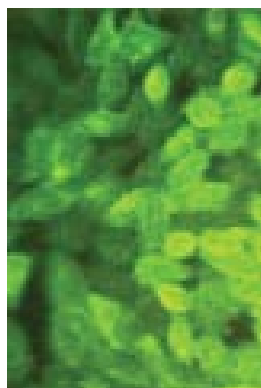


Les protéines CCN : quand multimodulaire rime avec multifonctionnel

Bernard Perbal

> La famille CCN comporte des protéines qui sont impliquées dans la régulation de phénomènes biologiques fondamentaux lors de la multiplication cellulaire normale et pathologique. L'implication de ces protéines dans la signalisation cellulaire associée à l'adhérence, la migration et la prolifération en font des éléments clés de la régulation de la croissance normale. Les contrôles négatif et positif que ces protéines effectuent vis-à-vis de la prolifération et de la différenciation cellulaire dans les conditions normales sont perturbés dans de nombreuses maladies et en particulier dans plusieurs exemples de tumeurs cancéreuses. Nous analyserons dans cet article les bases structurales qui ont conduit au regroupement de ces protéines en une même famille et qui sous-tendent leurs activités biologiques multiples. <



UFR de Biochimie,
Université Paris 7 - D. Diderot,
2, place Jussieu,
75005 Paris, France.
perbal@ccr.jussieu.fr

gènes *Elm1*, *rCOP1* et de trois gènes *WISP* (*wint1-induced secreted protein*) [9-11] partageant le même type d'organisation multimodulaire a consolidé la notion de nouvelle famille de régulateurs, et a étendu la diversité des fonctions biologiques attribuées aux protéines CCN.

La famille CCN

Chez l'homme, on connaît actuellement six gènes (et protéines) CCN. Nous suivons dans cet article, les recommandations de nomenclature (*Tableau 1*) proposées par le Comité Directeur de l'*International CCN Society* (<http://www.ccn-society.jussieu.fr>) [12].

Le gène *ccn1* est un gène « immédiat-précoce » dont l'expression est stimulée par les facteurs de croissance [2], le TGFβ [4], ou la transformation oncogénique par le virus du sarcome de Rous (RSV) [5]. Le gène *ccn2* est aussi induit par le TGFβ. La protéine pour laquelle il code possède une activité mitogénique et chimiotactique [6]. Le gène *ccn3* [7] est un des sites d'intégration du virus auxiliaire de la myéloblastose aviaire (MAV) qui induit chez la poule des néphroblastomes dont les caractéristiques anatomopathologiques les apparentent aux tumeurs de Wilms [8]. La situation rencontrée

> Le contrôle de la croissance cellulaire normale requiert l'action concertée de nombreuses voies de signalisation faisant intervenir des cascades réactionnelles qui impliquent différents types de protéines dont la variété de mode d'action a été révélée au cours des deux dernières décennies.

L'existence d'un nouveau groupe de régulateurs de la croissance et de la différenciation cellulaires, a été mise à jour par la découverte (séquentielle) de gènes constituant ce qu'il est maintenant convenu de dénommer « la famille CCN ». Cet acronyme a été originellement proposé [1] à la suite d'une analyse informatique des séquences nucléotidiques des gènes *cyr61* (*cystein rich 61*), *cef10* (*chicken embryo fibroblast10*) [2, 3], *fisp12* (*fibroblast inducible secreted protein12*), *ctfg* (*connective tissue growth factor*) [4-6] et *nov* (*nephroblastoma overexpressed*) [7, 8]. Cette analyse confirmait la très grande parenté structurale de ces gènes et, d'autre part, jetait les bases de la reconnaissance de quatre modules structuraux communs aux protéines pour lesquelles ils codent [5]. La découverte plus récente des

CONSENSUS

RCLCLVFTLLHL

CCN3 (NOV)	1	mgsvqstsfclrk	QCLCLVFTLLHL	lgqvaat	32
CCN2 (CTGF)	1	mtaasmgpv	R VAFVV LLAL	csrpavg	26
CCN1 (CYR61)	1	mssria	RALALVFTLLHL	trlalst	23
CCN4 (WISP1/ELM1)	1	mrwflpwttlaavt		aaaastvlatalspapttmdftp	36
CCN5 (WISP2/COP1)	1	mrgrtp	KTHLLAFSLLCL	lskvrt	23
CCN6 (WISP3)	1	meglifstlllag		laqfccrvqgtgpldttpegrpg	36

CONSENSUS

QFCP PC RCP QPPPRCPPGVSLVLDGCGCKVCA

CCN3 (NOV)	33	QRCP	pQC	PRCP	ATPPTCAPGVRAVLDCS	CCLVCA	68	
CCN2 (CTGF)	27	QNC	gPC	RCP	dEPAPRPCAGVSLVLDGCG	CCRVCA	61	
CCN1 (CYR61)	24	CP	aAC	HCP	LEAPKCAPGVGLVRDGGCG	CKVCA	57	
CCN4 (WISP1/ELM1)	37	apledtssrp	QFC	wPC	ECP	PSPPRCPLGVSLITDGC	CCKMCA	80
CCN5 (WISP2/COP1)	24		QLCP	tPC	TCP	WPPPRCPGLVSLVLDGCG	CCRVCA	57
CCN6 (WISP3)	37	evsdapqrk	QFCH	wPC	KCP	QQKPRCPPGVSLVRDGC	CCKIICA	79

CONSENSUS

KQLGESCSSEADPCDPH KGLYCDYGADRP RY TGV CTA VE GVPC

CCN3 (NOV)	69	RQGESCS	DLEPCDES	SGLYCDRSAD	PsNQ	TGI	CTA	VE	GDNC	110	
CCN2 (CTGF)	62	KQLGELC	TERDPCDPH	KGLFCDFGSPAN	RK	IGV	CTA	KD	GAPC	103	
CCN1 (CYR61)	58	KQLNEDC	SKTOPCD	HtKGLECNFGASST	AL	KGI	CRA	q	SE	GRPC	100
CCN4 (WISP1/ELM1)	81	QQLGDNCTEAAI	CDPH	RGLYCDYSGDRP	RYaIGV	C	A	q	VV	CVGC	123
CCN5 (WISP2/COP1)	58	RRLGEP	CDQLHVCAS	QGLVCQPGA	GP	GG	RGALCL	l	AEd	DSSC	100
CCN6 (WISP3)	80	KQPGEI	CNEADL	CDPH	KGLYCDYSVDRP	RYeIGV	C	A	ylV	AVGC	122

CONSENSUS

EFNGVIYRNGESFQPNCKYQCTCIDGAIGCVPLC DVRLPNPDCPHP

CCN3 (NOV)	111	VFDGVIYRS	GEKFQPSCKE	QCTCRDQIGCVPRC	q1	DVLLPEPN	CPAP	158
CCN2 (CTGF)	104	IFGGTVYRS	GESFOSSCKYQCT	CLDGAVGCMPLC	sm	DVRLPSPD	CPFP	151
CCN1 (CYR61)	101	EYNSRIYONGES	FQPNCKHQCT	CIDGAVGCIPLC	pq	ELSLPNLG	CPNP	148
CCN4 (WISP1/ELM1)	124	VLDGVRVYNNG	SFQPNCKYNT	CIDGAVGCTPLC	l	RVRPPRLW	CPHP	170
CCN5 (WISP2/COP1)	101	EVNGRLYREGET	FQPHCSIR	CRCEGGFTCVPLC	se	DVRLPSWD	CPHP	148
CCN6 (WISP3)	123	EFNOVHYHNGOV	FQPNPLFS	CLCVSGAIGCTPLF	ip	kLagsh	C	158

CONSENSUS

RRVEVPGKCCEEVVC DED

CCN3 (NOV)	159	RKVEVPGK	CCEKWI	CgpDEE	dslggl	tlaayrpeatlgvevs	dssv	204
CCN2 (CTGF)	152	RRVKLPGK	CCEEVVC	DEP	kdqtvvgp	alaayrledtfgpd	ptmira	197
CCN1 (CYR61)	149	RLVKVTGQ	CCEEVVC	DED	sikdpm	edqgllgkelgfdase	veltrn	195
CCN4 (WISP1/ELM1)	171	RRVSIPGH	CCEQWVC	EDD	akrprkt	aprdtgafdavge	veawhr	214
CCN5 (WISP2/COP1)	149	RRVEVLGK	CCEWVC	GQG	gglgtq	plpaagp	qfsglvsslppgv	192
CCN6 (WISP3)	159	sgakg	GKksdQsnC		slep	llqg		187

CONSENSUS

NCIVQTTEWSPCKTCCG

CCN3 (NOV)	205		NCIEQTTEW	TACSKS	CG	221	
CCN2 (CTGF)	198		NCLVQTTEWS	ACKSKT	CG	214	
CCN1 (CYR61)	196	neliavgk	gsslkr	lpvf	gmepri	lynlpggq	244
CCN4 (WISP1/ELM1)	215		NCIAYTSP	WPSPCST	SCG	231	
CCN5 (WISP2/COP1)	193		PCPEWST	AWGP	CSTTCG	209	
CCN6 (WISP3)	188	lstsykt	mpayrnl	pliwkk			224

CONSENSUS		MGISTRVTNENAQCRMKEKTRLCMVRPC	DQDI	TIK	KGKK			
CCN3 (NOV)	222	MGFSTRVTN ^{NR} QCEMLKQ ^{TR} LCMVRPC	EQEP	eqp	TDK	KGKK	263	
CCN2 (CTGF)	215	MGISTRVTNDNAS ^{CR} LEKQ ^{SRL} CMVRPC	EADL	ee	NIK	KGKK	255	
CCN1 (CYR61)	245	TGISTRVTNDNPE ^{CR} L ^V KETRI ^{CE} VRPC	GQPV	ys	SIK	KGKK	285	
CCN4 (WISP1/ELM1)	232	IGVSTRISNVNAQ ^{CP} WPEQ ^{ES} R ^{LC} NLRPC	DVDI	ht	L ^{IK}	AGKK	272	
CCN5 (WISP2/COP1)	210	LGMATRVSN ^{NR} FC ^{RL} ETOR ^{RL} CLSRPC	ppsgrs		pqsaf		250	
CCN6 (WISP3)	225	MGISNRVTN ^{ENS} NC ^{EM} RK ^{EK} RL ^{CY} IQPC	DSNI	lk	TIK	ip	KGKT	267
CONSENSUS		CLRTKK	KPVKFTFSGCTSTKTYKPKFCGVCMDGRCC ^{TPH} KT ^{TI} QV					
CN3 (NOV)	264	CLRTKK	sl	KAIHLQ ^{FK} N ^{CT} SLHTYK ^{PR} FC ^{GV} CS ^{DGR} CC ^{TPH} NT ^{KT} TIQA			311	
CN2 (CTGF)	256	CIRTPK	is	KPIK ^{FEL} SG ^{CT} SMKTY ^{RA} K ^{FC} GV ^{CT} DGR ^{CC} TPH ^{RT} IT ^{LP} V			303	
CN1 (CYR61)	286	CSKTKK	sp	EP	RFTYAG ^{CL} SV ^{KK} Y ^{RP} K ^Y CG ^{CS} C ^{VDGR} CC ^{TP} Q ^L TR ^{IV} KM		333	
CN4 (WISP1/ELM1)	273	CLAVYQ	pe	ASM ^N FT ^{LAG} CT ^{STR} SY ^Q PK ^Y CG ^{VC} MD ^{NR} CC ^{IP} Y ^{KS} KT ^{TD} V			320	
CN5 (WISP2/COP1)								
CN6 (WISP3)	268	CQPTFQ	ls	KAEK ^{FV} FS ^{CS} ST ^{OS} YK ^{PT} FC ^{GI} CL ^{DKR} CC ^{IP} N ^{KS} K ^{MI} TI			315	
CONSENSUS		EFQC P	DGETFKKNVMWINTCTCHYNCPNPND					
CN3 (NOV)	312	EFQCS ^P	GQIV ^{KK} P ^{VM} IG ^{CT} CT ^{CH} IN ^{CP} K ^{NE}		aflqele ^{lk} tt ^{rg} km		357	
CN2 (CTGF)	304	EFKC ^P	DGEV ^M KK ^{NM} FI ^{KT} CACH ^{YN} CP ^{GD} ND		ifes ^{ly} yr ^k my ^{gd} ma		349	
CN1 (CYR61)	334	RFRCE	DGET ^{FS} KN ^{VM} IQ ^{SC} CK ^{NY} NC ^{PH} ANE		aafp ^{fy} rl ^{fd} nh ^{kf} rd		381	
CN4 (WISP1/ELM1)	321	SFQC ^P	DGL ^{CF} S ^{RO} V ^L WIN ^{AC} FN ^{LS} CR ^{NP} ND		ifad ^{les} yp ^{df} se ^{ia} m		367	
CN5 (WISP2/COP1)								
CN6 (WISP3)	316	QFDC ^P	pn ^{EG} S ^{FK} W ^{KM} L ^W IT ^{SC} V ^Q R ^{NC} RE ^{PG} D		if ^{se} l ^{ki} l		354	

Figure 1. Conservation de la structure primaire des protéines CCN humaines. Les alignements ont été effectués avec le programme *Interalign*. Les résidus les plus conservés sont indiqués en blanc sur fond noir. Lorsque deux groupes de résidus différents sont conservés, le deuxième est surligné en gris. Les quatre cystéines absentes dans CCN6 sont indiquées par une astérisque. Le résidu situé en position terminale du peptide signal est indiqué en rouge pour chacune des protéines.

avec CCN3 constituait le premier exemple d'une protéine CCN possédant des propriétés anti-prolifératives et dont l'expression était altérée lors de la tumorigénèse. L'analyse de gènes exprimés de manière différentielle dans des mélanomes murins à faible et haut pouvoir métastatique a permis l'isolement de *ccn4*, tandis que la caractérisation de gènes dont l'expression est abolie

dans les fibroblastes embryonnaires murins transformés a conduit à l'identification de *ccn5* [11].

Plus récemment, la caractérisation de gènes dont l'expression est stimulée dans des cellules épithéliales transformées par WNT-1 [9] a permis l'identification de *wisp1* et *wisp2* et de *ccn6* qui représentait un nouveau membre de la famille CCN.

Nomenclature CCN	Autres noms utilisés dans les publications
CCN1	CYR 61, CEF 10, IGFBP-rP 4, bIG-M1, IGFBP10
CCN2	CTGF, bIG-M1, FISP 12, IGFBP-rP 2, Hcs 24, IGFBP8, HBGF-0.8, ecogenin
CCN3	NOV, IGFBP-rP 3, IGFBP9
CCN4	WISP-1, ELM 1
CCN5	WISP-2, rCOP-1, CTGF-L, CTGF-3, HICP
CCN6	WISP-3

Tableau I. Nomenclature des protéines CCN. Des résultats récents ont indiqué que les noms attribués aux différentes protéines CCN lors de leur découverte ne sont pas toujours en adéquation avec leur fonction biologique (par exemple, CTGF n'est pas un "facteur de croissance", *per se*). Le comité directeur de l'*International CCN Society*, a proposé de dénommer ces protéines avec l'acronyme CCN, suivi d'un nombre, attribué selon l'ordre chronologique de leur découverte.

CONSENSUS		KPRFCGVCS DGR CCTPHNTKTIQVEFQCPQGQIVKKPVMVIGTCTCHGNC									
Homme	288	KPRFCGVCS DGR CCTPHNTKTIQAEFQ CSPGQIVKKPVMVIGTCTCHTNC	337								
Souris	285	KPRFCGVCS DGR CCTPHNTKTIQVEFQCLPGEITIKKPVVIGTCTCYSNC	334								
Rat	282	KPRFCGICSDGR CCTPENTKTIQVEFQCLPGQIILKKPVMVIGTCTCHSNC	331								
Caille	284	KPRYCGLCNDGR CCTPHNTKTIQVEFRCPQGKFLKKPMMLINTCVCHGNC	333								
Poule	282	KPRYCGLCNDGR CCTPHNTKTIQVEFRCPQGKFLKKPMMLINTCVCHGNC	331								
Xénope	273	KPKFCGQCS DGR CCTPHSSTKTMHVEFVCPQKRIVKKPVMVISTCVCHYNC	322								

CONSENSUS		PQNN	EAFFQLELELKT SRGKI	
Homme	338	PKNN	EAFLOLELKTTRGKM	357
Souris	335	PQNN	EAFLODLELKT SRGEI	354
Rat	332	PQNN	EAFLOLELKT SRGEM	351
Caille	334	PQSN	NAFFQPLDPMSS EAKI	353
Poule	332	PQSN	NAFFQPLDPMSS EAKI	351
Xénope	323	PQDS	sllqvenarfpglktnl	343

Figure 2. Conservation de la structure primaire des protéines CCN3(NOV) au cours de l'évolution. Seuls les résidus présents chez l'homme et conservés dans les autres espèces sont surlignés. Noter que dans plusieurs cas, certains résidus peuvent être conservés chez les oiseaux et les rongeurs, mais ne pas être présents chez l'homme. La très grande conservation inter-espèces suggère une fonction commune. Les jonctions des exons codant les différents domaines constitutifs de la protéine CCN3 humaine sont indiquées par les astérisques situés au-dessus de la séquence humaine.

Parenté structurale des protéines de la famille CCN

L'alignement des séquences primaires (Figure 1) montre la très grande identité structurale des différentes protéines CCN. On remarque en particulier la conservation de 38 cystéines dont la distribution (12, 10, 6 et 10 résidus) au sein des quatre modules constituant les protéines CCN suggère qu'elles sont engagées dans des ponts disulfures attribuant aux protéines CCN une structure compacte. La conservation de plusieurs résidus proline suggère qu'ils jouent aussi un rôle important dans le maintien d'une structure secondaire compacte.

Nous avons montré que les 38 cystéines qui sont maintenues dans la protéine CCN3 après sa maturation, le sont à une position qui est conservée, à la fois au sein des différentes protéines CCN humaines (Figure 1), et dans les différentes espèces (du xénope à l'homme) au cours de l'évolution (Figure 2). Une situation identique a été décrite dans le cas des protéines CCN1 et CCN2 [13-15]. La présence de blocs de résidus communs à toutes les protéines CCN suggère des parentés fonctionnelles. Cependant, ces analyses font aussi ressortir des caractéristiques structurales propres à chaque protéine CCN, qui sous-tendent probablement leurs propriétés biologiques différentes (voir plus loin).

Structure multimodulaire des protéines CCN

Les protéines CCN contiennent un peptide signal et sont formées de quatre modules structuraux présentant une

identité partielle avec : (1) les IGFBP (*IGF binding proteins* : protéines se liant aux IGF [*insulin-like growth factors*]) ; (2) le facteur von Willebrand ; (3) la thrombospondine de type 1 ; et (4) des facteurs de croissance contenant un motif *cystine knot*. Cette organisation structurale constitue le critère d'appartenance à la famille CCN (Figure 2).

Peptide signal

La présence d'un peptide signal à l'extrémité amino-terminale des protéines CCN avait suggéré qu'elles étaient sécrétées. Effectivement, la protéine CCN1 produite par des fibroblastes de souris (BALBc/3T3) en culture est sécrétée mais est associée, de manière très stable (avec une demi-vie supérieure à 24 heures), à la matrice extracellulaire au sein de laquelle elle pourrait être sequestrée [16] et, de manière transitoire, à la surface cellulaire [17, 18]. Elle est aussi détectée dans la fraction intracellulaire mais n'est pas détectée dans le milieu de culture.

La protéine CCN2 est présente dans le milieu conditionné des cellules de la veine du cordon ombilical (HUVEC) et subit une maturation dans le réticulum endoplasmique, ce qui est en accord avec la présence d'un peptide signal [5, 6]. La protéine CCN2 produite dans des conditions normales, par les fibroblastes de prépuce humain et par les cellules de tissus conjonctifs murins, est associée à la surface cellulaire. Elle est sécrétée très inefficacement et est très stable, alors que la protéine homologue murine FISP12 qui est très efficacement sécrétée par les fibroblastes de la lignée NIH3T3, est très instable dans le milieu.

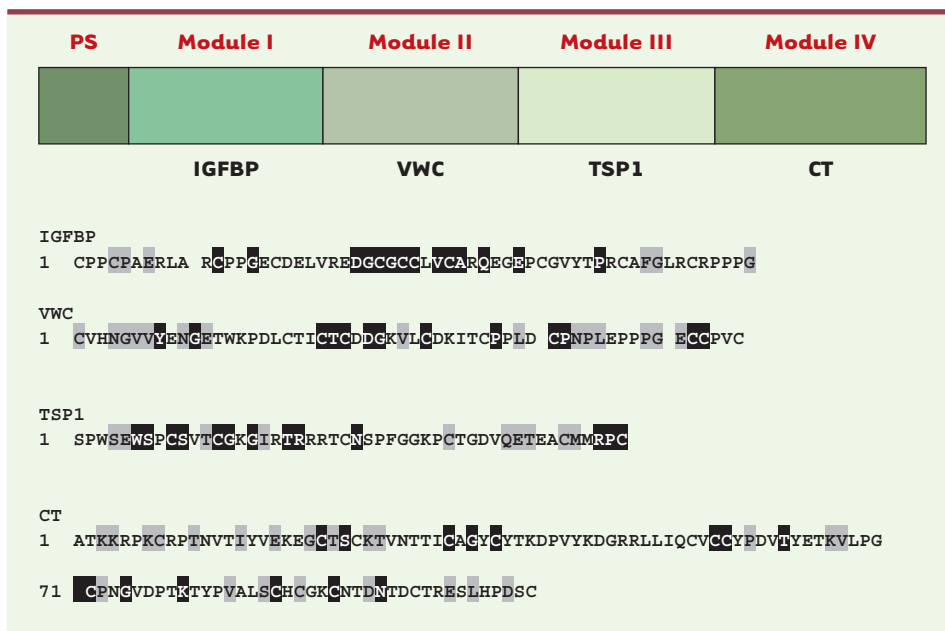


Figure 3. Organisation mosaïque des protéines CCN. Le schéma représente l'organisation des quatre domaines constituant les protéines CCN. Les séquences consensus des modules sont indiquées pour faire ressortir la conservation de certains résidus (surlignés en noir) au sein des différentes protéines CCN. Les résidus surlignés en gris sont conservés dans quelques protéines seulement. PS : peptide signal.

La protéine CCN3 est associée à la matrice extracellulaire [19]. Elle est sécrétée efficacement dans le milieu de culture des fibroblastes embryonnaires de poule, de diverses cellules épithéliales humaines, et de glioblastomes humains où elle est très stable (avec une demi-vie supérieure à 24 heures). Elle est également retrouvée de manière transitoire à la surface des cellules de corticosurrénalome (NCI-H295R) [20] ainsi que dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus) et 143 (ostéosarcome humain) [21]. La protéine CCN4 murine est sécrétée très efficacement par les cellules de mélanome K-1735 [11]. Ces différentes situations reflètent sans doute une association plus ou moins forte des protéines CCN à un (ou des) récepteur(s) cellulaire(s). Les quantités de protéines CCN présentes dans les milieux de cultures pourraient varier avec l'état physiologique des cellules ou être modulées par les interactions des protéines CCN avec d'autres protéines membranaires et de la matrice extracellulaire.

Les modules constitutifs des protéines CCN

Module I

Ce module montre une identité partielle avec les IGFBP. Sur la base de la comparaison de la séquence des protéines CCN1 de souris, CCN2 humaine et CCN3 de poule, il avait été proposé que les protéines CCN se lient aux IGF. Par le jeu des espacements variables d'acides aminés effectués par les programmes de comparaison de séquences, il est possible d'aligner 11 cystéines des IGFBP avec 11 cystéines des protéines CCN [22]. Cependant, un examen attentif des séquences révèle que cet alignement ne correspond pas à une réalité structurale car il repose sur un décalage des

séquences de CCN1 et de CCN2 qui ne respecte pas la conservation des résidus au sein des protéines CCN (Figure 4). La différence d'organisation des extrémités amino-terminales des protéines CCN est également révélée par les prévisions de structure secondaire, effectuées selon la méthode de Chou et Fasman [23], et qui attribuent aux protéines CCN3,4-6 une structure terminale riche en feuillet β , absente dans les autres membres de la famille CCN. Des expériences de pontage covalent ont suggéré que les protéines CCN2 et CCN3 entières puissent se lier aux IGF [24, 25]. Ces résultats sont en contradiction avec ceux que nous avons obtenus lors d'expériences de *ligand blot* et qui n'avaient pas permis de détecter d'interaction entre les IGF et CCN3 [26]. La très faible affinité des IGF vis-à-vis de la protéine CCN3 intacte reste controversée et doit être confirmée. Nous avons proposé que les isoformes tronquées décrites par le groupe de Brigstock pour CCN2 [13] et par notre groupe pour CCN3 [21, 27] se lient efficacement aux IGF et que la protéolyse de ces protéines joue un rôle important dans la modulation de leur activité biologique. Il a maintenant été établi que l'extrémité amino-terminale de CCN3 est capable de se lier à l'insuline avec une affinité beaucoup plus grande que celle des protéines IGFBP1-6 [22]. La protéolyse de CCN3 démasquerait des activités de liaison vis-à-vis de ligands pour lesquels ces protéines manifestent une faible affinité dans leur conformation native.

Module II

Il présente une similitude importante avec le motif répété C de la protéine de von Willebrand (Figure 3). Quatre cystéines sont absentes dans le module II de CCN6. Il est pro-

bable que ces cystéines participent à la formation de ponts disulfures propres à cette région et que leur absence ait des conséquences importantes pour les propriétés biologiques des protéines CCN. Ce motif est également retrouvé dans plusieurs autres protéines telles que le collagène α , les thrombospondines 1 et 2, la protéine SOG (*short gastrulation*), de drosophile et des mucines.

Le module II pourrait être impliqué dans des processus d'oligomérisation protéique précédés par une étape de dimérisation. Les résultats obtenus dans notre équipe avec la protéine CCN3 et par différents groupes pour les autres membres de la famille CCN [28] montrent que les protéines CCN forment des oligomères de haut poids moléculaire. L'implication du module IV dans la dimérisation homo- et hétérotypique des protéines CCN (*voir plus loin*) suggère que les modules II et IV coopèrent dans l'assemblage multimérique de ces protéines. Il est possible que la capacité d'oligomérisation de CCN6 soit affectée par l'absence des quatre cystéines du module II et que l'absence du module IV dans CCN5 compromette ses capacités de dimérisation et d'oligomérisation. La seconde partie du module II pourrait jouer le rôle de charnière entre les deux groupes de deux modules (I-II et III-IV) car elle ne contient aucune cystéine [14].

Module III

Il présente une grande similitude avec le motif WSXCSXXCG de la thrombospondine de type 1 qui jouerait un rôle important dans l'attachement cellulaire. Le module III présente également une similitude élevée (5 cystéines alignées sur les 6 du module) avec d'autres protéines (properdine, F-spondine, protéine circumsporozoïte) impliquées dans l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire et contenant une ou plusieurs répétitions de ce type. La présence de ce module dans les protéines CCN a fait penser qu'elles interagissent avec des constituants de la matrice extracellulaire et qu'elles interviennent dans les processus régulateurs de la prolifération.

Module IV

La conservation des résidus au sein de ce module est moins stricte que pour les autres modules. Six des cystéines présentes dans ce module sont susceptibles d'adopter une structure dite en « nœud à cystines » (*cystin knot*) qui permet la formation d'homo- et d'hétérodimères dans le cas de plusieurs facteurs de croissances tels que le NGF (*nerve growth factor*), le TGF β (*transforming growth factor β*) et le PDGF (*platelet derived growth factor*). Nous avons établi que ce module est suffisant pour permettre l'interaction de CCN3 avec la fibuline 1C ainsi que les protéines CCN3 et CCN2 [27].

Fonctions des protéines CCN

Dans des conditions normales, les protéines CCN participent à la régulation de processus biologiques. Elles interviennent aussi dans les conditions traumatiques, lors de la cicatrisation et dans les pathologies fibrotiques. Enfin, un

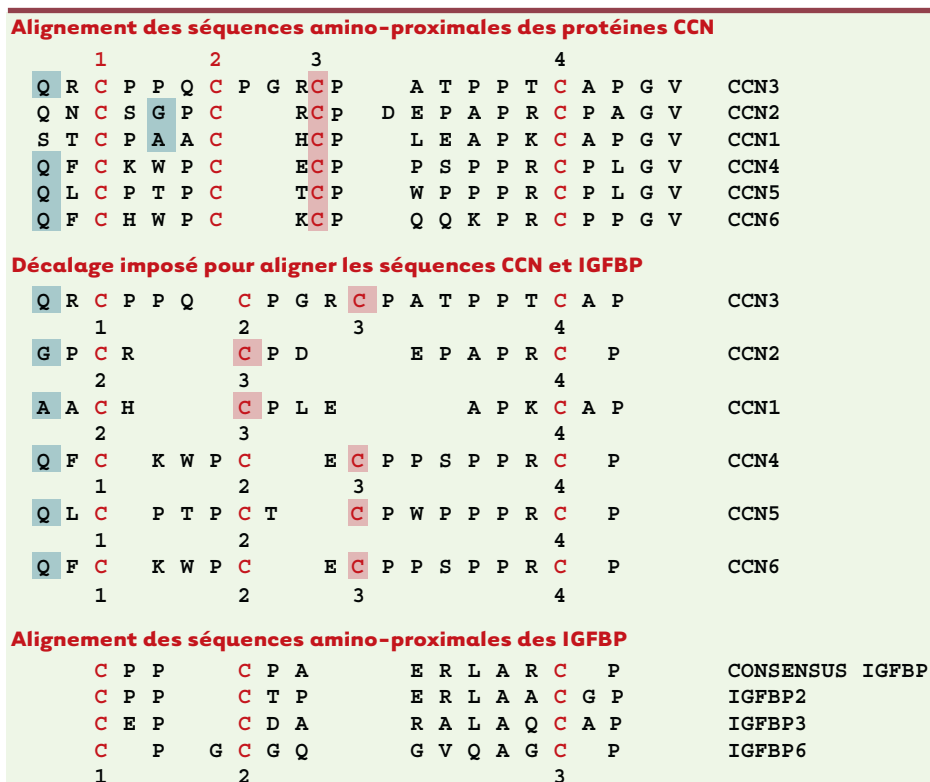


Figure 4. Alignement des extrémités amino-proximales des protéines CCN et des IGFBP.

L'alignement de cystéines des protéines CCN permet aussi de faire ressortir l'alignement des autres résidus (haut de la figure). L'alignement proposé pour faire coïncider les cystéines des protéines CCN et des IGFBP (deuxième partie de la figure) repose sur un décalage des extrémités amino-terminales des protéines CCN2 et CCN1 (visualisé par les cystéines surlignées en jaune et les résidus surlignés en bleu) qui ne respecte pas la conservation structurale des protéines CCN représentée en haut de la figure. La différence structurale des extrémités amino-terminales des protéines CCN peut jouer un rôle important vis-à-vis des fonctions biologiques qu'elles sont susceptibles de partager avec les IGFBP.

nombre croissant d'observations expérimentales attribue aux protéines CCN un rôle important dans la tumorigenèse. La détection des protéines CCN1, CCN2 et CCN3 dans le système vasculaire au cours du développement a suggéré que ces protéines interviennent dans la régulation de l'angiogénèse [12, 14, 28, 29]. Cela a été confirmé par la capacité des deux premières d'induire la néovascularisation des cornées de rat [30] et l'interaction de ces protéines avec l'intégrine $\alpha v \beta 14$. L'effet angiogénique des facteurs de croissance tels que le bFGF et le TGF β met en jeu la production des protéines CCN [14]. L'inactivation du gène *ccn1* chez la souris conduit à des altérations de la vascularisation des membranes extra-embryonnaires et du placenta, qui aboutissent à une importante mortalité prénatale [28]. Les protéines CCN interviennent aussi dans les processus d'ossification et de chondrogenèse. Lorsqu'elles ont été recherchées, les protéines CCN ont été détectées dans le cartilage hypertrophique [12, 31] et la protéine CCN1 peut induire la différenciation des cellules mésenchymateuses [32]. Les effets paracrines *in vitro* de la protéine recombinante CCN2 sur la prolifération et la différenciation de chondrocytes, d'ostéoblastes et de cellules endothéliales suggèrent qu'elle est impliquée dans l'ossification endochondrale. La surexpression ectopique de *ccn2* interfère avec la chondrogenèse articulaire et l'hypertrophie du cartilage, d'une manière qui dépend de la présence et du degré d'expression du TGF β . La protéine CCN1 est détectée dans les zones de réparation de fractures osseuses, dans les chondrocytes du cartilage de conjugaison et dans les ostéoblastes en culture [28]. De la même manière, CCN2 est impliquée dans la squelettogenèse, pendant le développement prénatal, et dans la réparation des fractures osseuses [28]. L'inactivation du gène *ccn2* chez la souris [28] conduit à des anomalies de développement du squelette au niveau des côtes, du sternum, des vertèbres cervicales et du crâne. La protéine CCN3 est également détectée dans le squelette embryonnaire humain et dans les chondrocytes au cours du développement normal chez l'homme et chez la poule [12, 28, 33]. L'expression de *nov* est stimulée par PTHrP (*parathyroid hormone related peptide*), un régulateur de la différenciation chondrocytaire dans les plaques de croissance [28]. Il est donc probable que CCN3 joue aussi un rôle dans la biologie des chondrocytes normaux. Des résultats récents ont attribué aux protéines CCN un rôle dans la polarisation au cours du développement et dans la morphogénèse. L'expression de *ccn3* est modulée par le produit du gène *Wnt1*, et la greffe de cellules Cos7 exprimant la protéine CCN3 dans le flanc d'embryons de poulet induit la formation de bourgeons de membres surnuméraires [28]. Ces observations confirment l'implication de CCN3 dans des interactions ectomésenchymateuses et sug-

gèrent, pour la première fois, qu'une protéine de la famille CCN joue un rôle dans les processus de dorsalisation chez les oiseaux. Nous avons récemment établi qu'au cours de la formation du tube neural, l'expression du gène *ccn3* est asymétrique, ce qui indique que la protéine CCN3 est également impliquée dans les processus de latéralisation [34]. Chez le triton, la protéine CCN2 joue un rôle morphogène dans les processus d'indentation interdigitale et est impliquée dans l'hypertrophie du cartilage [28]. Une surexpression de *ccn2* après dénervation aboutit à une atrophie musculaire [28]. Dans ce système, CCN2 joue un rôle dans les processus inflammatoires, le remodelage de la matrice extracellulaire, la prolifération cellulaire, l'ossification endochondrale et l'apoptose associée à la morphogénèse.

Protéines CCN et maladies

L'expression des protéines CCN a été associée à des maladies non tumorales telles que les fibroses rénales et hépatiques, l'athérosclérose et les sclérodermies. Le TGF β intervient dans le contrôle de la production de la protéine CCN2 au cours des processus pathologiques. Cependant, plusieurs résultats récents ont indiqué que cette relation n'est pas obligatoire. La protéine CCN2 complémente les activités biologiques du TGF β , mais n'est pas un médiateur de tous ses effets profibrogènes et a des effets propres qui ne sont pas liés à ceux du TGF β [28, 35].

L'identification du gène *CCN3* avait fourni les premières indications montrant que l'altération de l'expression des protéines CCN était impliquée dans la tumorigenèse [7]. Il est maintenant établi que l'expression du gène *ccn1* est altérée dans les cancers mammaires où la protéine CCN1 jouerait un rôle important dans la progression tumorale [36]. Une altération de l'expression de *ccn1* a également été décrite dans le cas des cancers pancréatiques [28].

Les résultats récents obtenus par notre équipe ont mis en exergue l'implication des protéines CCN dans le développement et le maintien des tumeurs cancéreuses. Nous avons établi que l'expression de *ccn3* est associée à un pronostic favorable et constitue un marqueur de différenciation tumorale utilisable en clinique pour le typage de tumeurs telles que les neuroblastomes ou les tumeurs de Wilms, alors que dans les corticosurrénales - dans lesquels *ccn3* est exprimé de manière très variable [12] - il ne constitue pas un marqueur fiable à lui seul. Dans le cas des sarcomes d'Ewing, des carcinomes rénaux et de certaines lignées de tumeurs prostatiques, l'expression de *ccn3* est associée à une capacité proliférative et à une tumorigénicité accrue [37, 38].

Mode d'action

L'obtention de protéines obtenues à partir de clones baculoviraux recombinants a permis d'étudier quelques effets biologiques de ces protéines. Cependant, il faut conserver à l'esprit que, dans les cellules d'insectes, ces protéines ne subissent pas toutes les modifications post-traductionnelles auxquelles elles sont soumises dans les cellules d'eucaryotes supérieurs [27]. Certaines de leurs propriétés biologiques, en particulier celles qui dépendent d'interactions avec des récepteurs ou des autres protéines solubles membranaires, peuvent nécessiter de telles modifications (exemple classique des glycosylations).

Les protéines recombinantes CCN1 et CCN2 ont toutes les deux des effets mitogéniques mais n'ont pas les mêmes modes d'action. Alors que la protéine CCN2 humaine, exerce une action directe sur la prolifération des cellules NIH3T3 [6] et des fibroblastes NRK [39], la protéine CCN1 d'origine humaine ou murine n'a pas d'activité mitogène intrinsèque ; elle potentialise les effets d'autres facteurs de croissance sur les cellules endothéliales et fibroblastiques. De manière inattendue, la protéine CCN2 d'origine murine n'a pas d'effet direct sur la prolifération des cellules NIH 3T3 et des cellules HUVEC, mais agit en synergie avec les facteurs de croissance qui stimulent la synthèse d'ADN dans ces cellules [40]. Cette observation indique que les différentes activités biologiques des protéines CCN2 humaine et murine peuvent être dues à des différences structurales ou aux différentes conditions expérimentales dans lesquelles ces activités sont mesurées [14].

De manière tout à fait opposée à ces effets stimulateurs, la protéine aviaire CCN3 recombinante native induit l'arrêt de croissance des fibroblastes embryonnaires de poule lorsqu'elle est produite en grande quantité [7] et son expression maximale dans des conditions de culture normales coïncide avec l'apparition de la phase de quiescence cellulaire [41]. Cependant, les expériences d'hybridation *in situ* que nous avons réalisées chez la poule et chez l'homme [33, 34] ont établi que l'expression de CCN3 n'est pas restreinte aux cellules quiescentes et de récents résultats ont attribué à la protéine CCN3 un effet stimulant la croissance sur les cellules de souris NIH3T3 [42].

Les propriétés biologiques des protéines CCN semblent donc différentes selon le contexte cellulaire et la nature de facteurs avec lesquelles elles sont susceptibles d'interagir [12].

Plusieurs observations attribuent aux protéines CCN un rôle dans les phénomènes d'adhérence et de migration cellulaire.

Nous avons établi que la protéine CCN3 interagit avec la fibuline 1C [27], protéine de la matrice extracellulaire qui intervient dans le contrôle de l'adhérence.

Les protéines CCN1 et CCN2 favorisent l'adhérence de différents types cellulaires (cellules vasculaires endothéliales, fibroblastes, cellules épithéliales et plaquettes) quand elles sont pré-adsorbées sur des supports plastiques [14]. Plusieurs résultats expérimentaux indiquent que ces protéines stimulent la migration des fibroblastes NIH3T3 et des cellules endothéliales [29, 43]. Les activités chimiotactiques des protéines CCN1 et CCN2 jouent un rôle important dans l'activité angiogénique de ces protéines [14]. Des travaux récents ont montré que l'adhérence, la migration et la prolifération relayées par CCN1 requièrent respectivement les intégrines $\alpha6\beta1$, $\alpha v\beta5$ et $\alpha v\beta3$ [44-46]. Les protéines CCN1 et CCN2 stimulent l'adhérence des plaquettes en interagissant avec l'intégrine $\alpha IIb\beta3$. Ces résultats illustrent la variété d'activité des effets biologiques des protéines CCN et fournissent un support à leur spécificité cellulaire.

La similitude structurale des différentes protéines CCN suggère que d'autres membres de cette famille puissent également interagir avec les intégrines et participer aux phénomènes d'adhérence et de migration qui sous-tendent l'angiogenèse.

Nos études ont établi que la protéine CCN3 interagit avec l'intégrine $\alpha v\beta3$ et avec l'intégrine $\alpha IIb\beta3$.

Nos études ont montré que le module carboxy-terminal des protéines CCN joue un rôle important dans la régulation de l'interaction cellulaire avec les substrats. En accord avec cette hypothèse, il a été montré récemment [44] que la protéine CCN1 privée de son module carboxy-terminal pouvait encore stimuler les intégrines $\alpha6\beta1$ et $\alpha v\beta3$, mais ne permettait plus l'adhérence des fibroblastes humains en culture.

Il semble donc que le module carboxy-terminal, en s'associant à différents partenaires, confère aux cellules qui produisent les protéines CCN la capacité d'interagir avec les cellules voisines. Nous avons proposé [12] que la formation de tels complexes joue un rôle essentiel dans la part de la signalisation positive et négative exercée par ces protéines. La biodisponibilité des diverses protéines CCN à un site particulier constituerait un élément clé de la régulation de leur activité biologique et l'altération constitutive du module carboxy-terminal rencontrée dans la protéine CCN5 pourrait rompre cet équilibre fonctionnel.

L'élimination du module I, qui a été observée dans le cas de la mutagenèse insertionnelle de *ccn3* par le virus aviaire MAV [7] a fourni le premier exemple permettant d'attribuer une base structurale à la modification fonctionnelle d'une protéine CCN. Il semble en effet que le ciblage incorrect de cette protéine tronquée interfère avec le dosage des différentes isoformes cytoplasmique et nucléaire [21, 27] de CCN3 et se traduise par l'acquisition d'un phénotype transformé.

Conclusions

La structure multimodulaire des protéines CCN suggérait une multifonctionnalité. L'implication de ces protéines dans plusieurs processus biologiques fondamentaux au cours du développement normal et pathologique a confirmé cette prédiction.

Plusieurs situations non exclusives peuvent être envisagées pour rendre compte des multiples propriétés biologiques des protéines CCN : (1) elles sont la somme des propriétés de chacun des quatre modules ; (2) elles sont propres à l'assemblage que constitue l'association des quatre modules ; (3) elles sont apparentées aux protéines qui contiennent ces modules tout en possédant une spécificité qui résulte de leur structure multimodulaire. En tout état de cause, la structure mosaïque des protéines CCN représente un exemple unique de brassage d'exons ayant conduit à la réunion de quatre modules dont les propriétés biologiques potentielles peuvent fournir une base structurale à l'implication des protéines CCN dans les voies de signalisation de la prolifération et de la croissance, dans les processus biologiques liés à la coagulation sanguine et à l'angiogenèse, ainsi que dans les fonctions d'attachement et de migration faisant intervenir des processus de communication intercellulaire et avec le milieu.

Nous avons proposé un modèle [12] selon lequel la diversité des propriétés biologiques attribuées aux protéines CCN résulterait de différentes combinaisons impliquant des partenaires dont la biodisponibilité varie avec la nature et l'état de développement des tissus dans lesquelles elles exercent leurs fonctions. Selon ce modèle, les extrémités amino- et carboxy-proximales des protéines CCN seraient respectivement responsables d'activités régulatrices négatives et positives. Leur élimination, qui est rencontrée dans certaines situations biologiques, normales ou pathologiques, conférerait aux protéines correspondantes des propriétés stimulatrices ou inhibitrices de type « constitutif », pouvant résulter de leur incapacité d'interagir avec des partenaires qui seraient impliqués dans la médiation de leur activité régulatrice.

L'identification des relations pouvant exister entre la structure multimodulaire des protéines CCN et leurs fonctions biologiques constitue un défi scientifique remarquable car elle pourrait permettre l'utilisation de cette nouvelle famille de protéines dans les protocoles de diagnostic, de typage et de pronostic d'une médecine moléculaire en pleine expansion. ♦

SUMMARY

The multimodular organization of the CCN proteins

The CCN family of genes and proteins is composed of key regulators involved in the control of cell growth in normal and pathological conditions. The CCN proteins are controlling cell adhesion, motility and proliferation. In pathological conditions, such as cancer development, the balance of negative and positive signals induced by these regulators is altered. In this review article we analyse the multimodular organization of the CCN proteins and discuss features that provide a structural basis for their multiple biological activities. ♦

RÉFÉRENCES

1. Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 1993 ; 327 : 125-30.
2. Lau LF, Nathans D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB : c 3T3 cells : coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 1182-6.
3. Simmons D, Levy D, Yannoni Y, Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src inducible gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 1178-82.
4. Almendral J, Sommer D, Mac Donald-Bravo H, Burckhardt J, Perera J, Bravo R. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1998 ; 8 : 2140-8.
5. Ryseck RP, Macdonald-Bravo H, Mattei MG, Bravo R. Structure, mapping, and expression of fisp-12, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein. *Cell Growth Differ* 1991 ; 2 : 225-33.
6. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 1991 ; 114 : 1285-94.
7. Joliet V, Martinerie C, Dambrine G, et al. Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol* 1992 ; 12 : 10-21.

REMERCIEMENTS

Les travaux effectués dans mon laboratoire ont été financés par le Comité National et les Comités du Cher et de l'Indre de la Ligue Nationale Contre le Cancer, l'Association pour la Recherche contre le Cancer, Matra Hachette et la Fondation pour la Recherche Médicale, le Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche et l'Association Française contre les Myopathies. Je remercie ma femme pour son soutien constant et son aide bénévole journalière au sein du laboratoire.

NOTE AJOUTÉE AUX ÉPREUVES

Depuis l'acceptation de cet article pour publication dans *médecine/sciences*, en septembre 2001, nous avons montré que l'expression de *ccn3* dans les tumeurs d'Ewing constitue un facteur de risque pour le développement de métastases osseuses et pulmonaires [47]. Nous avons aussi établi que la production de la protéine CCN3 par les cellules de glioblastomes interfère avec leurs propriétés tumorigènes *in vivo* [48]. Ces deux exemples renforcent l'utilité de CCN3 comme outil biomédical. Plusieurs articles ont également rapporté l'altération de la progression tumorale par CCN2 dans les cancers de l'œsophage [49], son implication dans l'angiogenèse tumorale [50] et l'expression de *ccn1*, *ccn4* et *ccn5* dans les lignées de cancer du sein [51, 52], ainsi que dans des tumeurs primaires du sein [53]. Plus récemment, il a été démontré que WISP3 possède une activité de type suppresseur de tumeurs dans le cas des cancers inflammatoires du sein [54].

Des résultats récents ont également établi que des épissages alternatifs sont responsables de la production de protéines CCN1 - tronquée du motif thrombospondine dans des fibroblastes humains [55] stimulés par le sérum - et CCN4, tronquée du motif von Willebrand [56] dans des carcinomes gastriques. Ces observations soulignent la variété structurale des différentes protéines CCN et soulèvent des questions intéressantes en ce qui concerne le rôle biologique de ces différentes isoformes dans la biologie des cellules normales et tumorales.

8. Perbal B. Contribution of MAV-1-induced nephroblastoma to the study of genes involved in human Wilms' tumor development. *Crit Rev Oncog* 1994 ; 5 : 589-613.
9. Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, et al. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in Wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 14717-22.
10. Zhang R, Averboukh L, Zhu W, et al. Identification of rCop-1, a new member of the CCN protein family, as a negative regulator for cell transformation. *Mol Cell Biol* 1998 ; 18 : 6131-41.
11. Hashimoto BY, Shindo-Okada N, Tani M, et al. Expression of the *ELM1* gene, a novel gene of the CCN (connective tissue growth factor, Cyr61/Cef10, and nephroblastoma overexpressed gene) family, suppresses *in vivo* tumor growth and metastasis of K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med* 1998 ; 187 : 289-96.
12. Perbal B. Nov (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Mol Pathol* 2001 ; 54 : 57-79.
13. Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrinol Rev* 1999 ; 20 : 189-206.
14. Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the connection. *Exp Cell Res* 1999 ; 248 : 44-57.
15. Essam ED, Moussad A, Brigstock D. Connective tissue growth factor: What's in a name. *Mol Genet Metab* 2000 ; 71 : 276-92.
16. Kireeva M, Latinkic B, Kolesnikova T, et al. Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. *Exp Cell Res* 1997 ; 233 : 63-77.
17. Yang GP, Lau LF. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ* 1991 ; 2 : 351-7.
18. O'Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF. Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 1990 ; 10 : 3569-77.
19. Perbal B. Caractérisation et expression du proto-oncogène *nov* humain dans les tumeurs de Wilms. *Bull Cancer (Paris)* 1994 ; 81 : 957-61.
20. Thomopoulos G, Kyurkchiev S, Perbal B. Immunocytochemical localization of NOVH and ultrastructural characteristics of NCI-H295R cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2001 ; 33 : 251-60.
21. Perbal B. Nuclear localization of NOV protein: a potential role for *nov* in the regulation of gene expression. *Mol Pathol* 1999 ; 52 : 84-91.
22. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrinol Rev* 1999 ; 20 : 761-87.
23. Chou PY, Fasman GD. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 1974 ; 13 : 222-45.
24. Burren C, Wilson E, Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R. Binding properties and distribution of insulin-like growth factor binding protein-related protein 3 (IGFBP-rP3/NovH), an additional member of the IGFBP superfamily. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 ; 84 : 1096-103.
25. Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterisation of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP super family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 12981-6.

26. Chevalier G, Yeger H, Martinerie C, et al. NovH: differential expression in developing kidney and Wilms' tumors. *Am J Pathol* 1998 ; 152 : 1563-75.
27. Perbal B, Martinerie C, Sainson R, Werner M, He B, Roizman B. The C-terminal domain of the regulatory protein NOVH is sufficient to promote interaction with fibulin 1C: a clue for a role of NOVH in cell-adhesion signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 869-74.
28. Ayer-Lelievre C, Brigstock D, Lau L, Pennica D, Perbal B, Yeger H. Report on the first international workshop on the CCN family of genes. *Mol Pathol* 2001 ; 54 : 105-7.
29. O'Brien TP, Lau LF. Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth Differ* 1992 ; 3 : 645-54.
30. Babic A, Kireeva M, Kolesnikova T, Lau L. CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 6355-60.
31. Nakanishi T, Kimura Y, Tamura T, et al. Cloning of a mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; 234 : 206-10.
32. Wong M, Kireeva M, Kolesnikova T, Lau L. Cyr61, Product of a growth factor-inducible immediate-early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Dev Biol* 1997 ; 192 : 492-508.
33. Kocialkowski S, Yeger H, Kingdom J, Perbal B, Schofield P. Expression of the human nov gene in first trimester fetal tissues. *Anat Embryol* 2001 ; 203 : 417-27.
34. Katsube KI, Chuai ML, Liu YC, et al. The expression of chicken nov, a member of the CCN gene family in early stage development. Gene expression pattern. *Brain Res* 2002 ; 1 : 61-5.
35. Blom IE, van Dijk AJ, Wieten L, et al. *In vitro* evidence for differential involvement of CTGF, TGFbeta, and PDGF-BB in mesangial response to injury. *Nephrol Dial Transplant* 2001 ; 16 : 1139-48.
36. Tsai MS, Hornby AE, Lakins J, Lupu R. Expression and function of CYR61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 5603-7.
37. Glukhova L, Angevin E, Lavialle C, et al. Specific genomic alterations associated with poor prognosis in high grade renal cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2001 ; 130 : 105-10.
38. Maillard M, Cadot B, Ball RY, et al. Differential expression of novH proto-oncogene in human prostate cell lines and tissues. *Mol Pathol* 2001 ; 54 : 275-80.
39. Frazier K, Grotendorst G. Expression of connective tissue growth factor mRNA in the fibrous stroma of mammary tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 1997 ; 29 : 153-61.
40. Kireeva ML, Latinkic BV, Kolesnikova TV, et al. Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. *Exp Cell Res* 1997 ; 233 : 63-77.
41. Scholz G, Martinerie C, Perbal B, Hanafusa H. Transcriptional down regulation of the nov proto-oncogene in fibroblasts transformed by p60v-src. *Mol Cell Biol* 1996 ; 16 : 481-6.
42. Liu C, Liu XJ, Crowe PD, et al. Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) codes for a growth factor that induces protein tyrosine phosphorylation. *Gene* 1999 ; 238 : 471-8.
43. Kireeva ML, MO FE, Yang GP, Lau LF. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol* 1996 ; 16 : 1326-34.
44. Grzeszkiewicz TM, Kirschling DJ, Chen N, Lau LF. CYR61 Stimulates human skin fibroblast migration through integrin alpha vbeta 5 and enhances mitogenesis through integrin alpha vbeta 3, independent of its carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 1943-50.
45. Chen N, Chen CC, Lau LF. Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin alpha 6beta 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 24953-61.
46. Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 10443-52.
47. Manara MC, Perbal B, Benini S, et al. The expression of *ccn3*(nov) gene in musculoskeletal tumors. *Am J Pathol* 2002 ; 160 : 849-59.
48. Gupta N, Wang, H, McLeod TL, et al. Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3(NOV). *Mol Pathol* 2001 ; 54 : 293-9.
49. Koliopoulos A, Friess H, Di Mola FF, et al. Connective tissue growth factor gene expression alters tumor progression in esophageal cancer. *World J Surg* 2002 ; 26 : 420-7.
50. Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, et al. Involvement of CTGF, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product in tumor angiogenesis. *Oncology* 2001 ; 61 : 315-22.
51. Saxena N, Banerjee S, Sengupta K, Zoubine MN, Banerjee SK. Differential expression of *WISP-1* and *WISP-2* genes in normal and transformed human breast cell lines. *Mol Cell Biochem* 2001 ; 228 : 99-104.
52. Tsai MS, Bogart DF, Li P, Mehmi L, Lupu R. Expression and regulation of *cyr61* in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 2002 ; 21 : 964-73.
53. Xie D, Nakachi K, Wang H, Elashoff R, Koeffler HP. Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP1 and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Res* 2001 ; 15 : 8917-23.
54. Kleer C, Zhang Y, Pan Q, et al. Wisp3 is a novel tumor suppressor gene of inflammatory breast cancer. *Oncogene* 2002 (sous presse).
55. Leng E, Malcom T, Tai G, Estable M, Sadowski I. Organization and expression of the *cyr61* gene in normal human fibroblasts. *J Biomed Sci* 2002 ; 9 : 59-67.
56. Tanaka S, Sugimachi K, Saeki H, et al. A novel variant of WISP1 lacking a von Willebrand type C module overexpressed in scirrhous gastric carcinoma. *Oncogene* 2001 ; 20 : 5525-32.

TIRÉS À PART
B. Perbal