semble spécifique à cette protéase. Néanmoins, des études plus approfondies seront nécessaires pour déterminer si cet effet est direct (dégradation de la fibuline-3 par ADAMTS5) ou indirect (modulation de l'expression de la fibuline-3 au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel).

Il faudrait notamment déterminer si ADAMTS5 et la fibuline-3 interagissent physiquement et directement entre-elles, notamment par des expériences de co-immunoprécipitation. Par ailleurs, compte tenu de l'activité de clivage d'ADAMTS5 sur la fibuline-2 dans le contexte du cancer du sein (Fontanil et al., 2017), l'hypothèse d'un clivage de la fibuline-3 par ADAMTS5 semble raisonnable. En faveur de cette hypothèse, de précédentes études ont déjà démontré que la fibuline-3 peut être clivée par ADAMTS3 et ADAMTS7 (Bekhouche et al., 2016; MacDonald et al., 2022). Le clivage de la fibuline-3 par ADAMTS7 produit 2 fragments de 35 et 18 kDa (MacDonald et al., 2022). Cependant, nos conditions d'analyses en western blot ne nous ont pas permis d'observer des fragments de petites tailles qui pourraient correspondre à des produits de clivage par ADAMTS5. Des observations supplémentaires visant à mettre en évidence de petits fragments permettront de tester cette hypothèse. Il est également possible d'utiliser des inhibiteurs d'ADAMTS5 dans les conditions de co-expression et de mesurer les effets sur la quantité de fibuline-3 entière.

De plus, il serait intéressant d'étudier l'effet de la fibuline-3 sur l'activité protéolytique d'ADAMTS5 sur d'autres substrats. En effet, comme cela a été montré pour la fibuline-1, co-facteur de certaines ADAMTSs (N. V. Lee et al., 2005), y compris ADAMTS5 (McCulloch et al., 2009), la présence de la fibuline-3 pourrait moduler l'action de clivage d'ADAMTS5 sur ses substrats comme l'aggrecan ou le versican.

Enfin, il est important de retranscrire ces observations *in vitro* dans un contexte physiologique. Certaines études ont déjà démontré l'association entre ADAMTS5 et la progression de la fibrose hépatique (Bauters et al., 2016; Bukong et al., 2016). Par ailleurs, la première partie des résultats de ce manuscrit décrit l'implication de la fibuline-3 dans la régulation de l'adhésion et la migration des CEFs, possiblement *via* une modulation du remodelage de leur microenvironnement. Dans cette partie de l'étude, nos résultats préliminaires réalisés à partir des échantillons de foies humains et des cellules LX-2 ne nous ont pas permis d'observer une association entre la fibuline-3 et ADAMTS5. De nouvelles expérimentations seront donc essentielles afin de mieux décrire cette relation et de savoir

si elle peut impacter l'homéostasie des CEFs. En effet, la relation entre une glycoprotéine et une protéase dans le milieu extracellulaire peut moduler l'environnement à la surface des cellules, modifiant leurs points de contacts avec la MEC et moduler ainsi leur dynamique et leur motilité.

Discussion et Perspectives

I. La fibuline-3, une fibuline distincte des autres ?

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure dynamique qui subit un renouvellement et un remodelage structurel continu, médiés par de nombreux processus biochimiques et biomécaniques. L'accumulation et l'augmentation de la rigidité de ce réseau sont des caractéristiques majeures de la fibrose hépatique, et ces modifications dynamiques de structure et de composition lors de la progression des maladies chroniques hépatiques (MCHs) affectent la fonctionnalité des cellules du foie. Etudier l'altération de la MEC au cours des MCHs peut ainsi nous permettre d'identifier de potentiels nouveaux candidats impliqués dans le remodelage matriciel.

Notre criblage protéomique réalisé à partir d'échantillons hépatiques a notamment mis en évidence trois fibulines, les fibulines 2, 3 et 5, et montré leur association avec la progression de la fibrose. Ces résultats confirment de précédents criblages protéomiques réalisés à partir de tissus cirrhotiques (Mazza et al., 2019) ou de tissus fibrosés associés à l'hépatite C (Baiocchini et al., 2016). Des études transcriptomiques ont également démontré une plus forte expression d'*EFEMP1* (fibuline-3) dans les stades avancés de fibrose associée à l'hépatite B chronique (Furuta et al., 2008) et aux NAFLD (He et al., 2021). Par ailleurs, le criblage protéomique de biopsies fibrotiques de patients atteints d'hépatite B ou C a identifié une association entre la fibuline-5 et les stades de fibrose tardifs (Bracht et al., 2015). Ainsi, quelle que soit l'approche expérimentale, ces trois fibulines ont déjà été identifiées dans la fibrose hépatique. Néanmoins, le rôle de ces fibulines dans la progression des MCHs est encore peu documentée.

Tandis que ces trois fibulines interagissent avec de nombreuses protéines (43 pour la fibuline-2, 129 pour la fibuline-3 et 158 pour la fibuline-5), notre étude comparative des réseaux d'interactions protéine-protéine (PPI) révèle que ces trois fibulines ne partagent que 16 partenaires, principalement des protéines du matrisome. L'analyse des termes associés aux processus biologiques *Gene Ontology* de chaque réseau PPI fait ressortir des annotations différentes et suggère que ces trois fibulines pourraient être impliquées dans des mécanismes biologiques différents. Les réseaux des fibulines 2 et 5 sont principalement associés aux processus relatifs à l'assemblage de la MEC, alors que les partenaires de la fibuline-3 sont associés au stress du réticulum endoplasmique et à la régulation de la communication cellulaire. Notons que l'association de la fibuline-3 avec des protéines impliquées dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique pourrait être une conséquence de l'activation de cette voie dans des conditions expérimentales de surexpression de cette protéine

sécrétée (Hulleman et al., 2016). Contrairement aux fibulines 2 et 5, la fibuline-3 n'interagit pas ou peu avec les composants structurels de la MEC, comme le collagène IV ou la tropoélastine (Kobayashi et al., 2007), ce qui suggère qu'elle possède des activités différentes au sein de la matrice. Dans le but d'inférer les fonctions des fibulines spécifiques à la matrice extracellulaire, cette analyse des réseaux PPI pourrait être approfondie par un enrichissement ne conservant que les partenaires protéiques retrouvés au sein de la MEC. Ce réseau pourrait alors être élargi en y incorporant les réseaux PPI de ces partenaires extracellulaires directs, afin d'identifier d'autres processus biologiques. L'approche que nous avons mis en œuvre pour analyser les réseaux PPI présente néanmoins une limitation importante. En effet, les bases de données utilisées pour cette étude via l'interface PSICQUIC ne contiennent pas certaines interactions décrites dans la littérature. Par exemple, nous avons pu noter que l'interaction entre la fibuline-3 et le récepteur de type I au TGF- β décrite dans deux études (Tian et al., 2015; Xu et al., 2022) n'est pas retrouvée dans notre réseau. Par conséquent, compléter les données de PSICQUIC avec d'autres sources d'informations permettrait d'avoir une vision plus complète des réseaux d'interactions des fibulines.

Les spécificités de ces réseaux PPI indiquent des fonctions diverses, notamment pour la fibuline-3, dont nous avons initié l'exploration dans les cellules étoilées du foie. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de la fibuline-3 dans la lignée LX-2 (dérivée des CEFs humaines) et l'avons comparé à la fibuline-2, ces deux protéines étant bien exprimées dans ces cellules en comparaison à la fibuline-5. Les expériences d'interférence ARN ciblant l'expression de la *FBLN2* et d'*EFEMP1* ont révélé des phénotypes spécifiques, en accord avec de possibles fonctions différentes. Les phénotypes cellulaires obtenus sont représentés schématiquement dans la **Figure 28**.

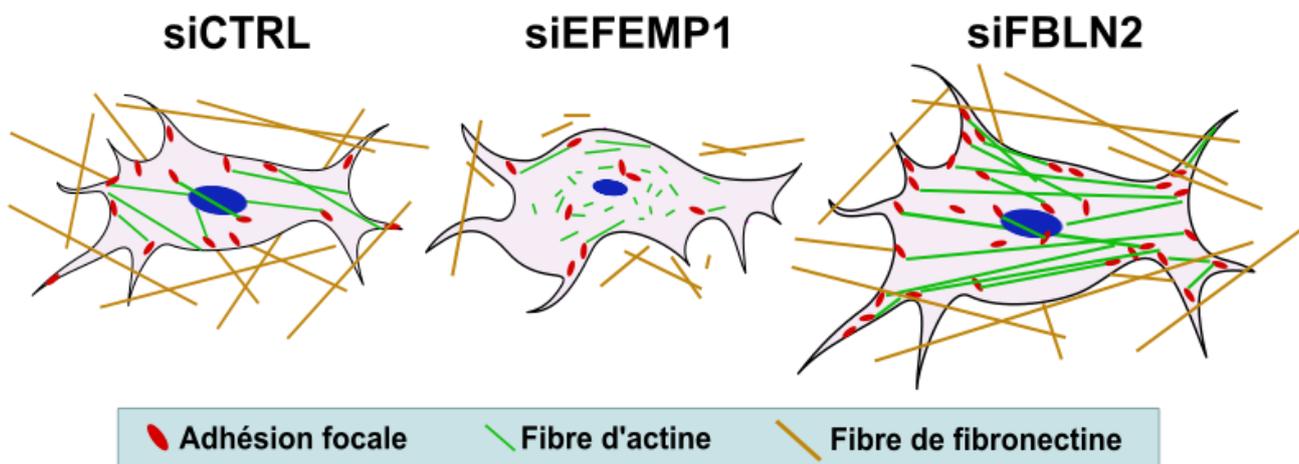


Figure 28. Représentation schématique des phénotypes de CEFs observés après inhibition de l'expression d'*EFEMP1* et de *FBLN2* par interférence ARN (siRNA).

Contrairement aux cellules siFBLN2, les cellules siEFEMP1 présentent un défaut de maturation des fibres de stress associé à une diminution des forces de tensions exercées sur le noyau par le cytosquelette. Il est à noter que nous avons observé plus de fibres d'actine dans la condition siFBLN2 en comparaison avec la condition contrôle, mais cet effet ne semble pas suffisant pour impacter la force de tension du cytosquelette exercée sur le noyau. La diminution de l'expression d'*EFEMP1* est accompagnée d'une perte partielle des points d'adhésion focaux dans les cellules LX-2, tandis que les cellules siFBLN2 possèdent plus de points d'adhésion et une surface d'étalement plus importante. En accord avec le rôle des adhésions focales dans la migration cellulaire (Legerstee & Houtsmuller, 2021), nous avons observé une diminution des capacités migratoires des cellules siEFEMP1 en comparaison aux deux autres conditions. Il est intéressant de noter que l'inhibition de la fibuline-3 n'affecte pas les premières étapes d'attachement et d'étalement des cellules, suggérant une possible compensation par d'autres systèmes d'adhésion. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en étudiant par imagerie ces autres modes d'adhésion cellule-matrice, comme par exemple les structures de lamellipodes également retrouvées dans les CEFs (Melton & Yee, 2007), qui permettent notamment aux cellules d'interagir avec leur microenvironnement et de migrer.

Nous avons également démontré que l'inhibition de l'expression d'*EFEMP1* dans les cellules LX-2 affecte le réseau de fibronectine à la surface cellulaire sans affecter son expression, suggérant une perturbation de l'intégrité du réseau de fibronectine. Nos observations suggèrent ainsi que la fibuline-3 serait impliquée dans la régulation des interactions cellule-matrice, affectant les capacités d'adhésion et de mobilité des cellules étoilées du foie.

D'autres fibulines semblent également moduler les capacités d'adhésion et de migration cellulaire *in vitro*. La fibuline-1, par exemple, est associée à des actions inhibitrices de l'adhésion et de la motilité cellulaire (Twal et al., 2001). Ce rôle a été attribué à une liaison compétitive de la fibuline-1 avec le syndecan-4 (protéoglycane localisé à la surface des cellules) pour la fixation au domaine HepII de la fibronectine, empêchant les interactions cellule-matrice en présence de fibuline-1 (Williams & Schwarzbauer, 2009). La fibuline-5 (Lomas et al., 2007; Nakamura et al., 2002) et la fibuline-7 (Sarangi et al., 2018) sont capables, quant à elles, d'interagir avec les intégrines transmembranaires, et d'impacter les capacités migratoires des cellules (Albig & Schiemann, 2004). Il est également intéressant de noter que la fixation des cellules HUVECs sur une matrice de fibuline-7 induit un regroupement des points d'adhésion, une réorganisation des fibres de stress et une altération de l'étalement des cellules (de Vega et al., 2014). Ainsi, certaines fibulines sont présentées dans la littérature comme des modulateurs de l'adhésion en perturbant les interactions entre la surface des cellules et la matrice environnante. Les résultats de notre étude suggèrent que la fibuline-3 module l'adhésion des cellules étoilées du foie par un mécanisme différent.

En effet, nos observations suggèrent que la fibuline-3 serait impliquée dans la stabilisation du réseau fibrillaire de fibronectine, altérant ainsi l'adhésion et la migration des cellules. Il est désormais bien connu que la détection des signaux mécaniques provenant de la matrice extracellulaire influence grandement la différenciation, la survie ou encore la migration cellulaire. *In vitro*, la culture des cellules sur une surface rigide, mimant une MEC compacte et hautement organisée, favorise leur migration (Lo et al., 2000), leur étalement (Mooney et al., 1995) ainsi que la maturation du cytosquelette d'actine et l'induction des forces de tension (Yeung et al., 2005), notamment sur l'enveloppe nucléaire (N. Wang et al., 2009). En cohérence avec nos résultats, la fibrillogenèse de la fibronectine est couplée à la formation de fibres de stress et à l'interaction entre les fibres d'actine et les complexes d'adhésion focaux *in vitro* (Zhou et al., 2008). De plus, l'inhibition de l'assemblage des fibres de fibronectine diminue la capacité des fibroblastes à générer des forces de tractions, tout en réduisant significativement le nombre total d'adhésions focales (Scott et al., 2015). Ces études, associées à nos résultats, suggèrent que la fibuline-3 aurait un rôle important dans la régulation du remodelage matriciel, notamment de la fibronectine, à la surface des CEFs, avec des conséquences sur les adhésions focales et la migration de ces cellules.

Localiser précisément la fibuline-3 dans l'espace extracellulaire permettrait de mieux caractériser son rôle dans la modulation de l'adhésion et de la migration cellulaire. Il est en effet possible qu'elle soit proche de la membrane plasmique, *via* une interaction directe ou indirecte avec la cellule, formant ainsi un pont entre la surface des cellules et la matrice extracellulaire. Une localisation plus éloignée dans la matrice suggérerait d'autres implications, notamment dans la régulation du remodelage matriciel. Malgré plusieurs méthodes utilisées, nos essais d'immunomarquages réalisés sur les CEFs primaires ou les LX-2 ne nous ont cependant pas permis de préciser la localisation de la fibuline-3. Il existe à ce jour dans la littérature très peu d'images d'immunofluorescence de la fibuline-3 en cytologie, témoignant de la difficulté à visualiser cette protéine. Cela peut être expliqué par le manque d'efficacité des anticorps commercialisés actuellement, par un repliement de la protéine spécifique empêchant l'exposition des épitopes d'intérêt ou encore par une trop faible concentration locale de la fibuline-3 dans le milieu extracellulaire.

II. Un rôle possible de la fibuline-3 dans le remodelage matriciel

Le phénotype induit par l'inhibition de l'expression d'*EFEMP1* suggère que la fibuline-3 serait impliquée dans le maintien de l'intégrité du réseau matriciel à la surface des cellules étoilées du foie. De précédentes études ont également déjà démontré l'implication de la fibuline-3 dans la stabilisation des structures fibrillaires de la MEC, notamment grâce aux modèles murins *Efemp1*^{-/-}. L'invalidation de la fibuline-3 chez la souris est liée à une diminution de fibres élastiques dans les tissus conjonctifs (McLaughlin et al., 2007). Ces défauts progressent avec l'âge et entraînent une altération sévère du réseau de fibres élastiques (Rahn et al., 2009). De plus, les souris *Efemp1*^{-/-} développant un infarctus du myocarde présentent un dépôt de collagène moins important après la lésion, associé à un alignement anormal des fibres de collagène (Murtha et al., 2023). La déplétion de la fibuline-3 dans les cellules épithéliales rétinienne est associée à une réduction de la formation de filaments de collagène VI à la membrane basale de ces cellules (Woodard et al., 2022) et sa surexpression dans les cellules trabéculaires perturbe le réseau de fibronectine à la surface des cellules, affectant leur morphologie (Tan et al., 2024). Au cours de notre étude, nous avons observé une perturbation du réseau de fibronectine à la surface des cellules LX-2 dans la condition si*EFEMP1* mais d'autres réseaux fibrillaires comme le collagène de type I ou les fibres élastiques pourraient également être impactés par une diminution de l'expression de la fibuline-3. Cette hypothèse pourrait être testée par immunodétection de ces composants matriciels ou encore par imagerie en microscopie de seconde harmonique (SHG) permettant de visualiser les fibres de collagène, par exemple dans des modèles de co-culture où le collagène fibrillaire se dépose (Cuvellier et al., 2021).

Contrairement à la majorité des fibulines, la fibuline-3 n'est pas connue pour interagir fortement avec les composants structurels de la MEC (Kobayashi et al., 2007). Son interaction avec la tropoélastine semble trop faible pour impacter la formation et le maintien du réseau élastique. Comme le suggère Livingstone et al., l'influence de la fibuline-3 sur l'intégrité de la matrice fibrillaire semble être indirecte, *via* des interactions avec d'autres molécules impliquées dans le remodelage de la MEC (Livingstone et al., 2020). En particulier, la fibuline-3 interagit fortement avec TIMP-3, l'inhibiteur majeur des métalloprotéases de la matrice, agissant ainsi comme un co-facteur de TIMP-3 et renforçant l'inhibition des protéases matricielles (Klenotic et al., 2004). De plus, la surexpression de la fibuline-3 dans les cellules endothéliales est associée à la fois à l'induction de l'expression de TIMP-3 et à l'inhibition des activités métalloprotéases, entraînant une altération de l'intégrité matricielle et une perturbation de la migration cellulaire (Albig et al., 2006). D'autres études suggèrent un rôle de

la fibuline-3 dans la régulation de protéases dans des contextes divers comme le remodelage vasculaire hypertensif (Z. Lin et al., 2016), le cancer du poumon (X. Chen et al., 2014; E. J. Kim et al., 2012) ou le carcinome hépatocellulaire (Dou et al., 2016). Nous avons notamment observé une diminution de l'expression de TIMP-3 dans les cellules LX-2 siEFEMP1 en comparaison aux autres conditions. Ainsi, la fibuline-3 pourrait contrôler le remodelage de la matrice fibrillaire en régulant les activités des protéases matricielles *via* son interaction avec TIMP-3 et/ou son effet sur l'expression de cette protéine.

Dans la seconde partie des résultats de ce manuscrit, nous avons également observé une relation complexe qui relie la fibuline-3 avec la protéase matricielle ADAMTS5. En effet, dans notre étude de co-expression dans la lignée COS7, nous avons pu observer qu'en présence d'ADAMTS5, la quantité de fibuline-3 sous sa forme entière (environ 63 kDa) diminue. Faute de temps, nos expérimentations n'ont néanmoins pas permis de caractériser la nature de cette relation, par exemple, s'ils interagissent ensemble et si la fibuline-3 est clivée directement par ADAMTS5. Nous savons par ailleurs que TIMP-3 interagit avec ADAMTS5 et inhibe ses activités protéasiques (Kashiwagi et al., 2001; Troeberg et al., 2014). Compte tenu de l'interaction connue entre TIMP-3 et la fibuline-3, nous pouvons ainsi imaginer un réseau d'interactions entre ces trois protéines matricielles (**Figure 29**). Ce modèle hypothétique pourrait également expliquer l'implication de la fibuline-3 dans le maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire à travers la régulation des activités des protéases matricielles et son impact sur l'adhésion et la migration des cellules étoilées du foie.

Il serait donc intéressant de tester ce modèle et de caractériser les possibles interactions entre la fibuline-3, TIMP-3 et ADAMTS5 grâce à des expériences de co-immunoprécipitation ou encore de ligature de proximité (*Proximity Ligation Assay*, PLA) qui permettraient d'évaluer la distance entre ces protéines en cytologie. Par ailleurs, une étude des activités enzymatiques des MMPs et des ADAMTSs dans les conditions de siRNA, en utilisant des techniques de zymographie, permettrait d'évaluer l'influence de la fibuline-3 sur les activités des protéases matricielles dans le microenvironnement des CEFs.

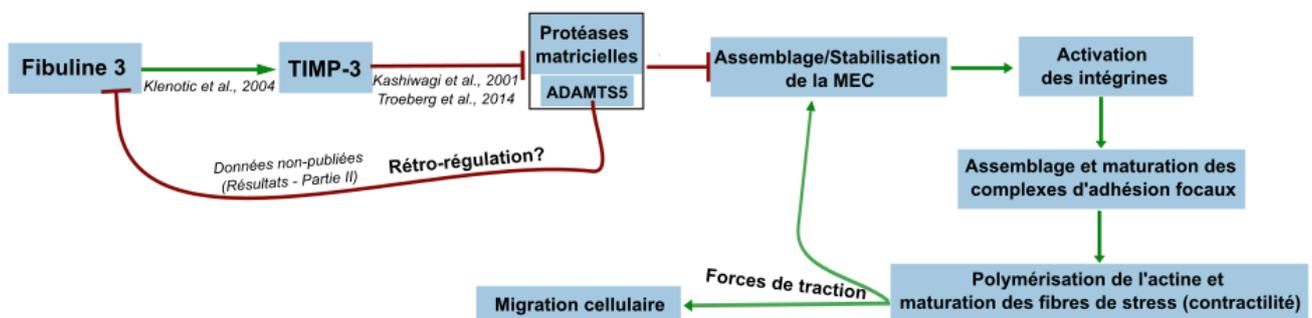


Figure 29. Hypothèse d'un réseau impliquant la fibuline-3, TIMP-3 et ADAMTS5 dans la régulation des interactions cellule-matrice extracellulaire.

Une perturbation de ce réseau pourrait impacter le remodelage matriciel à la surface cellulaire et altérer les interactions cellule-matrice, et ainsi l'adhésion et la migration cellulaire.

III. Un lien entre la fibuline-3 et la sénescence des CEFs ?

La fibuline-3 a initialement été découverte dans un criblage réalisé à partir de fibroblastes humains sénescents et fut considérée comme un modulateur de la sénescence (Lecka-Czernik et al., 1995). La sénescence se caractérise par un arrêt de la réplication et ces auteurs montrent notamment que la surexpression d'*EFEMP1* dans les fibroblastes quiescents stimule la synthèse d'ADN, suggérant une augmentation de la prolifération (Lecka-Czernik et al., 1995). Cette étude montre également que la fibuline-3 est capable de contrôler la sénescence des fibroblastes de façon paracrine, et qu'il existe différentes formes avec des activités promotrices ou inhibitrices de la sénescence.

Par ailleurs, en utilisant un modèle d'induction de la sénescence dans des fibroblastes primaires, Brauer et al. ont montré que, par surexpression de la protéine p21 et en absence de lésions de l'ADN, le nombre et la taille des points d'adhésion focale augmentent et que cet effet est associé à une augmentation des forces de traction exercées sur la MEC par le cytosquelette (Brauer et al., 2023). Ces effets s'accompagnent d'une rigidification de la MEC, due en partie à la synthèse de lysyl oxydases. Dans notre étude, les cellules LX-2 si*EFEMP1* présentent un phénotype opposé à celui des fibroblastes sénescents observé dans (Brauer et al., 2023), avec une diminution du nombre de complexes d'adhésion focaux, une réduction des forces de tractions et de migration et un réseau de matrice fibrillaire altéré, suggérant que la fibuline-3 pourrait contribuer à l'établissement d'un phénotype sénescents dans les CEFs.

Etant donné que les cellules LX-2, en tant que lignée cellulaire immortalisée, ne peuvent constituer un modèle judicieux pour étudier la sénescence, nous avons utilisé les CEFs primaires pour étudier ce phénomène et avons observé une augmentation du nombre de cellules sénescents dans les conditions si*EFEMP1* ; observations qui semblent donc contradictoires avec la littérature.

Nous avons néanmoins observé que les CEFs primaires avaient fortement tendance à se décoller dans les conditions si*EFEMP1*, et on ne peut pas exclure que les cellules observées correspondent à une sous-population de cellules adhérentes qui auraient partiellement échappé à l'action des siRNAs. Le décollement des CEFs primaires déficientes en *EFEMP1* est possiblement une conséquence d'une diminution du nombre de points d'adhésion focale mais nous n'avons pas encore validé cette observation dans ces cellules. Pour conclure quant à l'implication de la fibuline-3 dans les phénomènes de sénescence et d'adhésion des CEFs, il sera donc important de réaliser une étude complète dans les CEFs primaires, en analysant toute la population cellulaire, y compris les

cellules décollées, afin d'établir des liens de causalité entre ces phénotypes : perturbation du réseau de fibronectine, formation et maturation des points d'adhésion focale, forces de traction et sénescence.

Compte tenu de son rôle établi dans le contrôle de la sénescence (Lecka-Czernik et al., 1995), il est probable que la fibuline-3 joue un rôle dans ce processus *in vivo*, lors de la réponse aux lésions hépatiques et de la progression de la fibrose. Dans ce contexte, il est désormais bien établi que la sénescence des CEFs est un mécanisme associé à la régression de la fibrose hépatique et à sa résolution (Krizhanovsky et al., 2008). Des études suggèrent que la présence, de façon transitoire, des fibroblastes sénescents peut avoir des effets bénéfiques dans le contexte de la réparation ou de la régénération tissulaire (Demaria et al., 2014; Yun, 2018). Il a néanmoins été démontré que leur présence de façon permanente dans les plaies chroniques non-cicatrisantes est associée à la sécrétion de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) et de TGF- β , affectant la synthèse de la MEC (Vande Berg et al., 2005). Il est donc possible que les cellules sénescents soient bénéfiques à la cicatrisation lorsqu'elles sont présentes de façon transitoire, mais néfastes lorsqu'elles s'accumulent dans le contexte de la progression fibrotique.

La sénescence appartient à un ensemble de programmes associés au ralentissement de la prolifération et à l'inactivation des cellules. La fibuline-3 est un marqueur de l'inactivation des CEFs, son gène *EFEMP1* faisant partie de la signature génique des CEFs inactivées (Rosenthal et al., 2021). Le processus d'inactivation des CEFs est considéré comme un moment clé dans la réversion de la fibrose, associé à l'élimination d'environ 50% des myofibroblastes (Kisseleva et al., 2012; Troeger et al., 2012). Il est néanmoins intéressant de noter que les études démontrent que les CEFs inactivées peuvent être réactivées *in vitro* et *in vivo*, en réponse à un nouveau stimulus, de façon beaucoup plus rapide et avec un phénotype plus fibrogénique que les CEFs nouvellement activées (El Taghdouini et al., 2015; Kisseleva et al., 2012). Notre récent modèle *in silico* démontre que la ré-inactivation de ces cellules contribue à l'accumulation de collagène de type I dans le cas de lésions chroniques (Bouguéon et al., 2024). Dans ce contexte, ces cellules inactivées sont réactivées, créant une population de myofibroblastes plus fibrogéniques. Ainsi, l'accumulation de cette population de CEFs inactivées, spécifiquement dans les stades fibrotiques avancés, contribue à la progression de la pathologie.

Compte tenu de la forte hétérogénéité des CEFs dans la fibrose hépatique, il est possible qu'il existe une sous-population de CEFs avec un phénotype intermédiaire entre inactivation et sénescence, et exprimant la fibuline-3. L'accumulation de ces cellules avec la progression de la pathologie pourrait ainsi expliquer l'augmentation des niveaux protéiques de la fibuline-3 dans les stades avancés et contribuer à la fibrose hépatique.

IV. Conclusion

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, le rôle spécifique de la fibuline-3 dans la plasticité des cellules étoilées, en lien avec la modulation de l'adhésion et de leur migration, possiblement *via* la régulation des réseaux de matrice extracellulaire à la surface de ces cellules. La localisation de la fibuline-3 et de ses partenaires dans le microenvironnement fibrotique devra maintenant être étudiée avec précision afin de caractériser le rôle de cette protéine dans la dynamique des cellules étoilées du foie au cours de la progression des maladies chroniques hépatiques.

Références bibliographiques

- Albig, A. R., Neil, J. R., & Schiemann, W. P. (2006). Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo. *Cancer Research*, *66*(5), 2621-2629. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4096>
- Albig, A. R., & Schiemann, W. P. (2004). Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *DNA and Cell Biology*, *23*(6), 367-379. <https://doi.org/10.1089/104454904323145254>
- Alcendor, D. J., Knobel, S., Desai, P., Zhu, W. Q., & Hayward, G. S. (2011). KSHV regulation of fibulin-2 in Kaposi's sarcoma: Implications for tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*, *179*(3), 1443-1454. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.024>
- Apte, S. S. (2020). ADAMTS Proteins: Concepts, Challenges, and Prospects. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2043*, 1-12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9698-8_1
- Aranda, B., Blankenburg, H., Kerrien, S., Brinkman, F. S. L., Ceol, A., Chautard, E., Dana, J. M., De Las Rivas, J., Dumousseau, M., Galeota, E., Gaulton, A., Goll, J., Hancock, R. E. W., Isserlin, R., Jimenez, R. C., Kerssemakers, J., Khadake, J., Lynn, D. J., Michaut, M., ... Hermjakob, H. (2011). PSICQUIC and PSIScore: Accessing and scoring molecular interactions. *Nature Methods*, *8*(7), 528-529. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1637>
- Argraves, W. S., Dickerson, K., Burgess, W. H., & Ruoslahti, E. (1989). Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor beta subunit cytoplasmic domain. *Cell*, *58*(4), 623-629. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90097-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90097-4)
- Argraves, W. S., Tran, H., Burgess, W. H., & Dickerson, K. (1990). Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *The Journal of Cell Biology*, *111*(6 Pt 2), 3155-3164. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.6.3155>
- Atfi, A., Dumont, E., Colland, F., Bonnier, D., L'Helgoualc'h, A., Prunier, C., Ferrand, N., Clément, B., Wewer, U. M., & Thérêt, N. (2007). The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF- β signaling through interaction with the type II receptor. *Journal of Cell Biology*, *178*(2), 201-208. <https://doi.org/10.1083/jcb.200612046>
- Auer-Grumbach, M., Weger, M., Fink-Puches, R., Papić, L., Fröhlich, E., Auer-Grumbach, P., El Shabrawi-Caelen, L., Schabhüttl, M., Windpassinger, C., Senderek, J., Budka, H., Trajanoski, S., Janecke, A. R., Haas, A., Metze, D., Pieber, T. R., & Guelly, C. (2011). Fibulin-5 mutations link inherited neuropathies, age-related macular degeneration and hyperelastic skin. *Brain: A Journal of Neurology*, *134*(Pt 6), 1839-1852. <https://doi.org/10.1093/brain/awr076>
- Azar, F., Courtet, K., Dekky, B., Bonnier, D., Dameron, O., Colige, A., Legagneux, V., & Theret, N. (2020). Integration of miRNA-regulatory networks in hepatic stellate cells identifies TIMP3 as a key factor in chronic liver disease. *Liver International*, *40*(8), 2021-2033. <https://doi.org/10.1111/liv.14476>
- Baglieri, J., Brenner, D. A., & Kisseleva, T. (2019). The Role of Fibrosis and Liver-Associated Fibroblasts in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(7), 1723. <https://doi.org/10.3390/ijms20071723>
- Baiocchi, A., Montaldo, C., Conigliaro, A., Grimaldi, A., Correani, V., Mura, F., Ciccocanti, F., Rotiroli, N., Brenna, A., Montalbano, M., D'Offizi, G., Capobianchi, M. R., Alessandro, R., Piacentini, M., Schininà, M. E., Maras, B., Nonno, F. D., Tripodi, M., & Mancone, C. (2016). Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution. *PLOS ONE*, *11*(3), e0151736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151736>
- Baird, B. N., Schliekelman, M. J., Ahn, Y.-H., Chen, Y., Roybal, J. D., Gill, B. J., Mishra, D. K., Erez, B., O'Reilly, M., Yang, Y., Patel, M., Liu, X., Thilaganathan, N., Larina, I. V., Dickinson, M. E., West, J. L., Gibbons, D. L., Liu, D. D., Kim, M. P., ... Kurie, J. M. (2013). Fibulin-2 is a driver

- of malignant progression in lung adenocarcinoma. *PloS One*, 8(6), e67054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067054>
- Balog, S., Fujiwara, R., Pan, S. Q., El-Baradie, K. B., Choi, H. Y., Sinha, S., Yang, Q., Asahina, K., Chen, Y., Li, M., Salomon, M., Ng, S. W.-K., & Tsukamoto, H. (2023). Emergence of highly profibrotic and proinflammatory Lrat+ Fbln2+ HSC subpopulation in alcoholic hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. <https://doi.org/10.1002/hep.32793>
- Bandzerewicz, A., & Gadomska-Gajadur, A. (2022). Into the Tissues : Extracellular Matrix and Its Artificial Substitutes: Cell Signalling Mechanisms. *Cells*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/cells11050914>
- Barth, J. L., Argraves, K. M., Roark, E. F., Little, C. D., & Argraves, W. S. (1998). Identification of chicken and *C. elegans* fibulin-1 homologs and characterization of the *C. elegans* fibulin-1 gene. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 17(8-9), 635-646. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(98\)90114-7](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(98)90114-7)
- Bauters, D., Spincemaille, P., Geys, L., Cassiman, D., Vermeersch, P., Bedossa, P., Scroyen, I., & Lijnen, H. R. (2016). ADAMTS5 deficiency protects against non-alcoholic steatohepatitis in obesity. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 36(12), 1848-1859. <https://doi.org/10.1111/liv.13181>
- Bekhouche, M., Leduc, C., Dupont, L., Janssen, L., Delolme, F., Vadon-Le Goff, S., Smargiasso, N., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., Zanella-Cleon, I., Dubail, J., De Pauw, E., Nusgens, B., Hulmes, D. J. S., Moali, C., & Colige, A. (2016). Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(5), 1741-1756. <https://doi.org/10.1096/fj.15-279869>
- Bohlega, S., Al-Ajlan, H., & Al-Saif, A. (2014). Mutation of fibulin-1 causes a novel syndrome involving the central nervous system and connective tissues. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 22(5), 640-643. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.210>
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(12), 786-801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>
- Bouguéon, M., Legagneux, V., Hazard, O., Bomo, J., Siegel, A., Feret, J., & Théret, N. (2024). A rule-based multiscale model of hepatic stellate cell plasticity: Critical role of the inactivation loop in fibrosis progression (p. 2024.01.24.577157). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.01.24.577157>
- Bourd-Boittin, K., Bonnier, D., Leyme, A., Mari, B., Tuffery, P., Samson, M., Ezan, F., Baffet, G., & Theret, N. (2011). Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(6), 2173-2184. <https://doi.org/10.1002/hep.24598>
- Bracht, T., Schweinsberg, V., Trippler, M., Kohl, M., Ahrens, M., Padden, J., Naboulsi, W., Barkovits, K., Megger, D. A., Eisenacher, M., Borchers, C. H., Schlaak, J. F., Hoffmann, A.-C., Weber, F., Baba, H. A., Meyer, H. E., & Sitek, B. (2015). Analysis of disease-associated protein expression using quantitative proteomics—Fibulin-5 is expressed in association with hepatic fibrosis. *Journal of Proteome Research*, 14(5), 2278-2286. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00053>
- Brandsma, C.-A., van den Berge, M., Postma, D. S., Jonker, M. R., Brouwer, S., Paré, P. D., Sin, D. D., Bossé, Y., Laviolette, M., Karjalainen, J., Fehrmann, R. S. N., Nickle, D. C., Hao, K., Spanjer, A. I. R., Timens, W., & Franke, L. (2015). A large lung gene expression study

- identifying fibulin-5 as a novel player in tissue repair in COPD. *Thorax*, 70(1), 21-32. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205091>
- Brauer, E., Lange, T., Keller, D., Görlitz, S., Cho, S., Keye, J., Gossen, M., Petersen, A., & Kornak, U. (2023). Dissecting the influence of cellular senescence on cell mechanics and extracellular matrix formation in vitro. *Aging Cell*, 22(3), e13744. <https://doi.org/10.1111/accel.13744>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brown, J. C., Sasaki, T., Göhring, W., Yamada, Y., & Timpl, R. (1997). The C-terminal domain V of perlecan promotes beta1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *European Journal of Biochemistry*, 250(1), 39-46. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00039.x>
- Bukong, T. N., Maurice, S. B., Chahal, B., Schaeffer, D. F., & Winwood, P. J. (2016). Versican : A novel modulator of hepatic fibrosis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 96(3), 361-374. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.152>
- Chakraborty, P., Dalpati, N., Bhan, C., Dash, S. P., Kumar, P., & Sarangi, P. P. (2020). A C-terminal fragment of adhesion protein Fibulin7 regulates neutrophil migration and functions and improves survival in LPS induced systemic inflammation. *Cytokine*, 131, 155113. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155113>
- Chakraborty, P., Dash, S. P., Dalpati, N., Kumar, P., Jain, D., & Sarangi, P. P. (2021). A C-terminal fragment of adhesion protein fibulin-7 inhibits growth of murine breast tumor by regulating macrophage reprogramming. *The FEBS Journal*, 288(3), 803-817. <https://doi.org/10.1111/febs.15333>
- Charchanti, A., Kanavaros, P., Koniaris, E., Katakaki, A., Glantzounis, G., Agnantis, N. J., & Goussia, A. C. (2021). Expression of Syndecan-1 in Chronic Liver Diseases : Correlation With Hepatic Fibrosis. *In Vivo (Athens, Greece)*, 35(1), 333-339. <https://doi.org/10.21873/invivo.12264>
- Chen, G., Xia, B., Fu, Q., Huang, X., Wang, F., Chen, Z., & Lv, Y. (2019). Matrix Mechanics as Regulatory Factors and Therapeutic Targets in Hepatic Fibrosis. *International Journal of Biological Sciences*, 15(12), 2509-2521. <https://doi.org/10.7150/ijbs.37500>
- Chen, J., Wei, D., Zhao, Y., Liu, X., & Zhang, J. (2013). Overexpression of EFEMP1 correlates with tumor progression and poor prognosis in human ovarian carcinoma. *PloS One*, 8(11), e78783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078783>
- Chen, X., Meng, J., Yue, W., Yu, J., Yang, J., Yao, Z., & Zhang, L. (2014). Fibulin-3 suppresses Wnt/ β -catenin signaling and lung cancer invasion. *Carcinogenesis*, 35(8), 1707-1716. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu023>
- Chen, Y., Gilbert, M. A., Grochowski, C. M., McEldrew, D., Llewellyn, J., Waisbourd-Zinman, O., Hakonarson, H., Bailey-Wilson, J. E., Russo, P., Wells, R. G., Loomes, K. M., Spinner, N. B., & Devoto, M. (2018). A genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 2p16.1 within the gene EFEMP1. *PLoS Genetics*, 14(8), e1007532. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007532>
- Chowdhury, A., Hasselbach, L., Echtermeyer, F., Jyotsana, N., Theilmeier, G., & Herzog, C. (2017). Fibulin-6 regulates pro-fibrotic TGF- β responses in neonatal mouse ventricular cardiac fibroblasts. *Scientific Reports*, 7, 42725. <https://doi.org/10.1038/srep42725>
- Chowdhury, A., Herzog, C., Hasselbach, L., Khouzani, H. L., Zhang, J., Hammerschmidt, M., Rudat, C., Kispert, A., Gaestel, M., Menon, M. B., Tudorache, I., Hilfiker-Kleiner, D., Mühlfeld, C., Schmitto, J. D., Müller, M., & Theilmeier, G. (2014). Expression of fibulin-6 in failing hearts

- and its role for cardiac fibroblast migration. *Cardiovascular Research*, 103(4), 509-520. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu161>
- Clark-Patterson, G. L., Roy, S., Desrosiers, L., Knoepp, L. R., Sen, A., & Miller, K. S. (2021). Role of fibulin-5 insufficiency and prolapse progression on murine vaginal biomechanical function. *Scientific Reports*, 11(1), 20956. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00351-1>
- Claus, S., Fischer, J., Mégarbané, H., Mégarbané, A., Jobard, F., Debret, R., Peyrol, S., Saker, S., Devillers, M., Sommer, P., & Damour, O. (2008). A p.C217R mutation in fibulin-5 from cutis laxa patients is associated with incomplete extracellular matrix formation in a skin equivalent model. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(6), 1442-1450. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701211>
- Coates-Park, S., Rich, J. A., Stetler-Stevenson, W. G., & Peeney, D. (2024). The TIMP protein family : Diverse roles in pathophysiology. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 326(3), C917-C934. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00699.2023>
- Colige, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Dubail, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapière, C. M., & Nusgens, B. (2005). Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34397-34408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506458200>
- Cooley, M. A., Kern, C. B., Fresco, V. M., Wessels, A., Thompson, R. P., McQuinn, T. C., Twal, W. O., Mjaatvedt, C. H., Drake, C. J., & Argraves, W. S. (2008). Fibulin-1 is required for morphogenesis of neural crest-derived structures. *Developmental Biology*, 319(2), 336-345. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.029>
- Crawford, J., & Burt, A. (2012). Anatomy, pathophysiology and basic mechanisms of disease. *MacSween's Pathology of the Liver*, 1-77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3398-8.00001-5>
- Cuvellier, M., Ezan, F., Oliveira, H., Rose, S., Fricain, J.-C., Langouët, S., Legagneux, V., & Baffet, G. (2021). 3D culture of HepaRG cells in GelMa and its application to bioprinting of a multicellular hepatic model. *Biomaterials*, 269, 120611. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120611>
- Daneshgar, A., Klein, O., Nebrich, G., Weinhart, M., Tang, P., Arnold, A., Ullah, I., Pohl, J., Moosburner, S., Raschzok, N., Strücker, B., Bahra, M., Pratschke, J., Sauer, I. M., & Hillebrandt, K. H. (2020). The human liver matrisome—Proteomic analysis of native and fibrotic human liver extracellular matrices for organ engineering approaches. *Biomaterials*, 257, 120247. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120247>
- Dasouki, M., Markova, D., Garola, R., Sasaki, T., Charbonneau, N. L., Sakai, L. Y., & Chu, M.-L. (2007). Compound heterozygous mutations in fibulin-4 causing neonatal lethal pulmonary artery occlusion, aortic aneurysm, arachnodactyly, and mild cutis laxa. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 143A(22), 2635-2641. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31980>
- Davidson, B., Stavnes, H. T., Holth, A., Chen, X., Yang, Y., Shih, I.-M., & Wang, T.-L. (2011). Gene expression signatures differentiate ovarian/peritoneal serous carcinoma from breast carcinoma in effusions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(3), 535-544. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01023.x>
- Debeer, P., Schoenmakers, E. F. P. M., Twal, W. O., Argraves, W. S., De Smet, L., Fryns, J. P., & Van De Ven, W. J. M. (2002). The fibulin-1 gene (FBLN1) is disrupted in a t(12;22) associated with a complex type of synpolydactyly. *Journal of Medical Genetics*, 39(2), 98-104. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.2.98>

- Dekky, B., Azar, F., Bonnier, D., Monseur, C., Kalebić, C., Arpigny, E., Colige, A., Legagneux, V., & Théret, N. (2023). ADAMTS12 is a stromal modulator in chronic liver disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 37(11), e23237. <https://doi.org/10.1096/fj.202200692RRRR>
- DeLeve, L. D. (2015). Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 61(5), 1740-1746. <https://doi.org/10.1002/hep.27376>
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., de Bruin, A., Hara, E., & Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, 31(6), 722-733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Devarbhavi, H., Asrani, S. K., Arab, J. P., Nartey, Y. A., Pose, E., & Kamath, P. S. (2023). Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of Hepatology*, S0168-8278(23)00194-0. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.017>
- de Vega, S., Iwamoto, T., Nakamura, T., Hozumi, K., McKnight, D. A., Fisher, L. W., Fukumoto, S., & Yamada, Y. (2007). TM14 is a new member of the fibulin family (fibulin-7) that interacts with extracellular matrix molecules and is active for cell binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30878-30888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705847200>
- de Vega, S., Iwamoto, T., & Yamada, Y. (2009). Fibulins : Multiple roles in matrix structures and tissue functions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(11-12), 1890-1902. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8632-6>
- de Vega, S., Kondo, A., Suzuki, M., Arai, H., Jiapaer, S., Sabit, H., Nakada, M., Ikeuchi, T., Ishijima, M., Arikawa-Hirasawa, E., Yamada, Y., & Okada, Y. (2019). Fibulin-7 is overexpressed in glioblastomas and modulates glioblastoma neovascularization through interaction with angiopoietin-1. *International Journal of Cancer*, 145(8), 2157-2169. <https://doi.org/10.1002/ijc.32306>
- de Vega, S., Suzuki, N., Nonaka, R., Sasaki, T., Forcinito, P., Arikawa-Hirasawa, E., & Yamada, Y. (2014). A C-terminal fragment of fibulin-7 interacts with endothelial cells and inhibits their tube formation in culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 545. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.01.013>
- de Visser, H. M., Sanchez, C., Mastbergen, S. C., Lafeber, F. P. J. G., Henrotin, Y. E., & Weinans, H. (2019). Fib3-3 as a Biomarker for Osteoarthritis in a Rat Model with Metabolic Dysregulation. *Cartilage*, 10(3), 329-334. <https://doi.org/10.1177/1947603518754629>
- Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., & Meindl-Beinker, N. (2019). TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019. *Cells*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/cells8111419>
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 785-797. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>
- Djokic, J., Fagotto-Kaufmann, C., Bartels, R., Nelea, V., & Reinhardt, D. P. (2013). Fibulin-3, -4, and -5 are highly susceptible to proteolysis, interact with cells and heparin, and form multimers. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22821-22835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439158>
- Dou, C.-Y., Cao, C.-J., Wang, Z., Zhang, R.-H., Huang, L.-L., Lian, J.-Y., Xie, W.-L., & Wang, L.-T. (2016). EFEMP1 inhibits migration of hepatocellular carcinoma by regulating MMP2 and MMP9 via ERK1/2 activity. *Oncology Reports*, 35(6), 3489-3495. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4733>

- El Taghdouini, A., Najimi, M., Sancho-Bru, P., Sokal, E., & van Grunsven, L. A. (2015). In vitro reversion of activated primary human hepatic stellate cells. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 8, 14. <https://doi.org/10.1186/s13069-015-0031-z>
- El-Hallous, E., Sasaki, T., Hubmacher, D., Getie, M., Tiedemann, K., Brinckmann, J., Bätge, B., Davis, E. C., & Reinhardt, D. P. (2007). Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8935-8946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608204200>
- En-lin, S., Sheng-guo, C., & Hua-qiao, W. (2010). The expression of EFEMP1 in cervical carcinoma and its relationship with prognosis. *Gynecologic Oncology*, 117(3), 417-422. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.12.016>
- Ficht, X., & Iannacone, M. (2020). Immune surveillance of the liver by T cells. *Science Immunology*, 5(51), eaba2351. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba2351>
- Fisher, S. A., Rivera, A., Fritsche, L. G., Keilhauer, C. N., Lichtner, P., Meitinger, T., Rudolph, G., & Weber, B. H. F. (2007). Case-control genetic association study of fibulin-6 (FBLN6 or HMCN1) variants in age-related macular degeneration (AMD). *Human Mutation*, 28(4), 406-413. <https://doi.org/10.1002/humu.20464>
- Fontanil, T., Álvarez-Teijeiro, S., Villaronga, M. Á., Mohamedi, Y., Solares, L., Moncada-Pazos, A., Vega, J. A., García-Suárez, O., Pérez-Basterrechea, M., García-Pedrero, J. M., Obaya, A. J., & Cal, S. (2017). Cleavage of Fibulin-2 by the aggrecanases ADAMTS-4 and ADAMTS-5 contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells. *Oncotarget*, 8(8), 13716-13729. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14627>
- Fontanil, T., Mohamedi, Y., Cobo, T., Cal, S., & Obaya, Á. J. (2019). Novel Associations Within the Tumor Microenvironment: Fibulins Meet ADAMTSs. *Frontiers in Oncology*, 9, 796. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00796>
- Fontanil, T., Rúa, S., Llamazares, M., Moncada-Pazos, A., Quirós, P. M., García-Suárez, O., Vega, J. A., Sasaki, T., Mohamedi, Y., Esteban, M. M., Obaya, A. J., & Cal, S. (2014). Interaction between the ADAMTS-12 metalloprotease and fibulin-2 induces tumor-suppressive effects in breast cancer cells. *Oncotarget*, 5(5), 1253-1264. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1690>
- Forti, S., Scanlan, M. J., Invernizzi, A., Castiglioni, F., Pupa, S., Agresti, R., Fontanelli, R., Morelli, D., Old, L. J., Pupa, S. M., & Ménard, S. (2002). Identification of breast cancer-restricted antigens by antibody screening of SKBR3 cDNA library using a preselected patient's serum. *Breast Cancer Research and Treatment*, 73(3), 245-256. <https://doi.org/10.1023/a:1015854415746>
- Freeman, L. J., Lomas, A., Hodson, N., Sherratt, M. J., Mellody, K. T., Weiss, A. S., Shuttleworth, A., & Kielty, C. M. (2005). Fibulin-5 interacts with fibrillin-1 molecules and microfibrils. *The Biochemical Journal*, 388(Pt 1), 1-5. <https://doi.org/10.1042/BJ20050368>
- Friedman, S. L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2247-2250. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2247>
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells : Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews*, 88(1), 125-172. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>
- Furie, N., Shteynberg, D., Elkhatib, R., Perry, L., Ullmann, Y., Feferman, Y., Preis, M., Flugelman, M. Y., & Tzchori, I. (2016). Fibulin-5 regulates keloid-derived fibroblast-like cells through integrin beta-1. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(1), 35-40. <https://doi.org/10.1111/ics.12245>
- Furuta, K., Sato, S., Yamauchi, T., Ozawa, T., Harada, M., & Kakumu, S. (2008). Intrahepatic gene expression profiles in chronic hepatitis B and autoimmune liver disease. *Journal of Gastroenterology*, 43(11), 866-874. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2237-y>

- Gailhouste, L., Le Grand, Y., Odin, C., Guyader, D., Turlin, B., Ezan, F., Désille, Y., Guilbert, T., Bessard, A., Frémin, C., Theret, N., & Baffet, G. (2010). Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy : A new tool in the assessment of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, *52*(3), 398-406. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.12.009>
- Gallagher, W. M., Greene, L. M., Ryan, M. P., Sierra, V., Berger, A., Laurent-Puig, P., & Conseiller, E. (2001). Human fibulin-4 : Analysis of its biosynthetic processing and mRNA expression in normal and tumour tissues. *FEBS Letters*, *489*(1), 59-66. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02389-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02389-9)
- Gao, R., Tang, H., & Mao, J. (2023). Programmed Cell Death in Liver Fibrosis. *Journal of Inflammation Research*, *16*, 3897-3910. <https://doi.org/10.2147/JIR.S427868>
- Ge, Q., Chen, L., Jaffar, J., Argraves, W. S., Twal, W. O., Hansbro, P., Black, J. L., Burgess, J. K., & Oliver, B. (2015). Fibulin1C peptide induces cell attachment and extracellular matrix deposition in lung fibroblasts. *Scientific Reports*, *5*, 9496. <https://doi.org/10.1038/srep09496>
- Gianakas, C. A., Keeley, D. P., Ramos-Lewis, W., Park, K., Jayadev, R., Kenny, I. W., Chi, Q., & Sherwood, D. R. (2023). Hemicentin-mediated type IV collagen assembly strengthens juxtaposed basement membrane linkage. *The Journal of Cell Biology*, *222*(1), e202112096. <https://doi.org/10.1083/jcb.202112096>
- Giltay, R., Timpl, R., & Kostka, G. (1999). Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *18*(5), 469-480. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(99\)00038-4](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(99)00038-4)
- Godyna, S., Mann, D. M., & Argraves, W. S. (1995). A quantitative analysis of the incorporation of fibulin-1 into extracellular matrix indicates that fibronectin assembly is required. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *14*(6), 467-477. [https://doi.org/10.1016/0945-053x\(95\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0945-053x(95)90004-7)
- Gong, J., Jie, Y., Xiao, C., Zhou, W., Li, X., Chen, Y., Wu, Y., Cao, J., Zhang, Q., Gao, Z., Hu, B., & Chong, Y. (2020). Increased Expression of Fibulin-1 Is Associated With Hepatocellular Carcinoma Progression by Regulating the Notch Signaling Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 478. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00478>
- Gu, Y. C., Nilsson, K., Eng, H., & Ekblom, M. (2000). Association of extracellular matrix proteins fibulin-1 and fibulin-2 with fibronectin in bone marrow stroma. *British Journal of Haematology*, *109*(2), 305-313. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02011.x>
- Gupta, S., Dalpati, N., Rai, S. K., Sehrawat, A., Pai, V., & Sarangi, P. P. (2024). A synthetic bioactive peptide of the C-terminal fragment of adhesion protein Fibulin7 attenuates the inflammatory functions of innate immune cells in LPS-induced systemic inflammation. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*. <https://doi.org/10.1007/s00011-024-01903-7>
- Hasegawa, A., Yonezawa, T., Taniguchi, N., Otabe, K., Akasaki, Y., Matsukawa, T., Saito, M., Neo, M., Marmorstein, L. Y., & Lotz, M. K. (2017). Role of Fibulin 3 in Aging-Related Joint Changes and Osteoarthritis Pathogenesis in Human and Mouse Knee Cartilage. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *69*(3), 576-585. <https://doi.org/10.1002/art.39963>
- Hashimoto, G., Aoki, T., Nakamura, H., Tanzawa, K., & Okada, Y. (2001). Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS Letters*, *494*(3), 192-195. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02323-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02323-7)
- He, W., Huang, C., Zhang, X., Wang, D., Chen, Y., Zhao, Y., & Li, X. (2021). Identification of transcriptomic signatures and crucial pathways involved in non-alcoholic steatohepatitis. *Endocrine*, *73*(1), 52-64. <https://doi.org/10.1007/s12020-021-02716-y>

- Henrotin, Y., Gharbi, M., Mazzucchelli, G., Dubuc, J.-E., De Pauw, E., & Deberg, M. (2012). Fibulin 3 peptides Fib3-1 and Fib3-2 are potential biomarkers of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, *64*(7), 2260-2267. <https://doi.org/10.1002/art.34392>
- Heo, J. H., Song, J.-Y., Jeong, J.-Y., Kim, G., Kim, T. H., Kang, H., Kwon, A.-Y., & An, H. J. (2016). Fibulin-5 is a tumour suppressor inhibiting cell migration and invasion in ovarian cancer. *Journal of Clinical Pathology*, *69*(2), 109-116. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203129>
- Higashi, T., Friedman, S. L., & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *121*, 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>
- Hinz, B. (2009). Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: Implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Current Rheumatology Reports*, *11*(2), 120-126. <https://doi.org/10.1007/s11926-009-0017-1>
- Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Okawa, K., Hagiwara, A., Chien, K. R., Kita, T., & Nakamura, T. (2007). Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. *The Journal of Cell Biology*, *176*(7), 1061-1071. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611026>
- Horiguchi, M., Inoue, T., Ohbayashi, T., Hirai, M., Noda, K., Marmorstein, L. Y., Yabe, D., Takagi, K., Akama, T. O., Kita, T., Kimura, T., & Nakamura, T. (2009). Fibulin-4 conducts proper elastogenesis via interaction with cross-linking enzyme lysyl oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(45), 19029-19034. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908268106>
- Hoyer, J., Kraus, C., Hammersen, G., Geppert, J.-P., & Rauch, A. (2009). Lethal cutis laxa with contractural arachnodactyly, overgrowth and soft tissue bleeding due to a novel homozygous fibulin-4 gene mutation. *Clinical Genetics*, *76*(3), 276-281. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01204.x>
- Hu, B., Thirtamara-Rajamani, K. K., Sim, H., & Viapiano, M. S. (2009). Fibulin-3 is uniquely upregulated in malignant gliomas and promotes tumor cell motility and invasion. *Molecular Cancer Research: MCR*, *7*(11), 1756-1770. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0207>
- Hu, J., Duan, B., Jiang, W., Fu, S., Gao, H., & Lu, L. (2019). Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) suppressed the growth of hepatocellular carcinoma cells by promoting Semaphorin 3B(SEMA3B). *Cancer Medicine*, *8*(6), 3152-3166. <https://doi.org/10.1002/cam4.2144>
- Hu, X., Liu, T., Li, L., Gan, H., Wang, T., Pang, P., & Mao, J. (2023). Fibulin-2 Facilitates Malignant Progression of Hepatocellular Carcinoma. *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.5152/tjg.2023.22134>
- Huchtagowder, V., Sausgruber, N., Kim, K. H., Angle, B., Marmorstein, L. Y., & Urban, Z. (2006). Fibulin-4: A novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *78*(6), 1075-1080. <https://doi.org/10.1086/504304>
- Hulleman, J. D., Genereux, J. C., & Nguyen, A. (2016). Mapping wild-type and R345W fibulin-3 intracellular interactomes. *Experimental Eye Research*, *153*, 165-169. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.10.017>
- Hulleman, J. D., & Kelly, J. W. (2015). Genetic ablation of N-linked glycosylation reveals two key folding pathways for R345W fibulin-3, a secreted protein associated with retinal degeneration. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *29*(2), 565-575. <https://doi.org/10.1096/fj.14-255414>
- Hwang, C.-F., Chien, C.-Y., Huang, S.-C., Yin, Y.-F., Huang, C.-C., Fang, F.-M., Tsai, H.-T., Su, L.-J., & Chen, C.-H. (2010). Fibulin-3 is associated with tumour progression and a poor prognosis

- in nasopharyngeal carcinomas and inhibits cell migration and invasion via suppressed AKT activity. *The Journal of Pathology*, 222(4), 367-379. <https://doi.org/10.1002/path.2776>
- Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the matrisome—An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), a004903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>
- 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>
- Itou, R. A., Uyama, N., Hirota, S., Kawada, N., Wu, S., Miyashita, S., Nakamura, I., Suzumura, K., Sueoka, H., Okada, T., Hatano, E., Tsutsui, H., & Fujimoto, J. (2019). Immunohistochemical characterization of cancer-associated fibroblasts at the primary sites and in the metastatic lymph nodes of human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human Pathology*, 83, 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.08.016>
- Jaffar, J., Unger, S., Corte, T. J., Keller, M., Wolters, P. J., Richeldi, L., Cerri, S., Prêle, C. M., Hansbro, P. M., Argraves, W. S., Oliver, R. A., Oliver, B. G., Black, J. L., & Burgess, J. K. (2014). Fibulin-1 predicts disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 146(4), 1055-1063. <https://doi.org/10.1378/chest.13-2688>
- Jennings, C. M., Markel, A. C., Domingo, M. J. E., Miller, K. S., Bayer, C. L., & Parekh, S. H. (2024). Collagen organization and structure in FBLN5^{-/-} mice using label-free microscopy: Implications for pelvic organ prolapse. *Biomedical Optics Express*, 15(5), 2863-2875. <https://doi.org/10.1364/BOE.518976>
- Jeong, W.-I., Park, O., Radaeva, S., & Gao, B. (2006). STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 44(6), 1441-1451. <https://doi.org/10.1002/hep.21419>
- Joshi, S., Kaushik, M., Agarwal, M., & Daruka, M. (2023). Extracellular matrix : A regenerative conduit in dentistry. *IP International Journal of Periodontology and Implantology*, 8, 65-70. <https://doi.org/10.18231/j.ijpi.2023.014>
- Kamm, D. R., & McCommis, K. S. (2022). Hepatic stellate cells in physiology and pathology. *The Journal of Physiology*, 600(8), 1825-1837. <https://doi.org/10.1113/JP281061>
- Kanda, M., Nomoto, S., Okamura, Y., Hayashi, M., Hishida, M., Fujii, T., Nishikawa, Y., Sugimoto, H., Takeda, S., & Nakao, A. (2011). Promoter hypermethylation of fibulin 1 gene is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, 50(8), 571-579. <https://doi.org/10.1002/mc.20735>
- Kappanayil, M., Nampoothiri, S., Kannan, R., Renard, M., Coucke, P., Malfait, F., Menon, S., Ravindran, H. K., Kurup, R., Faiyaz-UI-Haque, M., Kumar, K., & De Paepe, A. (2012). Characterization of a distinct lethal arteriopathy syndrome in twenty-two infants associated with an identical, novel mutation in FBLN4 gene, confirms fibulin-4 as a critical determinant of human vascular elastogenesis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7, 61. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-61>
- 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>
- Karsdal, M. A., Nielsen, S. H., Leeming, D. J., Langholm, L. L., Nielsen, M. J., Manon-Jensen, T., Siebuhr, A., Gudmann, N. S., Rønnow, S., Sand, J. M., Daniels, S. J., Mortensen, J. H., & Schuppan, D. (2017). The good and the bad collagens of fibrosis—Their role in signaling and

- organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121, 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.014>
- Kashiwagi, M., Tortorella, M., Nagase, H., & Brew, K. (2001). TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *The Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12501-12504. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000848200>
- Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G. N., & Edwards, D. R. (2015). The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biology*, 16, 113. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0676-3>
- Khan, S. A., Dong, H., Joyce, J., Sasaki, T., Chu, M.-L., & Tsuda, T. (2016). Fibulin-2 is essential for angiotensin II-induced myocardial fibrosis mediated by transforming growth factor (TGF)- β . *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 96(7), 773-783. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.52>
- Kim, E. J., Lee, S. Y., Woo, M. K., Choi, S. I., Kim, T. R., Kim, M.-J., Kim, K. C., Cho, E. W., & Kim, I. G. (2012). Fibulin-3 promoter methylation alters the invasive behavior of non-small cell lung cancer cell lines via MMP-7 and MMP-2 regulation. *International Journal of Oncology*, 40(2), 402-408. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1191>
- Kim, I. G., Kim, S. Y., Choi, S. I., Lee, J. H., Kim, K. C., & Cho, E. W. (2014). Fibulin-3-mediated inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and self-renewal of ALDH+ lung cancer stem cells through IGF1R signaling. *Oncogene*, 33(30), 3908-3917. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.373>
- Kim, J., & Seki, E. (2023). Hyaluronan in liver fibrosis : Basic mechanisms, clinical implications, and therapeutic targets. *Hepatology Communications*, 7(4), e0083. <https://doi.org/10.1097/HCC9.0000000000000083>
- Kim, Y.-J., Yoon, H.-Y., Kim, S.-K., Kim, Y.-W., Kim, E.-J., Kim, I. Y., & Kim, W.-J. (2011). EFEMP1 as a novel DNA methylation marker for prostate cancer : Array-based DNA methylation and expression profiling. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(13), 4523-4530. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2817>
- Kimura, A., Toyoki, Y., Hakamada, K., Yoshihara, S., & Sasaki, M. (2008). Characterization of heparan sulfate on hepatocytes in regenerating rat liver. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 15(6), 608-614. <https://doi.org/10.1007/s00534-007-1321-7>
- Kinnman, N., Francoz, C., Barbu, V., Wendum, D., Rey, C., Hultcrantz, R., Poupon, R., & Housset, C. (2003). The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 83(2), 163-173. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000054178.01162.e4>
- Kisseleva, T., & Brenner, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 151-166. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
- Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., Evans, S. M., Dillmann, W., Glass, C. K., & Brenner, D. A. (2012). Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24), 9448-9453. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201840109>
- Klenotic, P. A., Munier, F. L., Marmorstein, L. Y., & Anand-Apte, B. (2004). Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is a binding partner of epithelial growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1). Implications for macular degenerations.

- The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30469-30473.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M403026200>
- Kluge, M., Mann, K., Dziadek, M., & Timpl, R. (1990). Characterization of a novel calcium-binding 90-kDa glycoprotein (BM-90) shared by basement membranes and serum. *European Journal of Biochemistry*, 193(3), 651-659. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19383.x>
- Knittel, T., Kobold, D., Piscaglia, F., Saile, B., Neubauer, K., Mehde, M., Timpl, R., & Ramadori, G. (1999). Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: Distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochemistry and Cell Biology*, 112(5), 387-401. <https://doi.org/10.1007/s004180050421>
- Kobayashi, N., Kostka, G., Garbe, J. H. O., Keene, D. R., Bächinger, H. P., Hanisch, F.-G., Markova, D., Tsuda, T., Timpl, R., Chu, M.-L., & Sasaki, T. (2007). A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 11805-11816. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611029200>
- Koda, Y., Teratani, T., Chu, P.-S., Hagihara, Y., Mikami, Y., Harada, Y., Tsujikawa, H., Miyamoto, K., Suzuki, T., Taniki, N., Sujino, T., Sakamoto, M., Kanai, T., & Nakamoto, N. (2021). CD8+ tissue-resident memory T cells promote liver fibrosis resolution by inducing apoptosis of hepatic stellate cells. *Nature Communications*, 12(1), 4474. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24734-0>
- Korfei, M., Schmitt, S., Ruppert, C., Henneke, I., Markart, P., Loeh, B., Mahavadi, P., Wygrecka, M., Klepetko, W., Fink, L., Bonniaud, P., Preissner, K. T., Lochnit, G., Schaefer, L., Seeger, W., & Guenther, A. (2011). Comparative proteomic analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and lung transplant donor lungs. *Journal of Proteome Research*, 10(5), 2185-2205. <https://doi.org/10.1021/pr1009355>
- Kostka, G., Giltay, R., Bloch, W., Addicks, K., Timpl, R., Fässler, R., & Chu, M.-L. (2001). Perinatal Lethality and Endothelial Cell Abnormalities in Several Vessel Compartments of Fibulin-1-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 21(20), 7025-7034. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.7025-7034.2001>
- Kovalszky, I., Schaff, Z., & Jeney, A. (1993). Potential markers (enzymes, proteoglycans) for human liver tumors. *Acta Bio-Medica De L'Ateneo Parmense: Organo Della Societa Di Medicina E Scienze Naturali Di Parma*, 64(5-6), 157-163.
- Krenkel, O., Hundertmark, J., Ritz, T. P., Weiskirchen, R., & Tacke, F. (2019). Single Cell RNA Sequencing Identifies Subsets of Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts in Liver Fibrosis. *Cells*, 8(5), 503. <https://doi.org/10.3390/cells8050503>
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., & Lowe, S. W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134(4), 657-667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>
- Kumagai, M., Tsuchiya, A., Yang, Y., Takeda, N., Natsui, K., Natusi, Y., Tomiyoshi, K., Yamazaki, F., Koseki, Y., Shinchi, H., Imawaka, N., Ukekawa, R., Nishibu, T., Abe, H., Sasaki, T., Ueda, K., & Terai, S. (2024). Fibulin-4 as a potential extracellular vesicle marker of fibrosis in patients with cirrhosis. *FEBS Open Bio*. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13842>
- Lau, J. Y., Oliver, B. G., Baraket, M., Beckett, E. L., Hansbro, N. G., Moir, L. M., Wilton, S. D., Williams, C., Foster, P. S., Hansbro, P. M., Black, J. L., & Burgess, J. K. (2010). Fibulin-1 is increased in asthma—A novel mediator of airway remodeling? *PloS One*, 5(10), e13360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013360>
- Law, E. W. L., Cheung, A. K. L., Kashuba, V. I., Pavlova, T. V., Zabarovsky, E. R., Lung, H. L., Cheng, Y., Chua, D., Lai-Wan Kwong, D., Tsao, S. W., Sasaki, T., Stanbridge, E. J., & Lung, M. L.

- (2012). Anti-angiogenic and tumor-suppressive roles of candidate tumor-suppressor gene, Fibulin-2, in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 31(6), 728-738. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.272>
- Le Pabic, H., Bonnier, D., Wewer, U. M., Coutand, A., Musso, O., Baffet, G., Clément, B., & Théret, N. (2003). ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 37(5), 1056-1066. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50205>
- Lecka-Czernik, B., Lumpkin, C. K., & Goldstein, S. (1995). An overexpressed gene transcript in senescent and quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, 15(1), 120-128. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.1.120>
- Lee, M. J., Roy, N. K., Mogford, J. E., Schiemann, W. P., & Mustoe, T. A. (2004). Fibulin-5 promotes wound healing in vivo. *Journal of the American College of Surgeons*, 199(3), 403-410. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2004.04.021>
- Lee, N. V., Rodriguez-Manzanique, J. C., Thai, S. N.-M., Twal, W. O., Luque, A., Lyons, K. M., Argraves, W. S., & Iruela-Arispe, M. L. (2005). Fibulin-1 acts as a cofactor for the matrix metalloprotease ADAMTS-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34796-34804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506980200>
- Legerstee, K., & Houtsmuller, A. B. (2021). A Layered View on Focal Adhesions. *Biology*, 10(11), 1189. <https://doi.org/10.3390/biology10111189>
- Lei, D., Zhang, F., Yao, D., Xiong, N., Jiang, X., & Zhao, H. (2017). MiR-338-5p suppresses proliferation, migration, invasion, and promote apoptosis of glioblastoma cells by directly targeting EFEMP1. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 89, 957-965. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.137>
- Leroy, V., Monier, F., Bottari, S., Trocme, C., Sturm, N., Hilleret, M.-N., Morel, F., & Zarski, J.-P. (2004). Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: Comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *The American Journal of Gastroenterology*, 99(2), 271-279. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.04055.x>
- Li, R., Wu, H., Jiang, H., Wang, Q., Dou, Z., Ma, H., Yan, S., Yuan, C., Yang, N., & Kong, B. (2020). FBLN5 is targeted by microRNA-27a-3p and suppresses tumorigenesis and progression in high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncology Reports*, 44(5), 2143-2151. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7749>
- Lin, M.-H., Pope, B. D., Sasaki, T., Keeley, D. P., Sherwood, D. R., & Miner, J. H. (2020). Mammalian hemicentin 1 is assembled into tracks in the extracellular matrix of multiple tissues. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 249(6), 775-788. <https://doi.org/10.1002/dvdy.159>
- Lin, Z., WANG, Z., LI, G., LI, B., XIE, W., & XIANG, D. (2016). Fibulin-3 may improve vascular health through inhibition of MMP-2/9 and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Medicine Reports*, 13(5), 3805-3812. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5036>
- Liu, G., Cooley, M. A., Jarnicki, A. G., Borghuis, T., Nair, P. M., Tjin, G., Hsu, A. C., Haw, T. J., Fricker, M., Harrison, C. L., Jones, B., Hansbro, N. G., Wark, P. A., Horvat, J. C., Argraves, W. S., Oliver, B. G., Knight, D. A., Burgess, J. K., & Hansbro, P. M. (2019). Fibulin-1c regulates transforming growth factor- β activation in pulmonary tissue fibrosis. *JCI Insight*, 5(16), e124529, 124529. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124529>
- Liu, G., Cooley, M. A., Nair, P. M., Donovan, C., Hsu, A. C., Jarnicki, A. G., Haw, T. J., Hansbro, N. G., Ge, Q., Brown, A. C., Tay, H., Foster, P. S., Wark, P. A., Horvat, J. C., Bourke, J. E.,

- Grainge, C. L., Argraves, W. S., Oliver, B. G., Knight, D. A., ... Hansbro, P. M. (2017). Airway remodelling and inflammation in asthma are dependent on the extracellular matrix protein fibulin-1c. *The Journal of Pathology*, *243*(4), 510-523. <https://doi.org/10.1002/path.4979>
- Livingstone, I., Uversky, V. N., Furniss, D., & Wiberg, A. (2020). The Pathophysiological Significance of Fibulin-3. *Biomolecules*, *10*(9), E1294. <https://doi.org/10.3390/biom10091294>
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M., & Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, *79*(1), 144-152. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76279-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76279-5)
- Loeys, B., Van Maldergem, L., Mortier, G., Coucke, P., Gerniers, S., Naeyaert, J.-M., & De Paepe, A. (2002). Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (FBLN5) results in a severe form of cutis laxa. *Human Molecular Genetics*, *11*(18), 2113-2118. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.18.2113>
- Lomas, A. C., Mellody, K. T., Freeman, L. J., Bax, D. V., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2007). Fibulin-5 binds human smooth-muscle cells through alpha5beta1 and alpha4beta1 integrins, but does not support receptor activation. *The Biochemical Journal*, *405*(3), 417-428. <https://doi.org/10.1042/BJ20070400>
- Lotery, A. J., Baas, D., Ridley, C., Jones, R. P. O., Klaver, C. C. W., Stone, E., Nakamura, T., Luff, A., Griffiths, H., Wang, T., Bergen, A. A. B., & Trump, D. (2006). Reduced secretion of fibulin 5 in age-related macular degeneration and cutis laxa. *Human Mutation*, *27*(6), 568-574. <https://doi.org/10.1002/humu.20344>
- Luo, R., Zhang, M., Liu, L., Lu, S., Zhang, C. Z., & Yun, J. (2013). Decrease of fibulin-3 in hepatocellular carcinoma indicates poor prognosis. *PloS One*, *8*(8), e70511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070511>
- MacDonald, B. T., Keshishian, H., Mundorff, C. C., Arduini, A., Lai, D., Bendinelli, K., Popp, N. R., Bhandary, B., Clauser, K. R., Specht, H., Elowe, N. H., Laprise, D., Xing, Y., Kaushik, V. K., Carr, S. A., & Ellinor, P. T. (2022). TAILS Identifies Candidate Substrates and Biomarkers of ADAMTS7, a Therapeutic Protease Target in Coronary Artery Disease. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *21*(4), 100223. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100223>
- Mahajan, D., Kancharla, S., Kolli, P., Sharma, A. K., Singh, S., Kumar, S., Mohanty, A. K., & Jena, M. K. (2021). Role of Fibulins in Embryonic Stage Development and Their Involvement in Various Diseases. *Biomolecules*, *11*(5), 685. <https://doi.org/10.3390/biom11050685>
- Manders, D. B., Kishore, H. A., Gazdar, A. F., Keller, P. W., Tsunozumi, J., Yanagisawa, H., Lea, J., & Word, R. A. (2018). Dysregulation of fibulin-5 and matrix metalloproteases in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, *9*(18), 14251-14267. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24484>
- Mao, H. Y., Liu, S. P., Kong, G. M., Xu, Y., Xu, Y. C., Sun, G. Z., Wang, Z., Han, F., Tong, J. D., & Bo, P. (2019). FBLN3 inhibited the invasion and metastasis of colorectal cancer through the AKT/mTOR pathway. *Neoplasma*, *66*(3), 336-342. https://doi.org/10.4149/neo_2018_180703N441
- Mao, S. A., Glorioso, J. M., & Nyberg, S. L. (2014). Liver regeneration. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *163*(4), 352-362. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.01.005>
- Marmorstein, L. Y., Munier, F. L., Arsenijevic, Y., Schorderet, D. F., McLaughlin, P. J., Chung, D., Traboulsi, E., & Marmorstein, A. D. (2002). Aberrant accumulation of EFEMP1 underlies drusen formation in Malattia Leventinese and age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(20), 13067-13072. <https://doi.org/10.1073/pnas.202491599>

- Mazza, G., Telese, A., Al-Akkad, W., Frenguelli, L., Levi, A., Marrali, M., Longato, L., Thanapirom, K., Vilia, M. G., Lombardi, B., Crowley, C., Crawford, M., Karsdal, M. A., Leeming, D. J., Marrone, G., Bottcher, K., Robinson, B., Del Rio Hernandez, A., Tamburrino, D., ... Rombouts, K. (2019). Cirrhotic Human Liver Extracellular Matrix 3D Scaffolds Promote Smad-Dependent TGF- β 1 Epithelial Mesenchymal Transition. *Cells*, 9(1), E83. <https://doi.org/10.3390/cells9010083>
- McCulloch, D. R., Nelson, C. M., Dixon, L. J., Silver, D. L., Wylie, J. D., Lindner, V., Sasaki, T., Cooley, M. A., Argraves, W. S., & Apte, S. S. (2009). ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Developmental Cell*, 17(5), 687-698. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.008>
- McDonald, B., & Kubes, P. (2016). Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. *Gastroenterology*, 151(6), 1087-1095. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.048>
- McLaughlin, P. J., Bakall, B., Choi, J., Liu, Z., Sasaki, T., Davis, E. C., Marmorstein, A. D., & Marmorstein, L. Y. (2007). Lack of fibulin-3 causes early aging and herniation, but not macular degeneration in mice. *Human Molecular Genetics*, 16(24), 3059-3070. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm264>
- McLaughlin, P. J., Chen, Q., Horiguchi, M., Starcher, B. C., Stanton, J. B., Broekelmann, T. J., Marmorstein, A. D., McKay, B., Mecham, R., Nakamura, T., & Marmorstein, L. Y. (2006). Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 26(5), 1700-1709. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.5.1700-1709.2006>
- 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>
- Melton, A. C., & Yee, H. F. (2007). Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(6), 1446-1453. <https://doi.org/10.1002/hep.21606>
- Mohamedi, Y., Fontanil, T., Cobo, T., Vega, J. A., Cobo, J. L., García-Suárez, O., Cobo, J., Cal, S., & Obaya, Á. J. (2019). The molecular interaction of ADAMTS-1 and fibulin-1 and its potential contribution to breast cancer biology. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2019. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.81>
- Mohamedi, Y., Fontanil, T., Vega, J. A., Cobo, T., Cal, S., & Obaya, Á. J. (2024). Lung Inflammatory Phenotype in Mice Deficient in Fibulin-2 and ADAMTS-12. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25042024>
- Moll, F., Katsaros, D., Lazennec, G., Hellio, N., Roger, P., Giacalone, P.-L., Chalbos, D., Maudelonde, T., Rochefort, H., & Pujol, P. (2002). Estrogen induction and overexpression of fibulin-1C mRNA in ovarian cancer cells. *Oncogene*, 21(7), 1097-1107. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205171>
- Mooney, D. J., Langer, R., & Ingber, D. E. (1995). Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix. *Journal of Cell Science*, 108(6), 2311-2320. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.6.2311>
- Morrissey, M. A., Keeley, D. P., Hagedorn, E. J., McClatchey, S. T. H., Chi, Q., Hall, D. H., & Sherwood, D. R. (2014). B-LINK: A hemicentin, plakin, and integrin-dependent adhesion system that links tissues by connecting adjacent basement membranes. *Developmental Cell*, 31(3), 319-331. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.08.024>

- Muriel, J. M., Dong, C., Hutter, H., & Vogel, B. E. (2005). Fibulin-1C and Fibulin-1D splice variants have distinct functions and assemble in a hemicentin-dependent manner. *Development (Cambridge, England)*, *132*(19), 4223-4234. <https://doi.org/10.1242/dev.02007>
- Muriel, J. M., Dong, C., & Vogel, B. E. (2012). Distinct regions within fibulin-1D modulate interactions with hemicentin. *Experimental Cell Research*, *318*(20), 2543-2547. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.08.007>
- Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biology*, *12*(11), 233. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-11-233>
- Murtha, L. A., Hardy, S. A., Mabotuwana, N. S., Bigland, M. J., Bailey, T., Raguram, K., Liu, S., Ngo, D. T., Sverdlov, A. L., Tomin, T., Birner-Gruenberger, R., Hume, R. D., Iismaa, S. E., Humphreys, D. T., Patrick, R., Chong, J. J. H., Lee, R. J., Harvey, R. P., Graham, R. M., ... Boyle, A. J. (2023). Fibulin-3 is necessary to prevent cardiac rupture following myocardial infarction. *Scientific Reports*, *13*(1), 14995. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41894-9>
- Musso, O., Rehn, M., Saarela, J., Théret, N., Liétard, J., Hintikka, null, Lotrian, D., Campion, J. P., Pihlajaniemi, T., & Clément, B. (1998). Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *28*(1), 98-107. <https://doi.org/10.1002/hep.510280115>
- Naba, A., Clauser, K. R., & Hynes, R. O. (2015). Enrichment of Extracellular Matrix Proteins from Tissues and Digestion into Peptides for Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *101*, e53057. <https://doi.org/10.3791/53057>
- Nakamura, T. (2018). Roles of short fibulins, a family of matricellular proteins, in lung matrix assembly and disease. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *73*, 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.003>
- Nakamura, T., Lozano, P. R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C.-F., Kobuke, K., Dalton, N., Takada, Y., Tashiro, K., Ross, J., Honjo, T., & Chien, K. R. (2002). Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature*, *415*(6868), 171-175. <https://doi.org/10.1038/415171a>
- Nakamura, T., Ruiz-Lozano, P., Lindner, V., Yabe, D., Taniwaki, M., Furukawa, Y., Kobuke, K., Tashiro, K., Lu, Z., Andon, N. L., Schaub, R., Matsumori, A., Sasayama, S., Chien, K. R., & Honjo, T. (1999). DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(32), 22476-22483. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22476>
- Nakasaki, M., Hwang, Y., Xie, Y., Kataria, S., Gund, R., Hajam, E. Y., Samuel, R., George, R., Danda, D., M J, P., Nakamura, T., Shen, Z., Briggs, S., Varghese, S., & Jamora, C. (2015). The matrix protein Fibulin-5 is at the interface of tissue stiffness and inflammation in fibrosis. *Nature Communications*, *6*, 8574. <https://doi.org/10.1038/ncomms9574>
- Nandhu, M. S., Hu, B., Cole, S. E., Erdreich-Epstein, A., Rodriguez-Gil, D. J., & Viapiano, M. S. (2014). Novel paracrine modulation of Notch-DLL4 signaling by fibulin-3 promotes angiogenesis in high-grade gliomas. *Cancer Research*, *74*(19), 5435-5448. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0685>
- 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>
- Nomoto, S., Kanda, M., Okamura, Y., Nishikawa, Y., Qiyong, L., Fujii, T., Sugimoto, H., Takeda, S., & Nakao, A. (2010). Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1, EFEMP1, a novel tumor-suppressor gene detected in hepatocellular carcinoma using

- double combination array analysis. *Annals of Surgical Oncology*, 17(3), 923-932. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0790-0>
- Obaya, A. J., Rua, S., Moncada-Pazos, A., & Cal, S. (2012). The dual role of fibulins in tumorigenesis. *Cancer Letters*, 325(2), 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.019>
- Oshima, J., Sidorova, J. M., & Monnat, R. J. (2017). Werner syndrome: Clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions. *Ageing Research Reviews*, 33, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.03.002>
- Pan, T. C., Sasaki, T., Zhang, R. Z., Fässler, R., Timpl, R., & Chu, M. L. (1993). Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium binding. *The Journal of Cell Biology*, 123(5), 1269-1277. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.5.1269>
- Pan, T.-C., Kluge, M., Zhang, R.-Z., Mayer, U., Timpl, R., & Chu, M.-L. (1993). Sequence of extracellular mouse protein BM-90/fibulin and its calcium-dependent binding to other basement-membrane ligands. *European Journal of Biochemistry*, 215(3), 733-740. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18086.x>
- Papke, C. L., Tsunozumi, J., Ringuette, L.-J., Nagaoka, H., Terajima, M., Yamashiro, Y., Urquhart, G., Yamauchi, M., Davis, E. C., & Yanagisawa, H. (2015). Loss of fibulin-4 disrupts collagen synthesis and maturation: Implications for pathology resulting from EFEMP2 mutations. *Human Molecular Genetics*, 24(20), 5867-5879. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv308>
- Pezzoli, D., Di Paolo, J., Kumra, H., Fois, G., Candiani, G., Reinhardt, D. P., & Mantovani, D. (2018). Fibronectin promotes elastin deposition, elasticity and mechanical strength in cellularised collagen-based scaffolds. *Biomaterials*, 180, 130-142. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.013>
- Piscaglia, F., Dudás, J., Knittel, T., Di Rocco, P., Kobold, D., Saile, B., Zocco, M. A., Timpl, R., & Ramadori, G. (2009). Expression of ECM proteins fibulin-1 and -2 in acute and chronic liver disease and in cultured rat liver cells. *Cell and Tissue Research*, 337(3), 449-462. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0823-9>
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., & Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 66(1), 212-227. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>
- Preis, M., Cohen, T., Sarnatzki, Y., Ben Yosef, Y., Schneiderman, J., Gluzman, Z., Koren, B., Lewis, B. S., Shaul, Y., & Flugelman, M. Y. (2006). Effects of fibulin-5 on attachment, adhesion, and proliferation of primary human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(3), 1024-1033. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.156>
- Rahn, D. D., Acevedo, J. F., Roshanravan, S., Keller, P. W., Davis, E. C., Marmorstein, L. Y., & Word, R. A. (2009). Failure of pelvic organ support in mice deficient in fibulin-3. *The American Journal of Pathology*, 174(1), 206-215. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080212>
- Ramadori, G., Saile, B., Ramadori, G., & Saile, B. (2002). Mesenchymal cells in the liver – one cell type or two? *Liver*, 22(4), 283-294. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0676.2002.01726.x>
- Reinhardt, D. P., Sasaki, T., Dzamba, B. J., Keene, D. R., Chu, M. L., Göhring, W., Timpl, R., & Sakai, L. Y. (1996). Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19489-19496. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19489>
- Renard, M., Holm, T., Veith, R., Callewaert, B. L., Adès, L. C., Baspinar, O., Pickart, A., Dasouki, M., Hoyer, J., Rauch, A., Trapane, P., Earing, M. G., Coucke, P. J., Sakai, L. Y., Dietz, H. C., De Paepe, A. M., & Loeyls, B. L. (2010). Altered TGFbeta signaling and cardiovascular manifestations in patients with autosomal recessive cutis laxa type I caused by fibulin-4

- deficiency. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 18(8), 895-901. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.45>
- 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>
- Roark, E. F., Keene, D. R., Haudenschild, C. C., Godyna, S., Little, C. D., & Argraves, W. S. (1995). The association of human fibulin-1 with elastic fibers : An immunohistological, ultrastructural, and RNA study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 43(4), 401-411. <https://doi.org/10.1177/43.4.7534784>
- Roehlen, N., Crouchet, E., & Baumert, T. F. (2020). Liver Fibrosis : Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9(4), E875. <https://doi.org/10.3390/cells9040875>
- Roman, J., & McDonald, J. A. (1993). Fibulin's organization into the extracellular matrix of fetal lung fibroblasts is dependent on fibronectin matrix assembly. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 8(5), 538-545. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/8.5.538>
- Rose, K. W. J., Taye, N., Karoulias, S. Z., & Hubmacher, D. (2021). Regulation of ADAMTS Proteases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 701959. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.701959>
- Rosenbloom, J., Abrams, W. R., & Mecham, R. (1993). Extracellular matrix 4 : The elastic fiber. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(13), 1208-1218.
- Rosenthal, S. B., Liu, X., Ganguly, S., Dhar, D., Pasillas, M. P., Ricciardelli, E., Li, R. Z., Troutman, T. D., Kisseleva, T., Glass, C. K., & Brenner, D. A. (2021). Heterogeneity of HSCs in a Mouse Model of NASH. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 74(2), 667-685. <https://doi.org/10.1002/hep.31743>
- Roybal, C. N., Marmorstein, L. Y., Vander Jagt, D. L., & Abcouwer, S. F. (2005). Aberrant accumulation of fibulin-3 in the endoplasmic reticulum leads to activation of the unfolded protein response and VEGF expression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(11), 3973-3979. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0070>
- Runhaar, J., Sanchez, C., Taralla, S., Henrotin, Y., & Bierma-Zeinstra, S. M. A. (2016). Fibulin-3 fragments are prognostic biomarkers of osteoarthritis incidence in overweight and obese women. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(4), 672-678. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.013>
- Sakane, S., Hikita, H., Shirai, K., Sakamoto, T., Narumi, R., Adachi, J., Kakita, N., Yamada, Y., Toyoda, H., Takahashi, H., Suda, G., Kai, M., Tahata, Y., Sakamori, R., Kumazaki, S., Fukumoto, K., Myojin, Y., Murai, K., Kodama, T., ... Takehara, T. (2024). Proteomic analysis of serum extracellular vesicles reveals Fibulin-3 as a new marker predicting liver-related events in MASLD. *Hepatology Communications*, 8(6), e0448. <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000448>
- Sanchez, C., Mazzucchelli, G., Lambert, C., Comblain, F., DePauw, E., & Henrotin, Y. (2018). Comparison of secretome from osteoblasts derived from sclerotic versus non-sclerotic subchondral bone in OA: A pilot study. *PloS One*, 13(3), e0194591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194591>
- Sarangji, P. P., Chakraborty, P., Dash, S. P., Ikeuchi, T., de Vega, S., Ambatipudi, K., Wahl, L., & Yamada, Y. (2018). Cell adhesion protein fibulin-7 and its C-terminal fragment negatively regulate monocyte and macrophage migration and functions in vitro and in vivo. *FASEB*

- Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(9), 4889-4898. <https://doi.org/10.1096/fj.201700686RRR>
- Sasaki, T., Kostka, G., Göhring, W., Wiedemann, H., Mann, K., Chu, M. L., & Timpl, R. (1995). Structural characterization of two variants of fibulin-1 that differ in nidogen affinity. *Journal of Molecular Biology*, 245(3), 241-250. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0020>
- Sasaki, T., Stoop, R., Sakai, T., Hess, A., Deutzmann, R., Schlötzer-Schrehardt, U., Chu, M.-L., & von der Mark, K. (2016). Loss of fibulin-4 results in abnormal collagen fibril assembly in bone, caused by impaired lysyl oxidase processing and collagen cross-linking. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 50, 53-66. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.12.002>
- Sasaki, T., Wiedemann, H., Matzner, M., Chu, M. L., & Timpl, R. (1996). Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix. *Journal of Cell Science*, 109 (Pt 12), 2895-2904. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.12.2895>
- Sato, Y., Sawada, S., & Nakanuma, Y. (2008). Fibulin-5 is involved in phleboscrosis of major portal vein branches associated with elastic fiber deposition in idiopathic portal hypertension. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 38(2), 166-173. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00253.x>
- Schaefer, L. (2014). Proteoglycans, key regulators of cell-matrix dynamics. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 35, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.05.001>
- 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>
- Schultz, D. W., Klein, M. L., Humpert, A. J., Luzier, C. W., Persun, V., Schain, M., Mahan, A., Runckel, C., Cassera, M., Vittal, V., Doyle, T. M., Martin, T. M., Weleber, R. G., Francis, P. J., & Acott, T. S. (2003). Analysis of the ARMD1 locus : Evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family. *Human Molecular Genetics*, 12(24), 3315-3323. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg348>
- Scott, L. E., Mair, D. B., Narang, J. D., Feleke, K., & Lemmon, C. A. (2015). Fibronectin fibrillogenesis facilitates mechano-dependent cell spreading, force generation, and nuclear size in human embryonic fibroblasts. *Integrative Biology*, 7(11), 1454-1465. <https://doi.org/10.1039/c5ib00217f>
- Seals, D. F., & Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases : Multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development*, 17(1), 7-30. <https://doi.org/10.1101/gad.1039703>
- Seeliger, H., Camaj, P., Ischenko, I., Kleespies, A., De Toni, E. N., Thieme, S. E., Blum, H., Assmann, G., Jauch, K.-W., & Bruns, C. J. (2009). EFEMP1 expression promotes in vivo tumor growth in human pancreatic adenocarcinoma. *Molecular Cancer Research: MCR*, 7(2), 189-198. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0132>
- Segade, F. (2010). Molecular evolution of the fibulins : Implications on the functionality of the elastic fibulins. *Gene*, 464(1-2), 17-31. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.05.003>
- Sharma, P., Beck, D., Murtha, L. A., Figtree, G., Boyle, A., & Gentile, C. (2022). Fibulin-3 Deficiency Protects Against Myocardial Injury Following Ischaemia/ Reperfusion in in vitro Cardiac Spheroids. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 913156. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.913156>
- Shmarakov, I. O., Jiang, H., Yang, K. J. Z., Goldberg, I. J., & Blaner, W. S. (2013). Hepatic retinoid stores are required for normal liver regeneration. *Journal of Lipid Research*, 54(4), 893-908. <https://doi.org/10.1194/jlr.M029801>

- Sicot, F.-X., Tsuda, T., Markova, D., Klement, J. F., Arita, M., Zhang, R.-Z., Pan, T.-C., Mecham, R. P., Birk, D. E., & Chu, M.-L. (2008). Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation. *Molecular and Cellular Biology*, 28(3), 1061-1067. <https://doi.org/10.1128/MCB.01876-07>
- Skov, V., Thomassen, M., Kjær, L., Larsen, T. S., Kruse, T. A., & Hasselbalch, H. (2019). Highly Deregulated Fibulins in Patients with Philadelphia-Negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Blood*, 134, 5396. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-130560>
- Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., Mullen, A. M., Bayon, Y., Pandit, A., Raghunath, M., & Zeugolis, D. I. (2019). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 31(1), e1801651. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>
- Spada, S., Tocci, A., Di Moduno, F., & Nisticò, P. (2021). Fibronectin as a multiregulatory molecule crucial in tumor matrix: From structural and functional features to clinical practice in oncology. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 40(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01908-8>
- Stone, E. M., Braun, T. A., Russell, S. R., Kuehn, M. H., Lotery, A. J., Moore, P. A., Eastman, C. G., Casavant, T. L., & Sheffield, V. C. (2004). Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine*, 351(4), 346-353. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040833>
- Stone, E. M., Lotery, A. J., Munier, F. L., Héon, E., Piguet, B., Guymer, R. H., Vandenberg, K., Cousin, P., Nishimura, D., Swiderski, R. E., Silvestri, G., Mackey, D. A., Hageman, G. S., Bird, A. C., Sheffield, V. C., & Schorderet, D. F. (1999). A single EFEMP1 mutation associated with both Malattia Leventinese and Doyme honeycomb retinal dystrophy. *Nature Genetics*, 22(2), 199-202. <https://doi.org/10.1038/9722>
- Tan, J., Cai, S., Luo, X., Li, Q., Chen, Y., Chen, Z., Mao, Y., Liu, G., Yang, M., & Liu, X. (2024). Stop codon variant in *EFEMP1* is associated with primary open-angle glaucoma due to impaired regulation of aqueous humor outflow. *Experimental Eye Research*, 241, 109859. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109859>
- Tang, J.-C., Liu, J.-H., Liu, X.-L., Liang, X., & Cai, X.-J. (2015). Effect of fibulin-5 on adhesion, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via an integrin-dependent mechanism. *World Journal of Gastroenterology*, 21(39), 11127-11140. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i39.11127>
- Tateaki, Y., Ogawa, T., Kawada, N., Kohashi, T., Arihiro, K., Tateno, C., Obara, M., & Yoshizato, K. (2004). Typing of hepatic nonparenchymal cells using fibulin-2 and cytoglobin/STAP as liver fibrogenesis-related markers. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(1), 41-49. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0666-0>
- Théret, N., Bouezzedine, F., Azar, F., Diab-Assaf, M., & Legagneux, V. (2021). ADAM and ADAMTS Proteins, New Players in the Regulation of Hepatocellular Carcinoma Microenvironment. *Cancers*, 13(7), 1563. <https://doi.org/10.3390/cancers13071563>
- Théret, N., Musso, O., L'Helgoualc'h, A., Campion, J. P., & Clément, B. (1998). Differential expression and origin of membrane-type 1 and 2 matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in association with MMP2 activation in injured human livers. *The American Journal of Pathology*, 153(3), 945-954. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65636-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65636-2)
- Théret, N., Musso, O., Turlin, B., Lotrian, D., Bioulac-Sage, P., Campion, J. P., Boudjéma, K., & Clément, B. (2001). Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 34(1), 82-88. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.25758>

- Thiele, M., Johansen, S., Gudmann, N. S., Madsen, B., Kjaergaard, M., Nielsen, M. J., Leeming, D. J., Jacobsen, S., Bendtsen, F., Møller, S., Detlefsen, S., Karsdal, M., Krag, A., & GALAXY Consortium. (2021). Progressive alcohol-related liver fibrosis is characterised by imbalanced collagen formation and degradation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *54*(8), 1070-1080. <https://doi.org/10.1111/apt.16567>
- Tian, H., Liu, J., Chen, J., Gatza, M. L., & Blobe, G. C. (2015). Fibulin-3 is a novel TGF- β pathway inhibitor in the breast cancer microenvironment. *Oncogene*, *34*(45), 5635-5647. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.13>
- Tran, H., Mattei, M., Godyna, S., & Argraves, W. S. (1997). Human fibulin-1D: Molecular cloning, expression and similarity with S1-5 protein, a new member of the fibulin gene family. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *15*(7), 479-493. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(97\)90021-4](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(97)90021-4)
- Tran, H., VanDusen, W. J., & Argraves, W. S. (1997). The self-association and fibronectin-binding sites of fibulin-1 map to calcium-binding epidermal growth factor-like domains. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(36), 22600-22606. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22600>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology: CB*, *27*(21), R1147-R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Troeberg, L., Lazenbatt, C., Anower-E-Khuda, M. F., Freeman, C., Federov, O., Habuchi, H., Habuchi, O., Kimata, K., & Nagase, H. (2014). Sulfated glycosaminoglycans control the extracellular trafficking and the activity of the metalloprotease inhibitor TIMP-3. *Chemistry & Biology*, *21*(10), 1300-1309. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.07.014>
- Troeger, J. S., Mederacke, I., Gwak, G.-Y., Dapito, D. H., Mu, X., Hsu, C. C., Pradere, J.-P., Friedman, R. A., & Schwabe, R. F. (2012). Deactivation of Hepatic Stellate Cells during Liver Fibrosis Resolution in Mice. *Gastroenterology*, *143*(4), 10.1053/j.gastro.2012.06.036. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.036>
- Tsuchida, T., & Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *14*(7), 397-411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
- Tsuda, T., Wu, J., Gao, E., Joyce, J., Markova, D., Dong, H., Liu, Y., Zhang, H., Zou, Y., Gao, F., Miller, T., Koch, W., Ma, X., & Chu, M.-L. (2012). Loss of fibulin-2 protects against progressive ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *52*(1), 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.11.001>
- Tsunezumi, J., Sugiura, H., Oinam, L., Ali, A., Thang, B. Q., Sada, A., Yamashiro, Y., Kuro-O, M., & Yanagisawa, H. (2018). Fibulin-7, a heparin binding matricellular protein, promotes renal tubular calcification in mice. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *74*, 5-20. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.04.014>
- Tu, K., Dou, C., Zheng, X., Li, C., Yang, W., Yao, Y., & Liu, Q. (2014). Fibulin-5 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-7 expression. *BMC Cancer*, *14*, 938. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-938>
- Twal, W. O., Czirok, A., Hegedus, B., Knaak, C., Chintalapudi, M. R., Okagawa, H., Sugi, Y., & Argraves, W. S. (2001). Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 24), 4587-4598. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.24.4587>
- Twal, W. O., Hammad, S. M., Guffy, S. L., & Argraves, W. S. (2015). A novel intracellular fibulin-1D variant binds to the cytoplasmic domain of integrin beta 1 subunit. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *43*, 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.021>

- Utani, A., Nomizu, M., & Yamada, Y. (1997). Fibulin-2 binds to the short arms of laminin-5 and laminin-1 via conserved amino acid sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2814-2820. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.5.2814>
- Vande Berg, J. S., Rose, M. A., Haywood-Reid, P. L., Rudolph, R., Payne, W. G., & Robson, M. C. (2005). Cultured pressure ulcer fibroblasts show replicative senescence with elevated production of plasmin, plasminogen activator inhibitor-1, and transforming growth factor-beta1. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 13(1), 76-83. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2005.130110.x>
- Visconti, R. P., Barth, J. L., Keeley, F. W., & Little, C. D. (2003). Codistribution analysis of elastin and related fibrillar proteins in early vertebrate development. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 22(2), 109-121. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(03\)00014-3](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(03)00014-3)
- Vogel, B. E., & Hedgecock, E. M. (2001). Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions. *Development (Cambridge, England)*, 128(6), 883-894. <https://doi.org/10.1242/dev.128.6.883>
- Volkomorov, V., Grigoryeva, E., Krasnov, G., Litviakov, N., Tsyganov, M., Karbyshev, M., Zavyalova, M., Afanasyev, S., Cherdyntseva, N., Lisitsyn, N., & Beresten, S. (2013). Search for potential gastric cancer markers using miRNA databases and gene expression analysis. *Experimental Oncology*, 35(1), 2-7.
- Wake, K. (1980). Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *International Review of Cytology*, 66, 303-353. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61977-4](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61977-4)
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., & Luo, Y. (2012). RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 14(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
- Wang, M., Topalovski, M., Toombs, J. E., Wright, C. M., Moore, Z. R., Boothman, D. A., Yanagisawa, H., Wang, H., Witkiewicz, A., Castrillon, D. H., & Brekken, R. A. (2015). Fibulin-5 Blocks Microenvironmental ROS in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, 75(23), 5058-5069. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0744>
- Wang, N., Tytell, J. D., & Ingber, D. E. (2009). Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(1), 75-82. <https://doi.org/10.1038/nrm2594>
- Wang, T., Wang, M., Fang, S., Wang, Q., Fang, R., & Chen, J. (2017). Fibulin-4 is associated with prognosis of endometrial cancer patients and inhibits cancer cell invasion and metastasis via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget*, 8(12), 18991-19012. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15086>
- Wang, W.-M., Ge, G., Lim, N. H., Nagase, H., & Greenspan, D. S. (2006). TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. *The Biochemical Journal*, 398(3), 515-519. <https://doi.org/10.1042/BJ20060630>
- Wang, Z., Cao, C.-J., Huang, L.-L., Ke, Z.-F., Luo, C.-J., Lin, Z.-W., Wang, F., Zhang, Y.-Q., & Wang, L.-T. (2015). EFEMP1 promotes the migration and invasion of osteosarcoma via MMP-2 with induction by AEG-1 via NF- κ B signaling pathway. *Oncotarget*, 6(16), 14191-14208. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3691>

- Wayne, G. J., Deng, S.-J., Amour, A., Borman, S., Matico, R., Carter, H. L., & Murphy, G. (2007). TIMP-3 inhibition of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) is modulated by interactions between aggrecan and the C-terminal domain of ADAMTS-4. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 20991-20998. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610721200>
- Welcker, D., Stein, C., Feitosa, N. M., Armistead, J., Zhang, J.-L., Lütke, S., Kleinriders, A., Brüning, J. C., Eming, S. A., Sengle, G., Niehoff, A., Bloch, W., & Hammerschmidt, M. (2021). Hemicentin-1 is an essential extracellular matrix component of the dermal-epidermal and myotendinous junctions. *Scientific Reports*, 11(1), 17926. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96824-4>
- Williams, S. A., & Schwarzbauer, J. E. (2009). A shared mechanism of adhesion modulation for tenascin-C and fibulin-1. *Molecular Biology of the Cell*, 20(4), 1141-1149. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-06-0621>
- Winship, A., Cuman, C., Rainczuk, K., & Dimitriadis, E. (2015). Fibulin-5 is upregulated in decidualized human endometrial stromal cells and promotes primary human extravillous trophoblast outgrowth. *Placenta*, 36(12), 1405-1411. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.10.008>
- Winship, A. L., Rainczuk, K., Ton, A., & Dimitriadis, E. (2016). Fibulin-5 localisation in human endometrial cancer shifts from epithelial to stromal with increasing tumour grade, and silencing promotes endometrial epithelial cancer cell proliferation. *Oncology Letters*, 12(1), 651-657. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4650>
- Wipff, P.-J., Rifkin, D. B., Meister, J.-J., & Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, 179(6), 1311-1323. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704042>
- Woodard, D. R., Daniel, S., Nakahara, E., Abbas, A., DiCesare, S. M., Collier, G. E., & Hulleman, J. D. (2022). A loss-of-function cysteine mutant in fibulin-3 (EFEMP1) forms aberrant extracellular disulfide-linked homodimers and alters extracellular matrix composition. *Human Mutation*, 43(12), 1945-1955. <https://doi.org/10.1002/humu.24452>
- Xu, X., Yang, C., Yu, X., & Wang, J. (2022). Fibulin-3 regulates the inhibitory effect of TNF- α on chondrocyte differentiation partially via the TGF- β /Smad3 signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1869(9), 119285. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119285>
- Yamamoto, K., Owen, K., Parker, A. E., Scilabra, S. D., Dudhia, J., Strickland, D. K., Troeberg, L., & Nagase, H. (2014). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-mediated endocytic clearance of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4 (ADAMTS-4): Functional differences of non-catalytic domains of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in LRP1 binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(10), 6462-6474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545376>
- Yamamoto, K., Troeberg, L., Scilabra, S. D., Pelosi, M., Murphy, C. L., Strickland, D. K., & Nagase, H. (2013). LRP-1-mediated endocytosis regulates extracellular activity of ADAMTS-5 in articular cartilage. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(2), 511-521. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216671>
- Yanagisawa, H., Davis, E. C., Starcher, B. C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (2002). Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature*, 415(6868), 168-171. <https://doi.org/10.1038/415168a>
- Yanagisawa, H., Schluterman, M. K., & Brekken, R. A. (2009). Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: Its function in development and disease. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3-4), 337-347. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0065-3>

- Yang, T., Qiu, H., Bao, W., Li, B., Lu, C., Du, G., Luo, X., Wang, L., & Wan, X. (2013). Epigenetic inactivation of EFEMP1 is associated with tumor suppressive function in endometrial carcinoma. *PLoS One*, *8*(6), e67458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067458>
- Yang, W., He, H., Wang, T., Su, N., Zhang, F., Jiang, K., Zhu, J., Zhang, C., Niu, K., Wang, L., Yuan, X., Liu, N., Li, L., Wei, W., & Hu, J. (2021). Single-Cell Transcriptomic Analysis Reveals a Hepatic Stellate Cell-Activation Roadmap and Myofibroblast Origin During Liver Fibrosis in Mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *74*(5), 2774-2790. <https://doi.org/10.1002/hep.31987>
- Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., & Janmey, P. A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *60*(1), 24-34. <https://doi.org/10.1002/cm.20041>
- Yi, C.-H., Smith, D. J., West, W. W., & Hollingsworth, M. A. (2007). Loss of fibulin-2 expression is associated with breast cancer progression. *The American Journal of Pathology*, *170*(5), 1535-1545. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060478>
- Yun, M. H. (2018). Cellular senescence in tissue repair: Every cloud has a silver lining. *The International Journal of Developmental Biology*, *62*(6-7-8), Article 6-7-8. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180081my>
- Zayas-Santiago, A., Cross, S. D., Stanton, J. B., Marmorstein, A. D., & Marmorstein, L. Y. (2017). Mutant Fibulin-3 Causes Proteoglycan Accumulation and Impaired Diffusion Across Bruch's Membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *58*(7), 3046-3054. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21720>
- Zhang, D., Wang, S., Chen, J., Liu, H., Lu, J., Jiang, H., Huang, A., & Chen, Y. (2017). Fibulin-4 promotes osteosarcoma invasion and metastasis by inducing epithelial to mesenchymal transition via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *International Journal of Oncology*, *50*(5), 1513-1530. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3921>
- Zhang, H., Wu, J., Dong, H., Khan, S. A., Chu, M.-L., & Tsuda, T. (2014). Fibulin-2 deficiency attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by reducing transforming growth factor- β signalling. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *126*(4), 275-288. <https://doi.org/10.1042/CS20120636>
- Zhang, H.-Y., Lardelli, M., & Ekblom, P. (1997). Sequence of zebrafish fibulin-1 and its expression in developing heart and other embryonic organs. *Development Genes and Evolution*, *207*(5), 340-351. <https://doi.org/10.1007/s004270050121>
- Zhang, R.-M., Kumra, H., & Reinhardt, D. P. (2020). Quantification of Extracellular Matrix Fiber Systems Related to ADAMTS Proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2043*, 237-250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9698-8_19
- Zhang, W., Conway, S. J., Liu, Y., Snider, P., Chen, H., Gao, H., Liu, Y., Isidan, K., Lopez, K. J., Campana, G., Li, P., Ekser, B., Francis, H., Shou, W., & Kubal, C. (2021). Heterogeneity of Hepatic Stellate Cells in Fibrogenesis of the Liver: Insights from Single-Cell Transcriptomic Analysis in Liver Injury. *Cells*, *10*(8), 2129. <https://doi.org/10.3390/cells10082129>
- Zhang, Y., Zhang, W., Zhang, R., & Xia, Y. (2022). Knockdown of FBLN2 suppresses TGF- β 1-induced MRC-5 cell migration and fibrosis by downregulating VTN. *Tissue & Cell*, *81*, 102005. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.102005>
- Zhao, W., Yang, A., Chen, W., Wang, P., Liu, T., Cong, M., Xu, A., Yan, X., Jia, J., & You, H. (2018). Inhibition of lysyl oxidase-like 1 (LOXL1) expression arrests liver fibrosis progression in cirrhosis by reducing elastin crosslinking. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, *1864*(4 Pt A), 1129-1137. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.01.019>

- Zhao, Y.-Q., Deng, X.-W., Xu, G.-Q., Lin, J., Lu, H.-Z., & Chen, J. (2023). Mechanical homeostasis imbalance in hepatic stellate cells activation and hepatic fibrosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *10*, 1183808. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1183808>
- Zheng, Q., Choi, J., Rouleau, L., Leask, R. L., Richardson, J. A., Davis, E. C., & Yanagisawa, H. (2006). Normal wound healing in mice deficient for fibulin-5, an elastin binding protein essential for dermal elastic fiber assembly. *The Journal of Investigative Dermatology*, *126*(12), 2707-2714. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700501>
- Zheng, Q., Davis, E. C., Richardson, J. A., Starcher, B. C., Li, T., Gerard, R. D., & Yanagisawa, H. (2007). Molecular analysis of fibulin-5 function during de novo synthesis of elastic fibers. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(3), 1083-1095. <https://doi.org/10.1128/MCB.01330-06>
- Zheng, X., Liu, L., Liu, J., Zhang, C., Zhang, J., Qi, Y., Xie, L., Zhang, C., Yao, G., & Bu, P. (2023). Fibulin7 Mediated Pathological Cardiac Remodeling through EGFR Binding and EGFR-Dependent FAK/AKT Signaling Activation. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, *10*(24), e2207631. <https://doi.org/10.1002/advs.202207631>
- Zhou, X., Rowe, R. G., Hiraoka, N., George, J. P., Wirtz, D., Mosher, D. F., Virtanen, I., Chernousov, M. A., & Weiss, S. J. (2008). Fibronectin fibrillogenesis regulates three-dimensional neovessel formation. *Genes & Development*, *22*(9), 1231-1243. <https://doi.org/10.1101/gad.1643308>
- Zhu, X.-J., Liu, J., Xu, X.-Y., Zhang, C.-D., & Dai, D.-Q. (2014). Novel tumor-suppressor gene epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 is epigenetically silenced and associated with invasion and metastasis in human gastric cancer. *Molecular Medicine Reports*, *9*(6), 2283-2292. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2135>

Annexes

A. Communications scientifiques

Article

“*Proteomic analysis of liver fibrosis reveals EFEMP1 as a new modulator of adhesion and migration of hepatic stellate cells.*” Célia Thomas, Fidaa Bouezzedine, Dominique Bonnier, Vincent Legagneux, Nathalie Théret. Soumis à Matrix Biology (le 11 juillet 2024)

Contribution dans des congrès internationaux

Congrès « Matrix Biology Europe » (Florence - Italie) – Septembre 2022

“*Integrative proteomics analysis of extracellular matrix identifies association of Fibulin-2, -3 and -5 with liver fibrosis and tumor aggressiveness.*” (Poster)

Congrès « European Association for the Study of the Liver » (Milan - Italie) – Juin 2024

“*Proteomic analysis of liver fibrosis reveals Fibulin-3 as a new regulator of hepatic stellate cell adhesion.*” (Poster)

Contribution dans des conférences

Journée « Printemps de la Recherche à l'lrset » (Rennes) - Avril 2023

“*Fibulins as novel actors in Chronic Liver Diseases?*” (Communication orale)

“Scientific days” Ecole doctorale SVS (Guerlédan) – Septembre 2023

“*Fibulins as novel actors in Chronic Liver Diseases?*” (Communication orale)

Meeting annuel Société Française de la Biologie de la Matrice Extracellulaire (Strasbourg) – Novembre 2023

“*Association of Fibulin-3 with liver fibrosis, a new regulator of hepatic stellate cell homeostasis?*” (Communication orale)

Bourse de voyage de la SFBMEc et prix de la meilleure communication orale en Cancérologie par Aponia Therapeutics

13^{ème} journée Recherche « Chimie, Biologie, Mathématique et Physique, la recherche fondamentale au service du Médicament et de la Santé » (Rennes) - Janvier 2024

“*Association of Fibulin-3 with liver fibrosis, a new regulator of hepatic stellate cells homeostasis?*” (Poster)

B. Enseignements

- 2021 : M1 BMC, UE Communication cellulaire, Université de Rennes (1H30 CM)
- 2022 : M1 BMC, UE Communication cellulaire, Université de Rennes (1H30 CM)
- 2022-2023 : L2 Biochimie, Université de Rennes (36H TP – Mission d'enseignement)

C. Animations scientifiques

- 2021 : Demi-journée DECLICS (Rencontres chercheurs-lycéens)
- 2021-2022 : Organisatrice Pint of Science Rennes 2022
- 2022-2023 : Membre du club des doctorants et post-doctorants de l'Irset « DOC'7 »
 - o Organisation de journées scientifiques :
 - « Printemps de la Recherche à l'Irset » : 14 avril 2023
 - « Chercheur·e·s d'Aujourd'hui et de Demain : 24 novembre 2023
 - o Organisation d'ateliers destinés aux doctorants et stagiaires de l'Irset
- 2022-2023 : Membre du Comité organisationnel des Séminaires de l'Irset

D. Autres formations suivies

Description de la formation	Trans.	Scien.	Organisateur	Volume horaire
Forum Doctorants – Entreprises	X		Pôle doctoral de Rennes	3h
Analyse d'images de microscopie optique		X	Université de Rennes	19h30
Certification Expérimentation Animale		X	Université de Rennes	60h
Ethique de la recherche et intégrité scientifique dans les relations humaines au travail	X		Pôle doctoral de Rennes	2h
Introduction à l'éthique de la recherche et à l'intégrité scientifique	X		Collège doctoral de Rennes	3h30
« Je cherche efficacement avec Pubmed »		X	BU de Rennes	1h
Journée interdisciplinaire « La Place des Femmes dans les Sciences »	X		Collège doctoral de Rennes	8h
« Créer des supports de cours efficaces »	X		Collège doctoral de Rennes	3h
MOOC Doctorat et poursuite de carrière	X		FUN-MOOC	12h

Titre : Les fibulines, de nouveaux acteurs dans les maladies chroniques hépatiques

Mots clés : foie ; fibrose ; matrice extracellulaire ; cellule étoilée du foie ; fibuline

Résumé : Les maladies chroniques hépatiques (MCHs) sont fréquemment associées au développement d'une fibrose hépatique, caractérisée par une accumulation excessive de matrice extracellulaire (MEC) entraînant une distorsion de l'architecture du foie et un dysfonctionnement des fonctions hépatiques. L'activation des cellules étoilées du foie (CEFs) est un élément-clé dans la fibrose hépatique : les CEFs activées se différencient sous forme de myofibroblastes capables de sécréter des composants de la MEC. Comprendre et caractériser le microenvironnement est essentiel pour le développement d'approches thérapeutiques efficaces. Dans ce contexte, notre équipe a initié un criblage protéomique qui vise à étudier l'altération dynamique de la MEC au cours de la progression des MCHs et identifier

de potentiels nouveaux candidats impliqués dans le remodelage de la MEC. Cette étude a notamment confirmé l'association des fibulines 2, 3 et 5 avec la progression de la fibrose hépatique.

Mes travaux avaient pour objectif de caractériser et comparer l'implication de ces trois fibulines dans le développement de la fibrose. Nous avons pu mettre en évidence des fonctions spécifiques pour chaque fibuline et montrer que les CEFs constituent la principale source cellulaire de ces trois fibulines dans le foie. Plus spécifiquement, nous avons mis en évidence et caractérisé le rôle de la fibuline-3 dans la régulation de l'adhésion et de la migration des CEFs, possiblement en régulant le remodelage matriciel à la surface des cellules.

Title: Fibulins as new actors in chronic liver diseases

Keywords: liver ; fibrosis ; extracellular matrix ; hepatic stellate cell ; fibulin

Abstract: Chronic liver diseases (CLD) are often associated with fibrosis development, characterized by excessive accumulation of extracellular matrix (ECM), leading to distortion of liver architecture and dysfunction. Activation of hepatic stellate cells (HSCs) is a key step in liver fibrosis: activated HSCs differentiate into myofibroblasts able to secrete ECM components. Understanding and characterizing the microenvironment is critical to develop new therapeutic approaches. In this context, our team initiated a proteomic screening which aimed at studying the dynamic alteration of the ECM during CLD progression and identifying new potential candidates possibly involved in ECM

remodeling. This study had notably confirmed the association of fibulin-2, -3 and -5 with progression of liver fibrosis.

The aim of my work was to characterize and compare the involvement of these three fibulins in the development of fibrosis. We have highlighted specific functions for each fibulin and identified HSCs as the major cellular source of these three fibulins in the liver. More specifically, we have identified and characterized the specific role of fibulin-3 in the regulation of HSC adhesion and migration, possibly by regulating ECM remodeling at the cell surface.