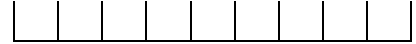


UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Année 2011



Conséquences moléculaires et cellulaires des  
mutations de la filamine A associées à une  
dystrophie valvulaire héréditaire

THÈSE DE DOCTORAT  
Discipline: Biologie  
Spécialité: Biochimie et biologie cellulaire

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Aurélie LARDEUX**

*Le 27 janvier 2012, devant le jury ci dessous*

Rapporteurs :

Mme Corinne ALBIGÈS-RIZO, Directeur de recherche CNRS, Institut Albert Bonniot,  
GRENOBLE

Mme Marie-Paule JACOB, Directeur de recherche CNRS, INSERM U698, PARIS

Examineurs :

M. Pierre LUTZ, Directeur de recherche CNRS, UMR5089 CNRS, TOULOUSE

M. Hervé LE MAREC, Professeur, UMR915, Université de NANTES

Directeur de thèse:

M. Jean MÉROT, Chargé de recherche CNRS, UMR915, NANTES

Co-directeur de thèse :

M. Jean-Jacques SCHOTT, Directeur de recherche INSERM, UMR915, NANTES

*" La vie est courte, l'art est long, l'occasion fugitive, l'expérience trompeuse, le jugement difficile. "*  
Hippocrate

# Sommaire

<b>Sommaire .....</b>	<b>ii</b>
<b>Table des figures.....</b>	<b>vi</b>
<b>Table des tableaux.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>viii</b>
<b>Avant Propos .....</b>	<b>x</b>
<b>I Introduction.....</b>	<b>1</b>
I.1 PHYSIOLOGIE DES VALVES CARDIAQUES .....	3
<i>I.1.1 Anatomie des valves .....</i>	<i>3</i>
I.1.1.1 Les valves atrio-ventriculaires .....	4
I.1.1.2 Les valves semi-lunaires .....	4
<i>I.1.2 Développement embryonnaire : valvulogénèse .....</i>	<i>5</i>
<i>I.1.3 Histologie des valves.....</i>	<i>7</i>
I.1.3.1 La matrice extracellulaire des valves.....	8
I.1.3.1.1 Les composants .....	8
I.1.3.1.2 L'organisation stratifiée .....	11
I.1.3.2 Les différents types cellulaires des valves.....	12
<i>I.1.4 Les fonctions des valves .....</i>	<i>14</i>
I.2 LES VALVULOPATHIES.....	16
<i>I.2.1 La dérégulation pathologique de la matrice valvulaire .....</i>	<i>16</i>
<i>I.2.2 Historique et prévalence.....</i>	<i>17</i>
<i>I.2.3 Les différents groupes de valvulopathies .....</i>	<i>18</i>
I.2.3.1 Les valvulopathies isolées .....	20
I.2.3.2 Les valvulopathies liées à un syndrome .....	21
<i>I.2.4 L'apport de la génétique dans les valvulopathies .....</i>	<i>23</i>
I.2.4.1 Dystrophie valvulaire myxoïde liée au chromosome X (XMVD).....	23
I.2.4.2 Mutations de la filamine A.....	27
I.3 LA FILAMINE A.....	29
<i>I.3.1 Découverte .....</i>	<i>29</i>
<i>I.3.2 Gènes et isoformes .....</i>	<i>29</i>
<i>I.3.3 Structure de la filamine A .....</i>	<i>30</i>
I.3.3.1 Sites de liaison à l'actine .....	31
I.3.3.2 Domaines répétés .....	31
I.3.3.3 Site de dimérisation .....	32
<i>I.3.4 Les protéines partenaires de la filamine A .....</i>	<i>33</i>
<i>I.3.5 Les fonctions de la filamine A.....</i>	<i>34</i>
I.3.5.1 Stabilisation membranaire, signalisation intracellulaire et activité transcriptionnelle .....	35
I.3.5.2 Mobilité cellulaire .....	37
I.3.5.3 Mécano-protection et organisation du cytosquelette .....	42
I.3.5.3.1 Organisation du réseau d'actine.....	42
I.3.5.3.2 Mécano-protection .....	42
<i>I.3.6 Localisation et distribution .....</i>	<i>46</i>
<b>II Les objectifs .....</b>	<b>48</b>
<b>III Partie I .....</b>	<b>49</b>
<b>Les mutations de la filamine A.....</b>	<b>49</b>
<b>associées à la XMVD diminuent la stabilité des intégrines <math>\beta</math>1.....</b>	<b>49</b>

III 1 INTRODUCTION.....	50
III.2 MATERIEL ET METHODE .....	52
III.2.1 Réactifs, plasmides et traitement .....	52
III.2.2 Culture cellulaire.....	52
III.2.2.1 Cellules de mélanome et cellules HT1080.....	52
III.2.2.2 Clonage de lignées cellulaires stables exprimant les FlnA WT, P637Q et G288R .....	53
III.2.2.3 Transfection transitoire .....	53
III.2.3 RT-PCR semi quantitative en temps réel.....	54
III.2.3.1 Extraction des ARN totaux.....	54
III.2.3.2 La transcription inverse .....	54
III.2.3.3 PCR quantitative.....	54
III.2.4 Immunofluorescence .....	55
III.2.4.1 Marquage du cytosquelette et des protéines des points focaux. ....	55
III.2.4.2 Assemblage de la matrice de fibronectine.....	56
III.2.5 Fonctions cellulaires.....	56
III.2.5.1 Test d'étalement.....	56
III.2.5.2 Test d'adhésion .....	56
III.2.5.3 Test de migration: Comblement de brèche ou "Wound Healing" .....	57
III.2.5.4 Test de migration: Chambre de Boyden .....	57
III.2.6 Biochimie .....	58
III.2.6.1 Extraction et dosage protéique.....	58
III.2.6.2 Immunoprécipitation .....	58
III.2.6.3 Western-blot.....	58
III.2.7 Statistiques .....	59
III.3 RESULTATS .....	60
III.3.1 Établissement de lignées stables exprimant les FlnA WT, G288R et P637Q.....	60
III.3.2 Les mutations n'affectent pas les propriétés d'organisation du réseau d'actine par la FlnA.	62
III.3.3 Les mutations de la FlnA affectent l'adhésion et la migration cellulaire.....	64
III.3.4 Les mutations de la FlnA ne semble pas modifier l'initiation des points focaux .....	66
III.3.5 Les mutations de la FlnA affectent l'expression des intégrines $\beta 1$ .....	67
III.3.6 Les mutations modifient le profil d'expression des intégrines .....	69
III.3.7 Les mutations de la FlnA augmentent la dégradation des intégrines $\beta 1$ .....	71
III.4 DISCUSSION / PERSPECTIVES .....	74
<b>IV Partie II.....</b>	<b>87</b>
<b>Effets de mutations de la filamine A sur l'interaction avec de nouvelles protéines partenaires ..</b>	<b>87</b>
IV.1 INTRODUCTION .....	88
IV.2 MATERIEL ET METHODE : DOUBLE HYBRIDE .....	89
IV.2.1 La souche de levure.....	89
IV.2.2 Les constructions plasmidiques .....	89
IV.2.3 Les appâts et les proies .....	89
IV.2.4 Les milieux de culture .....	90
IV.2.5 La transformation des levures.....	91
IV.2.6 Les tests d'auxotrophie .....	91
IV.2.7 Le test colorimétrique : $\beta$ -galactosidase .....	92
IV.3 RESULTATS .....	94
IV.3.1 Identification de protéines partenaires de la FlnA WT par double hybride.....	94
IV.3.2 Modifications d'interaction avec les protéines partenaires identifiées et les FlnA mutantes	96
IV.3.2.1 Analyse qualitative des interactions. ....	97
IV.3.2.2 Analyse quantitative des interactions. ....	99
IV.4 DISCUSSION / PERSPECTIVES .....	101

<b>V Discussion générale.....</b>	<b>105</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>114</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>131</b>
FILAMIN-A-RELATED MYXOMATOUS MITRAL VALVE DYSTROPHY: GENETIC, ECHOCARDIOGRAPHIC AND FUNCTIONAL ASPECTS .....	132
EXPRESSION OF THE FAMILIAL CARDIAC VALVULAR DYSTROPHY GENE, FILAMIN-A, DURING HEART MORPHOGENESIS .....	142

# Table des figures

Figure 1 : Schéma du cœur et des valves cardiaques .....	3
Figure 2 : Schéma du développement embryonnaire des valves cardiaques.....	6
Figure 3 : Schéma des valves cardiaques matures.. .....	7
Figure 4 : Organisation de la matrice extracellulaire. ....	8
Figure 5 : Coupe histologique d'une valve mitrale saine. ....	12
Figure 6 : Prévalence des pathologies valvulaires en fonction de l'âge. ....	18
Figure 7 : L'arbre généalogique de la famille 1 atteinte de XMVD. ....	25
Figure 8 : Aspects échocardiographiques de la dystrophie valvulaire mitrale modérée chez une femme de la famille 1.. .....	26
Figure 9 : Schéma représentatif de la FlnA avec les mutations identifiées dans quatre familles atteintes de XMVD.....	27
Figure 10 : Schéma des interactions entre la filamine A et les filaments d'actine.....	30
Figure 11 : Structure de l'ABD et localisation des « Hinges ». ....	32
Figure 12 : Schéma d'un monomère de FlnA avec les zones d'interaction de protéines partenaires. ....	33
Figure 13 : Les fonctions de la filamine A.. .....	35
Figure 14 : Interaction indirecte entre la filamine A et les intégrines.. .....	40
Figure 15 : Interactions de la filamine A impliquées dans la migration cellulaire. ....	41
Figure 16 : Schéma de l'effet lié à l'étirement sur la FlnA au niveau de la fixation des intégrines et de la libération de FilGAP.....	43
Figure 17 : Structures et ligands des intégrines. ....	44
Figure 18 : Caractérisation des lignées stables exprimant les FlnA WT, G288R et P637Q dans les cellules M2.. .....	50
Figure 19 : Morphologie des cellules exprimant les FlnA WT, G288R et P637Q.....	63
Figure 20 : Organisation du réseau d'actine et localisation de la FlnA dans les lignées stables.....	64
Figure 21 : Adhésion cellulaire des lignées stables. ....	65
Figure 22 : Migration cellulaire des lignées stables.....	66
Figure 23 : Formation des points focaux dans les lignées stables. ....	67
Figure 24 : Diminution de l'expression des intégrines $\beta 1$ dans les lignées exprimant les FlnA G288R et P637Q.....	69
Figure 25 : Expression des intégrines dans les lignées stables. ....	70
Figure 26 : Dégradation des intégrines $\beta 1$ dans les lignées exprimant les FlnA mutantes. ....	72
Figure 27 : Représentation graphique de l'évolution de l'aire des cellules HT1080 KO FlnA transfectées avec la FlnA WT et mutée (P637Q ou G288R) en fonction du temps d'étalement (3h et 5h).....	73
Figure 28 : Schéma des différents points focaux liant la MEC et les cellules. ....	78
Figure 29 : Le trafic des intégrines.....	84
Figure 30 : Schéma des voies potentiellement impliquées par les mutations de la FlnA. ....	86
Figure 31 : Détermination du SID en fonction des fragments d'une même protéine partenaire interagissant avec la protéine appât. ....	90
Figure 32 : Représentation schématique de la construction de la FlnA utilisée comme appât pour le double hybride .....	94
Figure 33 : Représentation schématique des constructions de la FlnA WT et mutantes utilisées comme appâts pour le double hybride. ....	96

Figure 34 : Test d'auxotrophie vis-à-vis de l'histidine : actinine et vinculine. ....	97
Figure 35 : Test d'auxotrophie vis-à-vis de l'histidine : FxBox034, PTPN12 et LL5 $\beta$ .....	98
Figure 36: Quantification des résultats $\beta$ -gal pour les couples FlnA-LL $\beta$ 5.....	99
Figure 37 : Quantification des résultats $\beta$ -gal pour les couples FlnA-FxBox034 (A) et FlnA-PTPN12 (B).....	99
Figure 38 : Activation de la voie du TGF $\beta$ par les intégrines. ....	108
Figure 39 : La voie du TGF $\beta$ et les valvulopathies. ....	110
Figure 40 : La voie de la sérotonine et les valvulopathies.....	112
Figure 41 : Schéma des mécanismes impliquant potentiellement les mutations de la FlnA dans la physiopathologie des valvulopathies. ....	113

## Table des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des pathologies valvulaires. ....	19
Tableau 2 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western-blot et en immunofluorescence. ....	52
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative .....	54
Tableau 4 : Le rendement du clonage cellulaire pour les FlnA WT, G288R et P637Q .....	50
Tableau 5 : Tableau des SID avec la position dans la protéine, le nombre d'acides aminés (AA) qui les composent et la taille des protéines entières.....	90
Tableau 6 : Restrictions d'acides aminés pour les tests d'auxotrophie et d'interaction.....	92
Tableau 7 : Protéines partenaires de la filamine A WT identifiées par Hybrigenics.....	95

# Liste des abréviations

5HT : sérotonine  
5HTR : récepteur à la sérotonine  
A7 : cellules M2 réexprimant la filamine A sauvage  
*ABD : Actin binding domain*  
*BMP2 : bone morphogenetic protein 2*  
β gal: β galactosidase  
*BSA : bovine serum albumin*  
*CaM kinase II : Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependant kinase II*  
CAV : canal atrio-ventriculaire  
Cav1 : cavéoline 1  
CIV : cellules interstitielles de valve  
CEV : cellules endothéliales de valve  
CH : domaine d'homologie à la calponine  
cM : centimorgan  
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
DO : densité optique  
DTT : dithiothréitol  
E : stade de développement embryonnaire chez la souris  
*EGF : Epithelial growth factor*  
EGFR : récepteur à l'EGF  
*EMT : Endothelial to Mesenchymal Transition*  
*ERK1/2 : Extracellular signal Regulated Kinases*  
*ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport*  
F-actine : Filaments d'actine  
*FAK : Focal Adhesion Kinase*  
*FITC : fluorescein isothiocyanate*  
FlnA : filamine A  
FlnB : filamine B  
G418 : Généticien 418  
GAG : GlycoAminoGycanes  
*GAP : guanine activating protein*  
*GEF : guanine nucléotide exchange factor*  
*GFP : Green Fluorescen Protein*  
*GPIb : Glycoprotein Ib*  
*GTF2I : General Transcription Factor III*  
GTPases : enzymes qui lient et hydrolysent la guanosine triphosphate  
*IPS : Induced pluripotent stem cells*  
*JNK : c-Jun N-terminal kinases*  
*LAP : Latency Associated Peptide*  
*LTBP : Latent transforming growth factor-beta binding proteins*  
M2 : cellules déficiente en filamine A  
*MAPK : Mitogen-activated protein kinase*  
MEC : Matrice ExtraCellulaire  
*MKK : Mitogen activated protein kinase kinase*  
MMP : métalloprotéinases matricielles



N-ter : partie N terminale  
ONP : orthonitrophénol  
ONPG : Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside  
PAF : paraformaldéhyde  
PAK1: p21 activated protein kinases  
*PCR* : *polymerase chain reaction*  
PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule 1  
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinases  
PKA ou PKC : protéines kinases A ou C  
*PTPN* : *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor*  
*ROCK* : *Rho associated protein kinase*  
*SAC* : *Calcium-Permeable Channels*  
*SCF* : *Skp1 Cullin Fbox complexe*  
SDS : dodécylsulfate de sodium  
*SERT* : *SERotonin Transporter*  
SID : domaine spécifique d'interaction  
*SKP1* : *S-phase kinase-associated protein 1*  
SVF : serum de veau foetale  
SVNN : serum de veau nouveau né  
*TIMP* : *Tissue inhibitor of metalloproteinases*  
*TGF $\beta$*  : *Transforming Growth Factor  $\beta$*   
*VECAM-1* : *vascular cell adhesion molecule 1*  
*VEGF* : *Vascular Endothelial Growth Factor*

### **Pathologies**

DFM : la dysplasie fronto-métaphysaire  
HNP : l'hétérotopie nodulaire péri-ventriculaire  
OFD : l'ostéodysplasie fronto-oto-palato-digitales  
SMN : le syndrome de Melnick-Needles  
*XMVD* : *X linked myxomatous valvular disease*

### **Gènes :**

*BGN* : gène du bigycane  
*ACTA2* : gène de l'actine musculaire lisse  $\alpha 2$   
*COL3A1* : gène du collagène de type 3 chaîne  $\alpha 1$   
*ELN* : gène de l'élastine  
*FBN1* : gène de la fibrilline 1  
*FLNA* : gène de la filamine A  
*GPR50* : gène de « G protein-coupled receptor 50 »  
*HPRT* : gène de l'*Hypoxanthrine phosphoribosyl transferase*  
*ITG* : gène des intégrines  
*JAG1* : gène de la protéine « jagged 1 »  
*LIMK* : gène de la kinase 1 à domaine LIM  
*NPPA* : gène du peptide natriurétique de type A  
*TGFBR I ou II* : gènes des récepteurs au TGF $\beta$  de type I ou II  
*ZNF185* : gène de ZNF185 zinc finger protein 185

# Avant Propos

Au cours de mon cursus universitaire, je me suis dirigée vers le domaine de la biochimie et biologie moléculaire. J'ai réalisé un Master 1 « Sciences biologiques et médicales » à Nantes pour me rapprocher de la thématique « santé ». J'ai ensuite poursuivi mon cursus universitaire par le Master 2 « Sciences Biologiques et Médicales », spécialité « Biologie, Biotechnologies et Recherche Thérapeutique » de Nantes au cours duquel j'ai réalisé mon stage à l'institut du thorax UMR915 sous la direction du Docteur Jean Mérot.

Dans la continuité de mes stages, j'ai poursuivi par une thèse à l'institut du thorax sur un nouveau sujet pour lequel aucune étude fondamentale n'avait été développée. L'unité UMR915 est une unité mixte de recherche dirigée par le Professeur Pierre Pacaud qui a pour objectif de développer une recherche translationnelle majoritairement sur les maladies cardiovasculaires. L'avantage de travailler au sein de l'institut du thorax est de partager différents points de vue : des cliniciens sur les aspects de la pathologie et des généticiens sur l'identification de mutations par des approches à la pointe de la technologie. Ma thèse s'est déroulée dans l'équipe « cardiopathies et mort subite » dans la thématique « physiologie cellulaire et moléculaire » travaillant majoritairement sur les canaux ioniques, ce qui m'a permis de m'ouvrir à d'autres sujets. Ainsi, à partir d'une étude familiale réalisée par l'équipe de génétique sur une dystrophie valvulaire liée au chromosome X, des mutations dans le gène *FLNA* ont été identifiées mais, les mécanismes physiopathologiques associés n'étaient pas connus. Mon projet de thèse a porté sur l'identification des conséquences moléculaires et cellulaires associées aux **mutations de la filamine A impliquées dans la dystrophie valvulaire liée au chromosome X.**

Les objectifs du projet ont consisté en deux parties :

- L'étude des effets des mutations de la filamine A (FlnA) dans un modèle cellulaire de mélanome déficient en FlnA par l'établissement et la caractérisation de **lignées stables exprimant les FlnA sauvages ou mutantes.** À partir de ces lignées, j'ai étudié différentes fonctions cellulaires comme la migration et l'adhésion à l'aide de techniques peu utilisées au sein du laboratoire.
- **L'identification de potentielles protéines partenaires** de la FlnA. Dans le but d'étudier ces nouvelles interactions, nous avons utilisé la technique du double hybride.

Enfin, mon projet de thèse s'est inscrit dans un réseau Leducq transatlantique d'excellence sur la valve mitrale.

# I Introduction



L'institut du thorax, dans lequel ces travaux de thèse se sont déroulés, développe des axes de recherche focalisés sur les pathologies cardiovasculaires et plus particulièrement, les troubles du rythme cardiaque, les pathologies vasculaires et les facteurs de risque liés à ces pathologies. D'autres atteintes liées au thorax sont également étudiées tels que les maladies respiratoires. Récemment, un axe important de recherche translationnelle, de la clinique à la physiopathologie en passant par la génétique, a été développé sur les pathologies des valves cardiaques.

Le système cardiovasculaire est une machinerie complexe régulé avec précision. Il est composé du cœur formant la pompe cardiaque qui assure la propulsion du sang dans l'appareil circulatoire. Cette propulsion est permise grâce à l'activité contractile du cœur qui permet l'expulsion du sang oxygéné de l'aorte vers les organes pour retourner ensuite au cœur par les veines. La distribution du sang est réalisée à une fréquence de 70 battements par minute pour un débit de 5 litres de sang à la minute chez l'homme au repos. Au cours de ce cycle, le sang est oxygéné au moment du passage dans la circulation pulmonaire. Dans le cœur, la circulation du sang est régulée par les valves cardiaques qui sont essentielles à une fonction cardiaque efficace. Lors d'une atteinte de ces valves cardiaques, le cœur doit fournir un effort plus important afin d'assurer une circulation sanguine normale. Cependant, à long terme, la fonction cardiaque se trouve altérée conduisant à des insuffisances cardiaques, voir à des morts subites.

Dans le but de comprendre le contexte dans lequel ces travaux de thèse ont été réalisés, l'introduction a été divisée en 3 parties :

La première partie donne des informations sur la physiologie des valves cardiaques au niveau anatomique, du développement embryonnaire, histologique et des fonctions de ces valves.

La deuxième partie présente les différentes pathologies des valves cardiaques avec leurs prévalences et leurs classifications. Le détail d'une étude génétique réalisée sur une dystrophie valvulaire héréditaire liée à des mutations de la filamine A montre l'importance de cette protéine.

La troisième partie décrit la structure et les fonctions de la filamine A afin de comprendre son implication dans la physiopathologie des valvulopathies.

## I.1 Physiologie des valves cardiaques

### I.1.1 Anatomie des valves

Le cœur humain est une pompe composée de 4 cavités représentées par 2 ventricules et 2 oreillettes. Il fonctionne de façon cyclique par deux étapes : la systole, la période de contraction ventriculaire permettant l'éjection du sang et la diastole, la période de relaxation ventriculaire pendant laquelle le cœur se remplit de sang. Ce cycle se produit à une fréquence moyenne de 70 battements par minute chez l'homme au repos. Cet organe est capable d'éjecter 5 litres de sang par minute chez l'homme sain au repos.

Notre organisme nécessite deux circulations sanguines : une circulation sanguine pulmonaire assurée par le « cœur droit », qui est formé par l'oreillette droite et le ventricule droit, permet l'oxygénation du sang. Une circulation sanguine systémique associée au ventricule gauche permet d'apporter les nutriments et l'oxygène essentiels aux différents organes. Ces circulations sanguines sont orientées dans un sens unidirectionnel grâce à la séparation des différentes cavités cardiaques par des valves atrio-ventriculaires, entre les ventricules et les oreillettes, et des valves semi-lunaires entre les ventricules et les voies d'éjection artérielle. Ces structures valvulaires sont ancrées dans le « squelette fibreux » en continuité du muscle cardiaque formant la base des anneaux valvulaires. Les différents types de valves ont des structures et des compositions différentes en fonction de l'orientation du flux sanguin et de leur localisation dans le cœur (Lincoln et al., 2006; Misfeld and Sievers, 2007) (Figure 1).

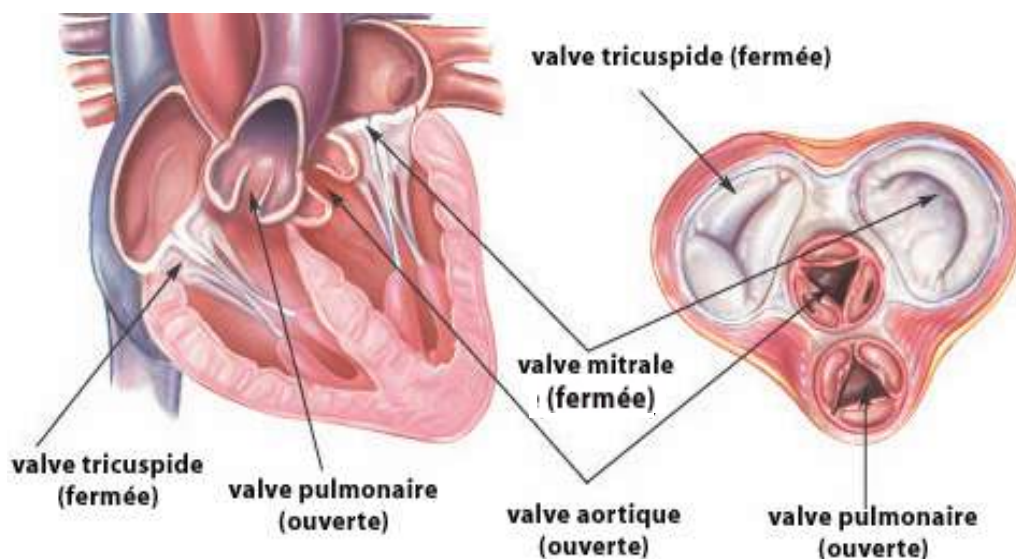


Figure 1 : Schéma du cœur et des valves cardiaques d'après lifeisnow.com The guardian

### **I.1.1.1 Les valves atrio-ventriculaires**

Les valves atrio-ventriculaires sont situées à la jonction entre les oreillettes et les ventricules. Elles sont composées de replis membranaires appelés valvules qui sont minces, flexibles et asymétriques donnant une forme d'anneau à la valve. Ces structures ont la particularité d'être reliées à des cordages tendineux fins et fibreux, qui sont eux mêmes maintenus par les muscles papillaires dans le prolongement du ventricule, empêchant le retour des valvules dans l'oreillette pendant la systole. Ces valves atrio-ventriculaires sont au nombre de 2 :

- La valve mitrale séparant l'oreillette gauche et le ventricule gauche est composée de deux valvules (antérieure et postérieure) et subit une pression transvalvulaire maximale de 120 mm Hg (Sacks et al., 2009).

- La valve tricuspide séparant l'oreillette droite et le ventricule droit est, quant à elle, composée de 3 valvules (antérieure, postérieure et septale) et subit une pression transvalvulaire maximale d'environ 25 mm Hg.

### **I.1.1.2 Les valves semi-lunaires**

Les valves semi-lunaires situées à l'entrée des voies d'éjection artérielle sont composées de valvules appelées aussi cuspidés de forme semi-lunaire qui ne sont pas rattachées au ventricule. La forme sigmoïde de ces valves permet un écoulement sanguin de façon laminaire dans les artères (Hinton and Yutzey, 2011). Il existe 2 valves semi-lunaires :

- La valve aortique séparant le ventricule gauche et l'aorte est composée de 3 cuspidés (coronaire droite, coronaire gauche et non coronaire) supportant une pression transvalvulaire maximale de 80 mm Hg. Les cuspidés coronaires sont appelées ainsi, car les artères coronaires prennent naissance au-dessus d'elles au niveau de la valve aortique. La perfusion des coronaires peut se faire lors de la fermeture des cuspidés qui permet le passage du sang oxygéné.

- La valve pulmonaire séparant le ventricule droit et l'artère pulmonaire est également composée de 3 cuspidés subissant une pression transvalvulaire maximale de 10 mm Hg.

Outre, les différences de structure et de forme observées entre les valves présentées précédemment, elles ont également des différences d'épaisseur liées à diverses contraintes hémodynamiques qu'elles subissent tels que les contraintes de cisaillement liées à l'orientation du flux sanguin ou les contraintes tensionnelles liées aux pressions subies. (Combs and Yutzey, 2009a). Concernant les contraintes tensionnelles, les valves du « cœur droit » (tricuspide et pulmonaire) qui subissent des pressions faibles (~20 mm Hg), sont

moins épaisses que les valves du « cœur gauche » (mitrale et aortique) pour lesquelles les pressions estimées sont d'environ 100 mm Hg. Dans les conditions physiologiques, l'épaisseur des valves cardiaques n'excède pas 1 mm alors que leur épaisseur peut atteindre 5 mm dans des conditions pathologiques (Hinton and Yutzey, 2011). Dans le cas des contraintes de cisaillement, les valves atrio-ventriculaires sont également plus épaisses que les valves semi-lunaires liées aux turbulences du flux sanguin entre les ventricules et les oreillettes. Enfin les parties libres des valvules sont également plus épaisses comparées aux parties reliées aux anneaux valvulaires dues au fait qu'elles sont les premières à subir les variations de flux sanguin.

Afin de mieux comprendre les différences de structures entre les valves cardiaques, une description de leur développement embryonnaire et de leur composition sera présentée dans les paragraphes suivants.

### ***1.1.2 Développement embryonnaire : valvulogénèse***

Au cours du développement embryonnaire, le cœur est le premier organe fonctionnel. Le tube cardiaque primitif est formé d'une couche extérieure de cellules myocardiques et une couche intérieure de cellules endocardiques séparées par une gelée cardiaque. Au cours de la torsion du cœur, cette gelée forme le canal atrio-ventriculaire (CAV), les voies d'éjection artérielle ainsi que les cavités cardiaques (Hinton and Yutzey, 2011).

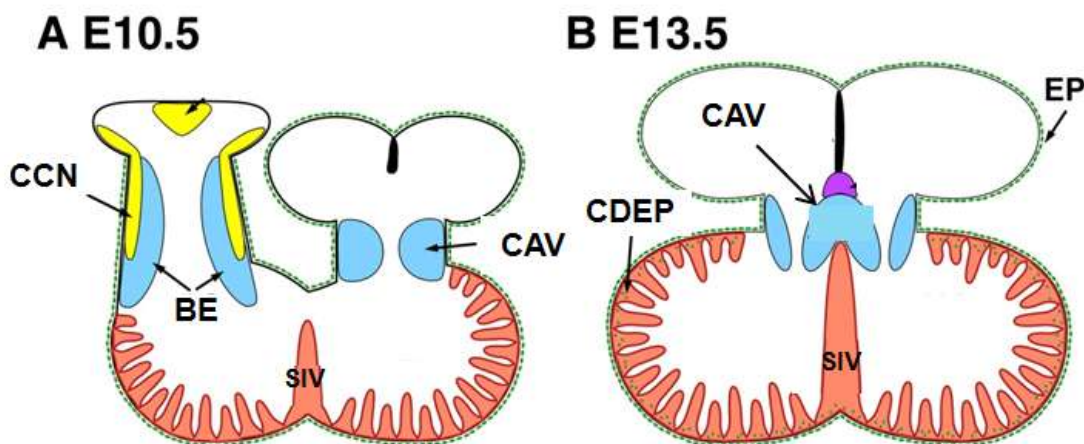
La formation des valves cardiaques apparaît au cours des 5 à 8 premières semaines de développement chez l'homme (Person et al., 2005). La première étape de la valvulogénèse (28<sup>ème</sup> jour) est le développement des bourrelets endocardiques dans le CAV et dans les voies d'éjection artérielle (Combs and Yutzey, 2009b). Ces bourrelets forment des barrières physiques pour empêcher le retour du sang dans les régions qui donneront les futures cavités. Au cours de la formation de ces bourrelets, le facteur de croissance BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) inhibe l'expression des gènes spécifiques des chambres cardiaques tels que *nppa* codant pour le peptide natriurétique de type A ou encore les connexines 40 et 43 dans les cellules myocardiques environnantes (Ma et al., 2005). Ensuite, ces cellules augmentent la sécrétion de composants de la matrice extracellulaire (MEC) tels que l'acide hyaluronique et le versicane dans la gelée cardiaque induisant le gonflement des bourrelets (Schroeder et al., 2003).

La fusion des bourrelets antérieur et postérieur du CAV fait apparaître deux CAV droit et gauche formant les orifices des futures valves mitrales et tricuspides. Plus tardivement, les bourrelets des voies d'éjection artérielle donneront les orifices des valves aortiques et pulmonaires (Person et al., 2005) (Figure 2).



Après cette étape de fusion des bourrelets, le phénomène de transformation de cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses appelé aussi « Endothelial to Mesenchymal Transition » EMT est activé par différents facteurs de croissance comme le BMP2, TGF $\beta$ , NOTCH et la voie Wnt (Ma et al., 2005). Les cellules endothéliales en cours de transformation s'hypertrophient, expriment moins de molécules des jonctions intercellulaires tel que PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1) et acquièrent des capacités d'invasion et de migration cellulaire. Elles envahissent alors les bourrelets endocardiques formant les valves primitives avec les différentes cuspidés ou valvules (Schoen, 2008; Wirrig and Yutzey, 2011).

Ensuite un amincissement et un allongement des valves primitives apparaissent grâce la prolifération des cellules mésenchymateuses qui elle-même est activée *via* les voies de signalisation associées aux facteurs BMP2 et TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ). Dans le même temps, ces cellules produisent des composants de la MEC associés au tendon (collagènes I et III, ténascine) et au cartilage (collagène II et aggrécane). Enfin les valves cardiaques se maturent puis s'organisent en couches stratifiées composées de protéoglycanes, d'élastine et de collagène. Cette maturation est possible grâce au processus de dégradation spécifique réalisé par des métalloprotéinases matricielles (MMP) (Hinton et al., 2006; Hinton and Yutzey, 2011).

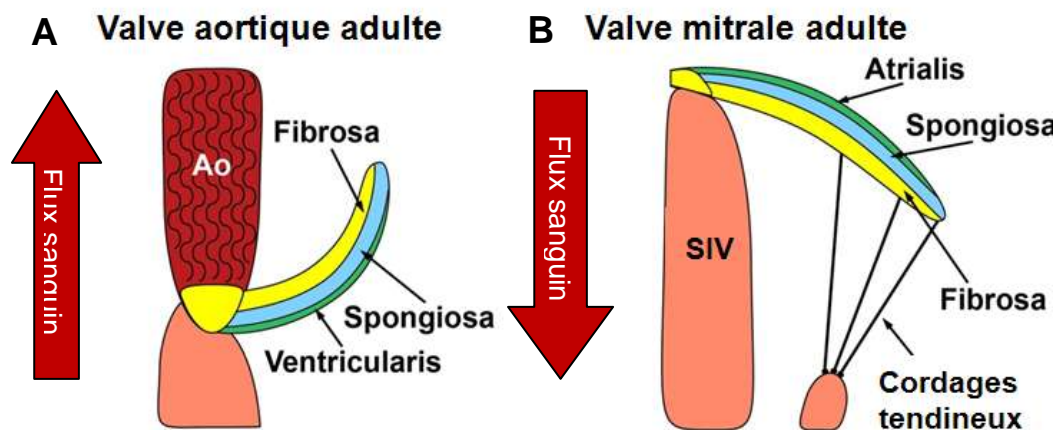


**Figure 2: Schéma du développement embryonnaire des valves cardiaques** (A) Au stade embryonnaire (E) 10.5 jours chez la souris, les bourrelets endocardiques immatures sont formés dans le CAV et les voies d'éjection artérielle. Les zones bleues correspondent à la présence de cellules dérivées de l'endocarde après l'EMT et en jaune des cellules de la crête neurale. (B) Au stade E13.5 chez la souris correspondant au stade 5 - 6 semaines chez l'homme, les valves primitives en bleu commencent le remodelage de leur MEC et leur élongation.

BE = bourrelets endocardiques, EP = épicarde, CDEP = cellules dérivées de l'épicarde, SIV = septum inter-ventriculaire CCN = cellules de la crête neurale. D'après Wirrig and Yutzey, 2011

### 1.1.3 Histologie des valves

Après leur maturation, les valves cardiaques présentent une organisation tissulaire stratifiée en plusieurs couches dont la composition diffère selon leur localisation par rapport au flux sanguin (Figure 3). La partie valvulaire en contact avec le flux sanguin correspond à la couche *ventricularis* (valves semi-lunaires) ou *atrialis* (valves atrio-ventriculaires) séparée de la couche la plus éloignée du flux sanguin : la *fibrosa* par la couche intermédiaire : la *spongiosa*. Le fonctionnement des valves nécessite un équilibre précis entre la flexibilité et la rigidité de ces structures. Ceci est permis grâce à une hétérogénéité de la MEC dans les différentes couches valvulaires qui confère les propriétés biomécaniques nécessaires aux valves afin de résister aux contraintes hémodynamiques liées aux tensions et au flux sanguin subis au cours de la systole (Hinton et al., 2006; Lincoln et al., 2006; Hinton and Yutzey, 2011).



**Figure 3 : Schéma des valves cardiaques matures.** La valve aortique (A) et la valve mitrale (B) matures sont composées de 3 couches distinctes, avec différentes compositions matricielles. Les couches *ventricularis/atrialis* supportent le flux sanguin et sont associées à une couche intermédiaire (la *spongiosa*) et à une couche plus éloignée du flux sanguin, la *fibrosa*. Les flèches rouges représentent l'orientation du flux sanguin. Ao = aorte, SIV = septum inter-ventriculaire. D'après Wirrig and Yutzey, 2011.

Au cours des cycles de contractions cardiaques, la MEC valvulaire résiste à de nombreuses tensions grâce à ses propriétés viscoélastiques. Durant le mouvement d'ouverture ou de fermeture de la valve, la MEC subit des forces de torsion ainsi que des forces de cisaillement par le passage du flux sanguin. Enfin, lorsque les valves se ferment et retiennent le sang, la MEC valvulaire subit d'autres forces de tension (Misfeld and Sievers, 2007). L'association des propriétés viscoélastiques des différents composants matriciels en fonction des différentes couches permet à la MEC de résister à ces différentes tensions afin de maintenir l'intégrité des valves.

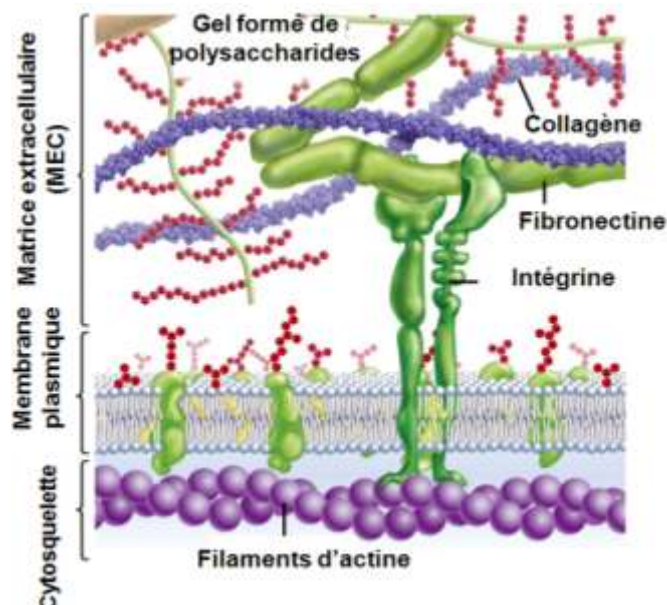
### I.1.3.1 La matrice extracellulaire des valves

Les valves sont des structures avec peu de cellules et présentent une organisation proche des tissus conjonctifs (tendons ou cartilages). La MEC valvulaire possède une composition particulière de protéines matricielles selon les différentes couches des valves.

#### I.1.3.1.1 Les composants

La MEC et ses macromolécules sont synthétisés et secrétés majoritairement par les fibroblastes. Elle forme un maillage de différents types de collagène retenu par des fibres élastiques auxquelles s'ajoutent des glycoprotéines d'adhésion et les glycosaminoglycanes (GAG). Ces derniers sont peu flexibles et chargés négativement attirant les molécules d'eau permettant la formation d'un gel hydrophile qui est caractéristique de la MEC. De plus, elle participe au maillage de la MEC par l'interaction avec les autres composants. Les fibroblastes participent à l'organisation de la MEC grâce à une balance entre synthèse et dégradation de ces différents composants (Jacob, 2006). La synthèse de collagènes et d'élastine est élevée au cours du développement embryonnaire et de la croissance mais, diminue à l'âge adulte. Ces processus sont réactivés après des atteintes mécaniques ou protéolytiques de la MEC.

Les composants matriciels sont de différentes catégories (Figure 4):



**Figure 4 : Organisation de la matrice extracellulaire.** La MEC est un maillage de collagènes fixé à des molécules d'adhésion (fibronectine) permettant le lien avec les intégrines transmembranaires. La communication entre les signalisations intracellulaires et extracellulaires (et réciproquement) est permise grâce à ces intégrines. La MEC enferme aussi des GAG, des protéoglycanes et des facteurs de croissance. D'après Pearson Prendice hall, Inc.

**- Les protéines structurales :**

Les collagènes sont des protéines fibreuses classées en 5 types. Dans les valves matures, les types de collagènes majoritairement exprimés sont les types I et III. Ces chaînes  $\alpha$  de collagène s'associent et forment une structure en triples hélices appelée procollagène qui est sécrétée puis maturée en tropocollagène dans la MEC. Ce tropocollagène s'assemble pour former des fibrilles de collagène et enfin des fibres de collagènes très résistantes. La tropoélastine, précurseur soluble, est sécrétée dans la MEC et forme, lors de sa polymérisation, des molécules d'élastine hydrophobes. Dans la MEC, la tropoélastine s'associe en fibres élastiques grâce aux microfibrilles composées de glycoprotéines : les fibrillines. Ces fibres élastiques sont alors composées à 90% d'élastine. Dans les valvules ou cuspidés, la proportion de collagènes est de l'ordre de 50% de la MEC et celle de l'élastine de 11% de la MEC (Schoen, 2008). Par ailleurs, des mutations de l'élastine et de la fibrilline 1 sont associées respectivement au syndrome de Williams Beuren et au syndrome de Marfan (Judge and Dietz, 2005; Pober, 2010). De plus, des mutations dans les collagènes, quant à elles, sont associées aux différents syndromes d'Ehlers-Danlos (Malfait et al., 2010). Ces syndromes énoncés précédemment sont des maladies du tissu conjonctif associées à des atteintes des valves cardiaques qui seront décrites dans le chapitre concernant les valvulopathies.

**- Les protéines d'adhésion :**

La fibronectine est une glycoprotéine qui peut être soit plasmatique à l'état soluble ou tissulaire à l'état insoluble s'associant en fibres à la surface des cellules. Elle se fixe à différentes protéines comme les collagènes, les intégrines ou encore les protéoglycanes. Des souris invalidées pour la fibronectine développent des défauts de formation des coussins endocardiques et donc des valves (George et al., 1993; Combs and Yutzey, 2009b). Une autre protéine d'adhésion importante, la périostine est sécrétée dans la MEC et se lie aux intégrines ainsi qu'aux composants structuraux de la MEC comme les collagènes. Des études ont montré son rôle essentiel de différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules de type fibroblastique dans la valvulogénèse au cours de la phase suivant l'EMT (Norris et al., 2009a).

**- Les protéines anti-adhésives :**

Les ténascines sont des glycoprotéines très exprimées au cours du développement embryonnaire. La ténascine X est capable de moduler l'assemblage des fibres de collagène et l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMP). Des mutations de la ténascine X ont été identifiées dans un syndrome similaire à celui d'Ehlers-Danlos de type II (Malfait et al.,

2010). L'ostéonectine et l'ostéopontine sont des glycoprotéines liées au processus d'ossification participant au mécanisme physiopathologique de calcification des valves (Lincoln et al., 2006).

#### **- Les protéoglycanes et glycosaminoglycanes :**

L'acide hyaluronique est un GAG formé d'un polymère composé de répétitions d'unité saccharidique. Le versicane est un protéoglycane avec des capacités d'hydratation élevées et antiadhésives ayant également la capacité d'interagir avec les intégrines. Dans le contexte des valves cardiaques, le défaut d'expression du versicane ou de l'acide hyaluronique chez des souris est létal empêchant le développement des coussins endocardiques nécessaire à la formation des valves (Mjaatvedt et al., 1998).

#### **- Les enzymes :**

Les MMP sont des endonucléases qui constituent une famille de 23 membres connus chez l'homme dont l'activité est contrôlée par des inhibiteurs tissulaires spécifiques des MMP ou TIMP (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases) qui se fixent sur le site actif des MMP. Il existe 6 sous-familles de MMP : les collagénases (MMP-1, -8 et -13), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromélysines (MMP-3, -10 et -11) et les matrilysines (MMP-7 et -26) différenciées par les substrats qu'elles dégradent. En plus de ces 4 groupes, il faut ajouter les MMP de type membranaire (MT-MMP) (MMP-14, -15, -16, -17, -24 et -25) et les autres qui ne peuvent pas être classés dans les autres groupes (MMP-19, -20, -21 et -23). L'expression des MMP est variable selon les tissus, la MMP-1 est exprimée dans toutes les valves alors que la MMP-2 est exprimée préférentiellement dans les valves aortiques et pulmonaires. Dans les conditions physiologiques, les MMP-3 et -9 ne sont pas exprimées (Dreger et al., 2002). En revanche, il a été démontré dans des valves mitrales humaines avec une atteinte myxomateuse, une surexpression des MMP-1, -2, -9 et -13 (Rabkin et al., 2001). Dans des valves humaines sténosées avec des calcifications, il a été démontré une augmentation de l'expression et de l'activité de la MMP-3, -9 et TIMP-1 (Fondard et al., 2005). L'équilibre entre MMP et TIMP est essentiel à une régulation physiologique de la MEC.

Les différents composants de la MEC valvulaire participent au développement embryonnaire des valves. Ils permettent surtout de résister aux tensions mécaniques en fonction des propriétés de structure, d'hydratation, d'élasticité ou de rigidité qu'ils apportent. La particularité des valves provient de leur structure stratifiée en plusieurs couches avec différentes compositions matricielles.

### ***1.1.3.1.2 L'organisation stratifiée***

La MEC valvulaire participe à la durabilité des valves mais, aussi aux processus cellulaires d'adhésion et l'activation des cellules interstitielles de valves (CIV) au cours de la réparation tissulaire (Schroeder et al., 2003).

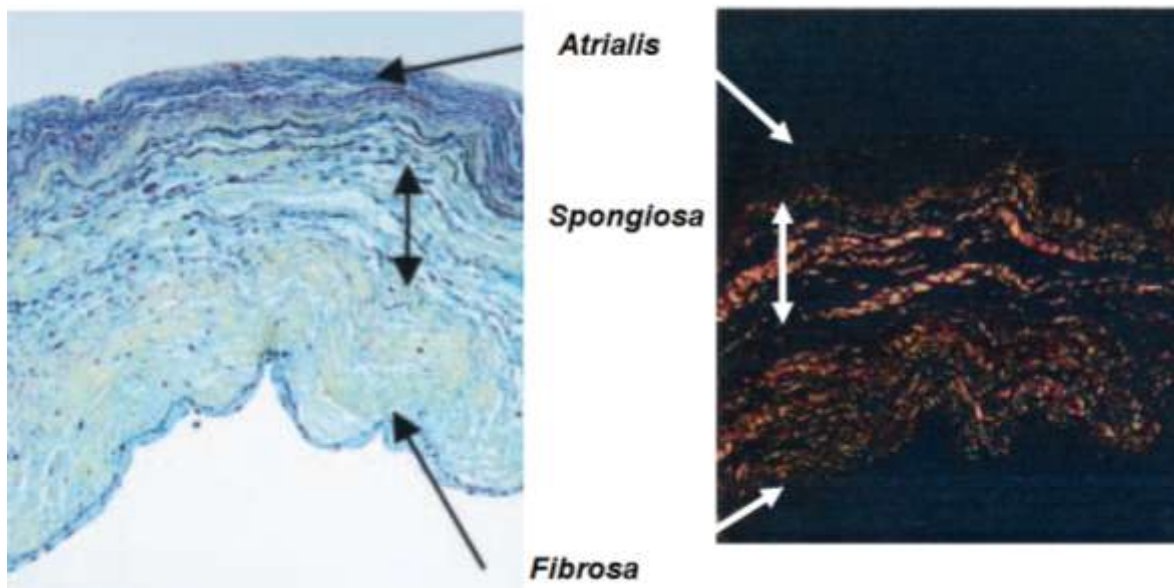
Dans l'architecture stratifiée des valves cardiaques (Figure 5), les fibres élastiques de la *ventricularis* des valves aortiques et de l'*atrialis* des valves mitrales confèrent l'élasticité nécessaire à la valve, pour son extension au cours de son ouverture ainsi que sa rétractation au cours de sa fermeture. Ces couches confèrent la flexibilité essentielle aux valves afin de laisser passer le sang sans perturber le flux sanguin (Hinton and Yutzey, 2011).

Les protéoglycanes tels que l'aggrécane et le versicane dans la *spongiosa* permettent d'absorber les forces de compression ainsi que le mouvement entre les fibres élastiques (*ventricularis*) et les fibres de collagènes (*fibrosa*). L'organisation de cette couche est moins structurée à l'inverse de l'agencement parallèle des fibres élastiques dans l'*atrialis*. La *spongiosa* permet de supporter les gradients de pression et le changement de forme des valves au cours de la contraction cardiaque.

La *fibrosa*, quant à elle, est majoritairement composée de fibres de collagène denses et parallèles de type I et un peu de type III qui apportent la rigidité et la résistance de la valve (Sacks and Yoganathan, 2007). La composition en différents types de collagènes évolue au cours de la maturation valvulaire dans le but de répondre à la demande fonctionnelle du rythme cardiaque et structurale liée à la croissance du cœur. Les collagènes permettent de résister aux forces d'étirement subies par les valves.

Enfin, les cordages tendineux permettent de transmettre les contractions des muscles papillaires aux valves et retiennent ces valves au cours de la systole. Ils sont composés de collagènes et d'élastine.





**Figure 5 : Coupe histologique d'une valve mitrale saine.** A) Coloration au Pentachrome de Movat des différentes couches de la valve mitrale (Jaune : Collagènes, Bleu : protéoglycanes, Noir : élastine) B) Coloration au Rouge Picro-sirius permettant d'observer les fibres de collagènes en lumière polarisée (Rouge : fibres de collagènes). D'après Rabkin et al, 2001.

### I.1.3.2 Les différents types cellulaires des valves

La matrice valvulaire contient des cellules qui permettent non seulement le maintien de l'intégrité structurale des valves mais également sa réparation en cas de dommages tissulaires. Pendant de nombreuses années, ces cellules ont été classées dans la catégorie des fibroblastes par leur capacité de sécrétion et de dégradation de la MEC. En réalité, les valves contiennent environ 6 types cellulaires avec des caractéristiques particulières : les cellules endothéliales provenant de l'EMT, les CIV quiescentes, les CIV activées, les cellules souches progénitrices de CIV, les CIV en cours de différenciation ostéoblastique et les cellules endothéliales de valve (CEV) (Liu et al., 2007).

Au cours du développement embryonnaire, les cellules endothéliales provenant des bourrelets endocardiques vont se différencier en cellules mésenchymateuses, migrer et proliférer dans la matrice d'acide hyaluronique et de versicane de ces bourrelets. De nombreuses études ont montré que cette transformation ou EMT implique des molécules de la famille du TGF $\beta$ , du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et de la voie NOTCH.

Dans les valves primitives, ces progéniteurs mésenchymateux se différencient en cellules similaires à des fibroblastes appelées CIV quiescentes. Une étude de Norris et al. En 2009 a démontré que la périostine oriente la différenciation des progéniteurs dérivant de l'EMT vers un type fibroblastique donnant les CIV (Norris et al., 2009a)(Norris et al., 2009b). Les CIV quiescentes correspondent aux cellules majoritaires dans les valvules et sont localisées préférentiellement sous l'endothélium valvulaire. Ces cellules sont donc plus denses dans les couches *fibrosa* et *ventricularis* comparées à la *spongiosa*. Dans les valves adultes, les CIV ont une faible activité de synthèse et de dégradation de la MEC et communiquent entre elles par des jonctions intercellulaires.

Une population de cellules souches précurseurs des cellules valvulaires a été identifiée dans la circulation sanguine et la moelle osseuse. Elle semble être recrutée au cours des processus pathologiques afin de permettre la réparation des valves par la transformation en CIV quiescentes ou activées (Liu et al., 2007).

Au cours du remodelage et de la réparation valvulaire, l'activation des CIV quiescentes en CIV activées ou myofibroblastes permettent le remodelage et la réparation tissulaire. Elles peuvent remplir cette fonction par l'activation des propriétés de synthèse des composants de la MEC et leur activité contractile. Cette activation est permise par des facteurs tels que TGF $\beta$  sécrété par les cellules endothéliales et le TNF $\alpha$  sécrété par les macrophages infiltrés dans les lésions valvulaires. L'expression de protéines musculaires tels que l'actine des muscles lisses et de la myosine des muscles striées confère une capacité contractile aux CIV grâce à la formation des fibres de stress. Les CIV activées sont caractérisées par une augmentation de leur activité de sécrétion et de dégradation des composants de la MEC comme les collagènes ou la fibronectine, mais aussi la sécrétion de facteurs de croissance comme le TGF $\beta$ 1. À la fin de la réparation valvulaire, les myofibroblastes sont éliminés par apoptose, lorsque cette apoptose est diminuée, cela peut déclencher des processus pathologiques de type myxomateux ou fibrotique par un excès d'activité des myofibroblastes. De plus, dans des conditions pathologiques de calcification des valves aortiques, la libération de BMP2 et le TGF $\beta$  induit la différenciation des CIV en ostéoblastes.

Enfin les CEV tapissent les valves et sont donc à l'interface entre le flux sanguin et le tissu valvulaire qui permettent de répondre à l'environnement mécanique et humoral subis par les valves. L'endothélium valvulaire forme une barrière essentielle à l'homéostasie en remplissant des fonctions dans la réponse inflammatoire, la coagulation ou encore la perméabilité. À l'inverse des cellules de l'endothélium vasculaire, les CEV possèdent la particularité de s'aligner de façon perpendiculaire aux forces d'étirement hémodynamique (Person et al., 2005).



### **I.1.4 Les fonctions des valves**

Les valves permettent d'orienter le flux sanguin dans le cœur, dans un sens unidirectionnel au cours de la contraction. Elles ont une fonction de clapet à l'intérieur du cœur afin d'empêcher le retour du sang dans les différentes cavités. Au cours de la vie, les valves cardiaques vont s'ouvrir et se fermer plus de 3 billions de fois, laissant passer de 5 litres de sang par minute chez l'homme au repos. De plus, les valves subissent des pressions importantes au cours de la systole, avec des pressions sur la valve mitrale pouvant aller jusqu'à 120 mm Hg au cours de la contraction (Sacks and Yoganathan, 2007).

Jusqu'à maintenant, les valves étaient considérées comme des structures inertes avec un fonctionnement passif régulé par les variations de pression intracardiaque. Au cours des 10 dernières années, des études ont permis de montrer que les valves possèdent des éléments de contractilité et d'innervation. D'après des travaux réalisés par l'équipe de Ingels en 2009, les valves humaines se contractent avant la systole par deux systèmes contractiles, soit *via* la stimulation électrique soit *via* la voie  $\beta$  adrénergique (Itoh et al., 2009). Ces systèmes agissent sur les cardiomyocytes et les cellules musculaires présentes dans l'anneau mitral ainsi que sur les CIV. (Swanson et al., 2011). Cette contraction permet le changement de forme des valves, facilite leur fermeture ou coaptation et augmente leur longévité en évitant les chocs violents à chaque contraction cardiaque. Les systèmes contractiles participent aussi au maintien de la géométrie du ventricule en évitant l'hypertrophie cardiaque par une précoaptation qui évite le reflux sanguin. Au niveau cellulaire, des études ont montré que les CIV mitrales appliquaient des forces plus importantes que les CIV aortiques et tricuspides dans des gels de collagène (Chester et al., 2001). Ces CIV forment de nombreuses jonctions intercellulaires et de connections avec la MEC permettant la propagation de la contraction à l'ensemble de la valve.

Depuis les années 1900, un réseau de nerfs sensitifs et moteurs a été caractérisé dans les différentes valves mais, sa fonction était inconnue jusqu'à maintenant. Ces nerfs proviennent de l'endocarde et se prolongent majoritairement dans la *ventricularis* pour la valve aortique ainsi que dans l'ensemble de la valve mitrale jusqu'aux cordages tendineux (El-Hamamsy et al., 2009). Des études ont montré que la stimulation de ce réseau par des neurotransmetteurs (sérotonine, acétylcholine...) induit des activités contractiles, de sécrétion et de réparation des CIV (Chester et al., 2001). De plus, l'endothélium valvulaire participe à ces stimulations par la sécrétion de prostaglandines qui vont activer les terminaisons nerveuses. Cet endothélium valvulaire peut également réagir à des stimulations

neuronales par la sécrétion de facteurs vasoactifs comme le monoxyde d'azote ou l'endothéline 1 (Ku et al., 1990).

En conclusion de cette partie, les valves s'adaptent aux milieux hémodynamiques et aux facteurs solubles en induisant des signaux paracrines, endocrines ou neurocrines. Ces valves sont complexes, autant d'un point de vue structural que fonctionnel. Au cours de la vie, les valves doivent être capables de s'adapter en modifiant leur structure et leurs fonctions. En revanche, des défauts d'adaptation de ces valves peuvent entraîner le développement de différentes valvulopathies.

## I.2 Les valvulopathies

### ***1.2.1 La dérégulation pathologique de la matrice valvulaire***

Dans les pathologies valvulaires, plusieurs processus physiopathologiques ont été identifiés induisant tous un remodelage de la MEC (Hinton et al., 2006).

Le ***processus myxomateux*** est caractérisé par une accumulation de protéoglycanes dans la *spongiosa* induisant l'épaississement de la valve. Une dégradation des collagènes et une fragmentation de l'élastine sont également observées. Ces modifications sont provoquées par une dérégulation des MMP. Dans une étude chez le chien, les MMP-1, -2, -9 et -13 sont augmentées dans les valves myxomateuses (Segura et al., 1998; Aupperle et al., 2009). Les valves sont alors plus souples induisant des régurgitations ou des prolapsus majoritairement de la valve mitrale. Ces anomalies sont souvent accompagnées d'une dilatation de l'anneau mitral et d'un allongement des cordages tendineux (Grande-Allen et al., 2003).

Le ***processus fibro-élastique*** est, quant à lui, caractérisé par une fragmentation des protéoglycanes et une accumulation des collagènes avec toujours une fragmentation des fibres d'élastine. La valve devient plus rigide avec une induction de l'expression des gènes de l'ostéogénèse (ostéopontine, ostéocalcine) dans les CIV activant le processus d'ossification. Les valves sont alors sténosées et leurs mouvements sont réduits (Kim et al., 2008)

Le dernier cas est le ***processus athérosclérotique*** qui se caractérise par une destruction des cellules endothéliales induisant une infiltration de cellules inflammatoires telles que les macrophages. Ces cellules induisent une oxydation de lipoprotéines accumulées dans les lésions valvulaires et une libération de cytokines aboutissant à une activation des CIV. Les modifications au niveau cellulaire et humoral activent le remodelage de la MEC conduisant à la calcification de la valve aortique (Boström et al., 2011).

Les mécanismes moléculaires et cellulaires des valvulopathies sont encore mal connus. L'implication du remodelage de la MEC ainsi que l'activation des CIV ont été démontrées dans les phases tardives du développement de ces pathologies (Rabkin et al., 2001)

Les processus physiopathologiques qui modifient la structure et la fonction des valves empêchent ces dernières d'orienter le sang correctement dans l'organisme. Les problèmes de fermeture ou d'ouverture des valves par un excès de rigidité ou d'élasticité peuvent

provoquer différentes pathologies valvulaires et avoir des répercussions sur la fonction cardiaque. La prévalence de ces pathologies valvulaires est souvent sous-estimée.

### ***1.2.2 Historique et prévalence***

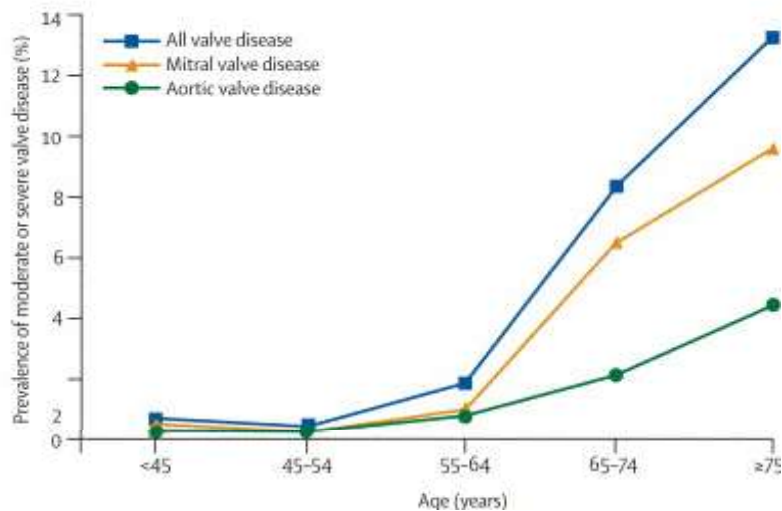
Au cours des 10 dernières années, le taux de mortalité dû aux maladies cardiovasculaires a régressé de 28 % dans la population américaine. Cette régression est due d'une part à l'évolution du mode de vie des patients et des facteurs environnementaux (Roger et al., 2011). D'autre part, elle est due à l'apport de nouvelles thérapies et à une prévention efficace sur les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires notamment le tabac et le cholestérol.

Actuellement, les pathologies des valves cardiaques, les arythmies et les maladies rhumatismales représentent 15 % des maladies cardiovasculaires. Pendant de nombreuses années, la cause majoritaire des valvulopathies était liée au rhumatisme articulaire aigu maintenant traité par une antibiothérapie efficace. Ces atteintes rhumatismales ont diminué de façon drastique en même temps que leurs atteintes "rhumatismales" des valves cardiaques. Les atteintes dites "dégénératives" sont alors devenues majoritaires caractérisées par une dégradation progressive des valves au cours du vieillissement. Les valvulopathies représentent toujours un enjeu de santé publique majeur dans les pays industrialisés avec environ 20000 décès par an aux États-Unis (Nkomo et al., 2006; Roger et al., 2011).

D'un point de vue clinique, le développement des pathologies valvulaires reste souvent inaperçu, car il est asymptomatique. L'apparition des premiers symptômes (essoufflements...) est souvent tardive alors que la pathologie est déjà très avancée, nécessitant dans la majorité des cas une chirurgie valvulaire. Grâce à une large étude sur la population américaine avec des examens échocardiographiques, la prévalence des maladies valvulaires a été estimée à 2,5 % aux États-Unis (Nkomo et al., 2006). Elle évolue avec l'âge, lié au diagnostic tardif, par une augmentation entre 54 ans et plus de 75 ans passant de 2% à 12% (Roger et al., 2011). Ainsi ces pathologies touchent 1 personne sur 8 de plus de 75 ans, autant les hommes que les femmes.

De plus, les maladies de la valve mitrale sont plus fréquentes que les atteintes de la valve aortique. Ces dernières ont une prévalence d'environ 0.9 % avec 15000 décès par an aux États Unis, alors que les pathologies de la valve mitrale apparaissent dans la population américaine à une fréquence de 1.7 %. Le diagnostic des pathologies de la valve mitrale est tardif ce qui est corrélé avec l'augmentation de la prévalence entre 54 et plus de 75 ans.

Parmi les maladies valvulaires, la régurgitation mitrale est la maladie valvulaire la plus fréquente alors que le rétrécissement mitral est la maladie la moins fréquente. La sténose aortique est la maladie valvulaire qui provoque le plus de remplacement valvulaire dans les pays industrialisés (Nkomo et al., 2006; Roger et al., 2011) (Figure 6).



**Figure 6 : Prévalence des pathologies valvulaires en fonction de l'âge.** Ce graphique représente l'évolution de l'ensemble des maladies valvulaires (Bleu), des maladies de la valve mitrale (Jaune) et des maladies de la valve aortique (Vert) en fonction de l'âge des patients dans la population américaine. D'après Nkomo et al., 2006.

### ***1.2.3 Les différents groupes de valvulopathies***

Actuellement, les valvulopathies n'ont pas une classification bien déterminée. Au niveau clinique, il existe la classification de Carpentier pour les pathologies de la valve mitrale permettant une classification anatomopathologique des régurgitations (Carpentier, 1983).

En général, ces pathologies sont réparties selon leur étiologie, soit isolées soit liées à un syndrome. Dans le cas des valvulopathies isolées, les patients présentent uniquement des atteintes valvulaires. À l'inverse, dans le cas des valvulopathies liées à un syndrome, les patients présentent d'autres symptômes comme des atteintes du squelette ou atteintes cérébrales.

Ces valvulopathies peuvent également être classées en fonction des valves atteintes : aortique et mitrale (fréquence élevée) ou pulmonaire et tricuspide (atteintes plus rares). De plus, les cliniciens regroupent ces pathologies en fonction des signes cliniques et échocardiographiques : la sténose qui se caractérise par une obstruction du flux sanguin due à un rétrécissement de la valve associé à une calcification. La régurgitation ou l'insuffisance est caractérisée par une fuite du flux sanguin due à une perte d'étanchéité (Schoen, 2005).

Une classification de ces différentes valvulopathies est proposée dans le tableau 1. Cette classification n'est certes pas exhaustive mais, elle permet de donner un aperçu de la diversité des pathologies touchant les valves cardiaques.

		Nom	Clinique	Génétique	Moléculaire	Prévalence
Isolée	Sténose aortique	Bicuspidie aortique	Calcification	<i>NOTCH1</i> , <i>ACTA2</i>	NOTCH1, cytosquelette	1-2/100
		Acquise	Dégénérative ou rhumatismale			
	Insuffisance aortique	Chronique	Rhumatismale ou infectieuse			
		Aigüe	Endocardite infectieuse aigüe			
	Sténose mitrale	Congénitale	Mauvaise insertion des cordages ou piliers			
		Acquise	Rhumatismale			
	Insuffisance mitrale	Prolapsus mitral	Myxoïde, fibro-élastique	chromosomes 11, 13, 16 ou X ( <i>FLNA</i> )	Cytosquelette	2-3/100
		Acquise	Rhumatismale ou infectieuse			
Syndrome	Marfan	Squelettique, oculaire, cardiovasculaire (dilatation racine aortique, régurgitation aortique et mitrale, prolapsus mitral)	<i>FBN1</i>	TGF $\beta$ , MEC	1-2 /10000	
	Loeys-dietz	Anévrismes de l'aorte, tortuosités artérielles, malformations craniofaciales	<i>TGFBR I</i> et <i>II</i>	TGF $\beta$		
	Williams-Beuren	Sténose aortique supra-avalvulaire, retards mentaux, malformations faciales	Délétion de gènes: <i>ELN</i> , <i>LIMK</i> , <i>GTF2I</i>	MEC	1/10000	
	Ehlers-Danlos Type IV	Hyperlaxité, délai de cicatrisation, prolapsus mitral, dilatation racine aortique	<i>COL3A1</i>	MEC		
	Alagille	Pigmentation oculaire, sténose pulmonaire et des artères périphériques, malformations craniofaciales	<i>JAG1</i>	NOTCH1		
	Noonan	Malformations craniofaciales, sténose pulmonaire, défaut de la valve mitrale	<i>KRAS</i> , <i>PTPN11</i>	Ras/MAPK, tyrosine phosphatases		

**Tableau 1 : Tableau récapitulatif des pathologies valvulaires.**

### I.2.3.1 Les valvulopathies isolées

Les pathologies de la valve aortique :

- **La sténose aortique (ou rétrécissement aortique)** existe sous des formes congénitales comme la bicuspidie ou des formes acquises (dégénérative par calcification ou rhumatismale).

- **L'insuffisance aortique** est plus rare avec des formes chroniques (rhumatismale ou infectieuse) ou aiguë, due à une endocardite infectieuse aiguë.

Les pathologies de la valve mitrale :

- **La sténose mitrale (ou rétrécissement mitral)** est une maladie rare avec une forme congénitale, associée à une mauvaise insertion des cordages tendineux et des piliers valvulaires ou une forme acquise de type rhumatismal.

- **L'insuffisance mitrale** est l'atteinte la plus fréquente des maladies valvulaires. La pathologie la plus répandue est le prolapsus mitral avec des formes fibro-élastiques ou myxoïdes. D'autres formes sont plus rares et de nature rhumatismale ou infectieuse.

En résumé, les pathologies les plus fréquemment retrouvées dans la population sont la sténose aortique congénitale et le prolapsus mitral (Schoen, 2005). Ces deux pathologies, les plus fréquentes, seront détaillées dans les paragraphes suivants.

#### La sténose aortique :

Cette atteinte de la valve aortique est la première cause de remplacement valvulaire dans les pays développés, avec une prévalence de 2 à 3 % chez les patients de plus de 65 ans (Hinton et al., 2006). Elle est caractérisée par un épaissement de la valve et une accumulation de dépôts calciques, due à un processus d'ossification. Des processus inflammatoires et artérioscléreux présents dans les valves activent la différenciation ostéoblastique par une libération de cytokines. Le développement de cette sténose est dans la plupart des cas associé à un processus dégénératif. Il existe également des formes congénitales plus rares liées à une bicuspidie aortique d'une prévalence de 1 à 2 % dans la population générale. Ce défaut congénital est caractérisé par la présence de 2 valvules au lieu de 3. Cette malformation se complique souvent d'une dilatation de l'aorte (Siu and Silversides, 2010). Les analyses génétiques de familles atteintes de bicuspidie de la valve aortique ont montré que plusieurs loci dans les chromosomes 5, 13 et 18 étaient impliqués. De plus, des mutations ont été identifiées dans les gènes *NOTCH1* sur le chromosome 9

codant pour un récepteur transmembranaire, ou *ACTA2* sur le chromosome 10 codant pour l'actine des muscles lisses (Garg et al., 2005; Garg, 2006).

#### Le prolapsus mitral :

La prévalence du prolapsus mitral dans la population générale est de 2,4 % (Towbin, 1999). Cette pathologie peut être sporadique ou familiale. Dans certains cas familiaux, la transmission héréditaire semble autosomique dominante (Towbin, 1999; Grau et al., 2007). Le prolapsus mitral provoque une régurgitation mitrale, induisant à long terme une insuffisance cardiaque, une fibrillation auriculaire allant jusqu'à des morts subites. La définition clinique est caractérisée par un déplacement des feuillets mitraux dans l'oreillette gauche au-dessus du plan de l'anneau mitral de plus de 2 mm au cours de la systole. On note que dans le prolapsus mitral, l'épaisseur des feuillets valvulaires s'accroît (environ 5 mm). On distingue des formes myxoïdes caractérisées par un épaissement et une redondance des feuillets de la valve mitrale, correspondant à un excès de tissus, et des formes dégénératives fibro-élastiques sans excès de tissus. Dans ce dernier cas, les cordages sont souvent allongés et finissent par se rompre.

Ces dernières années, des études génétiques ont permis d'identifier des loci potentiellement impliqués dans cette maladie sur les chromosomes 11, 13 et 16, mais aucun gène n'a encore été identifié (Freed et al., 2003; Nesta et al., 2005). Un autre locus a été découvert sur le chromosome X dans une valvulopathie rare (Kyndt et al., 1998; Grau et al., 2007).

#### **I.2.3.2 Les valvulopathies liées à un syndrome**

Le **syndrome de Marfan** est une maladie héréditaire avec des atteintes de tissu conjonctif fibreux. Les patients présentent des atteintes squelettiques, oculaires et cardiovasculaires. Ces dernières complications affectent majoritairement les valves avec un prolapsus ou une régurgitation mitrale, ainsi qu'une dilatation de la racine aortique ou une régurgitation aortique (Judge and Dietz, 2005). D'après des études génétiques, les mutations dans le gène *FBN1* sont les plus souvent représentées dans cette pathologie. Ce gène code pour la fibrilline 1, protéine de la MEC, qui permet d'y séquestrer le TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ). L'hypothèse privilégiée pour expliquer la pathologie est une suractivation de la voie de signalisation du TGF $\beta$ . Des traitements pharmacologiques sont proposés avec des anticorps anti-TGF $\beta$  et le Losartan, un antagoniste des récepteurs AT1 à l'angiotensine II réduisant les effets de la suractivation de la voie du TGF $\beta$  (Habashi et al., 2006).



Le **syndrome de Williams Beuren** est une maladie héréditaire caractérisée par des retards mentaux, des modifications faciales, une hypertension et une sténose aortique supra valvulaire. Il est dû à une microdélétion de gènes dans le chromosome 7. Les gènes impliqués dans cette pathologie sont l'élastine (composant de la MEC), LIMK-1 (kinase 1 à domaine LIM) ou encore GTF2I (*General Transcription Factor II*) (Pober, 2010).

Le **syndrome de Loey-Dietz** est une maladie autosomique dominante avec les caractéristiques cliniques suivantes : anévrismes aortiques, tortuosités artérielles et malformations craniofaciales. Ce syndrome est causé par des mutations sur les gènes codant pour les récepteurs de type 1 ou 2 du TGF $\beta$  (Van Hemelrijk et al., 2010).

Le **syndrome d'Ehlers-Danlos Type IV** est une pathologie héréditaire du tissu conjonctif. Il est caractérisé par une hyperlaxité de la peau et des articulations, un délai de cicatrisation et des défauts cardiaques incluant le prolapsus mitral, la dilatation de la racine aortique et la rupture des grosses artères. Des mutations dans le gène *COL3A1* qui code pour la chaîne  $\alpha$  du collagène de type 3 ont été identifiées. Pour d'autres types de syndrome d'Ehlers-Danlos, des mutations dans les gènes du collagène du type 2 et 5 ont également été décrites (Malfait et al., 2010).

Le **syndrome Alagille** est une maladie autosomique dominante caractérisée par des changements de pigmentation oculaire, une sténose de la valve pulmonaire, des modifications au niveau des artères périphériques et des atteintes neuronales. Une analyse génétique a permis d'identifier des mutations dans le gène *JAG1* qui code pour un ligand du récepteur notch (Kamath et al., 2004).

Le **syndrome de Noonan** est caractérisé par des malformations faciales, des atteintes cardiaques comme une sténose pulmonaire et des défauts de la valve mitrale, des anomalies squelettiques et des retards mentaux. Les gènes mutés dans ce syndrome sont impliqués dans la voie de signalisation Ras/MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) comme les gènes K-ras ou raf mais également le gène codant pour la tyrosine phosphatase PTPN11 (*Tyrosine-protein phosphatase non-receptor 11*) (Tartaglia et al., 2001, 2011).

En résumé, les valvulopathies ont des aspects cliniques différents (sténose, insuffisance, liées à un syndrome...) et un lien héréditaire a été identifié dans certaines valvulopathies. Cependant, les mécanismes physiopathologiques sont encore mal connus. L'hypothèse la plus souvent avancée est que les maladies valvulaires seraient dues à des défauts génétiques qui se manifesteraient au cours du développement et qui s'aggraveraient

avec le vieillissement (SMITH and MATTHEWS, 1955; Roberts and Ko, 2005; Hinton and Yutzey, 2011).

A l'heure actuelle les thérapeutiques médicamenteuses, utilisant les diurétiques ou les vasodilatateurs, permettent de faire diminuer la pression intracardiaque contribuant à un ralentissement de la dégénérescence valvulaire. Cependant, le seul traitement curatif est le remplacement ou la réparation valvulaire mais, ces interventions chirurgicales réalisées à cœur ouvert avec une circulation extracorporelle sont des chirurgies lourdes. En cas d'opération, les valves pathologiques sont remplacées par des prothèses valvulaires. Il existe des bio-prothèses provenant de porc ou de patients décédés mais, elles nécessitent une nouvelle opération au bout de 10 ans et sont donc destinées à des patients âgés. Pour des patients plus jeunes, il existe des prothèses mécaniques nécessitant un traitement anticoagulant à vie (Bonow et al., 2008).

## ***1.2.4 L'apport de la génétique dans les valvulopathies***

### **1.2.4.1 Dystrophie valvulaire myxoïde liée au chromosome X (XMVD)**

Dans le but de mieux comprendre les bases moléculaires liées à la physiopathologie de ces valvulopathies, des études génétiques sont menées sur des cas familiaux d'atteintes valvulaires. La stratégie consiste à identifier des gènes potentiellement cibles pour comprendre le mécanisme physiopathologique éventuellement commun aux différents gènes identifiés. Dans la partie suivante, une étude familiale sur une valvulopathie rare est détaillée afin de décrire la démarche expérimentale suivie dans le but d'identifier le gène impliqué.

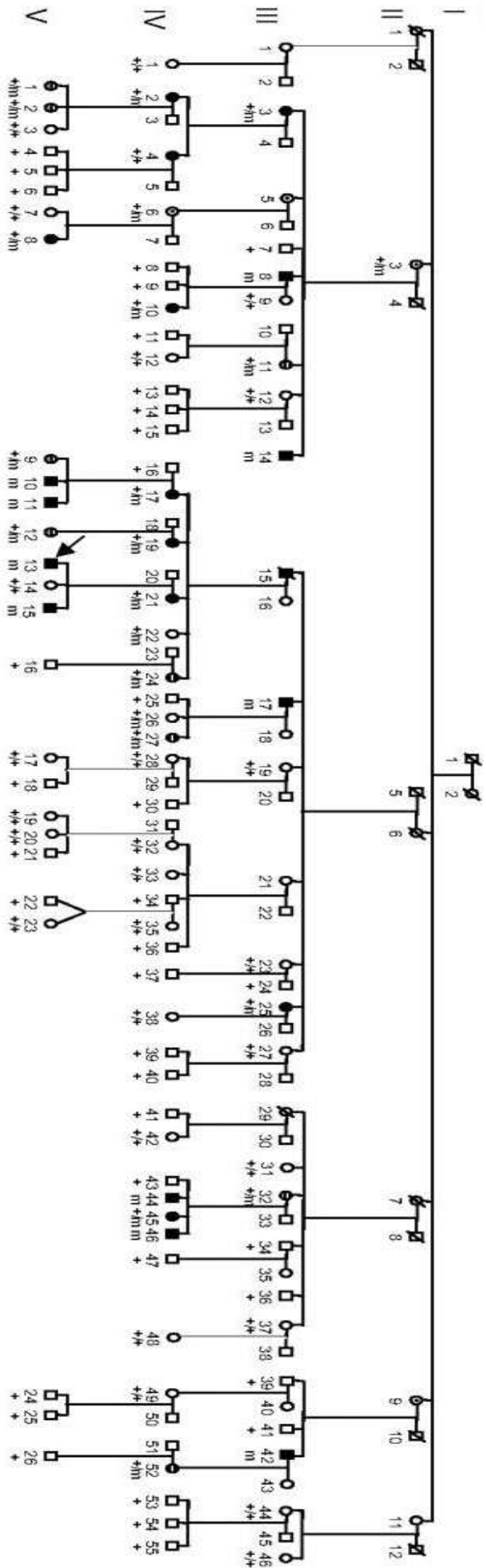
À l'institut du thorax, la stratégie d'étude de génétique familiale a été appliquée à une dystrophie valvulaire myxoïde identifiée chez un patient âgé de 17 ans avec une régurgitation aortique sévère sans aspect syndromique. Son cousin fut opéré quelques temps plus tard pour une régurgitation mitrale sévère due à une dystrophie valvulaire. Ces deux patients présentaient une hémophilie A mineure. Grâce à une étude généalogique, une grande famille (Famille 1) de 300 membres a pu être répertoriée sur 5 générations.

Dans cette famille, 91 membres ont accepté de participer à l'étude. Sur les 44 hommes, 10 souffrent de prolapsus mitral progressif dont 4 sont également atteints de régurgitations aortiques et 4 autres ont subi une chirurgie valvulaire. Sur les 47 femmes, 10 présentent des anomalies des valves aortiques ou mitrales qui restent asymptomatiques. De plus, un jeune enfant de 10 ans a été diagnostiqué avec une régurgitation aortique sévère

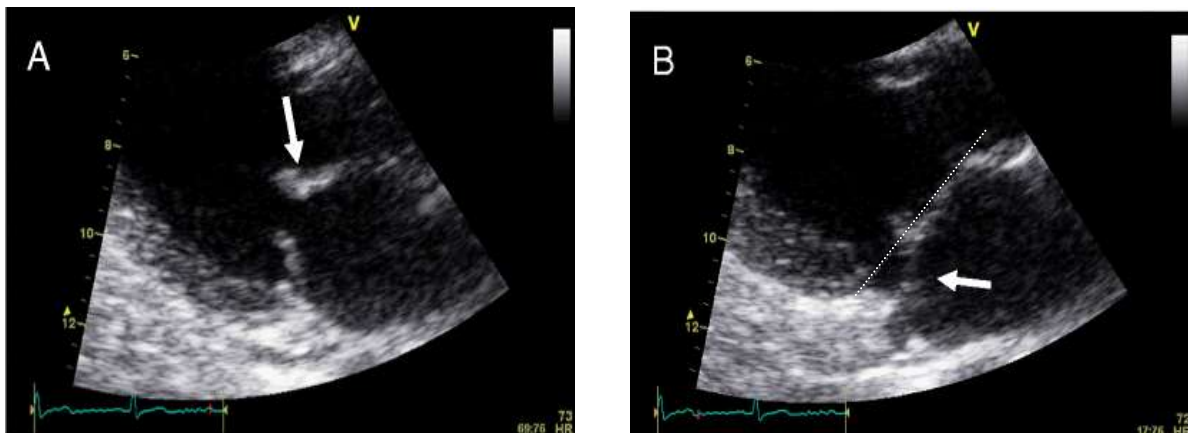
due à une sténose aortique. La première analyse de liaison réalisée sur cette famille présentant en plus de l'atteinte valvulaire une hémophilie A, a permis de localiser sur le chromosome X un locus d'intervalle génétique de 8 centimorgans (cM) (Kyndt et al., 1998; Trochu et al., 2000).

La recherche de patients avec une hémophilie A et opérés pour une valvulopathie a permis de retrouver un nouveau patient de 52 ans présentant une régurgitation aortique sévère et d'identifier dans cette famille un ancêtre commun vivant au 18<sup>ème</sup> siècle (Figure 7). Grâce à cette nouvelle branche s'ajoutant à l'arbre généalogique de la première famille et à une nouvelle analyse de liaison, l'intervalle génétique a été réduit à 6 cM. Dans cette famille, 3 hommes présentent une dystrophie valvulaire mitrale et un homme a été opéré pour un remplacement valvulaire aortique.

À partir d'une étude échocardiographique complète sur cette grande famille française réalisée par Professeur Thierry Le Tourneau à l'institut du thorax (Figure 8), les feuillets des valves mitrales des patients masculins ont un aspect dystrophique avec un allongement et un épaississement des feuillets antérieurs et postérieurs. Un élargissement de l'anneau mitral et une ballonnisation de la valve mitrale sont également observés et probablement à l'origine des régurgitations mitrales. De plus, des régurgitations aortiques sont également observées et les femmes présentent une dystrophie de la valve mitrale moins sévère. Quelques atteintes des valves pulmonaires et tricuspides ont pu être mises en évidence chez certains patients.



**Figure 7 : L'arbre généalogique de la famille 1 atteinte de XMVD.** Les femmes sont indiquées par des cercles et les hommes par des carrés. Les symboles remplis indiquent les membres atteints par la pathologie, symboles vides, les membres sans symptômes cliniques et en hachurés les statuts indéterminés. Les symboles avec un point à l'intérieur représentent les membres transmetteurs obligatoires de la pathologie et les symboles barrés indiquent les membres décédés. La flèche représente le cas-index. D'après Kyrndt et al., 2007



**Figure 8 : Aspects échocardiographiques de la dystrophie valvulaire mitrale modérée chez une femme de la famille 1.** (A) Épaississement au bout du feuillet mitral antérieur (Flèche blanche). (B) Prolapsus ou ballonnisation marquée du feuillet postérieur (flèche blanche) et une ballonnisation modérée du feuillet antérieur (ligne pointillée = ligne anneau mitral). D'après Lardeux et al., 2011.

Cette famille française atteinte de XMVD n'est pas un cas isolé. En effet, une famille britannique (Famille 2) atteinte de XMVD a également été identifiée. Le cas-index est décédé à la naissance d'une maladie valvulaire congénitale sévère, il présentait une atteinte des 4 valves. D'autres membres de la famille, comme le grand-père avait subi un remplacement de la valve tricuspide. Le frère du cas-index a également été diagnostiqué pour des pathologies valvulaires aortique et mitrale.

De la même façon, un jeune garçon d'une famille africaine (Famille 3) a été diagnostiqué avec un épaississement et un aspect dystrophique des valves cardiaques conduisant à une incompetence variable des différentes valves.

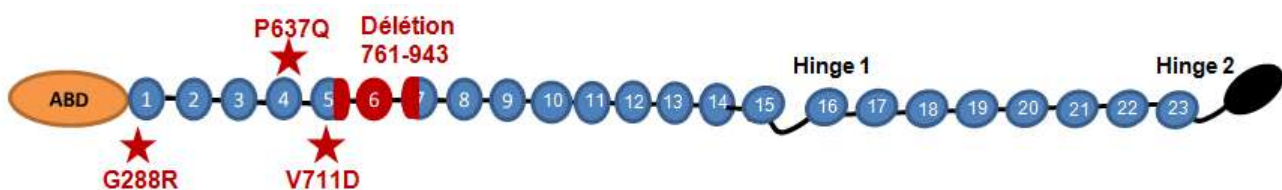
Enfin, il a été identifié au sein d'une famille chinoise (Famille 4) que 2 garçons présentent des dystrophies aortique et mitrale conduisant à des régurgitations. Ces patients présentent des atteintes polyvalvulaires avec un épaississement myxomateux.

Dans l'ensemble de ces familles, les hommes ont des atteintes mitrales plus sévères que les femmes dues à la transmission par le chromosome X et ces atteintes sont souvent multivalvulaires. De plus, aucune modification extracardiaque (malformations squelettiques, épilepsies) d'aspect syndromique n'a été mise en évidence.

### I.2.4.2 Mutations de la filamine A

Un locus a été identifié dans le chromosome Xq28 à partir de l'analyse de liaison sur la grande famille française atteinte de XMVD décrite précédemment. Un premier séquençage sur les 20 à 30 gènes de l'intervalle sélectionné a été réalisé. Aucune mutation n'a été identifiée sur 3 gènes candidats : *GPR50* codant pour un récepteur membranaire couplé aux protéines G, *BGN* codant pour le biglycane et *ZNF185* codant pour le facteur de transcription ZNF185 (« zinc finger protein 185 »). Par contre, une mutation a été identifiée dans le gène *FLNA* composé de 48 exons codant pour la FlnA. Ce gène fut le premier identifié dans une dystrophie valvulaire myxoïde non syndromique (Kyndt et al., 2007). La mutation identifiée dans la famille française se traduit par une substitution d'un acide aminé en position 637 d'une proline en arginine (P637Q).

D'autres mutations ont été identifiées sur ce gène dans les autres familles. Dans les familles 2 et 3, les substitutions G288R et V711D ont été identifiées respectivement. Enfin, dans la famille 4, une délétion entre les exons 16 et 19 provoque une délétion de 182 acides aminés de la valine 761 à l'acide aspartique 943 (Figure 9) (Kyndt et al., 2007).



**Figure 9 : Schéma représentatif de la FlnA avec les mutations identifiées dans quatre familles atteintes de XMVD.** La FlnA est représentée avec le domaine de liaison à l'actine (Orange ABD), les 23 domaines répétés (Bleu) et le domaine de dimérisation (Noir). En rouge, les mutations induisant des substitutions d'acides aminés et la délétion associées à la XMVD sont localisées dans les différents domaines de la protéine.

Notons que d'autres mutations de la FlnA ont été identifiées provoquant un large ensemble d'anomalies congénitales avec des défauts squelettiques, cérébraux ou cardiovasculaires.

L'hétérotopie nodulaire péri-ventriculaire (HNP) provoque des épisodes d'épilepsie et des anomalies cardiovasculaires telles que le canal artériel persistant, une valve aortique bicuspide, des anévrismes de l'aorte ou des accidents vasculaires cérébraux (Robertson et al., 2003; Feng and Walsh, 2004). Elle se caractérise par une localisation anormale d'un ensemble de neurones le long de la paroi du ventricule. Ces neurones présentent un défaut de migration dans le cortex cérébrale au cours du développement fœtal qui ne modifie pas l'activité cérébrale des patients. Ces mutations majoritairement localisées au niveau du

domaine de liaison à l'actine et des domaines 21 à 23 de la FlnA (Cf paragraphe page 27). Elles induisent un épissage anormal de l'ARNm conduisant à l'expression de protéines FlnA tronquées et non fonctionnelles.

En plus de l'HNP, un ensemble de différentes ostéodysplasies fronto-oto-palato-digitales (OFD) a été associé à des mutations de la FlnA comprenant les syndromes OFD, la dysplasie fronto-métaphysaire (DFM) et le syndrome de Melnick-Needles (SMN). Elles se caractérisent par de nombreux symptômes communs : une surdité, une fissure du palet, des malformations craniofaciales, des retards mentaux et des défauts squelettiques. Les patients atteints de ces pathologies présentent des malformations cardiaques telles que une sténose pulmonaire, des anévrismes vasculaires et des défauts de septation cardiaque (Robertson et al., 2006). Les mutations impliquées sont majoritairement localisées dans le domaine de liaison à l'actine ou dans le domaine 10 de la FlnA (Clark et al., 2009) apportant des gains de fonction à la FlnA. Par exemple dans le cas de l'OFD1, les mutations sur la FlnA sont localisées dans un domaine d'homologie à la calponine (CH) permettant une plus forte interaction avec l'actine.

En résumé, les mutations de la FlnA conduisent à une grande diversité de pathologies liées à des anomalies congénitales. Dans le cas des anomalies congénitales du système cardiovasculaire, décrites précédemment dans la HNP et les OFD, les atteintes valvulaires ne sont pas prédominantes à l'inverse des atteintes valvulaires liées aux mutations de la FlnA associées à la XMVD.   l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à ces anomalies congénitales sont encore mal connus. En revanche, la localisation des mutations de la FlnA est spécifique dans les pathologies décrites. Dans le cas de la HNP, elles sont localisées dans la partie C terminale de la FlnA alors que pour les OFD, elles sont plus dans le domaine de liaison à l'actine et enfin pour la XMVD dans les 8 premiers domaines de la FlnA. Les effets des mutations sur la FlnA sont différents en fonctions des régions des protéines affectées ce qui reflètent le rôle complexe de la FlnA au cours du développement.

En conclusion, l'étude de génétique familiale appliquée à la XMVD a permis d'identifier des mutations dans la FlnA. Cette protéine est une protéine du cytosquelette des cellules avec une structure particulière semblable aux immunoglobulines. L'étude des mutations de la FlnA associées à la XMVD permettra d'identifier de nouvelles voies de signalisation potentiellement impliquées dans les mécanismes physiopathologiques associées aux valvulopathies. Une analyse détaillée de la structure et des fonctions de la FlnA sera présentée dans la dernière partie de l'introduction.

## I.3 La filamine A

### I.3.1 Découverte

La filamine appelée aussi « Actin Binding Protein », a été purifiée après co-précipitation avec l'actine à partir des macrophages de lapin (Hartwig and Stossel, 1975). Le nom de « filamine » vient du fait que cette protéine a été localisée au niveau des fibres de stress dans les fibroblastes de poulet. La filamine appartient à la famille des protéines de liaison à l'actine comme l' $\alpha$ -actinine, la spectrine ou la dystrophine. La synthèse de la filamine a été montrée dans des cellules non musculaires (fibroblastes, plaquettes,...) mais également dans des cellules musculaires (squelettiques) (Wang et al., 1975). Au cours de l'évolution, cette protéine a été très conservée comme en témoigne l'existence de protéines orthologues de la filamine dans d'autres organismes comme : *Dictyostelium discoideum*, *Entamoeb histolytica* (parasite) et *Drosophila* (Stossel et al., 2001).

### I.3.2 Gènes et isoformes

Chez l'homme, trois gènes (*FLNA*, *FLNB* et *FLNC*) ont été identifiés codant respectivement pour trois protéines (A, B et C) avec environ 70 % d'homologie de séquence. Les différences de séquence les plus importantes entre les 3 protéines se situent au niveau des deux domaines charnières (« Hinge » 1 et 2) avec 45 % d'homologie. Seule, la filamine C possède 81 acides aminés supplémentaires dans le 20<sup>ème</sup> domaine répété. Dans *Dictyostelium*, *Entamoeb* et *Drosophila*, les protéines orthologues ont majoritairement une charpente plus courte avec une vingtaine de domaines répétés (van der Flier and Sonnenberg, 2001b).

Le gène de la FlnA a une localisation spécifique sur le chromosome X au niveau du locus q28 alors que les autres gènes codant pour les filamines B et C sont localisés respectivement sur les chromosomes 3 et 7.

En plus de la localisation chromosomique différente, la régulation de l'expression des gènes codant pour les différentes isoformes de la filamine est complexe. La diversité de la famille des filamines est augmentée par l'épissage alternatif des ARNm aboutissant à de nombreux variants importants dans l'organisation et la régulation du cytosquelette d'actine en fonction des types cellulaires ou tissulaires. Concernant la filamine B (FlnB) par exemple, une étude de van der Flier et al. a montré que l'expression d'un variant sans le domaine « Hinge » 1 accélère la fusion des myoblastes C2C12 en myotubes. Ce phénomène est également associé à une dégradation de la FlnB entière. (Xie et al., 1998; van der Flier et al., 2002; Bello et al., 2009; Pentikäinen et al., 2011).

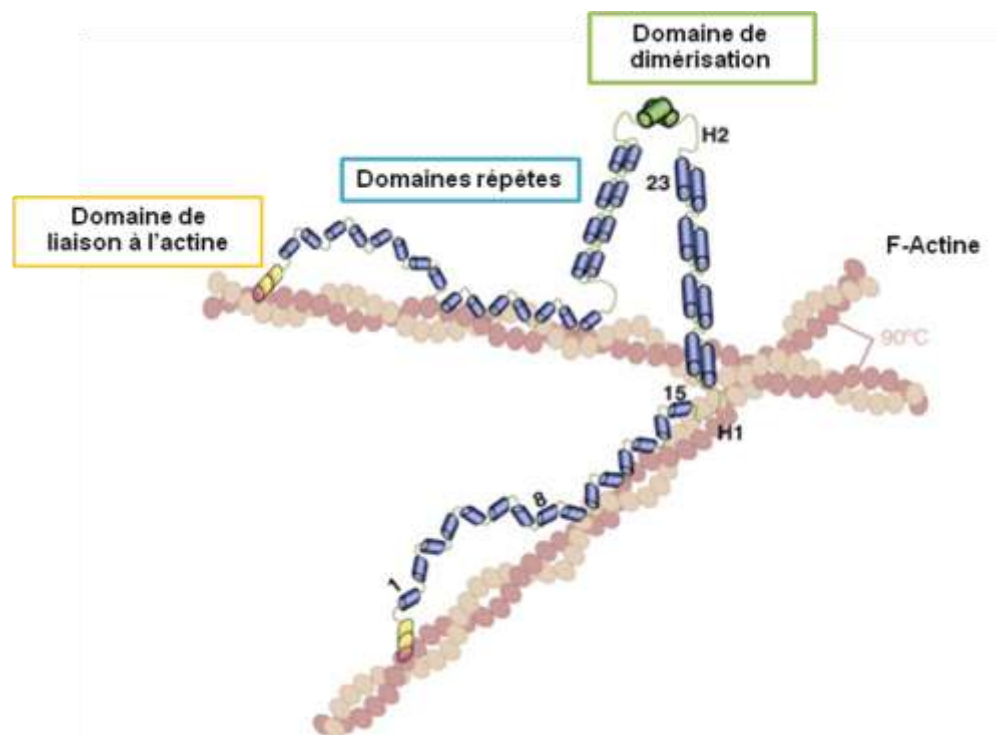


### I.3.3 Structure de la filamine A

Les filamines s'associent en dimères par l'interaction de leur extrémité C-terminale de façon non covalente. Ce dimère forme une structure particulière flexible en V, similaire aux immunoglobulines. Dans la suite, nous nous intéresserons plus particulièrement à la FlnA, une phosphoprotéine de 250 kDa composée de 2647 acides aminés, d'une longueur de 80 nm et de 3 à 5 nm de largeur (Gorlin et al., 1990).

La filamine A est composée de plusieurs domaines (Figure 10) :

- un domaine de liaison à l'actine en partie N-terminale,
- un "squelette" composé de 24 domaines répétés de 96 acides aminés dont la structure est semblable aux domaines des immunoglobulines. La flexibilité de la FlnA est assurée par deux régions charnières ou "Hinge" entre les domaines 15 - 16 et 23 - 24 qui permettent d'organiser le réseau d'actine de façon orthogonale.
- un domaine de dimérisation à l'extrémité C-terminale (24<sup>ème</sup> domaine) nécessaire à la formation des homodimères de FlnA ou des hétérodimères avec la FlnB.



**Figure 10 : Schéma des interactions entre la filamine A et les filaments d'actine.** Le dimère de filamine A interagit avec l'actine par son domaine de liaison à l'extrémité N-terminale et les domaines répétés de 9 à 15, La dimérisation de la FlnA est permise grâce aux domaines situés à l'extrémité C-terminale. D'après Zhou et al., 2010.

### I.3.3.1 Sites de liaison à l'actine

La partie amino-terminale (N-ter) de la FlnA est composée de 275 acides aminés appelée « Actin Binding Domain » (ABD) permettant la fixation aux filaments d'actine. Ce domaine comporte deux domaines d'homologie à la calponine (CH1 et CH2) de 110 résidus chacun. Chaque domaine CH est composé de 4 hélices  $\alpha$  avec 11 – 18 résidus suivis de boucles plus ou moins longues (Gorlin et al., 1990; Stossel et al., 2001). La structure quaternaire de l'ABD de la FlnA est similaire à celle de l' $\alpha$ -actinine (Figure 11B). De plus, ce domaine ABD se retrouve également dans d'autres protéines de liaison à l'actine :  $\beta$ -spectrine, dystrophine, utrophine... Récemment, un second site de liaison à l'actine avec une plus faible affinité a été mis en évidence dans les domaines 9 à 15 de la filamine (Nakamura et al., 2007). Enfin, la fixation de la FlnA avec l'actine par ce domaine ABD est régulée par la calmoduline dépendante du calcium (Nakamura et al., 2005).

### I.3.3.2 Domaines répétés

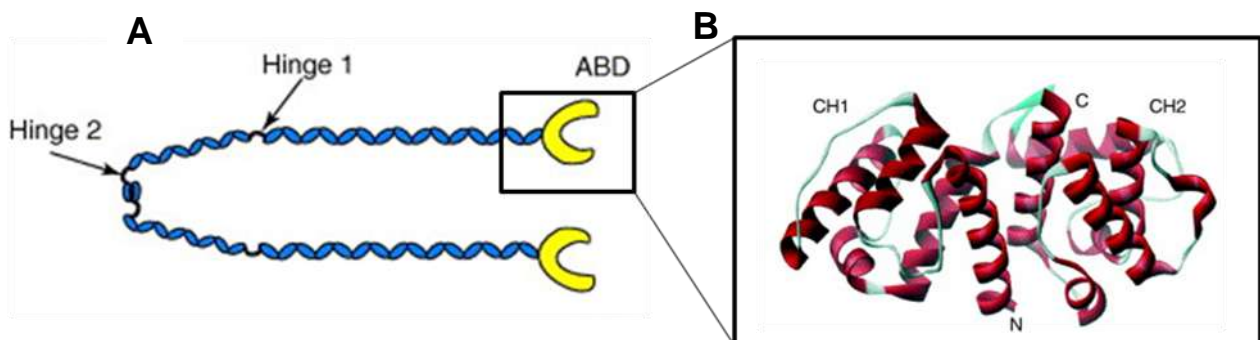
Le « squelette » de la protéine est composé de 24 séquences répétées de 96 résidus similaires aux domaines des immunoglobulines. Ces domaines sont formés de feuillets  $\beta$  antiparallèles (6-9 acides aminés) espacés de 3 - 4 acides aminés. Les domaines répétés sont séparés en deux parties appelées « Rod » 1 et 2 par des séquences charnières « Hinge » 1 et 2 situées respectivement entre les 15 – 16<sup>ème</sup> répétitions et entre les 23 - 24<sup>ème</sup> répétitions.

Chaque fragment « Rod » de la FlnA a une structure tridimensionnelle spécifique qui confère à la protéine des propriétés différentes. Le fragment « Rod »1 correspond aux 15 premiers domaines organisés en une chaîne linéaire d'environ 58 nm permettant l'espacement des filaments d'actine lors de la fixation du dimère de FlnA. En revanche, le fragment « Rod » 2 composé des répétitions 16 à 23 est plus compact (19 nm) et s'organise en une structure globulaire. Cette structure compacte du fragment « Rod » 2 est permise grâce aux repliements des domaines voisins 16, 18 et 20 sur les domaines 17, 19 et 21 par des liaisons hydrophobes au niveau des feuillets  $\beta$  (Gorlin et al., 1990). De plus, le fragment « Rod » 2 associé au domaine de dimérisation joue un rôle dans la signalisation intracellulaire par la fixation à de nombreuses protéines partenaires.

Par ailleurs, les domaines répétés de la FlnA ont été classés en 4 groupes (A, B, C et D) en se basant sur un alignement de séquence en acides aminés (Ithychanda et al., 2009). Par exemple dans le groupe A, les domaines 4, 9, 12, 17, 19, 21 et 23 de la FlnA ont des similarités de séquence. Ainsi les domaines appartenant à un même groupe possèdent une

structure similaire pouvant éventuellement lier les mêmes protéines. De plus, les domaines d'un même groupe semblent capables de fixer par un mécanisme commun des ligands proches comme la chaîne  $\alpha$  de la GPIb (Platelet glycoprotein Ib) sur le domaine 17 et les intégrines sur le domaine 21 (Ithychanda et al., 2009). La structure en domaines répétés permet de donner une orientation et une flexibilité à la FlnA afin de réaliser un angle de  $90^\circ$  à l'intersection avec les filaments d'actine.

Concernant les séquences charnières « Hinge », elles assurent aux dimères de FlnA une flexibilité importante nécessaire à l'organisation du réseau orthogonal d'actine. Ces domaines ont également d'autres rôles dans la régulation des fonctions de la FlnA. D'une part, ces séquences sont capables d'être clivées par la calpaïne générant des fragments de FlnA susceptibles de se fixer à des facteurs de transcription comme FOXC1 et de réguler l'activité transcriptionnelle. D'autre part, de nombreuses séquences consensus de phosphorylation ont été identifiées dans ou à proximité de ces « Hinges » permettant, dans le cas de la phosphorylation par la protéine kinase A (PKA), d'inhiber le clivage de la FlnA par la calpaïne (Figure 11 A) (Stossel et al., 2001; van der Flier and Sonnenberg, 2001b).



**Figure 11 : Structure de l'ABD et localisation des « Hinges ».** (A) Architecture de la filamine A humaine comprenant les domaines « Hinge » et les différents domaines répétés. (B) Structure quaternaire du domaine de liaison à l'actine de l' $\alpha$ -actinine, similaire en séquence au domaine ABD de la filamine (Franzot et al., 2005). D'après Popowicz et al., 2006 et Franzot et al., 2005.

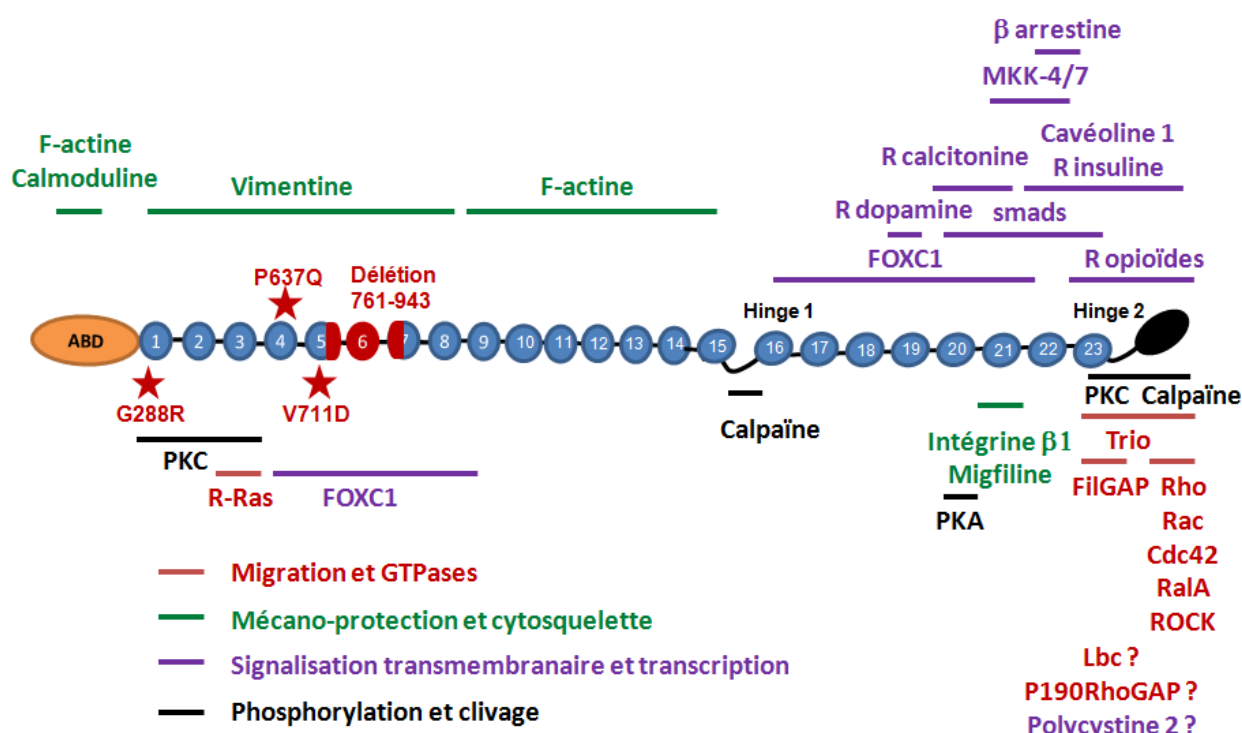
### I.3.3.3 Site de dimérisation

L'extrémité C-terminale de la FlnA permet sa dimérisation. Une étude de Pudas et al. (2005) a caractérisé le mécanisme de dimérisation des filamines chez les vertébrés. Cette dimérisation se produit par la liaison non covalente des feuillets  $\beta$  du domaine 24 de la filamine qui s'alignent de façon parallèle. La constante de dissociation du dimère de FlnA est de l'ordre du  $\mu\text{M}$  et correspond à la concentration de FlnA dans les plaquettes (Pudas et al., 2005). De plus, l'équilibre monomère/dimère est essentiel pour l'activité de la FlnA et peut

être altéré par la protéolyse de la FlnA, l'interaction de protéines partenaires au niveau du domaine 24 ou encore la localisation de la FlnA dans une région spécifique de la cellule.

### 1.3.4 Les protéines partenaires de la filamine A

Au cours des dernières années, plus de 90 protéines partenaires de la FlnA ont été identifiées. Ce sont des protéines transmembranaires, des enzymes comme les GTPases qui lient et hydrolysent le GTP, des facteurs de transcription ou des molécules impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire. Le rôle de la FlnA comme protéine d'ancrage pour de nombreuses protéines partenaires permet de réguler leur localisation spatio-temporelle au cours des processus cellulaires. Ces interactions sont régulées par différents processus agissant sur la FlnA tels que les forces mécaniques, la protéolyse, la phosphorylation et la compétition entre des protéines partenaires. Par ailleurs, les protéines partenaires ont une localisation particulière sur la FlnA, elles sont majoritairement situées sur les domaines de 16 à 24 (fragment « Rod » 2 et le 24<sup>ème</sup> domaine) alors que peu de protéines ont été identifiées dans les premiers domaines. Ceci suggère que la structure de la FlnA joue un rôle prépondérant dans la régulation de ces interactions. La localisation des interactions de certaines protéines partenaires de la FlnA est décrite dans la figure 12.



**Figure 12 : Schéma d'un monomère de FlnA avec les zones d'interaction de protéines partenaires.** Les protéines partenaires de la FlnA représentées sur ce schéma sont associées à des fonctions de mécano-protection (Actine, vimentine), de migration (GTPases), de signalisation (R : récepteur) et de régulation de la FlnA (PKA, PKC). Les différentes protéines partenaires citées seront détaillées dans les paragraphes suivants.

Certaines protéines partenaires de la FlnA sont particulièrement intéressantes pour leur rôle de signalisation entre la MEC et les signaux intracellulaires pouvant participer aux mécanismes physiopathologiques des valvulopathies. Les candidats potentiels peuvent être groupés en fonction des processus cellulaires dans lesquels ils sont impliqués tels que :

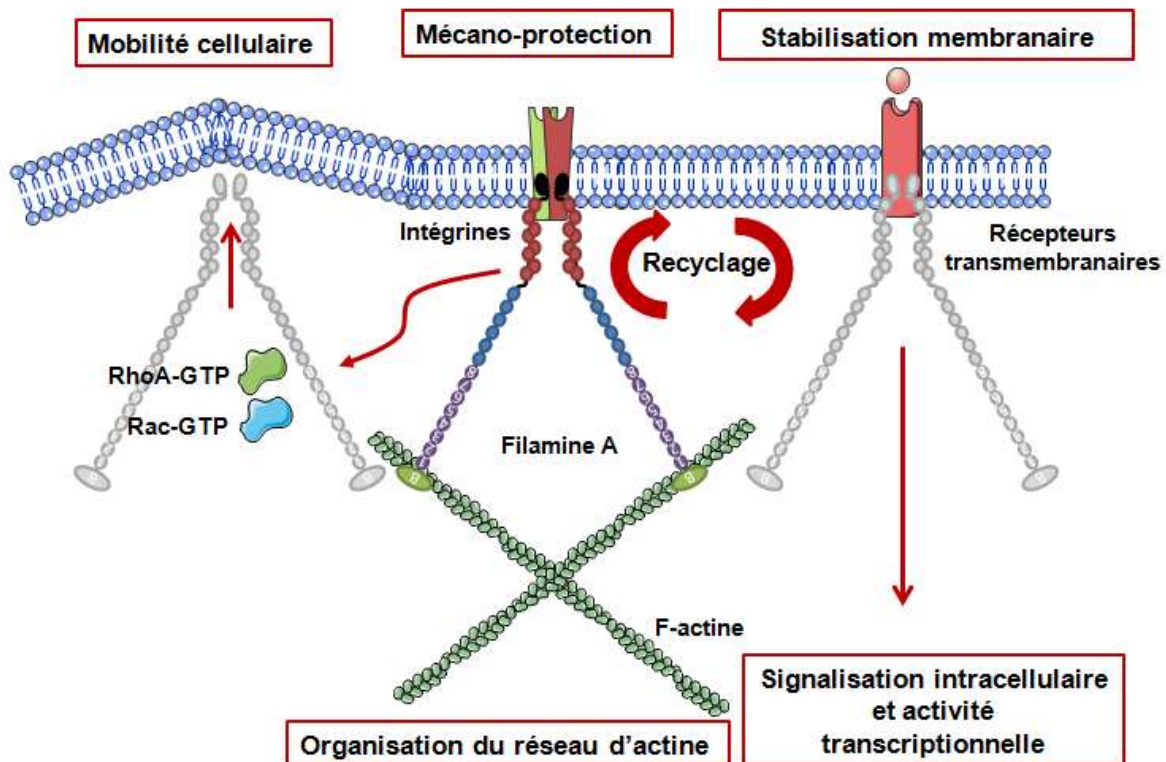
- La signalisation intracellulaire et activité transcriptionnelle qui fait intervenir la FlnA par l'interaction avec des récepteurs transmembranaires et les protéines de signalisation intracellulaire. Ces signalisations sont importantes dans la réparation tissulaire des valves activant la synthèse de composants de la MEC par les CIV.

- La migration cellulaire, par l'interaction avec les GTPases et l'organisation des points focaux, est essentielle au cours de l'EMT durant la valvulogénèse.

- La mécano-protection et l'organisation du cytosquelette grâce aux interactions avec les intégrines et l'actine sont nécessaires aux CIV afin de résister aux pressions subies par les valves au cours de la contraction du cœur.

### ***1.3.5 Les fonctions de la filamine A***

La grande diversité de ces protéines partenaires confère à la FlnA de nombreuses fonctions cellulaires (Figure 13). Notamment, la FlnA régule précisément les processus cellulaires tels que, l'organisation du réseau d'actine, la stabilité membranaire, la mécano-protection, la migration cellulaire et la transduction des signaux intracellulaires. Ces différentes fonctions associées aux protéines partenaires de la FlnA seront détaillées dans les paragraphes suivants.



**Figure 13 : Les fonctions de la filamine A.** La fonction principale de la filamine est l'organisation du réseau d'actine grâce à des interactions avec les filaments d'actine. Les autres fonctions impliquant la FlnA sont la stabilisation membranaire, la « mécano-protection, la mobilité cellulaire, la signalisation intracellulaire et l'activité transcriptionnelle.

### 1.3.5.1 Stabilisation membranaire, signalisation intracellulaire et activité transcriptionnelle

La FlnA est un élément clé de la stabilité membranaire grâce au lien qu'elle établit entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette d'actine. Son implication dans cette stabilité a été démontrée dans des cellules de mélanome déficientes en FlnA. Dans ces dernières, on retrouve une instabilité du réseau d'actine aboutissant à la formation de « bulles » au niveau de la membrane plasmique due en partie à l'application de forces hydrostatiques. Lorsque la FlnA est réexprimée, elle favorise l'organisation orthogonale des filaments d'actine et induit la disparition des « bulles » (Cunningham, 1995; Feng and Walsh, 2004).

La FlnA participe à l'ancrage de protéines transmembranaires au niveau de la membrane plasmique *via* le cytosquelette d'actine, important dans la localisation cellulaire et le transport vésiculaire de ces protéines. Beaucoup de récepteurs transmembranaires comme les intégrines, les récepteurs à l'insuline, à l'EGF (Epithelial Growth Factor), à la dopamine, à la calcitonine ou aux opioïdes s'associent à la FlnA (Li et al., 2002; He et al.,

2003; Seck et al., 2003; Simon and Onoprishvili, 2010). Globalement, la FlnA participe à la régulation de l'endocytose et la dégradation des protéines associées au trafic vésiculaire des récepteurs transmembranaires. L'endocytose des récepteurs transmembranaires utilise soit la voie des vésicules à clathrine soit la voie des cavéoles. La FlnA intervient dans l'endocytose associée aux cavéoles en interagissant avec la cavéoline 1 au niveau de ses domaines 22 à 24. Cette interaction au niveau de la membrane plasmique, permet la phosphorylation de la cavéoline 1 (Cav1) par la PKC $\alpha$  et une internalisation des cavéoles avec une localisation de Cav1 le long des fibres de stress (Muriel et al., 2011). La FlnA régule le taux d'internalisation des récepteurs membranaires tels que les récepteurs à la dopamine D3 et aux opioïdes (Cho et al., 2007; Simon and Onoprishvili, 2010). Une autre étude montre que le recyclage du récepteur à la calcitonine est diminué en absence de FlnA alors que la dégradation du récepteur est augmentée (Seck et al., 2003). Concernant le rôle de la FlnA dans la dégradation des récepteurs à la furine et à l'EGF, il a été montré que la FlnA participe à la sortie des endosomes tardifs vers la voie de dégradation associée aux lysosomes, en revanche, elle n'intervient pas dans les endosomes précoces (Liu et al., 1997). La FlnA régule la disponibilité des récepteurs à la membrane plasmique ainsi que leur dégradation en permettant le rapprochement de molécules de signalisation. Par exemple, la FlnA participe au rapprochement de la PKC du récepteur à la dopamine D3 et permet sa phosphorylation induisant sa désensibilisation et donc son endocytose par les cavéoles (Cho et al., 2007). L'ubiquitinylation du récepteur EGFR, est réalisée après rapprochement de la E3 ubiquitine ligase c-cbl par la FlnA.

La FlnA participe à la régulation d'autres protéines transmembranaires telles que les canaux ioniques. Il a été démontré que les forces mécaniques peuvent provoquer une augmentation de la concentration de calcium de façon prolongée dans la cellule par l'activation des canaux perméables au calcium (SAC). Cette augmentation de calcium peut induire l'apoptose des cellules après activation des caspases. L'interaction de la FlnA avec la polycystine 2 permet la formation de courbures au niveau de la membrane. Ceci permet de maintenir l'intégrité de la membrane et d'empêcher l'activation des SAC; Sharif-Naeini et al., 2009). Finalement, la FlnA participe à la stabilité des protéines transmembranaires par l'organisation du réseau d'actine, la régulation du trafic endosomal et de certaines voies de signalisation intracellulaire.

Le maintien par la FlnA de la stabilité des récepteurs transmembranaires permet l'induction de phosphorylation (Récepteurs à tyrosine kinase), d'activation des protéines G (Récepteur couplé aux protéines G) et le recrutement des protéines de signalisation intracellulaire. L'ensemble de ces modifications agit sur de nombreuses voies de signalisation dans lesquelles la FlnA joue également un rôle prépondérant. L'activation de

ces voies engendrent dans la cellule de nombreuses réponses comme la transcription de gènes des composants de la MEC ou encore le recyclage de récepteurs associés aux facteurs de croissance. La FlnA participe à la régulation des voies de signalisation des MAP kinases (MAPKs) impliquées dans la transmission de signaux provenant de la MEC. De plus, il a été montré que l'activation de ces voies MAPKs est associée à la calcification des CIV (Gu and Masters, 2009). Des travaux ont montré que la FlnA se lie à la  $\beta$ -arrestine conduisant à l'inactivation et à la dégradation des récepteurs couplés aux protéines G comme le récepteur de type 1A de l'angiotensine II (Scott et al., 2006). La FlnA participe à l'association entre la  $\beta$ -arrestine et ERK1/2 activée (*Extracellular signal Regulated Kinases1/2*) permettant l'activation des voies associées à ERK impliquées dans les processus de différenciation et de prolifération cellulaire des myofibroblastes (Scott et al., 2006). La FlnA interagit également avec les MKK (*Mitogen activated protein kinase kinase*) 4 et MKK7 impliquées dans l'activation de la voie JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) et la réorganisation du cytosquelette d'actine et des points focaux associée à la phosphorylation de la paxilline (Sarkisian et al., 2006; Nakagawa et al., 2010).

Par ailleurs, la FlnA est impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle en séquestrant ou en libérant des facteurs de transcription dans le cytoplasme. La FlnA se fixe aux facteurs de transcription SMAD2 et SMAD5 de la voie du TGF $\beta$  permettant leur phosphorylation et leur accumulation dans le noyau (Sasaki et al., 2001). Ces SMADs vont activer la transcription des gènes codant pour les protéines de la MEC comme les collagènes ou les protéoglycanes. Enfin, l'activité du facteur de transcription FOXC1 étroitement associée à la régulation des cellules de la crête neurale au cours du développement est importante dans la valvulogénèse. L'activité transcriptionnelle de FOXC1 est contrôlée au niveau nucléaire par des interactions avec la FlnA et la protéine régulatrice PBX1 (Berry et al., 2005).

### **I.3.5.2 Mobilité cellulaire**

La FlnA participe à la localisation et à la régulation des voies de signalisation en agissant sur les récepteurs et leurs effecteurs. Ces signalisations intracellulaires induisent des modifications d'activité GTPasique et de l'organisation du cytosquelette impliquées dans les processus de migration et d'adhésion cellulaire. Ces processus permettent aux cellules, sous l'influence de différents stimuli (facteurs de croissance, cytokines,...), de se déplacer *via* une réorganisation de leur cytosquelette d'actine. Ces cellules vont alors former des renflements membranaires appelés lamellipodes permettant l'extension du cytosquelette d'actine en association avec les points focaux ou filopodes, fines extensions permettant de détecter l'environnement (Borm et al., 2005). Par ailleurs, la FlnA est localisée sous la



membrane au niveau du front de migration et de la zone de rétractation de la cellule en cours de migration. Ceci lui confère un rôle important dans la formation et la dynamique des extensions membranaires et des points focaux. En effet, la FlnA interagit avec de nombreuses protéines partenaires impliquées dans les processus d'adhésion cellulaire associés aux points focaux comme les intégrines et la migfiline. Elle participe aussi au processus de migration cellulaire par la régulation des GTPases.

### **I.3.5.2.1 Points focaux d'adhésion**

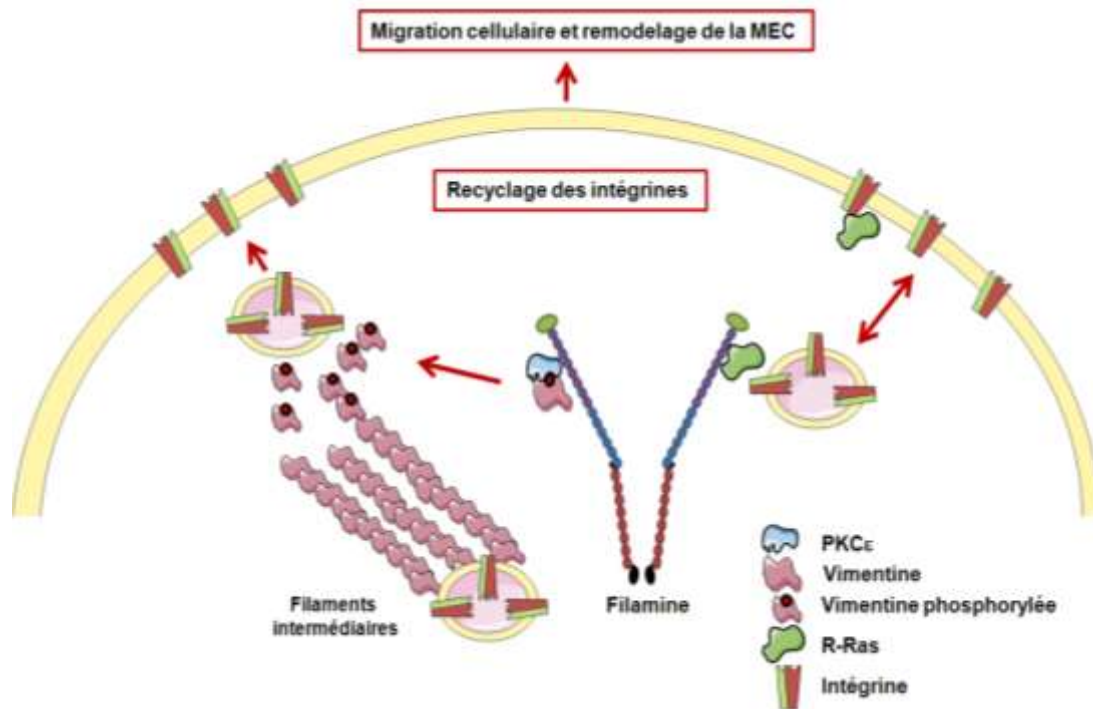
Au cours d'un stress mécanique comme l'étirement ou de stimuli chimiques tels que les facteurs de croissance, les cellules vont former des points focaux permettant l'ancrage de la cellule sur la MEC et la transduction de signaux intracellulaires par le cytosquelette d'actine. Les premiers acteurs de cette cascade d'événement sont les intégrines correspondant à des récepteurs d'adhésion très dynamiques à la surface des cellules. Il a été démontré que ces intégrines induisent le recrutement de la FlnA dans les points focaux d'adhésion afin d'accumuler l'actine et d'augmenter la résistance du cytosquelette de la cellule soumise à des contraintes mécaniques (Glogauer et al., 1998; Calderwood et al., 2001).

Dans une première étape, les cellules forment des complexes focaux de petites tailles pour se fixer à la MEC à partir de l'activation de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Cette dernière change de conformation et active les voies de signalisation intracellulaire grâce au recrutement de protéines adaptatrices comme la taline. Après l'activation de différentes kinases (FAK ou src) la phosphorylation de protéines adaptatrices ou des intégrines induit la maturation de ces complexes focaux permettant leur élargissement et leur stabilité afin de donner des adhésions focales. Ce processus nécessite le recrutement et le regroupement des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  ainsi que les protéines adaptatrices : vinculine, paxilline et  $\alpha$ -actinine. Ces adhésions focales liées aux fibres de stress sont maturées sous l'action du stress mécanique en adhésions fibrillaires. Ces dernières acquièrent la capacité à contracter les filaments d'actine par le système acto-myosine et s'enrichissent en intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et tensines. Les adhésions fibrillaires permettent d'organiser la matrice de fibronectine en fibres qui s'alignent le long des fibres de stress. La régulation de ces points focaux doit être dynamique pour permettre la mobilité cellulaire avec la formation de nouveaux points focaux sur le front de migration et le recrutement des intégrines alors que ces points focaux se dissocient pour la rétractation des cellules.

Des études ont montré que la perte d'expression de la FlnA inhibait la polarisation et le mouvement des cellules à cause d'une instabilité membranaire, induit par un défaut d'organisation du réseau d'actine dans les cellules de mélanome. À l'inverse, la

surexpression de la FlnA empêche la migration neuronale ce qui est permis grâce à sa phosphorylation qui la protège contre le clivage par la calpaïne et la dégradation (Sarkisian et al., 2006). Enfin, l'augmentation de l'interaction entre la FlnA et les intégrines  $\beta 7$  bloque également la migration, les extensions membranaires et la polarisation des cellules (Calderwood et al., 2001). Ces observations montrent que la régulation de la quantité de FlnA est importante pour la régulation de la polarisation des cellules au cours de la migration cellulaire.

Il existe également une interaction indirecte entre les intégrines et la FlnA qui participe aux processus d'adhésion, d'étalement et de migration cellulaire par la régulation du trafic des intégrines et donc des points focaux. La vimentine et la protéine R-Ras sont particulièrement impliquées dans cette interaction (Figure 14). (Caswell et al., 2009). La vimentine est une protéine appartenant aux filaments intermédiaires et participe au trafic vésiculaire intracellulaire. Il a été montré que la FlnA facilite la phosphorylation de la vimentine par la PKC $\epsilon$ . Cette phosphorylation provoque la dissociation des filaments intermédiaires orientant le trafic vésiculaire des intégrines vers la membrane plasmique (Kim et al., 2010; MacPherson and Fagerholm, 2010; Kim and McCulloch, 2011). De ce fait, la régulation de la vimentine par la FlnA participe aux processus d'adhésion et d'étalement cellulaire dépendant des intégrines. Concernant la GTPase R-Ras, il a été montré qu'une perte d'interaction avec le domaine 3 de la FlnA induit un défaut de migration cellulaire, d'assemblage de la matrice de fibronectine et d'activation des intégrines (Gawecka et al., 2010). Ainsi le recrutement de R-Ras sur la FlnA à proximité des endosomes permettrait une activation des intégrines, la migration cellulaire et le transport vésiculaire des intégrines.



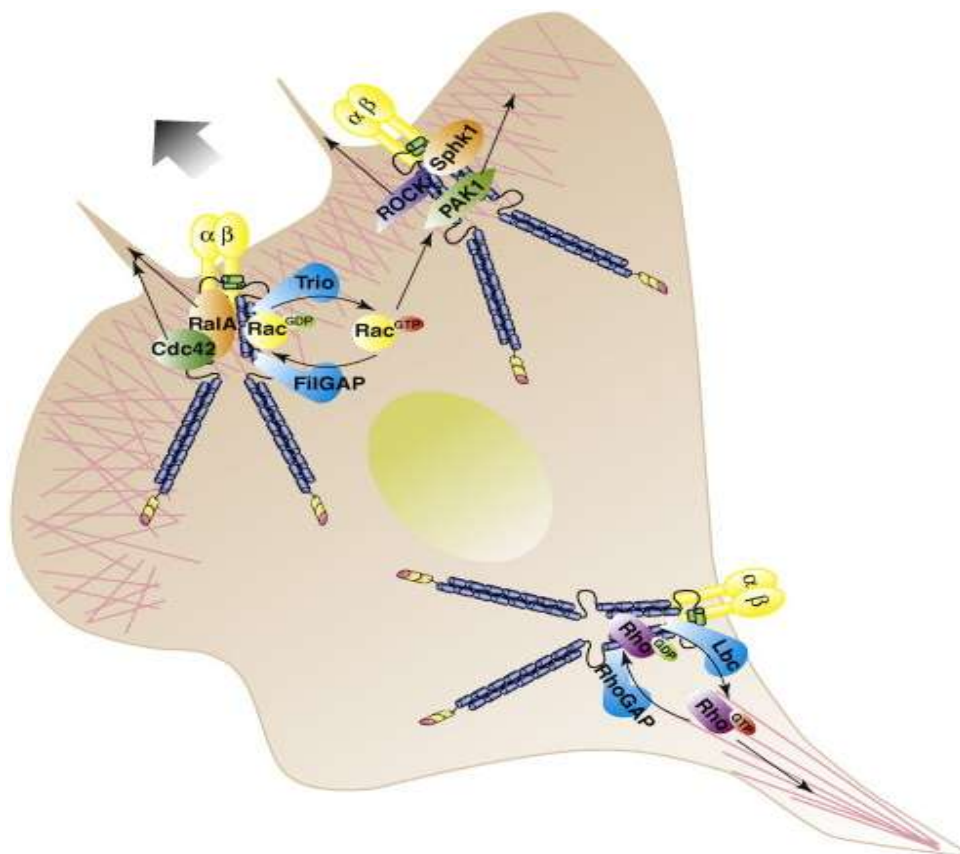
**Figure 14 : Interaction indirecte entre la filamine A et les intégrines.** La filamine permet la phosphorylation de la vimentine par le rapprochement de la PKC $\epsilon$ . Cette phosphorylation induit le désassemblage des filaments intermédiaires et le trafic des intégrines. Dans le cas de la protéine R-Ras, la FlnA permet son rapprochement avec les endosomes permettant ainsi le trafic vésiculaire des intégrines.

### 1.3.5.2.2 Les GTPases

La migration cellulaire est orchestrée par les GTPases monomériques de la famille Rho (Figure 15). Les extensions membranaires nécessaires à la migration cellulaire sont liées à une dynamique spécifique des GTPases cdc42, Ral A, Rac et RhoA ainsi que de leurs régulateurs. Les activateurs de ces GTPases, les « guanine nucleotide exchange factor » (GEF) permettent l'échange du GDP de la forme inactive par le GTP pour activer les GTPases et les inhibiteurs de GTPases, les « guanine activating protein » (GAP) inactivent les GTPases en remplaçant le GTP par du GDP. Il a été montré que la FlnA interagit avec beaucoup de ces GTPases et avec leurs régulateurs. Par ces interactions, la FlnA agit sur la localisation et l'activité des GTPases induisant des modifications dans les extensions membranaires qui sont essentielles au processus de migration cellulaire. La FlnA est recrutée par RalA liée au GTP en même temps que cdc42 afin d'initier la formation des filopodes par la polymérisation de l'actine et l'organisation en fibres parallèles d'actine (Ohta et al., 1999). Ces filopodes permettent de détecter l'environnement et d'orienter la migration cellulaire en fonction des stimuli rencontrés. La cellule oriente sa migration par la formation d'un lamellipode. L'interaction entre la FlnA et la protéine GEF Trio permet le rapprochement de Trio et de la GTPase Rac induisant son activation. La GTPase Rac activée permet

ensuite l'activation de la kinase PAK1 nécessaire à la polymérisation de l'actine de façon orthogonale et la formation de nouveaux filaments d'actine pour l'élaboration du lamellipode. En revanche, la voie RhoA/ROCK est inhibée par le recrutement de la protéine p190RhoGAP grâce à son interaction avec la FlnA au niveau du lamellipode.

La cellule ayant adhéérée à son substrat par la formation de points focaux et ayant orientée sa migration par un lamellipode, elle répartit son contenu cellulaire vers le sens de migration. Dans le sens opposé, il se produit alors une rétractation de la cellule par le détachement des points focaux associés au substrat. Il a été montré dans ce cas, la FlnA permet l'activation de RhoA par l'interaction avec la protéine GEF Lbc induisant l'activation de la kinase ROCK et la dissociation des points focaux (Ueda et al., 2003; Gawecka et al., 2010). L'activation de la kinase ROCK permet la phosphorylation de la protéine FilGAP induisant l'inhibition de la voie Rac (Bellanger et al., 2000; Nakamura et al., 2009). L'ensemble des régulations de ces GTPases participe aux processus de migration et d'étalement cellulaires avec une contribution importante de la FlnA du fait des nombreuses interactions que cette protéine peut favoriser entre les différentes protéines régulatrices.



**Figure 15 : Interactions de la filamine A impliquées dans la migration cellulaire.** La FlnA stabilise les GTPases monomériques (cdc42, RalA, Rac, RhoA) pendant la migration. Le front de migration des cellules est régulé par une série de complexes protéiques participant à l'assemblage et à la réorganisation du réseau d'actine par des GAP (FilGAP, p190RhoGAP) et des GEF (Trio, Lbc) ou des kinases (ROCK, PAK1 (p21 activated protein kinases 1) D'après Zhou et al., 2010.

### **I.3.5.3 Mécano-protection et organisation du cytosquelette**

#### ***I.3.5.3.1 Organisation du réseau d'actine***

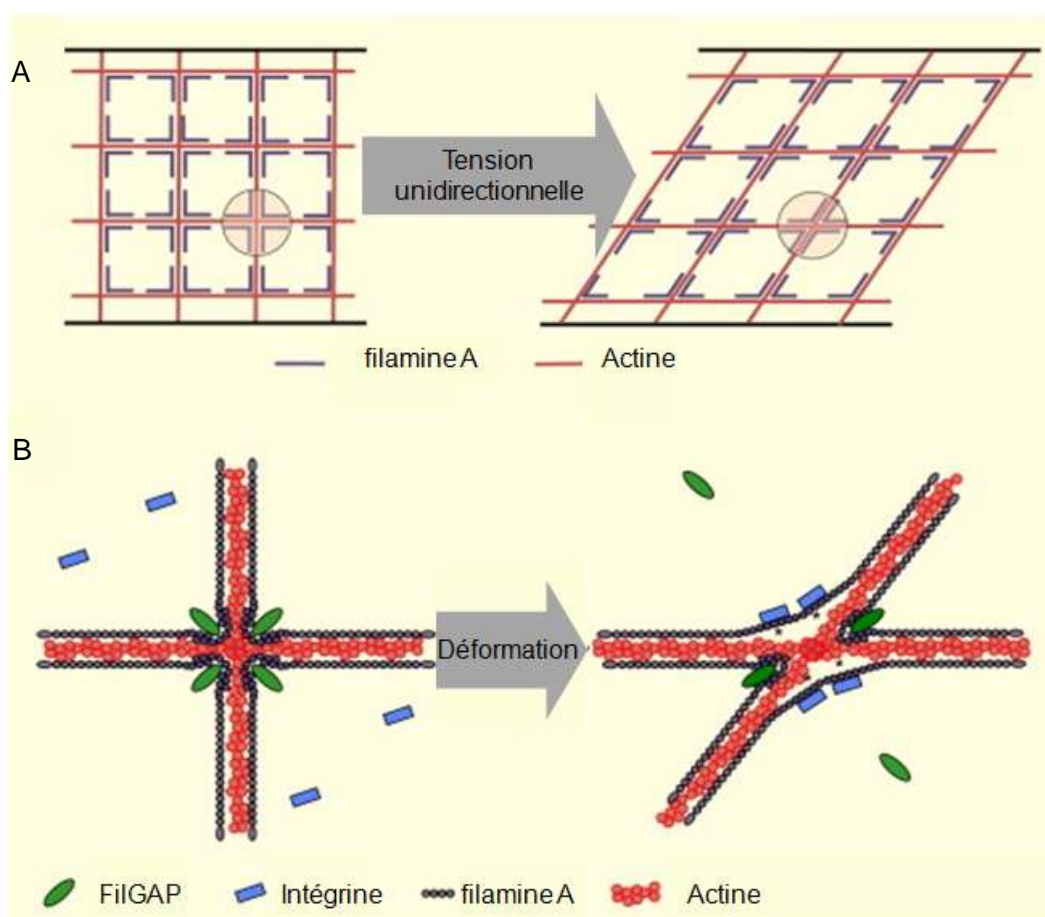
La FlnA interagit avec les filaments d'actine par ses domaines ABD modulant la forme des intersections (T avec un angle de 90° ou Y avec un angle inférieur à 90°) entre les filaments d'actine. Cette fixation spécifique permet un grand angle de branchement dû à la grande flexibilité de la protéine. Des études *in vitro* d'affinité de la FlnA purifiée avec les filaments d'actine ont permis de déterminer la constante d'affinité dans les conditions normales de  $2 \cdot 10^{-6}$  M et un niveau d'agrégation (saturation) de 8 à 12 filaments d'actine (F-actine) pour un dimère de filamine permettant d'obtenir un réseau (Gorlin et al., 1990; van der Flier and Sonnenberg, 2001a). De plus, le rapport entre filamine / F-actine doit être précis afin d'obtenir un réseau orthogonal. Ainsi, un rapport élevé 1/10 conduit à la formation de faisceaux d'actine (Weihsing, 1985) tandis que pour un rapport de 1/50, le réseau d'actine est organisé de façon orthogonale. La régulation de ces interactions est dépendante du calcium, la fixation de la calmoduline- $\text{Ca}^{2+}$  sur la FlnA induisant la dissociation du réseau FlnA / F-Actine (Feng and Walsh, 2004). En revanche, l'application d'un stress mécanique sur les cellules augmente l'affinité entre la FlnA et les filaments d'actine pouvant mener à la dissociation brutale du réseau filamine - actine. Au niveau cellulaire, la FlnA joue donc un rôle primordial dans la structure du cytosquelette d'actine en « 3D ».

De plus, la FlnA participe à l'organisation des filaments intermédiaires constituant de la charpente cellulaire et des structures plus stables par rapport aux filaments d'actine. Les interactions entre la vimentine, constituant majoritaire des filaments intermédiaires, et les premiers domaines de la FlnA permettent la phosphorylation de la vimentine par la PKC $\epsilon$ . La dissociation de la vimentine phosphorylée des filaments intermédiaires induit un étalement cellulaire (Kim et al., 2009, 2010). La FlnA module donc les propriétés de viscosité et d'élasticité du cytosquelette afin de permettre les changements morphologiques des cellules nécessaires pour résister aux forces mécaniques.

#### ***I.3.5.3.2 Mécano-protection***

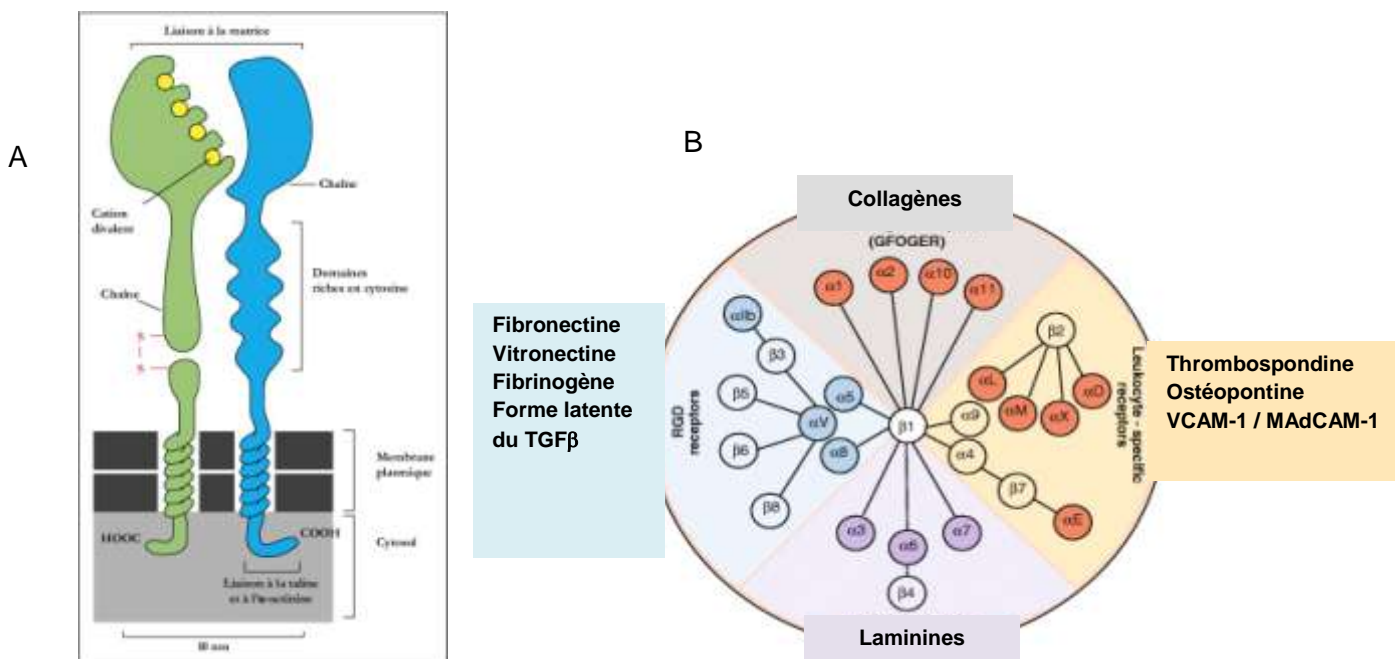
Au cours de l'application de forces mécaniques, les cellules préservent l'intégrité de leurs membranes par un remodelage du réseau d'actine et en adaptant leur forme et leur interaction à la MEC (Yamazaki et al., 2002). Ces changements vont activer des cascades de signalisation intracellulaire permettant une réponse adaptée, ce phénomène s'appelle la "mécano-protection". La FlnA sert de « mécanosenseur » des tensions appliquées sur les cellules grâce à son interaction avec les intégrines et FilGAP.

Récemment, il a été montré que les déformations subies par le réseau d'actine au cours d'un stress mécanique modifient les interactions de la FlnA avec les intégrines et FilGAP, une GAP inactivant Rac (Figure 16). Les tensions appliquées sur les cellules vont écartier les sous-unités du dimère de FlnA permettant la libération de FilGAP après dissociation de l'interaction avec les deux sous-unités de la FlnA (Ehrlicher et al., 2011). D'après une étude de Ohta et al en 2006, la phosphorylation de FilGAP pourrait diminuer l'activité de Rac au niveau de la membrane plasmique et inhibe la formation de lamellipodes (Ohta et al., 2006). Cette phosphorylation est induite par ROCK, une kinase activée par la voie RhoA. Cette voie permet également la formation de fibres de stress. En parallèle, la FlnA va fixer les intégrines et activer leur regroupement augmentant l'adhésion et l'activation des protéines de signalisation intracellulaire.



**Figure 16 : Schéma de l'effet lié à l'étirement sur la FlnA au niveau de la fixation des intégrines et de la libération de FilGAP.** A) Schéma représentant l'effet de l'application d'une tension unidirectionnelle sur le réseau de FlnA / F-actine. B) Modèle de fixation des intégrines et de FilGAP sur la FlnA avant et après une déformation. D'après Lynch and Sheetz, 2011.

Les intégrines sont des « mécanosenseur » importants des cellules qui sont des glycoprotéines membranaires d'ancrage des cellules sur la MEC. Ces récepteurs d'adhésion sont formés par des hétérodimères composés de 2 chaînes polypeptidiques transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$ . Chez l'homme, actuellement, il a été décrit 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  (Hynes, 2002). Ces protéines sont composées d'un domaine extracellulaire globulaire permettant l'interaction avec les ligands dans la MEC, d'un domaine transmembranaire permettant son ancrage dans la membrane et d'un court domaine intracellulaire de 75 acides aminés participant à la transduction de signaux intracellulaires (Figure 17 A) (Hynes, 2004; Johnson et al., 2009). La chaîne  $\beta 1$  des intégrines forme le plus d'hétérodimères (Figure 17 B) et est la plus exprimée dans les différents types cellulaires. Les intégrines peuvent être classés en 4 catégories en fonction de leurs ligands : 1) les récepteurs de type RGD reconnaissant la fibronectine, la vitronectine et la forme latente du TGF $\beta$ , 2) les récepteurs aux collagènes, 3) les récepteurs à la laminine et 4) les récepteurs leucocytaires reconnaissant l'ostéopontine ou la VCAM-1. (Figure 17 B).



**Figure 17 : Structures et ligands des intégrines.** (A) Représentation d'une intégrine composée de ses chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Les parties extracellulaires forment un site spécifique de liaison aux composants de la MEC. D'après MF Poupon., 2006. (B) Représentation schématique de la famille des 24 hétérodimères d'intégrines et de leurs ligands. D'après Barczyk et al., 2010.

Une des particularités des intégrines est leur implication dans une signalisation bidirectionnelle, soit « outside-in » ou « inside-out ». Dans la première, les intégrines transforment les signaux mécaniques dus à l'étirement appliqué sur la MEC en signaux



intracellulaires. Dans la seconde, les protéines régulatrices intracellulaires modifient l'activation des intégrines, leur affinité pour la MEC et leurs propriétés d'adhésion (Askari et al., 2009). Ces récepteurs d'adhésion établissent un lien avec le cytosquelette d'actine en formant des points focaux d'adhésion grâce à l'interaction avec des protéines de liaison à l'actine (taline, filamine,  $\alpha$  actinine...). Ces molécules adaptatrices sont classées en 3 grandes catégories avec des protéines de structure (taline ou filamine), des protéines d'échafaudage (paxilline ou kindlines) et des protéines à activité catalytique que sont les kinase (FAK ou *Focal Adhesion Kinase*, src) ou les phosphatase (PP2A, SHP-2) (Hato et al., 1998; Izard et al., 2004; Moser et al., 2008; Legate and Fässler, 2009a).

Les intégrines sont des structures complexes avec de nombreuses protéines partenaires ou ligands. Elles sont régulées de la même façon que la FlnA par des phosphorylations ou des compétitions d'interaction avec des protéines partenaires. Les chaînes  $\beta$  des intégrines possèdent de nombreux sites de phosphorylation. Il a été montré que la taline se fixe sur la forme non phosphorylée de la chaîne  $\beta 3$  des intégrines et induit son activation (Legate and Fässler, 2009a). Des études ont également montré que la phosphorylation de cette chaîne  $\beta 3$  des intégrines par FAK provoque la dissociation de la taline et l'association de la tensine induisant l'activation de la voie Akt (Oxley et al., 2008). De plus, la phosphorylation de la tyrosine 758 de la chaîne  $\beta 2$  des intégrines conduit à la dissociation de la FlnA et favorise l'interaction avec la protéine 14-3-3 (Takala et al., 2008). En revanche, la fixation de la FlnA induit une compétition avec la taline et la protéine 14-3-3 dépendant de l'état de phosphorylation au niveau des sites d'interaction sur les intégrines. Le phénomène de compétition entre la FlnA et la protéine 14-3-3 ou la taline permet de réguler les interactions avec les intégrines (Takala et al., 2008; Chen et al., 2009; Legate and Fässler, 2009b). La migfiline, quant à elle, se fixe sur la FlnA dans la région d'interaction avec les intégrines inhibant l'association de la FlnA avec les intégrines et facilitant celle de la taline (Lad et al., 2008). Plusieurs kinases permettant la phosphorylation de la FlnA ont été identifiées comme la protéine kinase A (PKA), Ribosomal S6 kinase (RSK), plusieurs isoformes de protéine kinase C (PKC) et CaM kinase II (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dépendant kinase II) (Jay et al., 2004; Woo et al., 2004). Cette complexité de régulation des intégrines permet une cinétique spatiale et temporelle de leur activation en fonction des kinases ou des protéines adaptatrices présentes à un moment donné. Cette dynamique de protéines est lié aux forces mécaniques subies, aux processus cellulaires engagés tels que la migration cellulaire ou encore la composition de la MEC.

La relation entre les intégrines et la FlnA est essentielle pour la « mécano-protection ». En 1995, l'interaction entre la FlnA et le domaine intra-cytoplasmique de la



chaîne  $\beta 2$  des intégrines a été découverte (Sharma et al., 1995). Par la suite, la région d'interaction entre la FlnA et la chaîne  $\beta 1$  des intégrines a pu être identifiée dans le domaine 21 de la FlnA qui est formé de 8 feuillets  $\beta$  créant un sillon où les intégrines viennent se loger. (Loo et al., 1998; Kiema et al., 2006). Un mécanisme d'auto-inhibition de la FlnA a été décrit par Lad et al en 2007, ce mécanisme est basé sur le repliement des domaines répétés 19 à 21 de la FlnA grâce à des liaisons non covalentes entre les feuillets  $\beta$  des différents domaines. Le repliement provoque un encombrement stérique qui empêche les intégrines d'avoir accès à leur site de fixation sur la FlnA (Lad et al., 2007; Jiang and Campbell, 2008). Par contre, il a été montré que les forces mécaniques appliquées sur les cellules permettent l'ouverture du dimère de FlnA et donc l'accès au site de liaison des intégrines. De plus, l'étirement induit le recrutement de la FlnA par les intégrines dans les points focaux d'adhésion permettant l'accumulation d'actine et l'augmentation de la rigidité du réseau cortical d'actine. Les forces appliquées sur les cellules induisent également l'expression de la FlnA par l'augmentation de la stabilité des ARNm (D'Addario et al., 2001). Cette interaction est importante afin de permettre la transmission du stress mécanique subi par les cellules au niveau du cytosquelette d'actine ainsi que pour maintenir l'intégrité de la membrane plasmique.

En conclusion de cette partie sur les multiples fonctions de la FlnA, il est important de noter que cette protéine joue un rôle majeur non seulement dans la structure cellulaire mais également dans les communications que la cellule établie avec son environnement. Ce sont des aspects déterminants pour les cellules de valves cardiaques soumises à des conditions environnementales si particulières.

### ***1.3.6 Localisation et distribution***

Les expressions de la filamine A et B sont ubiquitaires contrairement à la filamine C qui est exprimée majoritairement dans les muscles cardiaque ou squelettique. La FlnA est localisée le long des fibres de stress, aux intersections des filaments d'actine, sous la membrane plasmique et au niveau des renflements des cellules en cours de migration (van der Flier and Sonnenberg, 2001b).

Au cours du développement cardiaque de la souris, l'expression de FlnA est majoritairement retrouvée dans les cellules non musculaires, plus particulièrement dans les cellules épicrodiques, endocardiques et mésenchymateuses dérivant de l'EMT.

Au stade E9.5 du développement embryonnaire de la souris, l'expression de la FlnA est retrouvée dans l'endocarde et le mésenchyme des bourrelets endocardiques atrio-ventriculaires ainsi que dans les voies d'éjection artérielle mais, pas dans le myocarde.

Au stade E17.5, toutes les valves cardiaques expriment la FlnA. Cependant, elle est plus fortement marquée dans les cellules interstitielles de l'*atrialis* dans les valves atrio-ventriculaires et la *ventricularis* dans les valves semi-lunaires. La FlnA est également retrouvée dans le mésenchyme des sillons atrio-ventriculaires au niveau des valvules, l'endothélium des trabécules ventriculaires et dans les artères pulmonaires et aortiques.

Après la naissance, son expression est toujours présente dans les valves mais, aussi dans l'épicarde, les coronaires, l'anneau fibreux et dans les parois des artères pulmonaires et aortiques.

À partir du 6<sup>ème</sup> mois, une hétérogénéité d'expression est retrouvée dans les feuillets des valves et dans l'appareil valvulaire associé. Une faible expression est identifiée dans la *ventricularis* et l'*atrialis* des valves. Son expression est encore plus faible dans la partie sous endothéliale. Enfin, la FlnA n'est plus exprimée dans les muscles papillaires et les cardiomyocytes. Toutefois, une forte expression persiste dans les coronaires, l'anneau fibreux et les cordages tendineux.

Dans les valves myxomateuses, les expressions de la FlnA et de l'actine des muscles lisses sont augmentées dans l'ensemble de la valve alors qu'elles sont restreintes à l'espace sous-endothélial et dans la partie centrale des valves saines. (Norris et al., 2010). Ces observations montrent que la FlnA est associée aux processus physiopathologiques au cours de l'activation des CIV.

## II Les objectifs

À l'heure actuelle, plusieurs mutations dans le gène *FLNA* codant pour la FlnA ont été identifiées chez des patients atteints de XMVD. Ces patients développent des atteintes multivalvulaires avec un aspect dystrophique de la valve mitrale qui induit des régurgitations. Le lien entre la FlnA, une protéine du cytosquelette d'actine, et les mécanismes physiopathologiques de la XMVD n'était pas connu.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'identifier les conséquences moléculaires et cellulaires associés aux mutations de la FlnA et leurs liens avec les mécanismes physiopathologiques de la XMVD.

Dans **une première partie**, l'objectif a été d'étudier les effets des mutations G288R et P637Q de la FlnA dans un modèle cellulaire déficient en FlnA afin d'identifier les voies de signalisation potentiellement impliquées dans la XMVD.

Dans **une deuxième partie**, nous avons mené des travaux pour identifier de nouvelles protéines partenaires interagissant dans les premiers domaines de la FlnA. À l'heure actuelle, la majorité des protéines partenaires ont été localisée au niveau des domaines 16 à 24 alors que peu de protéines ont été identifiées au niveau des domaines contenant les mutations associées à la XMVD.



**III Partie I**  
**Les mutations de la filamine A**  
**associées à la XMVD diminuent la stabilité**  
**des intégrines  $\beta 1$**



## **III 1 Introduction**

Dans des études précédentes sur la dystrophie valvulaire myxoïde liée au chromosome X, des mutations dans le gène de la FlnA ont été identifiées (Kyndt et al., 1998, 2007). Par ailleurs, ce gène est le premier identifié dans une dystrophie valvulaire non liée à un syndrome. L'étude clinique de ces patients atteints de XMVD montrent qu'ils développent des atteintes multi-valvulaire sans autres atteintes syndromiques. Au niveau histologique, il semble que les valves de ces patients présentent une dégénération myxoïde conduisant à un épaississement et un allongement des valves ainsi qu'une dilatation de l'anneau mitral (Lardeux et al., 2011).

La FlnA est une protéine ubiquitaire du cytosquelette d'actine et de nombreux travaux ont détaillé les fonctions de la FlnA dans l'organisation orthogonale du réseau d'actine. (Gorlin et al., 1990)(van der Flier and Sonnenberg, 2001b). Elle intervient dans la « mécano-protection », la stabilité membranaire ou encore les processus d'adhésion, de migration et d'étalement cellulaire (Feng and Walsh, 2004). Au cours de l'application d'un stress mécanique sur les cellules, la FlnA est recrutée par les intégrines dans les points focaux permettant de rigidifier le réseau d'actine. Cette liaison permet la transmission entre la MEC et le cytosquelette des cellules de signaux mécaniques ou chimiques (TGF $\beta$ ). Cette transmission est médiée par des protéines transmembranaires d'adhésion que sont les intégrines. Les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  permettent la formation des points focaux fibrillaires essentiels à l'organisation de la matrice de fibronectine (Takada et al., 2007). Il a été montré que les intégrines permettent la régulation de la MEC par l'internalisation et la dégradation de ces composants par les lysosomes (Shi and Sottile, 2008)(Panetti and McKeown-Longo, 1993).

Le but de ce travail est d'identifier des mécanismes physiopathologiques de la valvulopathie impliquant la FlnA et de comprendre son rôle dans le développement de la pathologie.

Le meilleur modèle cellulaire aurait été les cellules de valves issues de patients exprimant les FlnA mutées mais, nous n'avons pas pu en obtenir dû à la rareté des prélèvements. En effet dans le cas des valvulopathies, l'option chirurgicale est la dernière option envisagée et elle privilégie la réparation au remplacement valvulaire. Dans la littérature, deux modèles de souris déficient en FlnA ont été caractérisés, les mâles considérés comme homozygote développent des défauts cardiaque, squelettique et du palet conduisant à une létalité importante. Ces phénotypes sont similaires à ceux retrouvés chez

les patients atteints de syndromes OFD associées à des mutations de la FlnA. Au niveau cellulaire, la déficience en FlnA induit une variabilité de phénotype en fonction du type cellulaire. Les fibroblastes ne développent pas de défaut de morphologie ou de migration. Par contre, les monocytes FlnA<sup>-/-</sup> ont perdu la capacité de migrer et de fusionner. De même il a été observé un défaut des jonctions adhérentes par une diminution de la VE-cadhérine des cellules endothéliales vasculaires FlnA<sup>-/-</sup>. Ces variabilités peuvent être dues à un effet de compensation de la FlnA par les autres isoformes.

Nous avons donc utilisé comme modèle les cellules M2 issues d'un mélanome et déficientes en FlnA exprimant faiblement la FlnB (Cunningham et al., 1992). Les cellules M2 forment des « bulles » à leur surface membranaire dues un défaut d'organisation du réseau d'actine. Ce défaut provoque une instabilité membranaire induisant alors des défauts de migration et une réduction des extensions membranaires. (Cunningham, 1995). La réexpression stable de la FlnA dans ces cellules M2 corrige ces défauts (cellules A7)(Cunningham et al., 1992). Après transfection de la FlnA WT ou mutée dans les cellules M2, il est alors possible d'évaluer *in vitro* les effets des mutations. Récemment, un modèle de cellules HT1080 invalidé par des shRNA contre la FlnA, la FlnB ou les deux FlnA/B a été caractérisé et seulement la double invalidation de la FlnA et la FlnB induit un défaut de migration. Les effets des mutations seront également évalués dans ce nouveau modèle.

Nous avons établi **des lignées stables exprimant les FlnA WT ou mutantes** (G288R ou P637Q) dans les cellules de mélanome déficientes en FlnA. Dans ces lignées stables, nous avons comparé, **les effets de la FlnA WT aux FlnA mutées** sur différents paramètres tels que la morphologie, la migration ou l'adhésion cellulaire. Nous avons identifié les voies de signalisation impliquées.



## III.2 Matériel et méthode

### ***III.2.1 Réactifs, plasmides et traitement***

Les fournisseurs des différents anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau 2. La fibronectine humaine et la laminine ont été fournies par la société Sigma Aldrich. La phalloïdine « fluorescein isothiocyanate » (FITC) et rhodamine ainsi que le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) et la Généticine G418 (G418) étaient fournis par la société Invitrogen. Le cycloheximide provenant de Calbiochem a été utilisé pour bloquer la synthèse protéique à 40µg/mL pendant 8 heures. Les séquences des différentes FlnA sauvage et mutantes G288R / P637Q ont été introduites dans un vecteur d'expression pcDNA3 contenant un promoteur fort CMV. Les séquences de ces FlnA ont également été sous clonées dans un plasmide pcDNA3 sous contrôle du promoteur CMV avec une séquence permettant de tagger les protéines avec le « green fluorescent protein » (GFP). Les anticorps utilisés et leurs dilutions sont répertoriés dans le tableau 2 suivant :

<b>Anticorps</b>				
			<b>dilution</b>	
<b>Nom</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>espèce</b>	<b>WB</b>	<b>IF</b>
Filamine A	Chemicon	Souris	1/4000	1/1000
intégrine $\beta$ 1 (12G10)	Chemicon	Souris	1/500	
intégrine $\beta$ 1 (4B7R)	Santa cruz	Souris		1/500
Vinculine	Sigma	Souris	1/1000	
Vinculine	Sigma	Lapin		1/400
Fibronectine	santa cruz	Lapin		1/500
GAPDH	santa cruz	Souris	1/10000	
Anti - mouse HRP	santa cruz		1/5000	
Anti - mouse HRP	santa cruz		1/5000	
Anti mouse alexa 594	molecular probe			1/1000
Anti mouse alexa 488	molecular probe			1/1000
Anti rabbit alexa 488	molecular probe			1/1000

**Tableau 2 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western-blot et en immunofluorescence.**

### ***III.2.2 Culture cellulaire***

#### **III.2.2.1 Cellules de mélanome et cellules HT1080**

Les cellules M2 déficientes en FlnA sont des cellules cancéreuses humaines isolées d'un mélanome (Cunningham et al., 1992). La lignée A7 est une lignée sous-clonale de cellules M2 dans laquelle l'expression stable de la FlnA WT a été restaurée. Ces lignées ont

été obtenues auprès du Dr. F Nakamura (Université de Harvard, Cambridge, MA). Ces cellules ont été cultivées en milieu MEM $\alpha$  supplémenté avec 2 % de sérum de veau foetal (SVF), 8 % de sérum de veau nouveau né (SVNN), 100 Unité/mL de pénicilline et 100 $\mu$ g/mL de streptomycine. Elles étaient placées à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> (5 %) avec une atmosphère humidifiée et ont été repiquées tous les 3 ou 4 jours. Une pression de sélection à 200 $\mu$ g/mL de G418 est maintenue sur les lignées stables et la lignée A7. La lignée de cellules HT1080 a été obtenue à partir de cellules humaines issues d'un fibrosarcome. Le Dr Lutz nous a fourni 3 lignées établies à partir des cellules HT1080 ainsi que les cellules HT1080 d'origine. Les 3 lignées ont été établies par transfection de shRNA qui permettent d'invalider soit la FlnA soit la FlnB et enfin les deux isoformes (FlnA et FlnB). Elles ont été cultivées dans du DMEM contenant 10 % de SVF, 100U/mL de pénicilline et 100 $\mu$ g/mL de streptomycine à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub>. Afin de maintenir la sélection de la lignée HT1080 invalidée pour la FlnA, 2 $\mu$ g/mL de Puromycine a été ajoutée au milieu de culture.

### **III.2.2.2 Clonage de lignées cellulaires stables exprimant les FlnA WT, P637Q et G288R**

Les cellules M2 ont étéensemencées à 3.10<sup>5</sup> cellules (80 % de confluence) dans un puits de 9.4 cm<sup>2</sup>. Pour réaliser les transfusions de plasmides pcDNA3 FlnA WT, G288R et P637Q, 2 $\mu$ g d'ADN plasmatique a été dilué dans 100 $\mu$ L de MEM $\alpha$  sans sérum auquel il est ajouté 3 $\mu$ L de Fugene6 (Roche – Applied science). Le mélange a été incubé 20 à 30 min à température ambiante (Tamb) puis les complexes ADN/lipide cationique ont été mis en contact avec les cellules adhérentes pendant 48 heures. Les cellules transfectées ont été diluées dans des boîtes de pétri de diamètre de 10 cm à 5.10<sup>4</sup> et 2.10<sup>5</sup> cellules et placées en milieu de sélection G418 à 800 $\mu$ g/mL au bout de 24h qui a été changé tout les deux jours pendant 15 jours. Un test de toxicité à l'antibiotique de sélection G418 sur les cellules M2 a permis de sélectionner la concentration de 800 $\mu$ g/mL afin d'avoir une mortalité de 95 % des cellules M2 en 10 jours. Les clones résistants ont été prélevés grâce à des cylindres de verre. Pour cela, les cellules ont été rincées avec un tampon « phosphate buffer saline » (PBS), les cylindres de verre enduits de graisse permettent d'isoler le clone du reste de la boîte et de décoller les cellules par l'action de la trypsine pendant 5 min. Les cellules de chaque clone ont été placées dans des plaques de 24 puits, puis amplifiées et congelées.

### **III.2.2.3 Transfection transitoire**

Les cellules HT1080 WT ou invalidées pour la FlnA ont étéensemencées à 30.10<sup>4</sup> cellules dans un puits de 9.4 cm<sup>2</sup> pour obtenir 80 % de confluence au bout de 24 heures.

Elles sont rincées avec du opti-MEM sans sérum. Les plasmides pcDNA3 avec un promoteur CMV codant pour les FlnA WT, G288R et P637Q taggées GFP ont été incubés avec un lipide cationique : la lipofectamine 2000 (Invitrogen). Le mélange de 2 $\mu$ g d'ADN pour 2 $\mu$ l de lipofectamine 2000 dilué dans du opti-MEM a été placé sur les cellules pendant 4 heures puis le milieu a été changé pour du milieu avec 10 % de sérum.

### ***III.2.3 RT-PCR semi quantitative en temps réel***

#### **III.2.3.1 Extraction des ARN totaux**

Les ARN totaux ont été isolés des cellules qui expriment la FlnA WT, G288R et P637Q ensemencées à 40.10<sup>4</sup> cellules dans un puits de 9.4 cm<sup>2</sup> à l'aide d'un kit RNeasy mini (Qiagen). Les ARN ont été dosés au NANODrop et la qualité des ARN a été évaluée par « polymerase chain reaction » (PCR) afin d'évaluer une éventuelle contamination par l'ADN génomique.

#### **III.2.3.2 La transcription inverse**

La transcription inverse (RT) permettant la transcription des ARN en ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée à l'aide d'un kit Applied Biosystem high capacity cDNA reverse transcription qui utilise des primers aléatoires. Le mélange réactionnel est incubé 10 min à 25°C et 120 min à 37°C qui permet la transcription en ADNc.

#### **III.2.3.3 PCR quantitative**

L'ADNc obtenu a été amplifié par PCR en présence de SYBER Green, un fluorophore qui est capable de fluorescé quand il se fixe à l'ADN double brin. La PCR quantitative a été réalisée à l'aide d'un kit Applied Biosystem Power SYBER green master mix PCR. Les oligonucléotides sens et anti-sens spécifiques des gènes à amplifier ont été choisis grâce au logiciel Primer Express 3.0 (Tableau 3).

Nom du gène	Amorces	Séquence des amorces	Tm(°C)
ITGB1	Sens	5'-CAACACCAGCTAAGCTCAGGAA-3'	58
	Anti sens	5'-CTAAATGGGCTGGTGCAGTTC-3'	58
ITGB3	Sens	5'-GTCCTCCAGCTCATTGTTGATG-3'	58
	Anti sens	5'-GGTCACGCACTTCCAGCTCTA-3'	59
ITGA5	Sens	5'-CAGTGCCGAGTTCACCAAG-3'	58
	Anti sens	5'-GCCTTGCCAGAAATAGCTTCCT-3'	60
ITGAV	Sens	5'-CGCGTCTTCCCGGATGT-3'	59
	Anti sens	5'-GGCTGGGTGGTGTGTTGCTT-3'	60

**Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative**

La spécificité de chaque couple de primer a été testée avec des dilutions croissantes d'ADNc et en analysant le spectre de dissociation du SYBRGreen du produit de PCR en fin d'expérience.

La plaque contenant les mélanges réactionnels a été centrifugée 2 min à 200g puis placées dans le lecteur ABI PRISM 7900HT. Le gène de référence utilisé pour la quantification des résultats est la Hypoxanthrine phosphoribosyl transferase (HPRT). Le cycle seuil ou Ct a été déterminé dans les différentes conditions par le nombre de cycle qui permet de détecter une fluorescence au-dessus du bruit de fond. La quantification relative du niveau d'expression a été obtenue par la méthode des  $\Delta\Delta Ct$  et normalisée par rapport à l'expression de la HPRT. Les résultats représentent la moyenne de 5 expériences indépendantes réalisées en duplicate.

### ***III.2.4 Immunofluorescence***

#### **III.2.4.1 Marquage du cytosquelette et des protéines des points focaux.**

Les cellules ont étéensemencées à  $2.5 \cdot 10^4$  cellules sur les lamelles de verre incubées. Elles sontensemencées 48 heures sur des lamelles de verre contenant de la laminine afin de faire un marquage du cytosquelette d'actine des cellules. Les lamelles ont été récupérées, rincées 2 fois au PBS puis fixées au paraformaldehyde (PAF) 2 % pendant 15 min. Après un nouveau rinçage au PBS, les cellules ont été perméabilisées avec du PBS, 0.1 % de Triton X100 et 50mM de  $NH_4Cl$  pendant 10 min. L'actine F polymérisée a été marquée avec de la phalloïdine couplé FITC ( $1\mu g/mL$ ) pendant 20 min. Les noyaux ont été marqués avec du DAPI pendant 10 min. Enfin les cellules ont été rincées 3 fois au PBS et les lamelles ont été montées sur lames à l'aide de Prolonggold (Invitrogen). Les images ont été obtenues sur un microscope à épifluorescence Zeiss Axiovert.

Les marquages d'immunofluorescence indirecte ont permis de localiser des protéines telles que la FlnA, l'intégrines  $\beta 1$  et la vinculine. Après la perméabilisation, les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires contre ces différentes protéines pendant 1 heure. Ces anticorps ont été dilués dans une solution de PBS avec 1 % de « bovine serum albumin » BSA pour saturer les sites aspécifiques. Les cellules ont été lavées 3 fois au PBS puis incubées 1 heure en présence des anticorps secondaires appropriés. Les noyaux des cellules ont été marqués et les lamelles ont été montées sur lames.

Le marquage de surface des intégrines  $\beta 1$  a été réalisé sur des cellules vivantes qui ont été lavées 3 fois au PBS puis incubées avec l'anticorps primaire anti-intégrine  $\beta 1$  (4B7R). Les

cellules ont ensuite été fixées au PAF 2 %, perméabilisées et les noyaux ont été marqués au DAPI.

#### **III.2.4.2 Assemblage de la matrice de fibronectine**

Cette technique a pour but d'évaluer la capacité des intégrines à se regrouper afin d'assembler la matrice de fibronectine à la surface des cellules. Les cellules ont étéensemencées à  $50.10^4$  cellules par puits de  $9.4 \text{ cm}^2$  et incubées ou non avec  $100\mu\text{g}$  de fibronectine humaine pendant 24 heures à  $37^\circ\text{C}$ . Elles ont été rincées 3 fois au PBS, fixées au PAF 2 % puis incubées avec l'anticorps primaire anti-fibronectine. Les cellules rincées ont été incubées avec un anticorps secondaire anti mouse couplé à l'Alexa 488 et marquées avec du DAPI. 3 images par condition ont été obtenues et l'assemblage de fibronectine à la surface des cellules a été quantifié par le logiciel ImageJ.

### **III.2.5 Fonctions cellulaires**

#### **III.2.5.1 Test d'étalement**

Les cellules ont été décollées avec de la trypsine puisensemencées à  $2,5.10^4$  cellules dans un puits d'une plaque 24 puits contenant au fond une lamelle de verre. Elles ont été replacées à  $37^\circ\text{C}$  dans l'incubateur pendant différents temps (3h, 8h, 12h et 24h) et les lamelles de verre ont été récupérées. Des images ont été prises en contraste de phase interférentiel (DIC) avec un microscope Zeiss Axiovert. Les images et la quantification des aires des cellules ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Les données correspondent à une moyenne de l'aire de 30 cellules sur 3 expériences indépendantes.

#### **III.2.5.2 Test d'adhésion**

La capacité d'adhésion des cellules a été évaluée en laissant adhérer les cellules sur différents substrats et pendant différents temps afin de déterminer le nombre de cellules qui ont adhéré. Des lamelles de verre ont été placées dans les puits d'une plaque 24 puits et ont été recouvertes avec différents substrats (fibronectine, laminine, verre). Une solution de fibronectine à  $25\mu\text{g/mL}$  a été incubée 45 min à  $T_{amb}$  pour avoir  $5\mu\text{g/cm}^2$  et une solution de laminine à  $20\mu\text{g/mL}$  a été placée 2 heures à  $T_{amb}$  pour avoir  $2\mu\text{g/cm}^2$ . Les excès de fibronectine et de laminine sur les lamelles ont été éliminés par 2 rinçages au PBS. Les cellules ont été récupérées par décollément à la trypsine etensemencées dans les puits à  $2,5.10^4$  cellules par puits. Elles ont été placées dans l'incubateur à  $37^\circ\text{C}$  pendant différents temps (30min, 1h et 2h) qui permet aux cellules d'adhérer aux substrats. À la fin des différents temps, le milieu des puits a été aspiré, les cellules ont été fixées avec une solution

de PAF à 2 % pendant 15 min, et ont été rincées 2 fois avec du PBS pour éliminer les cellules qui n'ont pas adhéré. Le marquage des noyaux a été réalisé par le DAPI, un intercalant de l'ADN. Les images ont permis de déterminer le nombre de cellules qui ont adhéré dans les différentes conditions grâce au logiciel d'analyse d'image ImageJ. Les résultats correspondent à une moyenne du nombre de noyaux sur 6 champs au cours de 4 expériences indépendantes.

### **III.2.5.3 Test de migration: Comblement de brèche ou “Wound Healing”**

La migration a été testée par une technique dite de “Wound Healing” ou encore comblement de brèche. Elle consiste à réaliser une cicatrice sur un tapis cellulaire et de suivre l'aire de comblement de cette brèche à un temps donné par les cellules. Elles ont étéensemencées à  $50.10^4$  cellules dans un puits de  $9.4 \text{ cm}^2$  afin d'obtenir une monocouche de cellules après 24 heures de culture. Une cicatrice a été réalisée à l'aide d'un cône de P1000 puis les cellules ont été rincées avec du PBS pour éliminer les débris cellulaires. La cicatrice a été observée en contraste de phase, par vidéo-microscopie, à l'aide un microscope Leica DMI6000B équipé d'une enceinte chauffée avec une atmosphère humide à 5 % de  $\text{CO}_2$ . Les images ont été prises avec un intervalle de 10 min pendant 24 heures. Le comblement de la cicatrice a été défini par le pourcentage d'aire recouvert au bout de 18 heures par rapport aux cellules M2 et correspond à la moyenne de 3 champs par puits sur 3 expériences indépendantes.

### **III.2.5.4 Test de migration: Chambre de Boyden**

Cette technique consiste à mesurer la capacité de migration des cellules à travers une membrane poreuse par un agent chimiotactique : le sérum. Les cellules ont été rincées 2 fois puis placées une nuit avec du milieu sans sérum afin de sevrer les cellules. Le lendemain, elles ont été décollées par la trypsine,  $5.10^4$  cellules ont été reprises dans  $200\mu\text{L}$  de milieu sans sérum puisensemencées dans le Transwell (Corning, Costar Corp) équipé d'une membrane contenant des pores de  $8\mu\text{m}$ . Les parties inférieures du Transwell contiennent du milieu supplémentées avec 10 % de sérum qui permet la migration des cellules à travers la membrane par chimio-attraction. Après 8 heures d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ , la partie supérieure de la membrane a été nettoyée avec un coton afin d'éliminer les cellules qui n'ont pas migré. Les cellules sur la face inférieure ont été rincées 2 fois au PBS, fixées avec du PAF 2 % pendant 10 min puis les noyaux ont été marqués avec du DAPI. Les images de la membrane sur 6 champs ont permis de déterminer le nombre de cellules qui ont migré à travers la membrane. Les expériences ont été réalisées en duplicate et les

données proviennent de 3 expériences indépendantes. Les résultats représentent un pourcentage par rapport au nombre de cellules M2 qui ont migré.

### **III.2.6 Biochimie**

#### **III.2.6.1 Extraction et dosage protéique**

Les cellules sont rincées 2 fois au PBS puis récupérées par grattage dans un tampon de lyse NETF (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2mM EDTA, 50mM NaF, 50mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM phenylméthylsulfonylfluoride (PMSF) et cocktail d'antiprotéase (Roche Complete) et incubées 30 min à 4°C. Les lysats ont été centrifugés 10 min à 10000g à 4°C pour culoter les protéines non solubilisées. Un aliquote du surnageant était prélevé pour le dosage protéique et le reste a été congelé à -20°C ou utilisé directement pour les immunoprécipitations. Les concentrations protéiques des différents échantillons ont été déterminées par un kit colorimétrique basé sur la méthode de Lowry compatible avec de nombreux détergents (Bio Rad D/C protein Assay, Bio Rad).

#### **III.2.6.2 Immunoprécipitation**

Les billes DynaBeads magnétiques couplées à des protéines G (Invitrogen) ont été équilibrées avec un tampon contenant 0.1M de sodium phosphate, 0.01 % de tween 20, pH8.2) puis pré-incubés avec les billes 30 min à Tamb sous agitation avec l'anticorps anti intégrine  $\beta 1$  (12G10). Elles ont été ensuite rincées 2 fois avec du tampon de fixation et 1 fois avec du tampon de lyse. Les échantillons protéiques obtenus préalablement ont été incubés avec les complexes billes-anticorps toute la nuit à 4°C sous agitation. Les billes ont été rincées 4 fois avec du tampon de lyse et les protéines immunoprécipitées ont été éluées avec le tampon Laemmli.

#### **III.2.6.3 Western-blot**

Les protéines (25 $\mu$ g) ont été dénaturées avec un tampon Laemmli (10 % de glycérol, 65mM Tris pH 6,8, 2.3 % de SDS, 10mM de DTT) 10 min à 80°C pour détecter la FlnA et 15 min à Tamb pour les intégrines  $\beta 1$ . Elles ont été séparées par électrophorèse dans un gel SDS-PAGE de 10 % de bis-acrylamide puis transférées sur une membrane de nitrocellulose par la technique de transfert liquide (0.45mm ; Amersham, Arlington Heights, IL). Les protéines transférées ont été visualisées par le rouge ponceau et les membranes sont saturées dans du TBS-T lait (10mM Tris, 500mM de NaCl, 0.1 % tween 20, 5 % de lait écrémé) pendant 30 min. L'anticorps primaire a été incubé pendant 1h à Tamb ou une nuit à 4°C. La membrane a été rincée 3 fois 10 min avec du TBS-T lait puis incubée 1h à Tamb avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase). Un dernier rinçage

de 30 min dans du TBS-T a été réalisé sur la membrane avant la révélation avec un kit ECL. Les signaux de chimiluminescence sont détectés par un ImageQuant Imager et analysés par le logiciel ImageQuant TL (Amersham, Arlington Heights, IL).

### ***III.2.7 Statistiques***

Les résultats ont été présentés avec les barres d'erreurs correspondant à l'erreur standard à la moyenne (SEM). Pour l'ensemble des résultats obtenus pour les tests fonctionnels sur les cellules et les Western-blot, des tests statistiques d'analyse de variance (ANOVA) à un facteur ont été réalisées et la correction de Bonferroni a été appliquée.



### **III.3 Résultats**

#### ***III.3.1 Établissement de lignées stables exprimant les FlnA WT, G288R et P637Q.***

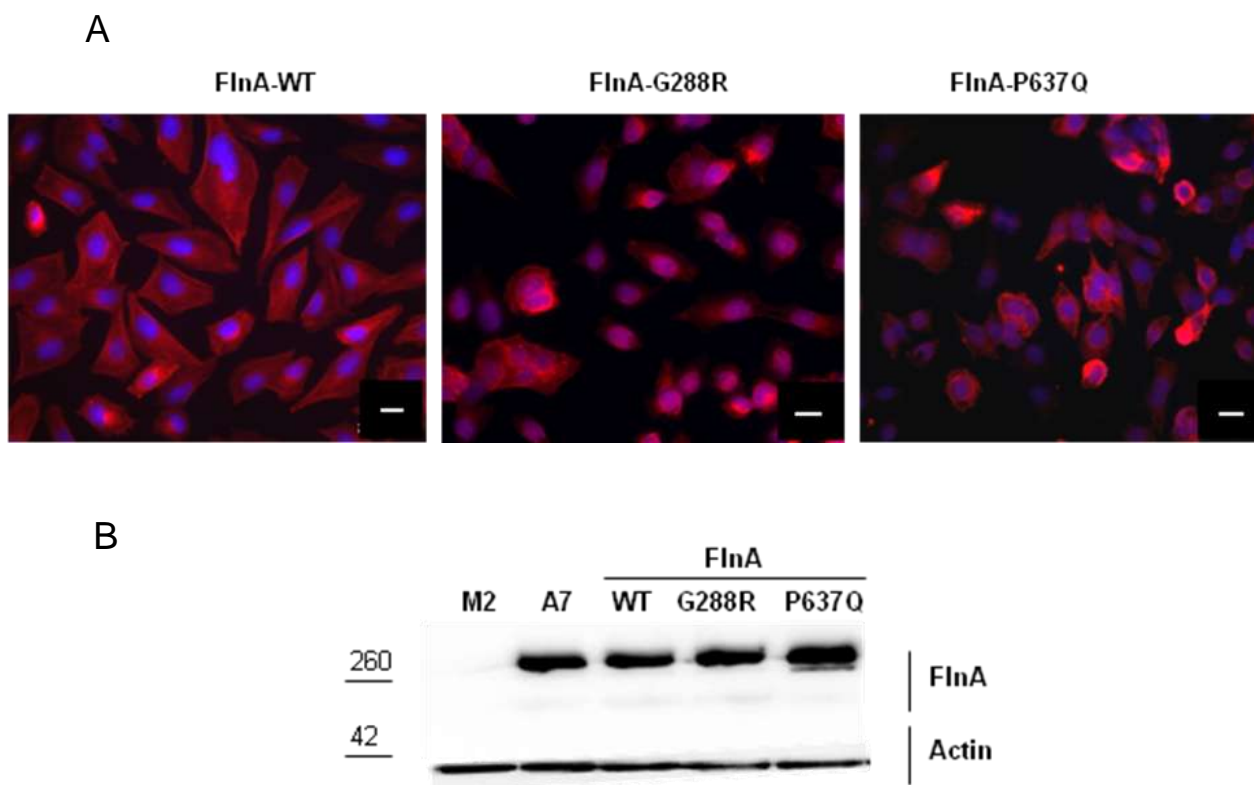
Les cellules de mélanome déficientes en FlnA (M2) ont été utilisées pour étudier les effets fonctionnels de 2 mutations de la FlnA associée à la XMVD (G288R et P637Q). Pour cela, les cellules M2 ont été transfectées avec les plasmides qui codent pour la FlnA WT, G288R ou P637Q. Il existait déjà une lignée cellulaire établie à partir des cellules M2 qui réexprime la FlnA WT (Cellules A7). Cependant, nous avons établi nos propres lignées exprimant les FlnA WT afin d'éviter les biais liés aux constructions plasmiques sous contrôle de promoteurs différents ainsi qu'au protocole de clonage cellulaire.

L'expression stable des FlnA WT ou mutantes ont été obtenues après une sélection par l'antibiotique G418 pendant 3 semaines afin d'obtenir des clones. À partir d'une moyenne de 100 clones isolés, leur sélection a été faite selon les critères suivants :

- Les clones homogènes doivent avoir plus de 80 % des cellules qui expriment la FlnA. Cette première sélection des clones positifs a été faite en se basant sur l'expression de la FlnA dans les cellules évaluée par immunofluorescence (Figure 18 A). Le nombre de clones a été réduit à une trentaine de clones pour chacun des clonages de lignées cellulaires stables exprimant la FlnA WT, P637Q et G288R

- Le rapport FlnA /  $\beta$  actine doit être comparable à celui retrouvé dans les cellules A7 (Figure 18 B). Après la caractérisation de l'expression de la FlnA et de la  $\beta$  actine par Western-blot, les clones qui présentaient un profil avec plusieurs bandes à différentes tailles n'ont pas été conservés, de même que les clones ayant des rapports FlnA /  $\beta$  actine différents des cellules A7.





**Figure 18 : Caractérisation des lignées stables exprimant les FlnA WT, G288R et P637Q dans les cellules M2.** A) Immunofluorescence sur les cellules exprimant les FlnA WT, G288R et P637Q montrent que 80 % des cellules expriment la FlnA (Rouge). Les noyaux sont marqués au DAPI (Bleu) (Barre blanche = 10 $\mu$ m) B) Représentation d'un Western-blot révélant la FlnA et la  $\beta$  actine en contrôle sur des lysats de cellules des lignées stables.

Enfin, le rendement de clones conservés pour chaque clonage cellulaire est de 11 % pour la FlnA WT, 10 % pour la FlnA G288R et 7 % pour la FlnA P637Q (Tableau 4). Par la suite, 3 clones par construction plasmidique ont été conservés donnant les mêmes résultats pour les différents tests réalisés au cours de ce travail.

	FlnA WT	FlnA G288R	FlnA P637Q
<b>Clones isolés</b>	<b>92</b>	<b>101</b>	<b>119</b>
<b>Clones positifs</b>	<b>29 (31%)</b>	<b>19 (19%)</b>	<b>33 (28%)</b>
<b>Clones conservés</b>	<b>10 (11%)</b>	<b>10 (10%)</b>	<b>9 (7%)</b>

**Tableau 4 : Le rendement du clonage cellulaire pour les FlnA WT, G288R et P637Q**

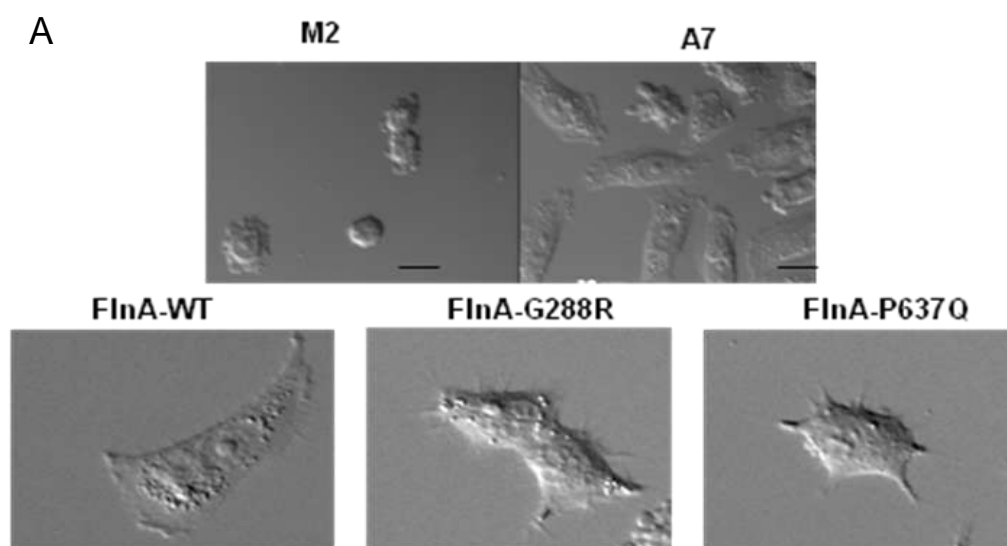


### **III.3.2 Les mutations n'affectent pas les propriétés d'organisation du réseau d'actine par la FlnA.**

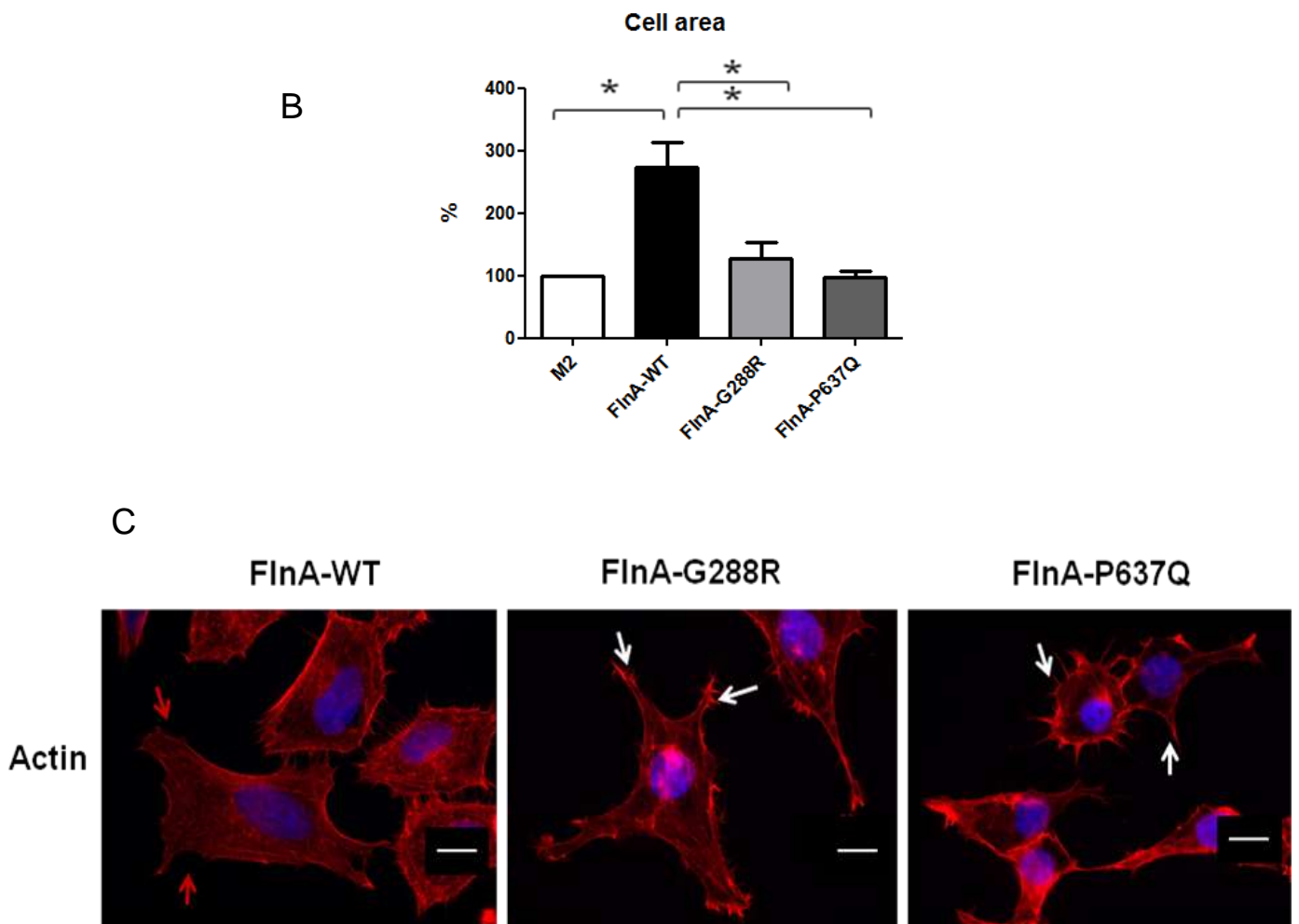
Dans des études précédentes de Cunningham et al, la FlnA joue un rôle crucial dans l'organisation du réseau cortical d'actine grâce à sa structure flexible qui lui permet de fixer les filaments d'actine à leur intersection avec un grand angle de branchement (Cunningham, 1995).

En fait, les cellules déficientes en FlnA présentent de nombreuses « bulles » à la surface de la membrane plasmique au cours de l'étalement cellulaire (24h). Par contre, les cellules A7 et les lignées qui expriment la FlnA WT, G288R et P637Q montrent une disparition rapide (12h) des « bulles » à la surface membranaire au cours de l'étalement. Ceci suggère que l'organisation du réseau d'actine est correcte (Figure 19 A), ces observations sont encore visibles après 24h d'étalement.

De plus, après 24 heures de culture sur des lamelles de verre, les cellules exprimant les FlnA G288R et P637Q sont plus petites que les cellules exprimant les FlnA WT (Figure 19 B). Il est intéressant de noter que les cellules exprimant les FlnA mutantes forment plus de filopodes et moins de lamellipodes que les cellules exprimant les FlnA WT (Figure 19 A). Ces observations sont encore plus marquées lorsque les cellules sont sevrées pendant une nuit sans sérum et activées avec 10 % de sérum pendant 15 min (Figure 19 C).







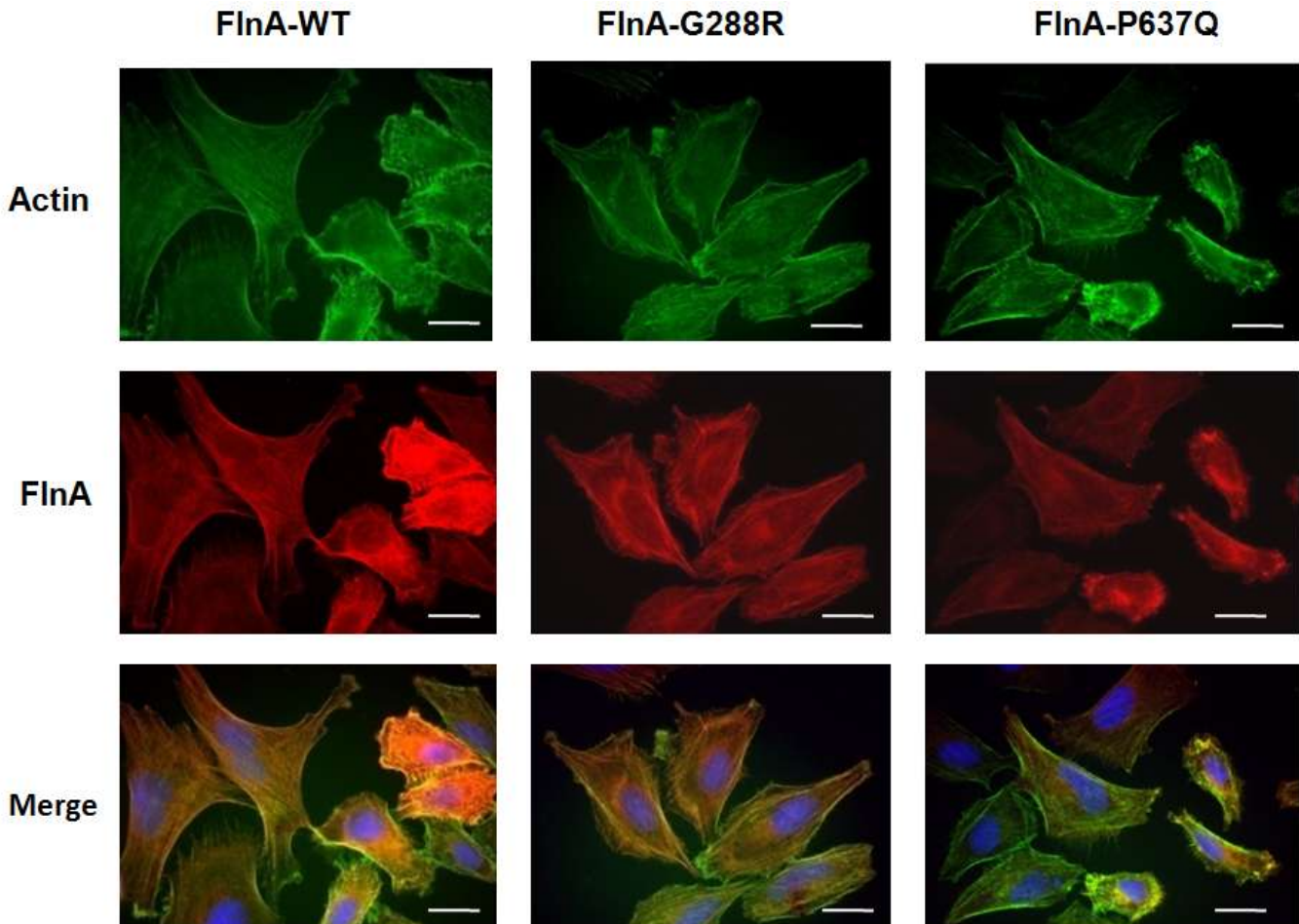
**Figure 19 : Morphologie des cellules exprimant les FlnA WT, G288R et P637Q.** A) Images des cellules M2, A7 et des lignées stables en contraste de phase après 24 heures d'étalement sur lamelles de verre (Barre noire = 10 $\mu$ m). B) Quantification de l'aire des cellules après 24 heures de culture sur lamelles de verre pour les cellules M2 et les lignées stables. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules M2 (\* $P < 0.05$ ). C) Immunofluorescence du cytosquelette de F-actine marqué à la phalloïdine couplé à la Rhodamine des cellules cultivées sur laminine pendant 24 heures sevrées une nuit et activées 15 min avec du 10 % de sérum (Barre blanche = 10 $\mu$ m). Les flèches blanches indiquent les filopodes et les flèches rouges les lamellipodes.

Afin d'étudier au mieux le cytosquelette d'actine, les différentes conditions de culture ont été testées. Les observations selon la confluence, le temps de culture et les substrats ont permis de montrer que les cellules exprimant les FlnA mutantes s'étaient mieux après 48 heures de culture sur des lamelles de verre recouvertes avec de la laminine. Dans ces conditions, les cellules ne présentent pas de modifications au niveau de l'organisation du cytosquelette d'actine. La formation de fibre de stress est observée dans toutes les cellules (Figure 20). De la même façon, le FlnA est localisée en sous membranaire et sur les fibres





de stress ce qui indique une colocalisation avec l'actine. L'ensemble de ces données suggère qu'à l'état stable l'organisation du réseau d'actine n'est pas modifiée par les mutations de la FlnA. Mais elles pourraient modifier la réponse cellulaire aux situations de stress, où la réorganisation du réseau d'actine est sollicitée comme au cours de l'adhésion à un substrat ou la migration cellulaire.



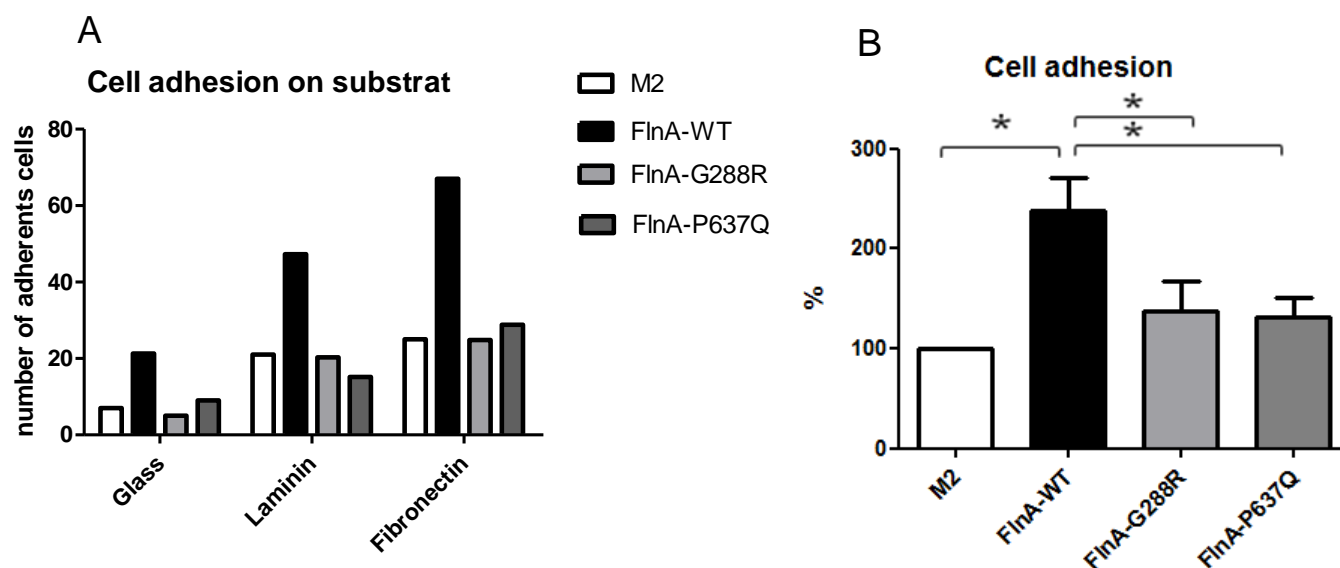
**Figure 20 : Organisation du réseau d'actine et localisation de la FlnA dans les lignées stables.** Immunofluorescence des cellules cultivées 48 heures sur des lamelles de verre recouvertes avec de la laminine. Le cytosquelette d'actine est marqué par la phalloïdine couplé au FITC (Vert) et la FlnA est marquée de façon indirecte avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594 (Rouge). (Barre blanche = 10 $\mu$ m)

### ***III.3.3 Les mutations de la FlnA affectent l'adhésion et la migration cellulaire.***

L'effet sur la taille des cellules exprimant les mutations de la FlnA paraît être plus marqué au cours des phases précoces de l'étalement comparé à l'état stable donc les capacités d'adhésion des cellules ont été analysées. Il a été démontré que la FlnA participe aux processus d'adhésion par l'intermédiaire de la vimentine ainsi que par son recrutement dans les points focaux (D'Addario et al., 2001). L'adhésion des cellules a été évaluée sur



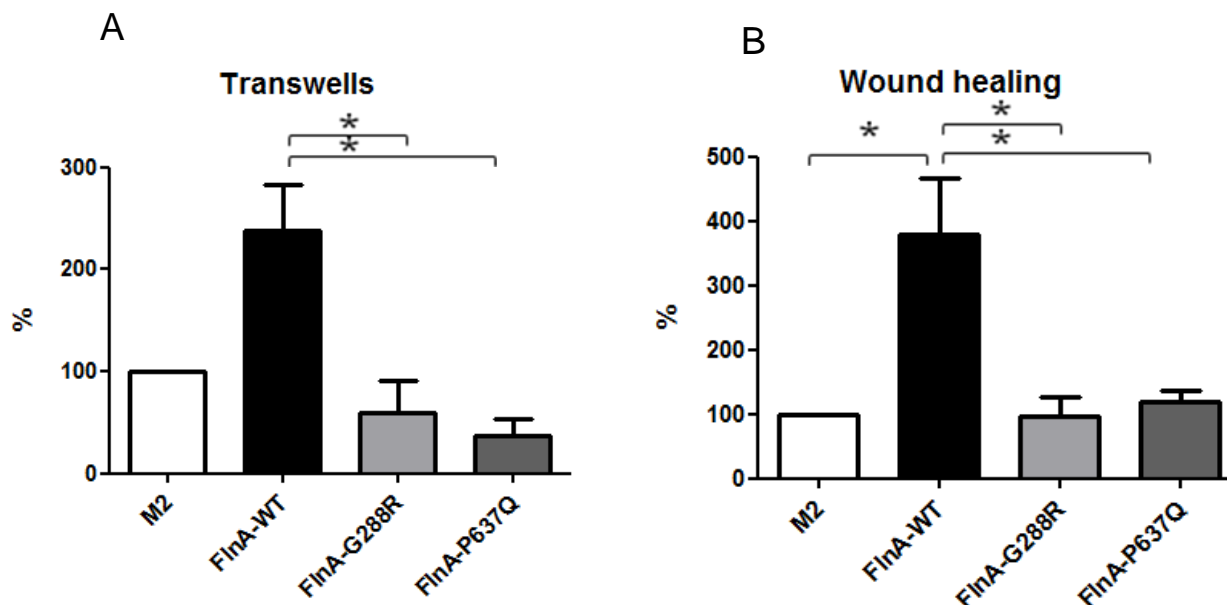
différents substrats tels que la fibronectine, la laminine et le verre à différents temps (30 min, 1h, 2h) (Figure 21 A). Les effets majeurs ont été observés lorsque les cellules sont ensemencées pendant 30 min sur des lamelles de verre recouvertes avec de la fibronectine. Comme le montre la figure 21 B, l'expression de la FlnA WT augmente significativement (x2.4) le nombre de cellules qui adhèrent en 30 min par rapport aux cellules M2. Par contre, l'expression des FlnA mutantes ne modifie pas significativement le nombre de cellules adhérentes. Les résultats sont similaires avec la laminine ou le verre mais, les différences sont moins marquées sur des temps d'1 ou 2 heures.



**Figure 21 : Adhésion cellulaire des lignées stables.** A) Les cellules sont laissées à adhérer sur les lamelles de verre seul, recouvertes avec de la laminine ou de la fibronectine pendant 30 min. B) Le graphique représente l'adhésion en 30 min sur des lamelles recouvertes avec de la fibronectine. Les noyaux des cellules marquées au DAPI sont comptés et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules M2 (\*P<0.05)

La capacité de migration a également été évaluée de 2 façons complémentaires. La première consiste à faire migrer les cellules à travers une membrane contenant des pores de 8µm (Insert Transwell) suivant un gradient de sérum qui stimule le chimiotactisme des cellules (Figure 22 A). La durée de l'expérience a été limitée à 8 heures afin de s'affranchir de la prolifération cellulaire (les cellules ayant un temps de doublement de l'ordre de 12 heures). La deuxième évalue la migration « orientée » par la réalisation d'une brèche sur une monocouche de cellules (Figure 22 B). Le suivi en temps réel de la fermeture de la brèche par vidéo-microscopie a permis d'évaluer la vitesse de migration des cellules entre deux divisions. Comme cela est illustré dans la figure 22, seule l'expression de la FlnA WT augmente significativement la migration des cellules M2 tant dans le test de migration au travers du transwell que dans le comblement de blessure (Figure 22 A et B respectivement).

À l'inverse, l'expression des FlnA mutantes ne modifie pas la migration des cellules M2 qui semble même diminuée dans le cas de la migration sur Transwells. La mesure spécifique des vitesses de migration en vidéomicroscopie montre que l'expression de la FlnA WT augmente également la vitesse de migration des cellules M2 de 0.2 à 0.6 $\mu$ m/min alors que l'expression des FlnA mutantes ne permet pas la restauration de la capacité de migration.

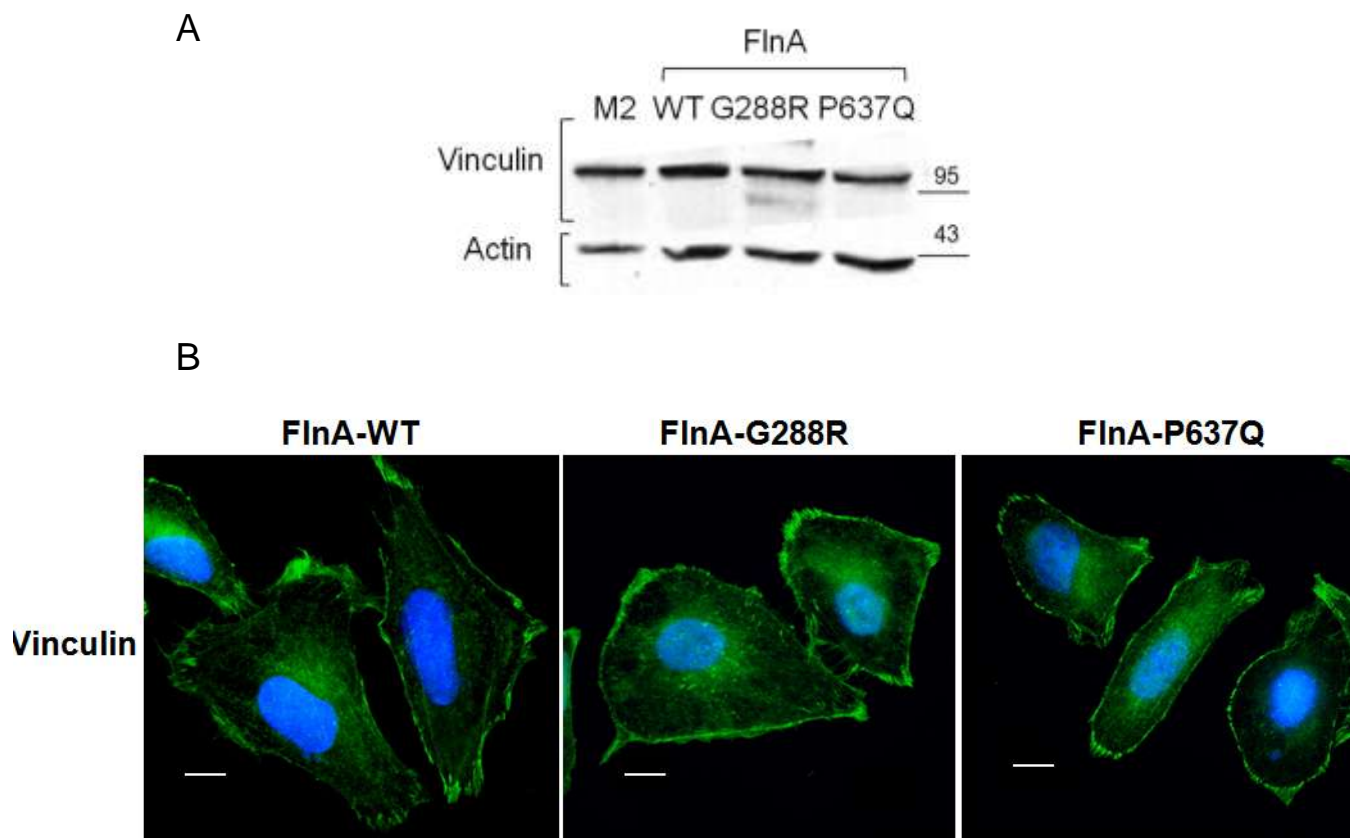


**Figure 22 : Migration cellulaire des lignées stables.** A) La migration cellulaire à travers une membrane poreuse (Transwell) est stimulée par un gradient de sérum pendant 8 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules M2 (\*P<0.05). B) La migration à partir d'une brèche sur une monocouche de cellules est suivie par vidéomicroscopie durant 24 heures. L'aire de recouvrement est déterminée à un temps de 18 heures qui permet d'obtenir un pourcentage de recouvrement. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules M2 (\*P<0.05)

### ***III.3.4 Les mutations de la FlnA ne semble pas modifier l'initiation des points focaux***

Les points focaux sont des complexes protéiques essentiels aux processus d'adhésion et de migration cellulaire. Il a été démontré que la FlnA est recrutée dans ces points focaux pour permettre une accumulation d'actine et donc une résistance au stress mécanique subi par les cellules. Nous avons étudié la formation des points focaux dans les lignées en analysant l'expression et la localisation de la vinculine. Comme illustré dans la figure 23 A, le niveau d'expression de la vinculine n'est pas modifié par les mutations de la FlnA, de même la vinculine maintient sa localisation au niveau des points focaux. Les cellules exprimant les FlnA mutantes sont capables de former des points focaux même s'ils

semblent moins étendus que dans les cellules exprimant les FlnA WT (Figure 23 B). Nous avons alors étudié les effets des mutations de la FlnA sur les protéines essentielles des points focaux que sont les intégrines.



**Figure 23 : Formation des points focaux dans les lignées stables.** A) Représentation d'un Western-blot révélant la vinculine et la  $\beta$  actine dans des lysats cellulaires de lignées stables B) Immunofluorescence de la vinculine (Vert) sur des cellules cultivées depuis 48 heures sur des lamelles de verre. Les noyaux sont marqués au DAPI (Bleu) (Barre blanche = 10 $\mu$ m)

### ***III.3.5 Les mutations de la FlnA affectent l'expression des intégrines $\beta$ 1***

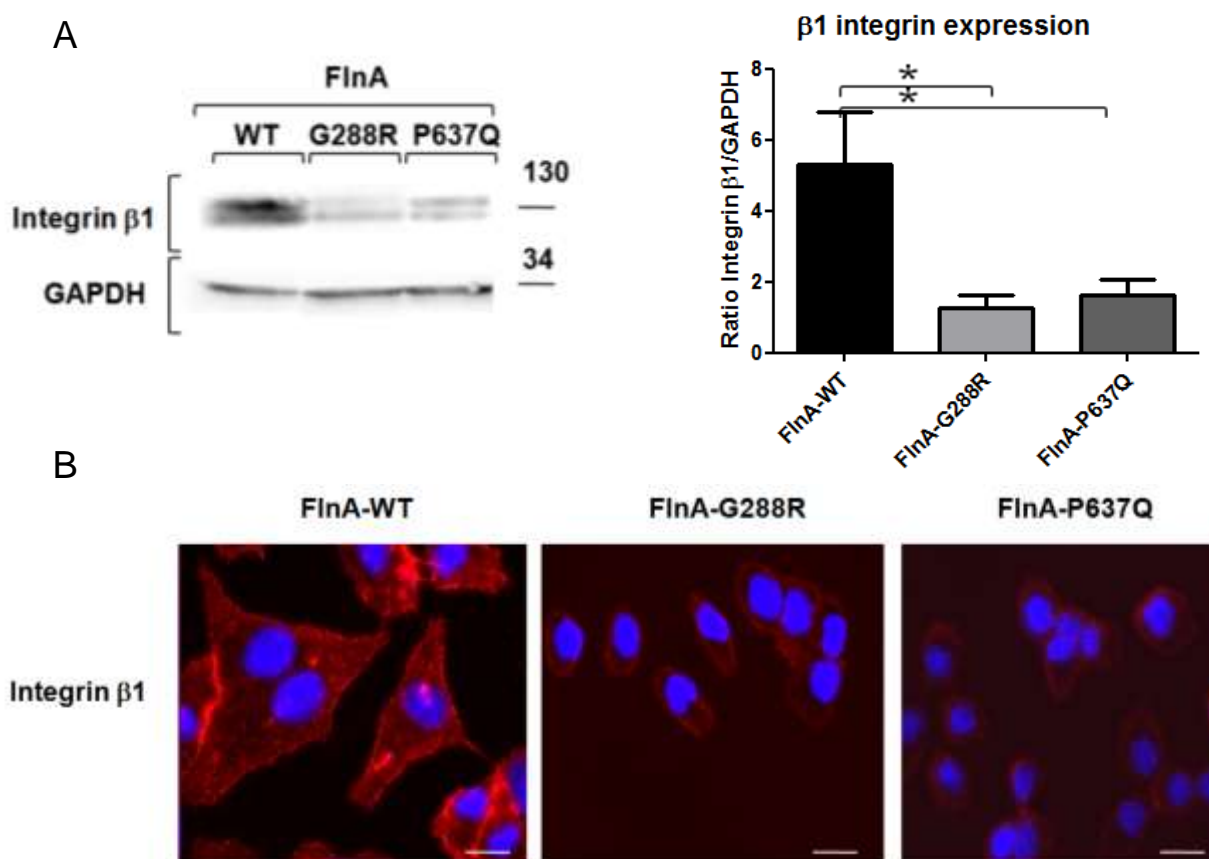
Des études ont démontré que la FlnA interagit avec les intégrines qui sont à l'interface entre la MEC et les signalisations intracellulaires impliquées dans l'étalement et la migration cellulaire. Cette interaction entre la FlnA et l'intégrine  $\beta$ 1 est essentielle à la mécano-protection. De plus, l'intégrine  $\beta$ 1 est la forme majoritairement exprimée dans les différents types cellulaires dont les cellules M2 (Gawecka et al., 2010). L'expression des intégrines  $\beta$ 1 a donc été évaluée dans les lignées exprimant les FlnA mutantes. Comme illustré dans la figure 24 A, la quantification des Western-blots montre que l'expression des



intégrines  $\beta 1$  est drastiquement réduit dans les lignées exprimant les FlnA G288R de 76 % et P637Q de 69 % comparé aux cellules exprimant la FlnA WT. La diminution d'expression des intégrines  $\beta 1$  se traduit par une réduction de leur localisation à la membrane plasmique. Les immunofluorescences extracellulaires réalisées avec un anticorps reconnaissant le domaine extracellulaire des intégrines montrent un marquage ponctiforme prononcé lorsque la FlnA WT est exprimée, alors que le marquage est fortement réduit et diffus lorsque les FlnA mutantes sont exprimées (Figure 24 B).

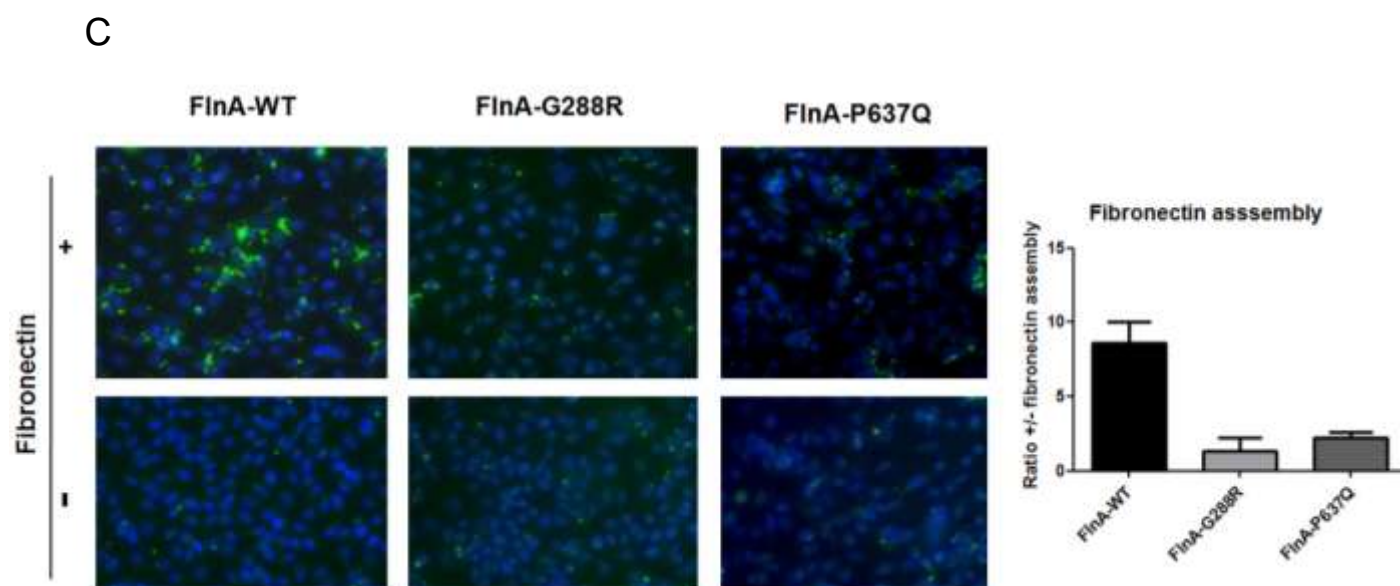
Les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  sont connues pour assembler la matrice de fibronectine à la surface des cellules par la formation de points focaux fibrillaires (Clark et al., 2005). Nous nous sommes donc demandé si la diminution du niveau d'expression des intégrines  $\beta 1$  aurait un impact sur la capacité d'assemblage en matrice de la fibronectine exogène. La figure 24 C montre que les cellules exprimant la FlnA WT sont capables d'agréger la fibronectine en matrice à la surface cellulaire après une incubation de 24 heures, alors que les cellules exprimant les FlnA mutantes ne sont pas capables d'assembler la matrice de fibronectine.

Les résultats obtenus montrent que les mutations de la FlnA diminuent l'expression des intégrines  $\beta 1$  qui induisent une réduction de l'assemblage de la matrice extracellulaire de fibronectine.









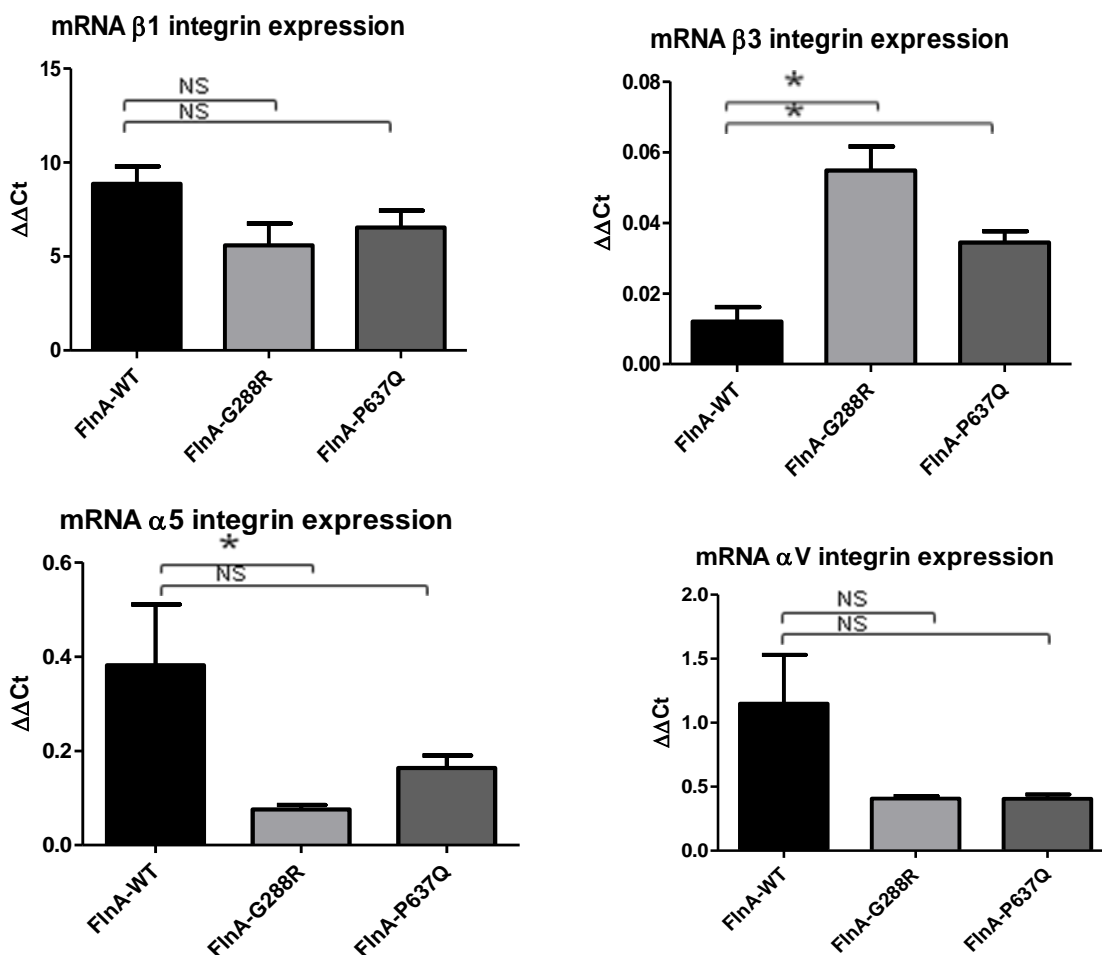
**Figure 24 : Diminution de l'expression des intégrines  $\beta$ 1 dans les lignées exprimant les FlnA G288R et P637Q.** A) Western-blot sur les lysats cellulaires des lignées révélant les intégrines  $\beta$ 1 et la GAPDH (gauche). Sur le graphique de droite, les résultats correspondent à la quantification réalisée sur 5 expériences indépendantes et normalisés par la GAPDH. (\* $P < 0.05$ ) B) Immunofluorescence des intégrines  $\beta$ 1 par un anticorps reconnaissant un épitope extracellulaire sur cellules non perméabilisées en culture depuis 24 heures. (Barre blanche =  $10\mu\text{m}$ ) C) Assemblage de fibronectine à la surface cellulaire des lignées stables. Les cellules cultivées en monocouche sont recouvertes pendant 24 heures avec ou sans fibronectine ( $100\mu\text{g}$ ) qui est ensuite marquée de façon indirecte avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (Vert). Les noyaux sont marqués au DAPI (Bleu). La quantification correspond au rapport de fluorescence détectée avec / sans incubation de fibronectine.

### III.3.6 Les mutations modifient le profil d'expression des intégrines

La diminution de l'expression des intégrines  $\beta$ 1 peut être due à un défaut de transcription et de synthèse protéique ou à une augmentation de la dégradation. Nous avons donc évalué le niveau d'ARNm des intégrines  $\beta$ 1 par RT QPCR dans les cellules exprimant les FlnA WT ou mutantes. Dans la figure 25, le niveau d'ARNm n'est pas significativement différent entre les lignées. Nous pouvons supposer que les mutations n'affectent pas la transcription du gène codant pour les intégrines  $\beta$ 1 et donc n'agiraient pas sur la synthèse. Il a été démontré que les sous unité  $\alpha$  des intégrines sont capables de réguler la stabilité et le trafic à la membrane des sous unité  $\beta$ . De plus l'activité des intégrines  $\beta$ 3 est capable de compenser en partie l'absence des intégrines  $\beta$ 1. Les cellules qui expriment les FlnA mutantes peuvent subir un remodelage de l'expression des intégrines afin de compenser le défaut des intégrines  $\beta$ 1. Le profil des ARNm dans les lignées stables a été étudié par RT-



PCR pour les différentes sous-unités d'intégrines. Une augmentation de l'expression des intégrines  $\beta 3$  est observée dans les lignées exprimant les FlnA mutantes venant éventuellement compenser le défaut des intégrines  $\beta 1$ . Cependant, ces intégrines  $\beta 3$  ne permettent pas l'assemblage de la matrice de fibronectine. En revanche, l'expression des intégrines  $\alpha 5$  n'est pas significativement modifiée par la mutation P637Q de la FlnA même significative pour la mutation G288R comme le montre la figure 25. En Western-blot, la diminution d'expression des intégrines  $\alpha 5$  n'a pas été confirmée. De plus, les mutations de la FlnA n'affectent pas de façon significative l'expression des intégrines  $\alpha V$ . Les modifications du profil des intégrines semblent montrer que les cellules sont capables de s'adapter à la diminution des intégrines  $\beta 1$ . Les résultats obtenus suggèrent que la transcription du gène codant pour les intégrines  $\beta 1$  n'est pas modifiée et donc que la diminution d'expression de ces intégrines serait liée à une augmentation de la dégradation.

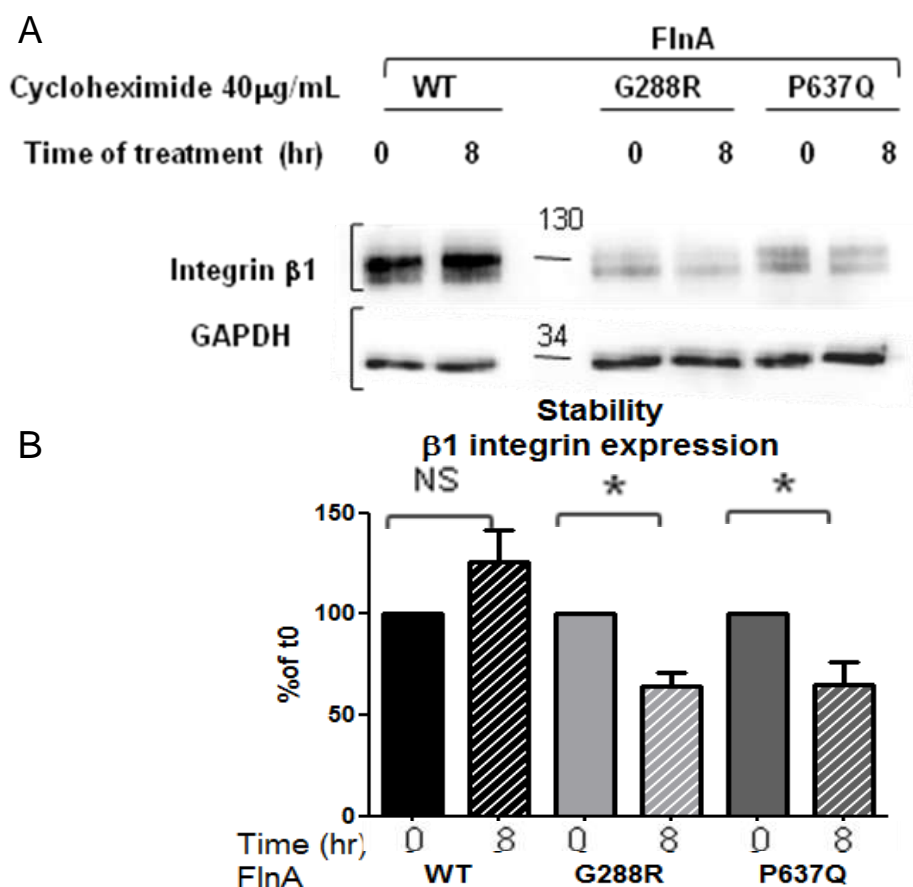


**Figure 25 : Expression des intégrines dans les lignées stables.** Les graphiques représentent l'expression des ARNm des sous-unités  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 1$  des intégrines. Les résultats correspondent aux  $\Delta\Delta Ct$  normalisés par l'expression du gène HPRT. (\*  $P < 0.05$ )

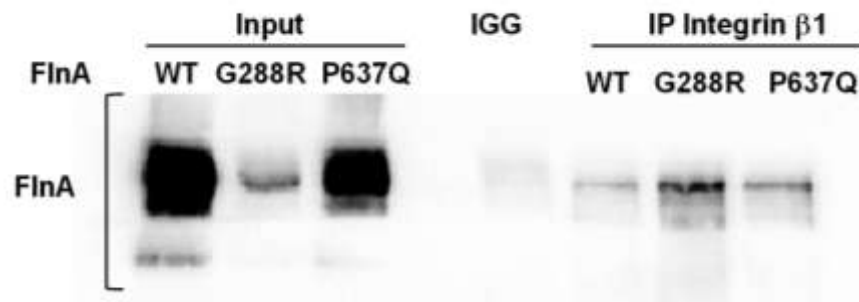
### III.3.7 Les mutations de la FlnA augmentent la dégradation des intégrines $\beta 1$

Ayant démontré que la transcription n'était pas affectée, la dégradation des intégrines  $\beta 1$  a été analysée. Les cellules exprimant la FlnA WT et mutantes ont été traitées pendant 8 heures avec du cycloheximide (40 $\mu$ g/mL) afin de bloquer la synthèse protéique. Le niveau d'expression des intégrines a été évalué par Western-blot présentés dans la figure 26 A. Au cours du traitement, l'expression des intégrines  $\beta 1$  n'est pas significativement modifiée par l'expression de la FlnA WT. En revanche, elle est significativement réduite dans les cellules exprimant les FlnA G288R et P637Q de 35 et 36 % respectivement.

Ces résultats sont en accord avec une augmentation du taux de dégradation des intégrines  $\beta 1$  dans les lignées exprimant les FlnA mutantes. Nous nous sommes demandé si cette instabilité était due à une perte d'interaction des intégrines  $\beta 1$  avec la FlnA même si le site d'interaction est éloigné de la région où sont localisées les mutations. Elles pourraient modifier la structure de la FlnA et donc sa liaison à des protéines partenaires. La co-immunoprécipitation de l'intégrine  $\beta 1$  avec la FlnA illustrée dans la figure 26 B montre que l'interaction est toujours présente avec les FlnA G288R et P637Q.



C



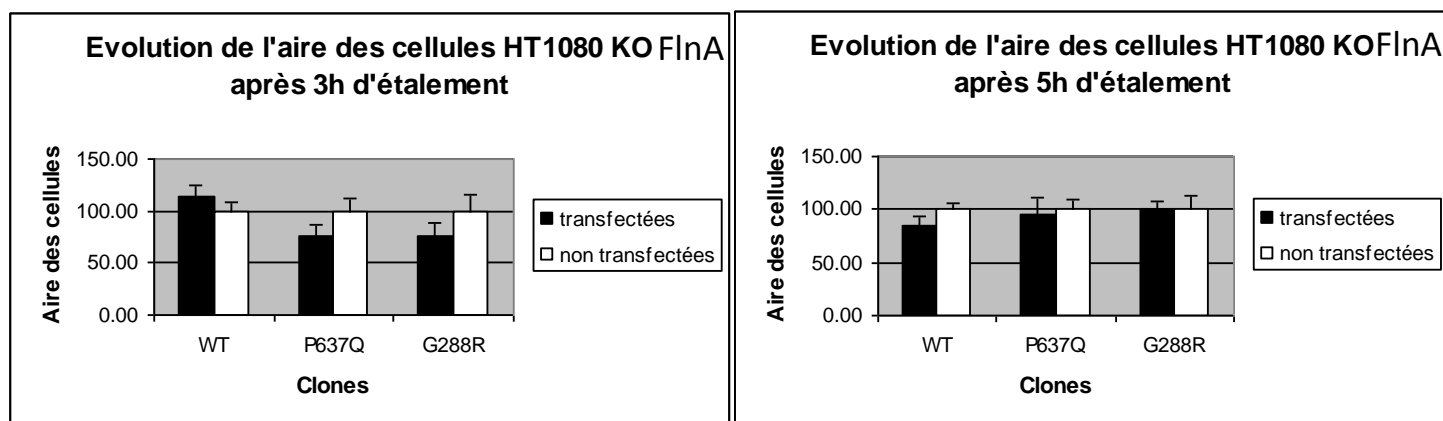
**Figure 26 : Dégradation des intégrines  $\beta$ 1 dans les lignées exprimant les FlnA mutantes.** A) Représentation d'un Western-blot des intégrines  $\beta$ 1 et de la GAPDH sur les lysats cellulaires des lignées stables traités ou non pendant 8 heures avec du cycloheximide. B) Les données présentées sur le graphique correspondent à la moyenne des quantifications de 5 expériences indépendantes normalisées par la GAPDH (\* $P < 0.05$ ). C) Immunoprécipitation des intégrines  $\beta$ 1 révélant la co-immunoprécipitation de la FlnA dans les lignées exprimant la FlnA WT, G288R et P637Q.

## Résultats préliminaires

Dans le but de confirmer les résultats obtenus dans les lignées de mélanome exprimant les FlnA WT ou mutantes, des lignées dérivées des cellules HT1080 invalidées par shRNA pour chacune des FlnA ou B ou invalidées pour les deux ont été utilisées.

Dans la lignée invalidée pour la FlnA, les effets des mutations de la FlnA sont en cours d'étude. Pour cela, les cellules ont été transfectées de façon transitoire avec les plasmides codant pour les FlnA WT ou mutantes (G288R ou P637Q) fusionnées avec la GFP. Les phases précoces d'étalement des cellules ont été évaluées en microscope à fluorescence afin de suivre l'aire des cellules transfectées comparée aux cellules non transfectées. Les résultats préliminaires sont présentés dans la figure 27.

Au bout de 3h d'étalement, les cellules exprimant les FlnA mutantes ont tendance à être plus petites que les cellules non transfectées alors que la FlnA WT ont tendance à avoir une taille plus grande que les cellules non transfectées. Ces résultats ne sont pas significatifs à cause de nombre réduit d'expériences réalisées. En revanche, les effets observés précédemment ne semblent pas persister au cours du temps, car elles ne sont plus présentes au bout de 5h d'étalement.



**Figure 27 : Représentation graphique de l'évolution de l'aire des cellules HT1080 KO FlnA transfectées avec la FlnA WT et mutée (P637Q ou G288R) en fonction du temps d'étalement (3h et 5h)**

### **III.4 Discussion / Perspectives**

Au cours de ce travail, nous avons étudié les effets des mutations de la FlnA associées à la XMVD. Cette première étude fondamentale dans un modèle cellulaire a permis d'identifier des modifications morphologiques, mais aussi des défauts de migration et d'adhésion cellulaire associés aux mutations de la FlnA. L'ensemble de ces modifications semblent être lié à une diminution d'expression des intégrines  $\beta 1$ .

Les résultats obtenus dans ce travail nous ont amené à discuter les 3 points suivants : 1) l'importance des modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* dans l'étude des mutations de la FlnA, 2) l'impact des mutations de la FlnA sur l'interaction avec les intégrines et 3) les conséquences des interactions entre la FlnA et les intégrines sur la physiopathologie des valvulopathies

#### **1) Modèles d'étude des mutations de la FlnA**

Nos observations ont été réalisées sur une lignée de cellules cancéreuses (M2) qui a été utilisée dans de nombreuses études afin de caractériser les fonctions de la FlnA (Coughlin et al., 2006; Zhou et al., 2010). En dehors de leur capacité proliférative, l'avantage de ces cellules M2 provient de leur défaut d'expression de FlnA, qui n'est apparemment pas compensé par la faible expression de FlnB (Jeon et al., 2008). Cependant, il existe des modifications du génome et des voies de signalisation de ces cellules provenant de leur origine cancéreuse (Cunningham et al., 1992). Même si l'utilisation d'une lignée cellulaire cancéreuse ne reflète pas totalement ce qui se passe dans des CIV dans des conditions physiopathologiques, elle apporte de nouvelles informations sur les conséquences moléculaires et cellulaires associés aux mutations de la FlnA.

Afin de confirmer les résultats obtenus dans le modèle de cellules M2, nous avons commencé à utiliser un autre modèle de cellules cancéreuses, les cellules HT1080. Ces cellules expriment les FlnA et FlnB de manière équivalente permettant une compensation des filamines entre elles, à l'inverse des cellules de mélanome. Les cellules HT1080 sont à l'origine de 3 lignées invalidées pour chacune des filamines A et B ou invalidée pour les deux isoformes. La lignée doublement invalidée pour les FlnA et FlnB est la seule à présenter un défaut de migration cellulaire (Baldassarre et al., 2009). Le niveau d'expression de la FlnB est important à prendre en compte dans l'étude sur l'effet des mutations de la FlnA.

Dans l'objectif de poursuivre notre étude sur des systèmes cellulaires plus pertinents et d'origine non tumorale, différents modèles expérimentaux pourraient être envisagés.

Notamment,

- L'étude des mutations de la FlnA dans des cultures de CIV représente une alternative intéressante à condition de résoudre les problèmes de disponibilité. Le meilleur modèle serait d'obtenir des CIV du patient mais, les biopsies et la réparation chirurgicale sont faites en dernier recours. Les cultures de CIV présentent l'avantage d'être isolées de valves ayant subies des contraintes mécaniques au cours de la contraction du cœur. De même, l'isolement de ces cellules à partir de valves de souris s'avère difficile à cause de la taille réduite des animaux. La réalisation de ces cultures primaires de CIV nécessite l'utilisation de plus grands animaux (lapin ou porc).

- L'utilisation de cultures primaires fibroblastiques de peau du patient porteur d'une mutation de la FlnA pourrait également s'avérer intéressante pour deux raisons.

Tout d'abord, les fibroblastes de peau du patient ont l'avantage d'exprimer la mutation P637Q dans son contexte génétique qui est un bon modèle d'étude proche du patient. Par contre, il faut garder à l'esprit que les patients ne présentent pas d'atteintes cutanées ou de défaut de cicatrisation. Dans de prochaines investigations, l'effet de l'étirement sur ces fibroblastes de peau sera étudié afin de se rapprocher des contraintes mécaniques subies par des CIV. Le deuxième avantage de ces cultures de fibroblastes de peau provient de leur capacité à pouvoir être dérivées en cellules pluripotentes : *induced pluripotent cells* (IPs) (Bel et al., 2010; Martinez-Fernandez et al., 2011). À partir de ces fibroblastes, en collaboration avec Michel Pucéat, des IPS seront obtenus puis différenciées en CIV par l'ajout de différents facteurs de croissance (BMP2, VEGF et FGF8). Ce nouveau modèle cellulaire nous permettra d'être le plus proche possible des conditions physiologiques des CIV du patient. Il sera par la suite intéressant de soumettre ces différents modèles à des contraintes mécaniques et d'étudier le comportement de ces cellules ainsi que les voies de signalisation du TGF $\beta$  et des intégrines.

Les modèles précédemment décrits restent des modèles *in vitro* qui peuvent ne pas refléter les effets *in vivo* des mutations de la FlnA dans les valves. Dans des conditions physiologiques, des travaux sur l'expression de la FlnA sauvage au cours du développement embryonnaire et sur le remodelage des valves cardiaques de souris ont été réalisés. L'expression de la FlnA sauvage a été suivie et son expression est retrouvée dans les valves cardiaques, en revanche, elle n'est pas détectable dans les cardiomyocytes ou les muscles papillaires (Norris et al., 2010). Les modèles animaux (*in vivo*) sont indispensables pour étudier l'impact des mutations sur les mécanismes physiopathologiques des valvulopathies. Ils permettront de suivre la formation et le fonctionnement des valves au cours du développement embryonnaire et au cours de l'évolution de la pathologie par des techniques



échocardiographiques. En plus des effets des mutations de la FlnA sur le fonctionnement des valves, leur morphologie et leur composition histologique apporteront des informations sur le type de remodelage subi par la MEC valvulaire.

Au sein du réseau Leducq Transatlantique dont nous faisons partie, un modèle de souris invalidée pour la FlnA ciblant les cellules endothéliales cardiaques par un système Cre-Nfatc1 a été mis au point. Les premières investigations réalisées sur ces souris montrent un épaissement des valves cardiaques et des régurgitations mitrales à l'âge adulte. Enfin un modèle animal important pour comprendre l'implication des mutations de la FlnA a été obtenu, ce sont les souris *Knock In* exprimant les FlnA mutantes (G288R et P637Q) à la place des FlnA WT. Prochainement, les valves de ces souris vont être caractérisées sur le plan échocardiographique et histologique. Les CIV de ces souris devraient permettre d'étudier l'implication des différentes voies de signalisation telles que les intégrines et le TGF $\beta$ . Les modèles *knock In* sont essentiels à la compréhension des effets des mutations de la FlnA dans le développement de la XMVD au niveau de l'animal entier et des CIV.

En revanche, il existe deux modèles de souris invalidées pour la FlnA qui ont déjà été décrits dans la littérature par AW Hart et Feng. Dans les cellules de ces souris invalidées pour la FlnA, les effets de cette inactivation sont différents selon les types cellulaires. Dans les fibroblastes de ces souris, aucune modifications morphologiques ou de défauts de migration n'ont pu être observés. Cependant, les cellules endothéliales présentent une diminution de VE-cadhérines des jonctions adhérentes (Feng et al., 2006; Hart et al., 2006). Il est important de rappeler que les altérations observées avec les différentes mutations de la FlnA pourraient varier en fonction des types cellulaires.

## 2) Impact des mutations de la FlnA sur l'interaction avec les intégrines

Dans cette partie, les points suivants vont être discutés : l'impact de la FlnB et du rapport FlnA /  $\beta$  actine, le remodelage du profil des intégrines, le rôle directe ou indirecte de la FlnA sur la dégradation des intégrines. Nous avons pu montrer que les modifications phénotypiques associées aux mutations de la FlnA observées impliquent des voies de signalisation liées aux processus d'adhésion et de migration cellulaire.

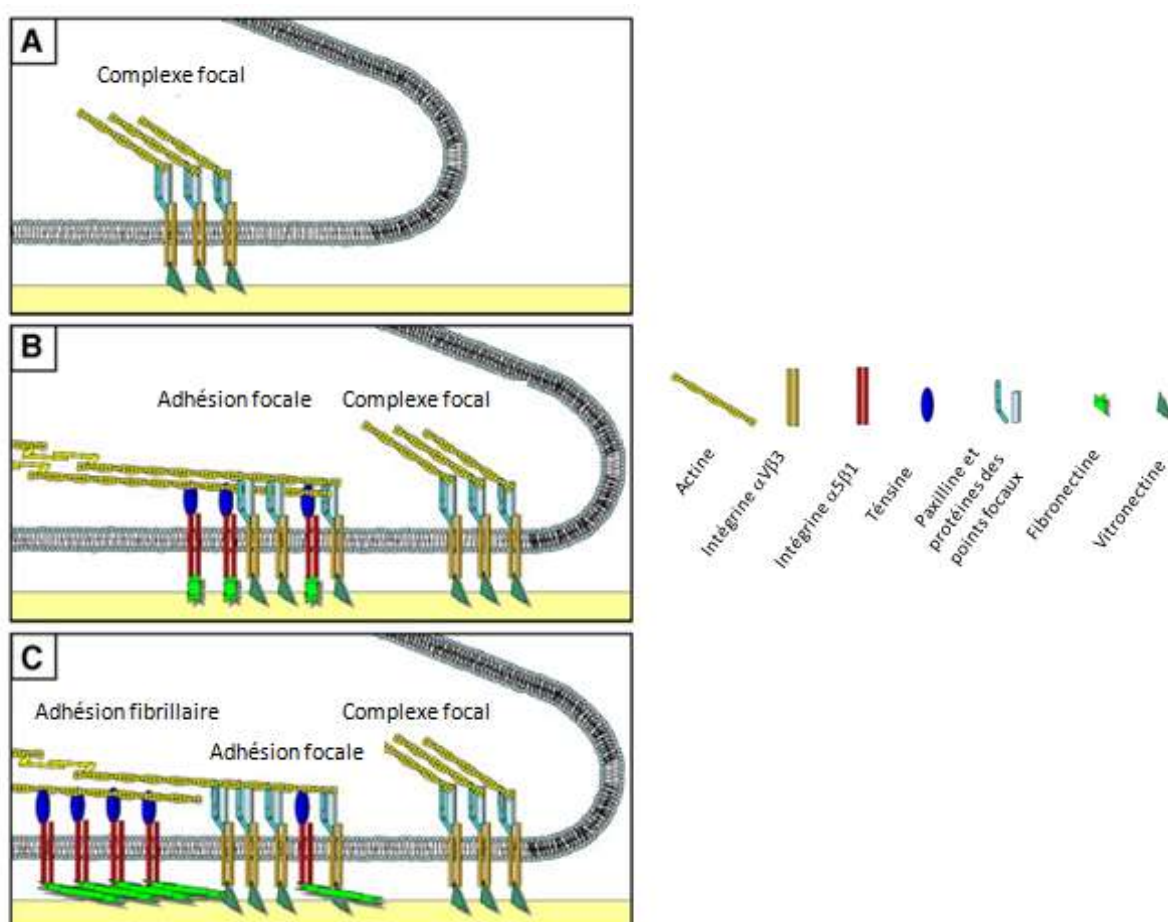
On peut noter que ces modifications des lignées FlnA mutantes engendrent un phénotype plus drastique que les modifications des cellules isolées de souris invalidées pour la FlnA. Cela peut s'expliquer par un défaut de compensation de la FlnA par la FlnB. En effet, les cellules M2 expriment faiblement la FlnB qui ne peut compenser le défaut de FlnA (Jeon et al., 2008). À l'inverse, l'absence de modification phénotypique dans les cellules HT1080 invalidées pour la FlnA ou la FlnB suggère l'existence du phénomène de compensation entre les filamines (Baldassarre et al., 2009). Dans les résultats préliminaires obtenus dans les lignées HT1080 invalidées pour la FlnA, l'étalement cellulaire a été étudié.

À des temps courts d'étalement (3h), l'expression des FlnA mutantes semble diminuer la taille des cellules invalidées pour la FlnA. À l'inverse, la FlnA WT semble augmenter la taille de ces cellules. Ces différences disparaissent avec le temps ce qui suggère le développement d'une compensation de la FlnA par la FlnB. Ce sont des résultats préliminaires qui ne sont pas statistiquement significatifs du fait du nombre réduit d'expérience réalisée. Un moyen d'étudier l'effet de la FlnB dans notre modèle de mélanome serait de surexprimer la FlnB dans les lignées exprimant les FlnA WT et mutantes afin d'étudier l'adhésion et la migration cellulaire.

Des travaux précédents ont établi que la FlnA doit être exprimée de façon proportionnelle à l'actine pour permettre son organisation en réseau orthogonal. Un excès ou un défaut d'expression de la FlnA provoque des modifications de migration cellulaire (Cunningham et al., 1992). La sélection des clones FlnA mutants a donc été établie avec un rapport FlnA sur actine proche de celui retrouvé dans les cellules M2 réexprimant la FlnA WT (Cellules A7). Le phénotype des lignées exprimant les FlnA mutantes n'est donc pas lié à des rapports FlnA /  $\beta$  actine différents pouvant influencer la migration cellulaire.

Les processus d'étalement, d'adhésion et de migration cellulaire modifiés par les mutations de la FlnA sont régulés par une voie de signalisation commune qui fait intervenir les intégrines (Barczyk et al., 2010). Ces dernières sont des récepteurs d'adhésion essentiels à la transmission des conditions environnementales de la MEC vers l'intérieur des cellules, et inversement de permettre aux cellules d'agir sur à la MEC. Au cours de ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'intégrine  $\beta 1$ , car son expression est majoritaire dans de nombreux types cellulaires et qu'elle interagit au niveau du domaine 21 de la FlnA. Nous avons pu démontrer que les mutations de la FlnA provoquent une dégradation des intégrines  $\beta 1$ . Cependant, l'intégrine  $\beta 1$  n'est pas la seule intégrine à participer aux processus d'adhésion et de migration cellulaire. Ces processus sont régulés par la cinétique de deux hétéro-dimères d'intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$  qui fixent la fibronectine (Régent et al., 2011). Au cours de la migration, l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  est recrutée dans les points focaux précoces à l'avant de la cellule. Elles sont ensuite remplacées par les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  dans les points focaux plus matures dits fibrillaire qui permettent l'assemblage de la fibronectine et la génération de forces de contraction par les cellules (Puklin-Faucher and Sheetz, 2009)(Figure 28). De plus, il a été démontré par Li et al. que la diminution d'expression de l'intégrine  $\beta 3$  induit une augmentation de l'expression d'intégrine  $\beta 1$  essentiel à l'angiogénèse cérébrale (Li et al., 2010). Dans des cellules épithéliales qui n'expriment pas l'intégrines  $\beta 1$ , une augmentation de l'activité des intégrines  $\alpha V\beta 3$  a pu être mise en évidence (Hayashida et al., 2010). Nous pouvons donc supposer que le défaut d'intégrine  $\beta 1$  est compensé par l'expression et

l'activité de l'intégrine  $\beta 3$ . Cette hypothèse semble vérifiée par l'expression élevée en ARNm de l'intégrine  $\beta 3$  dans les lignées exprimant les FlnA mutantes. De plus, les sous unités  $\alpha$  immatures des intégrines s'associent aux sous unités  $\beta$  immatures en excès dans le réticulum endoplasmique ensuite elles sont maturées ensemble dans le golgi avant leur trafic à la membrane (Koivisto et al., 1994). Les données récentes obtenues sur l'expression en ARNm des sous unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  montre une expression plus faible de ces sous unités dans les lignées mutantes qui pourrait déstabiliser le trafic, la maturation ou le maintien à la membrane des intégrines  $\beta 1$ . Ceci sera vérifié par la surexpression de sous unités  $\alpha$  dans les lignées afin d'analyser leur influence sur les fonctions cellulaires ainsi que sur l'expression des intégrine  $\beta 1$  à la membrane.



**Figure 28 : Schéma des différents points focaux liant la MEC et les cellules.** A) Les complexes focaux sont petits et dynamiques majoritairement localisées au niveau du front de migration. B) Les adhésions focales sont plus stables intégrant différents types d'intégrines et s'associent avec les fibres de stress. C) Les adhésions fibrillaires sont les adhésions les plus solides permettant l'assemblage de la fibronectine et les forces de contraction. D'après Chiquet et al., 2009.

En revanche, il a été démontré par Huveneers et al. que l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  ne permet pas l'assemblage de la fibronectine à la surface des cellules lié à son incapacité d'organiser les fibres de stress. Cependant, l'expression plus élevée de l'intégrine  $\alpha V$  permet de compenser en partie le défaut d'assemblage de fibronectine en absence de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par la formation de fibres de fibronectine plus courtes (Huveneers et al., 2008). La compensation par l'intégrine  $\beta 3$  ne semble pas suffisante pour rétablir les propriétés d'adhésion, de migration et d'assemblage de la fibronectine des cellules. Dans de prochaines investigations, nous allons étudier les effets de la réexpression de l'intégrine  $\beta 1$  sur les fonctions cellulaires que sont l'adhésion et la migration. Dans l'étude de Hayashida et al, il a été montré que les intégrines  $\alpha V\beta 3$  permettent une expression plus élevée de collagène I après une stimulation au TGF $\beta$  en absence des intégrines  $\beta 1$ . Ceci suggère que le rapport entre les intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$  est important dans la régulation de la MEC donc ce rapport serait intéressant à investiguer dans les lignées exprimant les FlnA mutantes autant d'un point de vue biochimique que fonctionnel. L'influence des intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$  sera évalué au niveau de leur expression ainsi que leur activité par Western-blot et FACS. Les effets de ces intégrines sur les processus d'adhésion et de migration vont être analysés grâce à des anticorps bloqueurs spécifiques de ces intégrines.

Nous avons montré que la diminution d'expression des intégrines  $\beta 1$  dans les lignées FlnA mutantes ne serait pas due à un défaut de transcription. La diminution des intégrines membranaires pourrait être la conséquence d'une dégradation par différents systèmes protéolytiques (protéasome, lysosome). Récemment, des études ont démontré que la FlnA participe au trafic membranaire et endosomal des protéines transmembranaires. Par exemple, la FlnA permet le recyclage des récepteurs Fc $\gamma$  des immunoglobulines et à la calcitonine. Par contre, son absence induit la dégradation de ces récepteurs dans les lysosomes (Seck et al., 2003; Beekman et al., 2008). De même, une étude récente de Muriel et al. a montré que la FlnA phosphorylée participe aussi au trafic des cavéoles (Muriel et al., 2011). Au niveau des intégrines, il a été démontré dans un modèle de souris invalidé pour la taline que les corps embryoïdes ne sont pas capables d'adhérer ni de se différencier à cause d'une diminution de l'expression des intégrines  $\beta 1$ . Cette diminution est due à la dégradation de l'intégrine  $\beta 1$  en partie par le protéasome. L'effet des mutations de la FlnA sur la stabilité membranaire des intégrines et leur trafic vésiculaire pourrait induire leur dégradation. L'utilisation d'inhibiteurs des voies de dégradation du protéasome (MG132) ou des lysosomes (Chloroquine) nous permettra d'étudier cette dégradation. Il sera également intéressant d'identifier les mécanismes de régulation de la FlnA sur le trafic des intégrines. Dans le but d'étudier l'endocytose des intégrines, des expériences de biotinylation

membranaire ont été réalisées. Cependant, le faible niveau d'expression des intégrines dans les lignées mutantes, qui rend leur détection difficile, ne nous a pas permis d'obtenir des résultats clairs.

Les effets éventuels de la FlnA sur la dégradation ou la stabilité des intégrines suggèrent qu'il existe un lien entre ces deux partenaires.

En effet, les mutations de la FlnA peuvent avoir un effet direct sur l'interaction entre FlnA et les intégrines  $\beta 1$  agissant sur la disponibilité de ces dernières. La liaison entre le domaine 21 de la FlnA et les intégrines sert de « mécano-senseur » des tensions appliquées sur la cellule (D'Addario et al., 2001). Cette liaison est régulée par l'auto-inhibition de la FlnA induite par le repliement des domaines 19 et 21 qui empêche l'accès aux intégrines à leur site d'interaction (Lad et al., 2007; Gehler et al., 2009)(Gehler et al., 2009). Nos travaux démontrent que l'interaction des intégrines  $\beta 1$  avec la FlnA serait maintenue dans les lignées FlnA mutantes. Toutefois, il serait important de vérifier si, en présence de contraintes mécaniques par exemple, les interactions entre ces protéines sont modifiées.

L'effet des mutations de la FlnA sur les intégrines peut également être indirect. L'interaction indirecte se réalise par l'intermédiaire de protéines partenaires de la FlnA dont deux sont particulièrement intéressantes, car elles interagissent dans la région de la FlnA où sont localisées les mutations associées à la XMVD.

- La vimentine qui permet le trafic des intégrines sur les filaments intermédiaires (Kim et al., 2010).
- La GTPases R-Ras qui est impliquée, quant à elle, dans le trafic vésiculaire et dans le recyclage des intégrines. (Gawecka et al., 2010)

Les mutations de la FlnA pourraient perturber la régulation des intégrines *via* ces deux protéines. Dans de prochaines investigations, le rôle de ces protéines partenaires sur la diminution des intégrines sera étudié dans des lignées mutantes.

### **3) Les conséquences des interactions entre la FlnA et les intégrines sur la physiopathologie des valvulopathies**

Dans les paragraphes suivants, les conséquences de la diminution des intégrines  $\beta 1$  sur la physiopathologie des valvulopathies ont été discutées selon deux parties. Dans un premier temps, l'impact de la diminution des intégrines peut avoir un effet sur la réponse au stress mécanique des CIV au niveau des points focaux et de la compaction de la MEC. Dans un deuxième temps cette diminution des intégrines peut être lié à une augmentation d'endocytose et de dégradation pouvant réguler les composants de la MEC. La diminution

des intégrines dans les lignées exprimant les FlnA mutantes pourraient apporter un début de réponse aux processus physiopathologiques des valvulopathies.

Dans le contexte des valves cardiaques, les CIV subissent un stress mécanique important au cours de la contraction du cœur. Les forces imposées par le flux sanguin sur des valves ou lors de leur fermeture induisent une déformation des CIV qui modifie leur attachement avec la MEC. L'étude de Latif et al. sur des valves humaines a permis de déterminer le profil d'expression des molécules d'adhésion à la surface de CIV. Cette étude montre que la sous unité  $\beta 1$  des intégrines est exprimée de façon prédominante alors que les sous unités  $\beta 3$  et  $\beta 4$  ne sont pas exprimées dans les valves. Les sous unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et  $\alpha 5$  sont fortement exprimées contrairement aux chaînes  $\alpha 6$  et  $\alpha V$  (Latif et al., 2005).

Il a été démontré que la FlnA joue un rôle de "mécano-protection" dans les cellules. Lors d'un stress mécanique, la FlnA est recrutée par les intégrines dans les points focaux qui permet l'adaptation de la forme des cellules et de leur attachement à la MEC (Glogauer et al., 1998; D'Addario et al., 2001)(D'Addario et al., 2001). Dans ces mêmes conditions, l'interaction de la FlnA avec les intégrines est facilitée par les déformations du réseau d'actine ce qui permet la libération de FilGAP. Cette GAP de Rac induit l'inactivation de la voie Rac qui diminue la formation de lamellipodes alors que les intégrines activent l'adhésion cellulaire (Ehrlicher et al., 2011). L'auto-inhibition de la FlnA au niveau du site d'interaction des intégrines est également régulée par les forces mécaniques (Lad et al., 2007) Ainsi, la diminution des intégrines  $\beta 1$  associée aux mutations de la FlnA provoquerait une modification de la résistance au stress mécanique par un défaut de réarrangement du cytosquelette d'actine des CIV. Dans ce contexte, l'analyse des effets du stress mécanique dans les lignées stables exprimant les FlnA WT et mutantes devrait-nous permettre de vérifier cette hypothèse. Un tel stress mécanique peut être généré grâce à un appareil FlexCell qui induit des tensions cycliques similaires à celles retrouvées au cours de la contraction cardiaque. Une autre approche pour produire un stress mécanique est basée sur l'utilisation de billes magnétiques couplées à des composants de la MEC. Une fois fixées aux cellules, les billes sont attirées par un aimant permettant d'appliquer spécifiquement des tensions sur certaines intégrines en fonction du ligand couplé.

Dans les conditions d'un stress mécanique, les cellules forment des points focaux plus matures par l'intermédiaire du regroupement d'intégrines afin d'augmenter leur interaction à la MEC (Chiquet et al., 2009). Dans ce cas, les intégrines existent sous différents états, soit un état relâché non lié à leur ligand, un état lié sans tensions et un état

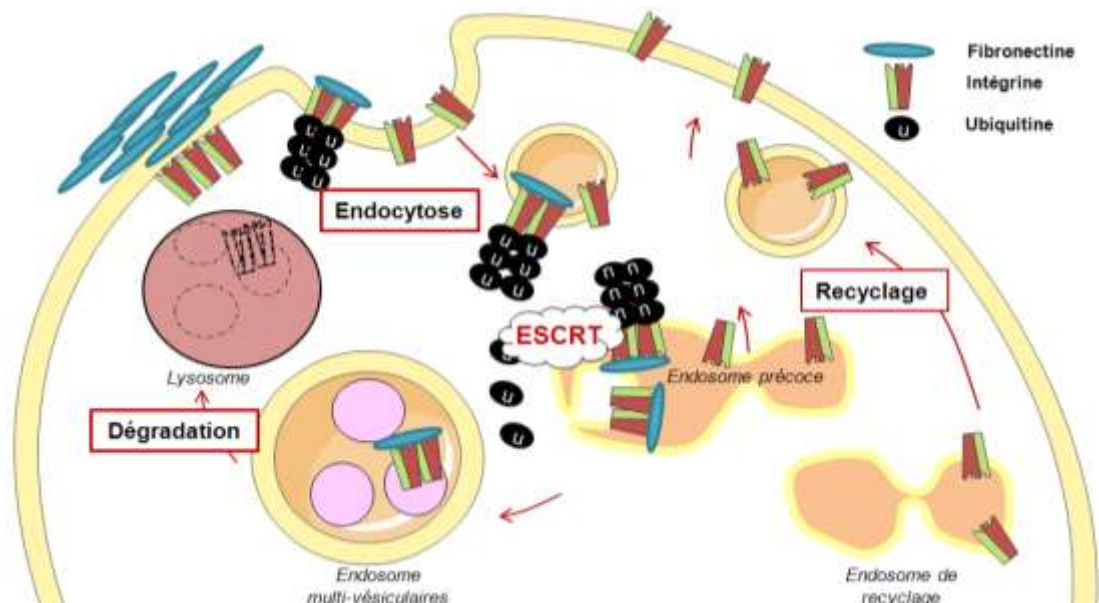
lié nécessitant des tensions. Ce dernier état permet de former des adhésions focales solides associées à la machinerie d'actine et de myosine II ainsi que l'activation de protéines tels que la FAK, la taline et la vinculine (Friedland et al., 2009). La diminution des intégrines  $\beta 1$  dans les CIV pourrait donc modifier la régulation des points focaux provoquant une réponse inappropriée aux contraintes mécaniques. Une étude de Kong et al. a démontré que l'application de force sur les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  prolonge la fixation avec la fibronectine stabilisant les adhésions focales (Kong et al., 2009). En plus du rôle essentiel de la solidité des points focaux au cours de l'application de tension, la rigidité du substrat agit sur la taille des points focaux matures (Régent et al., 2011). Il serait intéressant d'étudier les effets des mutations de la FlnA sur la maturation de ces points focaux en utilisant différentes rigidités de substrats ou encore au cours de l'application de différentes forces mécaniques.

Le regroupement de ces intégrines permet le recrutement de protéines adaptatrices qui permettent la phosphorylation des protéines du complexe d'adhésion (taline ou paxilline) (Wozniak et al., 2004). Les intégrines  $\alpha V\beta 3$  sont associées à des points focaux rapidement dissociés et liés à des signalisations qui font intervenir la taline et les kinases FAK et de la famille src. Dans le cas des intégrines  $\alpha 5\beta 1$ , elles sont associées à des points focaux rigides et matures liées à la tensine et régulé par les forces mécaniques. Les protéines des points focaux matures ainsi formés vont fixer les fibres de stress et la machinerie acto-myosine grâce à l'activité de la GTPase RhoA (Chiquet et al., 2009). Les intégrines permettent donc la transduction de signaux intracellulaires par l'activation de kinases tels que FAK, src ou PI3K, mais également de GTPases telles que RhoA ou R-Ras (Larsen et al., 2006). À l'aide de ces cascades de signalisation, les cellules sont capables d'induire des tensions par la réorganisation du cytosquelette d'actine. Une étude de Butcher et al. a montré que les cellules mésenchymateuses sous l'action de la périostine sont capables de condenser les gels de collagène de type I grâce aux intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\beta 1$  en agissant sur la voie RhoA/PI3K (Butcher et al., 2007). L'expression des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  dans des lignées cancéreuses permet la formation de fibres de stress, de points focaux matures ainsi que d'induire des forces de traction dans des gels de collagènes (Mierke et al., 2011). Il a également été montré que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  se fixe à la fibronectine soluble qui active la voie RhoA/ROCK et apporte une activité contractile aux cellules par la formation de longues fibres de stress (Huveneers et al., 2008). Ces tensions favorisent la libération des sites d'assemblage de la fibronectine qui induit la formation de fibres de fibronectine alignées sur les fibres de stress. L'activation des GTPases RhoA et Rac dans les lignées FlnA mutantes est actuellement en cours d'étude. D'après les résultats préliminaires, il semblerait que la voie RhoA soit augmentée et la voie Rac diminuée dans les lignées mutantes. Les variations

d'activité RhoA ne corrèlent pas avec la diminution des intégrines mais, il faut prendre en compte que la FlnA régule fortement les GTPases pouvant modifier la balance d'activation. Dans la suite du projet, l'application d'activateurs ou d'inhibiteurs des GTPases permettront d'identifier des modifications d'activités GTPasiques RhoA et Rac dans les lignées mutantes. Ces résultats permettront d'identifier si les modifications d'activité GTPasique sont liées aux mutations de la FlnA ou à la diminution des intégrines. De plus, des études de compaction de gel de collagène de type I vont être réalisés afin d'étudier les capacités contractiles de ces cellules.

Le mécanisme de dégradation et de recyclage des intégrines est indispensable au renouvellement de la MEC et la motilité cellulaire (Figure 29). En effet, la cellule en migration nécessite des cycles d'endocytose et exocytose rapides des intégrines permettant le remodelage et la maturation des points focaux d'adhésion. De même, l'internalisation des intégrines activées par leurs ligands permet leur dégradation favorisant le remodelage de la MEC (Wickström and Fässler, 2011). Ces mécanismes d'endocytose ou exocytose sont régulés par des GTPases monomériques de la famille des Rab, Arf6 et les microtubules. L'endocytose des intégrines impliquée dans le remodelage de la MEC passe majoritairement par une voie dépendante des cavéoles. Dans cette voie, il a été démontré que la fixation de la PKC $\alpha$  induit l'internalisation des intégrines  $\beta 1$  vers les endosomes précoces. À ce niveau, une petite portion des intégrines endocytées, correspondant celles fixées à leur ligand, est dirigée dans les endosomes tardifs puis dans les lysosomes pour être dégradée ce qui permet le renouvellement des composantes de la MEC (Caswell et al., 2009). La majorité des intégrines est recyclée dans un compartiment péri-nucléaire dépendant de Rab4 ce qui permet la formation de nouveaux points focaux (Lobert and Stenmark, 2010). Les intégrines sont continuellement en mouvement dans les compartiments cellulaires permettant leur disponibilité rapide pour l'adhésion ou la migration. Une étude de White et al. a montré que la voie de recyclage des intégrines est dépendante de l'hétérodimère  $\alpha\beta$ . Les intégrines  $\alpha V\beta 3$  sont rapidement recyclées par la voie dépendante de Rab4 alors que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est dépendante de la voie Rab11. Ces deux voies de recyclage des intégrines influencent la migration soit de façon orientée soit de façon aléatoire (White et al., 2007).





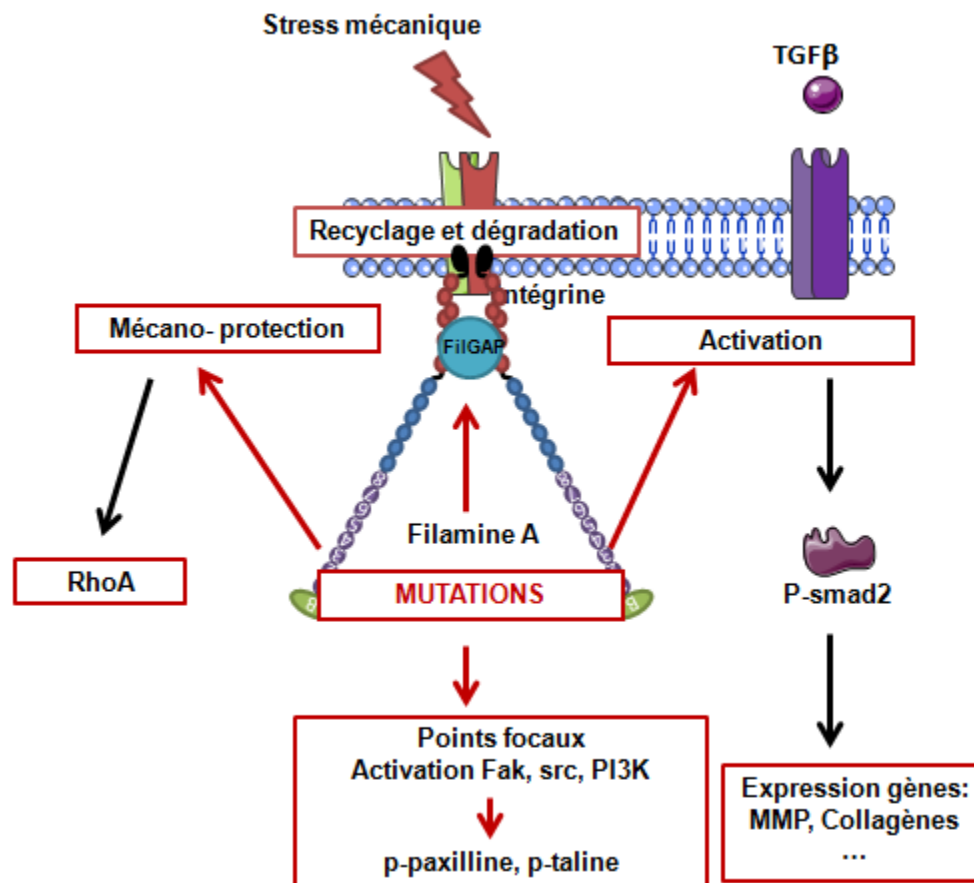
**Figure 29 : Le trafic des intégrines.** Dégradation et recyclage des intégrines. L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est ubiquitinylée quand elle est fixée à la fibronectine, ce qui permet de sortir des endosomes multi-vésiculaires par le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). D'après Lobert et al., 2010.

Dans le cas des valvulopathies, le remodelage de la MEC se fait par une dégradation de ses composants par les MMP ou par leur internalisation dans les cellules. Un tel mécanisme a été démontré pour la première fois en 2008, par Shi et al. dans des myofibroblastes. Leurs travaux montrent que le renouvellement de la matrice de fibronectine s'effectue par l'internalisation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  activée, dépendant des cavéolines (Shi and Sottile, 2008). La fixation de la fibronectine sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  induit son ubiquitylation. Les complexes sont alors endocytés dans les endosomes multi-vésiculaires. Lorsqu'ils sont exportés dans la lumière de ces dernières par la machinerie ESCRT, ils s'engagent dans la voie de dégradation par les lysosomes. Les intégrines permettraient alors le remodelage et la dégradation de la matrice en parallèle des MMP (Clark et al., 2005). Une étude de Lobert et al. a démontré que la dégradation de la matrice de fibronectine se fait par les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  ubiquitinylées (Lobert et al., 2010). Une autre étude à partir de souris invalidées pour la taline, il a démontré que les intégrines  $\beta 1$  sont dégradées en partie par la voie du protéasome induisant un défaut d'adhésion des corps embryoides ainsi que des défauts de différenciation épithéliale (Liu et al., 2011). Nous avons montré que la diminution d'expression des intégrines  $\beta 1$  induisait une diminution de l'assemblage de la matrice de fibronectine. Dans les CIV, la dérégulation du trafic ou de la dégradation des intégrines par les mutations de la FlnA modifierait la régulation de la MEC. Dans la poursuite du projet, la

capacité des cellules à dégrader et à internaliser les composants de la MEC sera évaluée. Cette étude sera réalisée par isolement des compartiments endosomaux après centrifugation différentielle associée à un gradient de sucrose qui permettent d'identifier la présence des composants de la MEC dans ces compartiments par Western-blot.

D'autres études ont montrées que les intégrines s'associent à des MMP membranaires tels que la MT1-MMP-1 qui permettent de localiser spécifiquement cette MT1-MMP-1 dans un gel de collagène et induire l'activation de la MMP-2 (Sakai et al., 2011). L'activation des intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$  par la fibronectine ou la vitronectine induisent l'expression de la MMP-9 par l'activation de la voie Akt/ERK/JNK dans des cellules épithéliales (Jin et al., 2011). Les modifications d'expression des intégrines par les mutations de la FlnA pourraient agir sur la localisation ou l'activation des MMP essentielles à la dégradation de la MEC. Ces variations des MMP seront évaluées dans les lignées exprimant les FlnA mutantes ou WT par zymographie et western blot en 2D mais également en 3D.

Les intégrines modulent également les voies de signalisations du TGF $\beta$  et de la sérotonine qui sont aussi importantes dans les mécanismes physiopathologiques des valvulopathies (Jian et al., 2002; Walker et al., 2004). Ces aspects seront détaillés dans la discussion générale.



**Figure 30 : Schéma des voies potentiellement impliquées par les mutations de la FlnA.**

Les mutations peuvent agir au niveau de la mécano-protection, du recyclage et dégradation des intégrines. Elles sont impliquées dans les voies de signalisation des points focaux et des facteurs de croissance.

En conclusion, ces travaux ont identifié la voie des intégrines possiblement impliquée dans les processus physiopathologiques de la XMVD, via l'interaction intégrine – FlnA (Figure 30). Nous pouvons suggérer que l'effet des mutations de la FlnA modifiait le mécanisme de « mécano-protection » et la réponse des CIV aux chemokines. Ces hypothèses sur l'effet des mutations de la FlnA devront être testées par des études sur la compaction de gel de collagènes par les cellules, leur réaction au stress mécanique et l'étude des voies de signalisation comme celles du TGFβ ou de la sérotonine.



**IV Partie II**  
**Effets de mutations de la filamine A sur**  
**l'interaction avec de nouvelles protéines**  
**partenaires**



## **IV.1 Introduction**

A l'heure actuelle, de nombreuses protéines (>60) interagissant au niveau des domaines 20 à 23 et du domaine de dimérisation (domaine 24) de la FlnA ont été identifiées (Nakamura et al., 2011). Or, la localisation des mutations de la FlnA associées à la XMVD est particulièrement restreinte aux domaines 1, 4, 5, 6 et 7 (Kyndt et al., 2007; Lardeux et al., 2011)(Kyndt et al., 2007). Dans cette région, peu de protéines partenaires ont été découvertes. Ainsi, la GTPase R-Ras a été identifiée comme interagissant avec le domaine 3 de la FlnA (Figure 12). Cette GTPase participe à la régulation des intégrines et agit sur les processus de migration cellulaire et de régulation de la MEC (Gawecka et al., 2010). D'autres protéines partenaires comme la vimentine et la PKC $\epsilon$  interagissent au niveau des premiers domaines de la FlnA. Il a été démontré que la FlnA participe à la phosphorylation de la vimentine. Cette phosphorylation est favorisée par le rapprochement de la PKC $\epsilon$  induisant le trafic vésiculaire des intégrines sur les filaments intermédiaires (Kim et al., 2010).

Le but de cette étude est d'identifier de nouvelles protéines partenaires qui interagissent au niveau des 8 premiers domaines de la FlnA. Notre hypothèse est que les mutations pourraient induire une modification d'interaction avec l'une de ces protéines partenaires et participer aussi aux processus physiopathologiques

Afin d'identifier ces nouvelles protéines partenaires, nous avons utilisé la technique de double hybride en levure qui permet l'identification des interactions protéine-protéine. Dans notre démarche, nous avons utilisé des constructions de la FlnA contenant ses 8 premiers domaines fusionnés au domaine Hinge2 et le domaine de dimérisation (domaine 24). Ce dernier domaine permet d'obtenir des constructions de FlnA qui se dimérisent (Nakamura et al., 2007). Les domaines 9 à 23 et le domaine de liaison à l'actine ont été retirés pour éviter de récupérer des protéines partenaires déjà connues et pour limiter les tailles des protéines exprimées dans les levures, car la FlnA entière fait 280 kDa.

Le screening par la technique de double hybride a été réalisée par l'entreprise "Hybrigenics". Ce screening a été réalisé contre une banque de placenta humain en utilisant comme appât la construction FlnA WT 1-8/24. Nous avons obtenu plusieurs nouvelles protéines partenaires.

Dans cette partie du travail, nous avons cherché à valider les résultats d'interaction, par double hybride, en utilisant les domaines d'interaction spécifiques des protéines identifiées dans la première analyse de double hybride. Des constructions de FlnA avec les mutations ont également été utilisées dans le but d'étudier l'effet de ces mutations sur l'interaction avec les protéines partenaires identifiées.

## **IV.2 Matériel et méthode : Double Hybride**

Le principe du double hybride est d'identifier les interactions directes entre protéines. Cette technique utilise la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel. Ce dernier est composé d'un domaine de liaison à l'acide désoxyribonucléique (ADN) et d'un domaine d'activation physiquement séparé. Le premier domaine permet la fixation à une séquence promotrice spécifique et le deuxième domaine facilite l'assemblage du complexe transcriptionnel. La protéine d'intérêt, dont l'interaction va être testée, est fusionnée avec l'un des deux domaines. De même, l'autre protéine sera fusionnée avec le deuxième domaine. Si les deux protéines de fusion interagissent, elles permettent la reconstitution du facteur de transcription et donc la transcription de gènes rapporteurs.

### ***IV.2.1 La souche de levure***

La souche de levure utilisée est la souche de *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A contenant trois gènes rapporteurs sous le contrôle de 3 promoteurs GAL4 différents (GAL1-HIS3, GAL2-ADE2 et GAL7-LacZ) réduisant le nombre de faux positifs. Le génotype (MAT a trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal-4 $\Delta$  gal-80 $\Delta$  LYS2 ::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2 ::GAL7-LACZ) de cette souche confère une auxotrophie pour la synthèse de tryptophane, de leucine, d'histidine, d'adénine et de  $\beta$ -galactosidase.

### ***IV.2.2 Les constructions plasmidiques***

Le vecteur plasmidique pPC97 permet le clonage des gènes d'intérêt en aval de la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN (DNA binding domain (DBD)) du facteur de transcription Gal4. Ce vecteur apporte le gène codant pour l'enzyme nécessaire à la synthèse de la leucine. Le vecteur plasmidique pPC86 permet le clonage des gènes d'intérêt en aval de la séquence codant pour le domaine d'activation de Gal4. Ce vecteur apporte, quant à lui, le gène codant pour l'enzyme nécessaire à la synthèse de tryptophane.

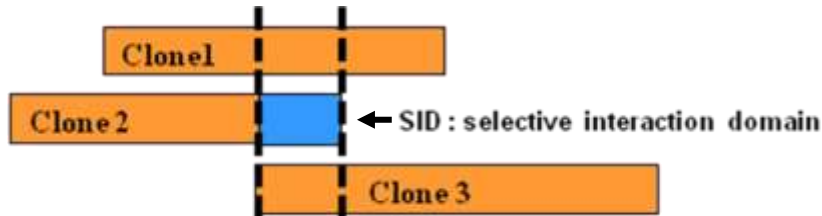
### ***IV.2.3 Les appâts et les proies***

Les protéines appâts, qui sont les protéines pour lesquelles les partenaires sont recherchées, correspondent aux 8 premiers domaines ainsi que le domaine de dimérisation de FlnA WT ou mutantes fusionnée au domaine de liaison à l'ADN. Les protéines proies, quant à elles, correspondent aux domaines spécifiques d'interaction (SID) des protéines identifiées dans le double hybride réalisé par la société "Hybrigenics". Les SID sont les domaines théoriques minimaux des protéines partenaires. Ces SID sont déterminés à partir des différentes zones d'interaction identifiées dans les différents clones d'une même



protéine partenaire par la "screen Hybrigenics". Le SID correspond à la partie de la protéine partenaire définie par (Figure 31) :

- la zone d'interaction débutant le plus tardivement : définition du début du SID.
- la zone d'interaction se terminant le plus précocement : définition de la fin du SID.



**Figure 31 : Détermination du SID en fonction des fragments d'une même protéine partenaire interagissant avec la protéine appât.**

Les SID déterminés pour les différentes protéines sont résumés dans ce tableau 5:

	SID (position)	Taille SID	Taille totale
Actinine 4	259 à 344	85	911
Vinculine	750 à 1003	253	1066
FxBox034	269 à 466	197	711
PTPN12	586 à 753	167	780
LL5 $\beta$	329 à 430	101	1210

**Tableau 5: Tableau des SID avec la position dans la protéine, le nombre d'acides aminés (AA) qui les composent et la taille des protéines entières.**

Nous avons utilisé un couple de protéines contrôles dont l'interaction a été démontrée. Ces protéines sont CT7 comme protéine appât (MAGEC1) qui est un antigène de mélanome et PICK1 comme protéine proie dont le rôle est de lier et d'organiser la localisation subcellulaire de certaines protéines membranaires. Des témoins négatifs ont été réalisés en associant les filamines avec les partenaires Pick ou CT7.

#### **IV.2.4 Les milieux de culture**

Les milieux liquides ont été stérilisés à l'autoclave et 2 % d'agar (Difco) ont été ajoutés au milieu pour obtenir les milieux gélosés.

- Le milieu Yeast Peptone Dextrose (YPD) est le milieu de croissance complet des levures auxotrophe ou non contenant 1 % d'extrait de levure, 2 % de peptones et 2 % de (D+)-glucose.
- Le milieu Yeast Nitrogen Base (YNB) est le milieu minimum utilisé pour la sélection des levures qui ne contient pas les acides aminés essentiels. Ce milieu est composé de 0.17 % de Yeast nitrogen base (sans acides aminés ni d'ammonium), 0.5 % de

sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et 2 % de (D+)-glucose. Il a été complété en fonction des tests effectués pour obtenir des concentrations finales de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'adénine, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'histidine, 100 $\text{mg}/\mu\text{L}$  de leucine et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tryptophane.

Les levures ont été inoculées dans les milieux précédemment décrits et incubées à 30°C en aérobie sous agitation à 220 rpm pour les cultures liquides.

#### ***IV.2.5 La transformation des levures***

Les levures ont été transformées par la méthode d'acétate de lithium qui fragilise les parois grâce à l'action alcaline du lithium. Une pré-culture de levures transformées ou non a été réalisée toute la nuit à 30°C sous agitation. La culture a été diluée pour obtenir une Densité Optique (DO) à 600nm comprise entre 0.2 et 0.3 puis incubée 3h à 30°C. Les levures ont été centrifugées 10 min à 2000rpm à 4°C, rincées à l'eau stérile puis recentrifugées. Pendant ce temps, les solutions d'acétate de lithium LiAc/TE/PEG et LiAc/TE/H<sub>2</sub>O préparées avec les proportions 1/1/8 pour obtenir au final 100mM de LiAc (pH : 7.5), TE : 10mM de tris et 1mM EDTA (pH : 7.5) et 40 % de PEG. Le culot de levure est resuspendu dans 500 $\mu\text{l}$  de solution LiAc/TE/H<sub>2</sub>O. L'ADN de sperme de saumon (ADN carrier) a été chauffé 2 min pour dénaturer l'ADN et augmenter l'efficacité de l'ADN entrainant. Dans un tube, le mélange des levures et de l'ADN a été réalisé dans l'ordre suivant : 5 $\mu\text{g}$  d'ADN transformant, 8 $\mu\text{l}$  d'ADN carrier, 100 $\mu\text{l}$  de levures et 1.2 mL de la solution LiAc/TE/PEG. Les tubes ont été mélangés et incubés 30 min à 30°C. Dans cette transformation, les ions  $\text{Li}^+$  servent à perméabiliser les parois et le PEG permet de « concentrer » l'ADN à la surface des levures. Un choc thermique a été réalisé en plaçant les levures 15 min à 42°C puis rapidement dans la glace pendant 2 min. Les levures ont ensuite été centrifugées 5 min à 1500g, la solution d'acétate de lithium a été enlevée et les levures ont été reprises dans 100 $\mu\text{l}$  de milieu liquide YNB. 10 à 50  $\mu\text{l}$  de transformation ont été étalées par des billes de verre stériles sur des milieux géloses sélectives ou non selon les tests. Les géloses ont été incubées à 30°C pendant 2 à 7 jours.

#### ***IV.2.6 Les tests d'auxotrophie***

Une fois, les levures transformées avec le plasmide codant pour la protéine appât, des tests d'auxotrophie ont été réalisés sur un milieu sélectif YNB dépourvu en leucine (YNB L-) car le plasmide pPC97 contient le gène codant une enzyme participant à la synthèse de la leucine. De même, les levures transformées avec le plasmide codant pour la protéine proie ont été placées sur un milieu sélectif YNB dépourvu en tryptophane (YNB W-) car le plasmide pPC89 contient le gène codant une enzyme participant à la synthèse du tryptophane. Les levures contenant les plasmides codant pour les protéines appâts ont été

alors co-transformés avec les plasmides codant pour les protéines proies puis placées sur un milieu sans tryptophane. Et inversement, les levures contenant les plasmides codant pour les protéines proies ont été co-transformées avec les plasmides codant pour les protéines appâts puis placées sur un milieu sans leucine. Pour obtenir des levures contenant les deux protéines appât et proie en même temps, les levures co-transformées sont placées sur un milieu dépourvu en leucine et tryptophane (YNB LW-)(Tableau 6). Les colonies de levures obtenues sur les géloses YNB LW- ont été remises en culture à 30°C dans un milieu YNB liquide.

Ensuite les suspensions de levures contenant les deux plasmides ont été diluées au 1/10. Des dépôts de 10 $\mu$ l de la solution mère et de la dilution 1/10 de levures sont mis en culture sur un milieu sélectif YNB LW- et également dépourvu en histidine (YNB LWH-). Cette dernière restriction pour l'histidine permet d'identifier l'interaction entre les deux protéines hybrides. Le facteur de transcription Gal4 ainsi reconstitué est nécessaire à la transcription du gène rapporteur de l'enzyme nécessaire à la synthèse d'histidine. De plus, les précédents dépôts ont été dupliqués sur un milieu YNBLW- pour servir de contrôle. Ces dépôts contrôles permettent de suivre le maintien des deux plasmides dans les levures. Si les levures ne poussent pas sur un milieu sélectif pour l'histidine, nous pouvons ainsi confirmer que le défaut d'interaction n'est pas dû à un défaut d'expression d'un des deux plasmides.

Constructions	Test d'expression Auxotrophie	Test d'interaction
pPC97 FlnA 1-8/24 WT G288R P637Q	LEU	HIS
pPC89 "SID" des protéines partenaires	TRP	

**Tableau 6 : Restrictions d'acides aminés pour les tests d'auxotrophie et d'interaction.**

Le tableau représente les restrictions d'acides aminés essentiels, pouvant être synthétisés après l'expression des plasmides ou par l'activation de la transcription de gènes codants pour des enzymes essentiels à leur synthèse.

#### ***IV.2.7 Le test colorimétrique : $\beta$ -galactosidase***

Afin de quantifier les interactions protéiques identifiées précédemment, un test colorimétrique est réalisé à partir des levures ayant poussées sur le milieu YNB LWH- indiquant une interaction entre les deux protéines hybrides. Ces levures sont remises en pré-culture dans du milieu YNB LW- toute une nuit à 30°C sous agitation. La DO a été mesurée à 600nm et doit être entre 0.5 et 1. Les levures ont été centrifugées 5 min à 2500rpm à 4°C

et reprises dans un tampon Z-Buffer composé de 60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 40mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, de 10mM de KCl, de 1mM sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) apportant les ions Mg<sup>2+</sup> nécessaires à l'activité de la β-galactosidase et 50mM de β mércaptoéthanol (pH : 7) stabilisant l'enzyme. La mesure de la DO a été réalisée pour chaque culture de levures qui a été reprise dans le tampon z-Buffer qui correspond alors à la densité cellulaire. Puis les levures sont diluées au 10<sup>ème</sup> dans du tampon z-Buffer. Deux gouttes de chloroforme et 0.1 % sodium dodécyl sulfate (SDS) ont également été ajoutés puis mélangés avec les levures puis incubés 10min à 30°C permettant la libération de l'enzyme. Le début du test est réalisé par l'ajout de 200μl du substrat chromogène Ortho-nitrophényl-β-galactoside (ONPG) à 4mg/mL et incubé à 30°C (heure de début de réaction). L'ONPG se dégrade en orthonitrophénol (ONP) de couleur jaune. La réaction est arrêtée à l'apparition de la coloration jaune par 500μl de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 1M (Heure de fin de réaction) qui inactive l'enzyme par son pH élevé. Les levures ont été centrifugées 5 min à 1100g et la DO a été mesurée à 420nm donnant l'absorbance de l'ONP et des débris cellulaires et à 595 nm donnant uniquement les débris cellulaires. Les unités de β-gal sont obtenues à partir de la formule mathématique suivante utilisant les mesures de DO à différentes longueurs d'onde et à différents temps. Les résultats ont été corrigés par les valeurs d'activité β-gal obtenues dans la condition contrôle de levures doublement transformées avec les plasmides codant pour les protéines Pick et la FlnA WT.

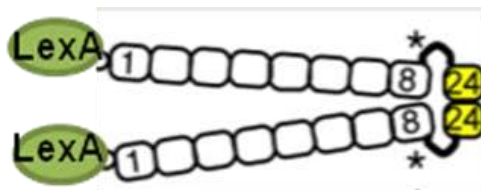
$$U_{\beta gal} = \frac{1000 (DO_{420nm} - 1,75 * DO_{595nm})}{v * t * DO_{600nm}}$$

- DO<sub>420nm</sub> : densité optique mesurée à 420nm en fin de réaction enzymatique ; représente l'absorbance de l'ONP présent et des débris cellulaires restants dans le surnageant.
- DO<sub>595nm</sub> : densité optique mesurée à 595nm ; reflète l'absorbance due uniquement aux débris cellulaires présents.
- DO<sub>600nm</sub> : densité optique mesurée à 600nm qui correspond à la densité cellulaire au début de la manipulation.
- t : représente le temps de réaction (min), c'est à dire le temps écoulé entre l'ajout de l'ONPG et l'ajout de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> au milieu réactionnel.
- v : représente le volume (mL) de culture cellulaire utilisé pour le dosage.

### IV.3 Résultats

#### IV.3.1 Identification de protéines partenaires de la FlnA WT par double hybride

Afin d'identifier les nouvelles protéines partenaires de la FlnA au niveau de la région où sont situées les mutations associées à la XMVD, une étude par double hybride a été menée par la société « Hybrigenics ». Dans cette étude, une construction de la FlnA contenant le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription LexA, les 8 premiers domaines, le domaine « Hinge » 2 et enfin le domaine de dimérisation (24<sup>ème</sup> domaine) a servi d'appât (Figure 32). Cette construction de la FlnA permet de maintenir sa stœchiométrie ainsi que son organisation en dimère *in vivo*. Elle conserve une structure flexible grâce au domaine « Hinge » 2 (van der Flier and Sonnenberg, 2001b). Par contre, les domaines 9 à 23 et le domaine de liaison à l'actine ont été enlevés pour supprimer les nombreuses interactions protéiques connues avec ces domaines. De plus, l'utilisation d'une forme plus petite de la filamine A permet une expression plus facile dans les levures. Le screening a alors été réalisé en utilisant une banque de placenta humain.



**Figure 32 : Représentation schématique de la construction de la FlnA utilisée comme appât pour le double hybride** (Nakamura et al., 2007). Cet appât est composé du domaine de liaison à l'ADN de LexA, les 8 premiers domaines de la FlnA, du domaine « Hinge2 » et du domaine de dimérisation.

De nouvelles protéines partenaires ont été identifiées par cette technique de double hybride. Nous avons retenu les 6 principales protéines qui obtenaient les meilleurs scores correspondant aux nombres de clones retrouvés pour une même protéine (Tableau 7). Parmi les 6 protéines, deux protéines, la vinculine et la PTPN12 ont été retenues pour leur rôle intéressant dans l'organisation du réseau d'actine et des points focaux d'adhésion.

Les protéines sélectionnées sont les suivantes (Tableau 7) :

<b>Protéines partenaires détectées par le screen en double hybride</b>		
<b>Nom</b>	<b>Fonction</b>	<b>nb de clones</b>
Actinine 1	Organisation du réseau d'actine	7
Actinine 4	Organisation du réseau d'actine	82
Vinculine	Organisation des points focaux d'adhésion (intégrines/actine)	1
PTPN12	Tyrosine phosphatase	1
PHLBD2/LL5 $\beta$	Protéine avec un domaine d'homologie avec la Pleckstrine	10
FxBox 034	Ubiquitinylation des protéines dans le protéasome	10

**Tableau 7 : Protéines partenaires de la filamine A WT identifiées** par Hybrigenics

Les  $\alpha$ -actinines-1 et -4 sont des protéines de structure du cytosquelette d'actine comprenant un domaine de liaison à l'actine et fonctionnent en dimères. Ces deux isoformes sont exprimées dans les cellules non musculaires, tels que les fibroblastes, et appartiennent à la super famille des spectrines. De plus, elles permettent la fixation du réseau d'actine aux points focaux d'adhésion et aux protéines transmembranaires (Michaud et al., 2009).

La vinculine est une protéine des points focaux d'adhésion qui permet l'interaction entre le cytosquelette d'actine et les intégrines. Elle fait partie d'un complexe d'adhésion faisant intervenir l' $\alpha$ -actinine et la taline (Dumbauld et al., 2009).

La PTPN12 (ou PTP-PEST, PTP contenant un motif PEST (Proline, acide Glutamique, Sérine, Thréonine)) est une tyrosine phosphatase. Cette protéine induit la déphosphorylation de molécules impliquées dans le recyclage des points focaux d'adhésion comme la paxilline. Elle régule également les processus d'adhésion et de migration cellulaire par la régulation des GTPases agissant sur le cytosquelette d'actine (Jamieson et al., 2005).

La PHLDB2 (Pleckstrin Homology-Like Domain, family B, member 2) ou LL5 $\beta$  est une protéine avec un domaine d'homologie à la pleckstrine. Ce domaine permet la transduction de signaux et l'organisation du cytosquelette par l'interaction avec les phosphoinositols membranaires (Paranavitane et al., 2003).

Enfin la FxBox 034 est composée d'un domaine F Box formant un complexe Skp1 Culline Fbox (SCF) avec la S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1), la culline agissant

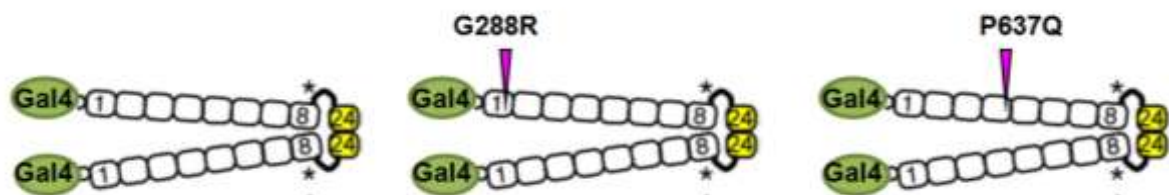
comme une ubiquitine ligase E3 multi-protéique. Ce complexe permet l'ubiquitinylation des protéines et leur dégradation par le protéasome (Yoshida et al., 2011a).

Nous pouvons remarquer que les actinines, la vinculine et la PTPN12 sont des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et la migration par la régulation des points focaux d'adhésion. De même, la LL5 $\beta$  est présente au niveau membranaire et est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Par contre, la FxBox 034 agit sur la voie de dégradation des protéines qui est, a priori, assez éloignée des processus d'organisation du réseau d'actine. Néanmoins, le rôle de la FxBox034 est intéressant à étudier dans le cadre d'une perte d'interaction avec la FlnA.

#### **IV.3.2 Modifications d'interaction avec les protéines partenaires identifiées et les FlnA mutantes**

Dans la suite du projet, nous avons voulu vérifier l'interaction avec les protéines identifiées précédemment par la société "Hybrigenics" et étudier les effets des mutations de la FlnA sur ces interactions.

La technique utilisée est le double hybride en levure avec la même structure d'appât que pour la société "Hybrigenics". Par contre, le facteur de transcription utilisé n'est pas le même dans ce double hybride, nous avons utilisé le facteur Gal4. Il a été réalisé 3 appâts contenant soit la forme sauvage de la FlnA soit les formes mutées G288R ou P637Q (Figure 33).



**Figure 33 : Représentation schématique des constructions de la FlnA WT et mutantes utilisées comme appâts pour le double hybride** (Nakamura et al., 2007). Ces appâts sont composés du domaine de liaison à l'ADN de Gal4, des 8 premiers domaines de la FlnA, du domaine « Hinge2 » et du domaine de dimérisation.

Pour les proies, les domaines d'interaction spécifique (SID) des protéines identifiées précédemment ont été utilisés. Ces SID sont des séquences théoriques minimum d'interactions des protéines partenaires. Nous avons sélectionné 5 protéines d'intérêt. Sur les deux actinines identifiées, seul l'actinine-4 a été sélectionnée du faite de sa forte homologie de structure avec l'actinine-1. De plus, elle a été identifiée dans 82 clones par la première analyse de double hybride. Nous avons également sélectionné la vinculine, la

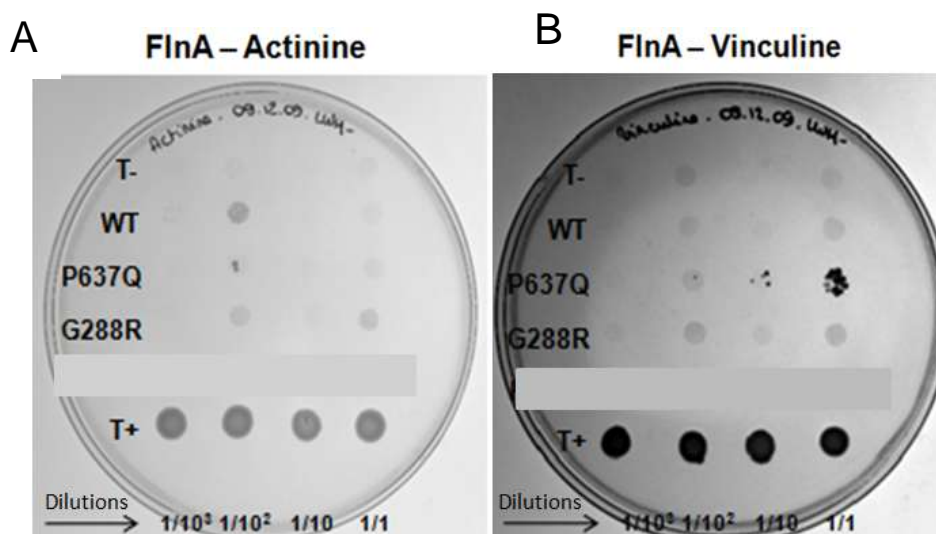
FxBox 034, la PTPN12 et la LL5 $\beta$ . Les interactions ont été mises en évidence par un test d'auxotrophie pour l'histidine et quantifiées par un test utilisant la  $\beta$  galactosidase. Si l'interaction se produit entre les deux protéines de fusion, les levures sont capables de pousser sur les milieux dépourvus d'histidine et de produire la  $\beta$  galactosidase.

#### IV.3.2.1 Analyse qualitative des interactions.

Les résultats des tests d'auxotrophie à l'histidine sont les suivants (Figure 34) :

- **Filamine A – SID Actinine-4** : Aucune levure exprimant les FlnA WT ou mutantes avec l'actinine 4 n'a pu être mise en évidence en milieu sans histidine. Ceci suggère qu'il n'y a pas d'interaction entre la FlnA et l'actinine 4 (Figure 34 A).

- **Filamine A – SID Vinculine** : De la même manière que pour l'actinine, les résultats d'interaction entre la FlnA WT et la vinculine n'ont pas été reproduits mais, il semblerait qu'une interaction faible serait présente pour la FlnA P637Q (Figure 34 B).



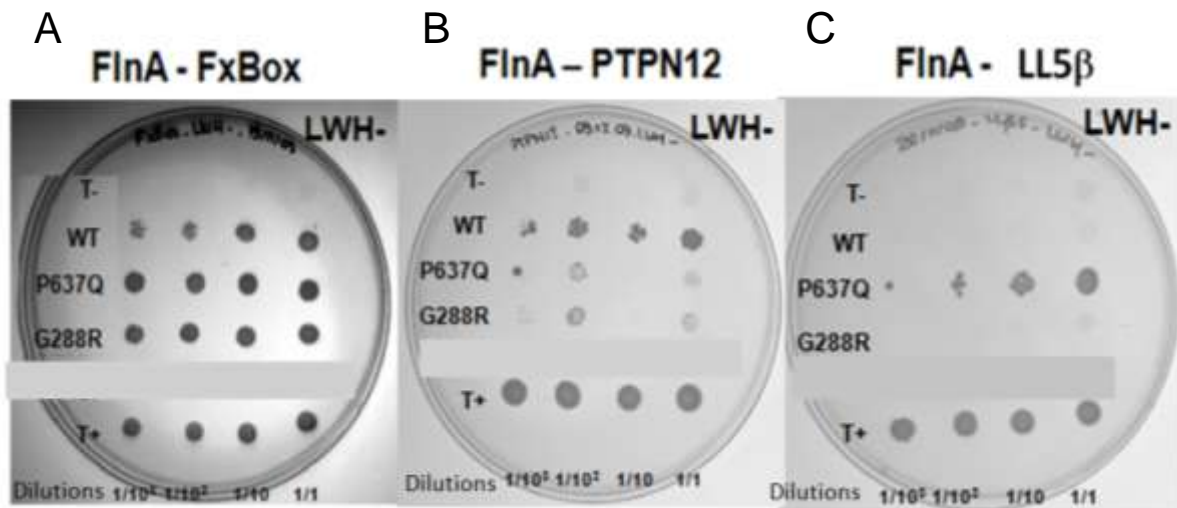
**Figure 34 : Test d'auxotrophie vis-à-vis de l'histidine : actinine et vinculine.** Ces tests sont réalisés pour les levures transformées FlnA puis actinine (A) ou vinculine (B) en patches liquides, sur gélose sans histidine. T+ : co-transformation avec Pick et CT7 ; T- : co-transformation avec la protéine partenaire+CT7. Les dépôts correspondent à des dilutions de 10 en 10 des suspensions de levures (Total (1), au 10<sup>ème</sup>, au 100<sup>ème</sup> et au 100<sup>ème</sup>)

- **Filamine A – FxBox034** : Les interactions ont été validées pour toutes les filamines. Ces interactions semblent plus fortes pour les FlnA mutées par rapport à la FlnA WT (Figure 35 A).



- **Filamine A – PTPN12** : Nous avons également validé l'interaction entre la PTPN12 et la FlnA WT. Par contre, les interactions entre les FlnA G288R et P637Q sont très faibles, car les levures sont difficilement distinguables sur les géloses (Figure 35 B).

- **Filamine A – LL5β** : Les résultats obtenus sur l'interaction entre la FlnA WT ou G288R et la LL5β, par la société "Hybrigenics" n'ont pas pu être reproduits. Par contre, une interaction entre FlnA P637Q et la LL5β a été mise en évidence (Figure 35 C).

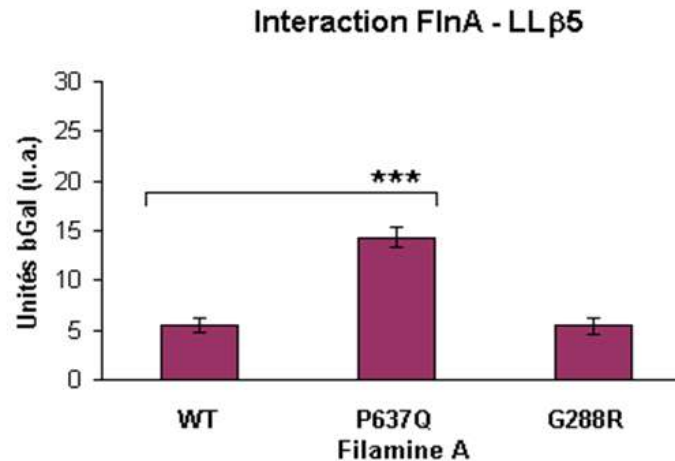


**Figure 35 : Test d'auxotrophie vis-à-vis de l'histidine : FxBox034, PTPN12 et LL5β.** Ces tests sont réalisés pour les levures transformées FlnA puis FxBox034 (A), PTPN12 (B) ou LL5β (C) en patchs liquides, sur gélose sans histidine. T+ : co-transformation avec Pick et CT7 ; T- : co-transformation avec la protéine partenaire+CT7. Les dépôts correspondent à des dilutions de 10 en 10 des suspensions de levures (Total (1), au 10<sup>ème</sup>, au 100<sup>ème</sup> et au 100<sup>ème</sup>)

Les tests d'auxotrophie à l'histidine nous ont permis de vérifier qualitativement la présence ou l'absence des interactions entre les FlnA et les protéines partenaires sélectionnées. Les interactions entre la FlnA WT et la FxBox034 ainsi qu'avec la PTPN12 ont été vérifiées. Les FlnA mutantes semblent interagir avec la FxBox034 pour les deux mutations et une interaction entre la FlnA P637Q et la LL5β a pu être identifiée. À l'inverse, nous n'avons pas pu confirmer les interactions avec la vinculine et l'actinine. Par la suite, les interactions ont été quantifiées par un test colorimétrique de dégradation de l'ONPG en ONP par la β-galactosidase (β-gal). Cette enzyme est exprimée de façon proportionnelle à la transcription du gène Lac Z, lui-même, transcrit de façon proportionnelle à l'intensité d'interaction entre l'appât et la proie. Toutes les interactions retrouvées sur gélose ont pu être quantifiées même si certaines interactions étaient faibles.

### IV.3.2.2 Analyse quantitative des interactions.

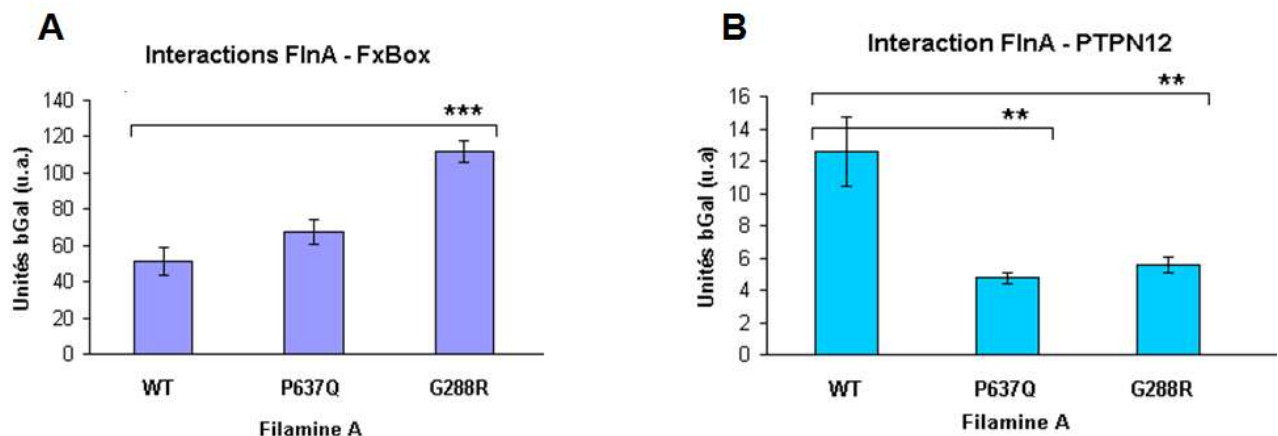
Comme illustré dans la figure 36, L'activité  $\beta$  gal est significativement plus importante pour les levures exprimant la FlnA P637Q et la LL5 $\beta$ . Ceci suggère qu'elle interagit plus fortement avec la LL5 $\beta$  en comparaison des FlnA WT et G288R.



**Figure 36: Quantification des résultats  $\beta$ -gal pour les couples FlnA-LL5 $\beta$ .** Résultats présentés en Unités  $\beta$ -gal arbitraires (u.a.).

Dans le cas de l'interaction avec le FxBox034, l'activité  $\beta$  gal est multipliée environ par deux dans les levures exprimant les FlnA G288R comparées à celles exprimant les FlnA WT (Figure 37A). Bien que l'activité  $\beta$  gal soit plus importante pour la FlnA P637Q que pour la FlnA WT, la mutation P637Q ne semble pas significativement modifier l'interaction avec la FxBox034.

En ce qui concerne la PTPN12, les activités  $\beta$  gal dans les levures exprimant les FlnA mutantes sont plus faibles que pour les FlnA WT (Figure 37 B). Ces résultats suggèrent que les interactions entre la PTPN12 et les FlnA mutantes sont plus faibles qu'avec la FlnA WT.



**Figure 37 : Quantification des résultats  $\beta$ -gal pour les couples FlnA-FxBox034 (A) et FlnA-PTPN12 (B).** Résultats présentés en Unités  $\beta$ -gal arbitraires (u.a.).

En revanche, les activités  $\beta$  gal dans les levures exprimant la vinculine ou l'actinine 4 en présence des FlnA n'ont pas pu être quantifiées.

Les interactions quantifiées démontrent que l'intensité d'interaction de la FxBox034 est plus forte avec les FlnA WT ou mutantes comparé aux intensités obtenues avec les protéines PTPN12 et LL5 $\beta$ . Dans le cas de l'interaction avec la FlnA WT, l'activité  $\beta$ -gal est 3 fois plus importante avec la FxBox034 qu'avec la PTPN12 et 9 fois plus importante avec la FxBox034 qu'avec la LL5 $\beta$ .

Les interactions entre les FlnA et les domaines spécifiques d'interaction (SID) des protéines partenaires ont été vérifiés en utilisant des vecteurs « proie » codant pour toute la séquence codante des protéines partenaires. Aucun test d'auxotrophie vis-à-vis de l'histidine n'a permis de mettre en évidence une interaction entre la FlnA WT et une des protéines partenaires entières.

En conclusion, ce travail a permis d'évaluer l'influence des mutations de la FlnA sur l'interaction avec de nouvelles protéines partenaires. Ces mutations renforcent l'interaction de la FxBox 034 pour la mutation G288R et de la LL5 $\beta$  pour la mutation P637Q. Les mutations G288R et P637Q de la FlnA diminuent l'interaction avec la PTPN12. Après la caractérisation de ces interactions par double hybride, elles devront être validées par des approches biochimiques de pull down et de co-immunoprécipitation.

## **IV.4 Discussion / perspectives**

Ce travail nous a permis d'identifier de nouvelles protéines partenaires de la FlnA dans les régions où sont localisées les mutations associées à la XMVD. Les protéines mises en évidence par la technique de double hybride sont au nombre de 6 : la vinculine, les actinines-1 et -4, la PTPN12, la LL5 $\beta$  et la FxBox034. Les interactions ont été comparées entre les FlnA WT et les mutantes. Nous avons pu montrer que certaines mutations semblent augmenter l'interaction entre la FlnA soit : avec la FxBox034 pour la mutation G288R soit avec la LL5 $\beta$  pour la mutation P637Q. Les deux mutations en revanche semblent diminuer l'interaction avec la PTPN12.

Dans un premier temps, un screening d'une banque d'ADNc de placenta humain sur la FlnA WT 1-8/24 a été réalisé par l'entreprise « Hybrigenics ». Cette entreprise utilise un système de double hybride avec des levures sexuelles formant des cellules diploïdes qui permet de cribler de grandes banques d'ADNc. Seules les interactions entre les FlnA WT et mutantes avec la vinculine et les actinines n'ont pas pu être vérifiées par le double hybride réalisé au sein du laboratoire. Pour la vinculine, un seul clone dans le premier double hybride de « Hybrigenics » avait été identifié ce qui laisse penser à un faux positif. L'actinine-4, quant à elle, avait été retrouvée dans plus de 80 clones. Dans ce cas, l'hypothèse d'un faux positif est alors peu probable. Toutefois, le défaut de validation pourrait être dû à la taille du domaine SID sélectionnée pour l'actinine. Ce domaine était éventuellement trop réduit pour permettre une liaison stable avec la FlnA.

Une nouvelle expérience de double hybride avec les FlnA a été réalisée en utilisant, cette fois-ci, les constructions des vecteurs « proie » codant pour les protéines partenaires entières. Cette approche a été utilisée afin de valider les interactions identifiées avec le SID des protéines partenaires et de s'assurer, comme dans le cas de l'actinine-4, que le domaine SID n'est pas trop réduit pour permettre l'interaction. Aucun test d'auxotrophie vis-à-vis de l'histidine n'a permis de mettre en évidence une interaction entre une FlnA WT et une des protéines partenaires entières. Ces résultats peuvent s'expliquer par un encombrement stérique de la zone d'interaction par le reste de la protéine partenaire sur la FlnA. De plus, la taille des protéines partenaires entières peut empêcher leur localisation dans le noyau des levures. Un défaut de sensibilité du système de double hybride peut également être mis en cause lié au facteur de transcription utilisé. Le système de double hybride utilisant le facteur de transcription Gal4 est moins sensible que le facteur LexA utilisé par le premier double hybride de « Hybrigenics ». Il serait intéressant d'utiliser un système de double hybride plus sensible, notamment avec LexA en domaine de liaison à l'ADN et Gal4 en domaine d'activation de la transcription. Dans la technique de double hybride, les interactions des

protéines partenaires doit être réalisé dans le noyau nécessitant la présence des protéines qui selon leurs tailles peuvent avoir du mal à être translocé dans le noyau. Nous avons donc choisi d'utiliser des constructions codant pour des protéines tronqués de la FlnA et également d'éliminer les protéines partenaires déjà connues dans les régions éliminées. Dans ce cas, nous avons toujours le risque que les protéines identifiées comme interagissant avec la FlnA soit dû à la formation d'un site factice par le rapprochement du domaine de dimérisation et des 8 premiers domaines de la FlnA. À l'inverse ses constructions réduites de la FlnA peuvent empêcher l'identification d'interaction liée à la structure moins flexible de la protéine.

Nos résultats obtenus en double hybride ne permettent pas de valider totalement les interactions identifiées par le premier double hybride de « Hybrigenics ». Cette technique de double hybride a l'inconvénient d'identifier de nombreux faux positifs. Elle est également réalisée dans des levures ne permettant pas toutes les modifications post-transcriptionnelles nécessaires à certaines interactions. L'ensemble de ces résultats devront être vérifiés par les approches biochimiques *in vitro* comme le « pull-down » et la co-immunoprécipitation. En effet, au vu de nos résultats sur l'effet des mutations de la FlnA sur la stabilité des intégrines, la plupart des partenaires potentiels sont intéressants.

De plus, parmi les nouvelles protéines partenaires de la FlnA, les actinines sont des protéines des points focaux qui appartiennent au même complexe protéique d'adhésion que les intégrines. En coopération avec la FlnA, l'actinine participe à la rigidité du réseau d'actine (Esue et al., 2009). Les points focaux d'adhésion sont essentiels aux processus cellulaires d'adhésion à la MEC, de migration ou de contraction des cellules. Nous pouvons supposer que les mutations modifiant les interactions entre la FlnA et l'actinine pourraient empêcher les cellules de réorganiser le cytosquelette d'actine au cours de contraintes mécaniques.

La protéine PTPN12 (ou PTP-PEST) est une phosphatase agissant sur la déphosphorylation des protéines appartenant aux points focaux d'adhésion. Précédemment, il a été identifié par Playford et al. une interaction entre la FlnA et la PTPN12 mais, la région d'interaction sur la FlnA n'avait pas été localisée (Playford et al., 2006). La PTPN12 est activée au cours du processus d'adhésion cellulaire faisant intervenir les intégrines et permet la régulation de la phosphorylation des kinases FAK ou src. L'activité de la PTPN12 nécessite une localisation spatio-temporelle spécifique au cours des processus de migration cellulaire. Il a été montré qu'une surexpression de la PTP-PEST dans les fibroblastes induit une diminution de l'activité Rac1 provoquant une instabilité des extensions membranaires (Sastry et al., 2002). D'autres travaux ont démontré que l'absence de la PTP-PEST augmente l'adhésion des cellules sur la fibronectine par la formation de nombreux points

focaux en revanche la mobilité de ces cellules est réduite (Angers-Loustau et al., 1999). La PTP-PEST est activée par la voie Ras qui induit la déphosphorylation de la kinase FAK et permet la dissociation des points focaux (Zheng et al., 2011). De plus, il a été démontré que l'inhibition des intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\beta 1$  diminuait la phosphorylation de la FAK qui induit une inhibition des voies ERK et smads ayant pour conséquence de réduire la synthèse de collagène de type I. Nous pouvons supposer que les mutations de la FlnA diminuent l'interaction avec la PTPN12. Cette diminution modifierait la localisation de la PTP-PEST régulant son activité sur les GTPases et la signalisation des points focaux au cours de l'activation des intégrines. Les modifications de migration et d'adhésion cellulaire dans des lignées exprimant les FlnA mutantes seraient cohérentes avec une diminution d'interaction avec la PTPN12. Dans le but de répondre à cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier la phosphorylation des voies de signalisation impliquant les kinases FAK ou src. De plus, le lien qui associe la diminution des intégrines  $\beta 1$  à la localisation et l'activité de la PTPN12 reste à évaluer.

En ce qui concerne la LL5 $\beta$ , une étude de Paravitane et al. montre que la LL5 $\beta$  interagit avec la partie C terminale des FlnA et C (Paravitane et al., 2007). La récente classification des domaines de la FlnA suggère que les protéines partenaires peuvent se lier à des domaines de la FlnA appartenant au même groupe (Ithychanda et al., 2009). Il est donc possible qu'un autre site de liaison existe dans les 8 premiers domaines de la FlnA. Les constructions réduites de la FlnA peuvent également former un site factice d'interaction avec le domaine de dimérisation et les premiers domaines de la FlnA. De plus, dans les cellules épithéliales, la LL5 $\beta$  participe à la localisation des intégrines spécifiques de la laminine sur le réseau de microtubules. La LL5 $\beta$  participe également à la voie de signalisation PI3K (Hotta et al., 2010). Les mutations de la FlnA pourraient alors modifier la liaison avec la LL5 $\beta$ . Cette dernière pourrait éventuellement réguler le trafic des intégrines et la voie PI3K dans d'autres types cellulaires. Les résultats de notre étude ont montré que la LL5 $\beta$  interagissait plus fortement avec la FlnA P637Q mais, pas avec la FlnA G288R. Ceci peut être lié la zone d'interaction entre les deux protéines qui serait localisée plus près de la région de la FlnA où est située la mutation P637Q.

Enfin, la FxBox034 est une protéine des complexes d'ubiquitinylation formant un complexe multi protéique ubiquitine E3 ligase (SCF) participant à la dégradation des protéines (Yoshida et al., 2011b). Il a été démontré que l'ABS2 $\alpha$  est une sous unité du complexe multi protéique ubiquitine E3 ligase associée à la dégradation des filamines par le protéasome. Cette protéine participe également à l'adhésion sur fibronectine des cellules

hématopoïétiques par la dégradation de la FlnA (Lamsoul et al., 2011; Razinia et al., 2011). De plus, la pré-intégrine  $\beta 1$  est la cible d'une protéine F-box la Fbx2. Cette protéine fait partie d'un complexe SCF qui permet la sortie et la dégradation à partir du réticulum endoplasmique de protéines N-glycosylées tel que l'intégrine  $\beta 1$ . Ceci permet d'éliminer les pré-intégrine  $\beta 1$  en excès qui ne se fixe pas à une sous unité  $\alpha$  (Yoshida et al., 2002). D'après nos résultats la FxBox034 interagirait plus fortement avec la FlnA mutée G288R pouvant favoriser sa dégradation. Nous pouvons aussi supposer que le rapprochement de la FxBox034 avec d'autres protéines telles que les intégrines induiraient leur ubiquitinylation. Il serait intéressant d'analyser l'ubiquitinylation des intégrines et des filamines dans les lignées exprimant les FlnA WT et mutantes.

Dans la poursuite du projet, il sera essentiel de confirmer les résultats obtenus par les doubles hybrides par l'utilisation des approches de « pull-down » et de co-immunoprécipitation. À partir des constructions du double hybride, des étapes de production de protéines FlnA taggées avec une séquence de 6 histidines en partie N-terminale sont actuellement en cours de réalisation. De plus, les plasmides codant pour les protéines partenaires et les anticorps pour les co-immunoprécipitations sont en cours de validation.

En conclusion de cette partie, les interactions identifiées sont à vérifier afin de pouvoir poursuivre les investigations sur leur rôle dans les mécanismes physiopathologiques des valvulopathies.





## **V Discussion générale**



A l'heure actuelle, les mécanismes physiopathologies des valvulopathies sont mal connus. De ce fait, la seule option thérapeutique est la chirurgie valvulaire. Par ailleurs, l'identification de ces mécanismes est essentielle pour le développement de thérapie médicamenteuse et la compréhension de la dégénérescence des bioprothèses valvulaires actuellement utilisées.

Il apparaît maintenant que l'évolution de ces pathologies soit due à un défaut congénital causé par des mutations dans des protéines de la MEC comme la fibrilline ou encore de signalisation comme la voie NOTCH (Dietz et al., 2005; Garg et al., 2005). Mon travail a consisté à identifier les conséquences moléculaires et cellulaires de mutations de la FlnA associées à la XMVD. Nous avons pu identifier, dans un modèle de mélanome déficient en FlnA, que les mutations provoquaient une diminution de l'expression des intégrines  $\beta 1$ . Cette diminution semblerait participer aux modifications morphologies, aux défauts d'adhésion et de migration cellulaire. Dans une autre étude, nous avons identifié de nouvelles protéines partenaires dans la région où sont localisées les mutations. Plus particulièrement, la PTPN12 qui participe à la signalisation des points focaux, la LL5 $\beta$  qui agit sur la localisation des intégrines via le réseau de microtubules et enfin la FxBox034 qui participe à la dégradation des protéines. L'ensemble de ces résultats semblent désigner la voie de signalisation des intégrines, comme un acteur important, dans les mécanismes physiopathologiques des valvulopathies associées aux mutations de la FlnA. Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion permettant l'organisation et la dégradation des composants de la MEC tel que la fibronectine. Mais leur rôle dans les processus physiopathologiques impliquant un remodelage de la MEC est encore mal défini. Ainsi les intégrines par l'intermédiaire de la FlnA pourraient participer à ces processus. La voie de signalisation des intégrines est une voie essentielle pour la transmission de signaux mécaniques ou chimiques entre la MEC et l'environnement intracellulaire (Takada et al., 2007). Les intégrines permettent l'activation des voies MAPKs et le renouvellement des composants de la MEC (Larsen et al., 2006; Ding et al., 2008). Il a été démontré qu'elles permettent la régulation de la voie de signalisation du TGF $\beta$  par la séquestration des facteurs de croissance (Wipff and Hinz, 2008). Les intégrines participent également à la disponibilité, à l'activation et au recyclage des protéines transmembranaires comme les récepteurs aux facteurs de croissance, ou encore les récepteurs et le transporteur de la sérotonine (Eliceiri, 2001).

De plus, de nombreux liens entre la signalisation des intégrines et celles du TGF $\beta$  ou encore la sérotonine ont été mis en évidence dans les valvulopathies.

Ainsi, les études génétiques des familles atteintes de valvulopathies ont identifié la voie du TGF $\beta$  comme un facteur majeur du développement de la pathologie. Par exemple, dans le syndrome de Marfan, la mutation de la fibrilline provoque la libération de TGF $\beta$

activant la voie de signalisation (Dietz et al., 2005). D'ailleurs, des mutations dans les récepteurs au TGF de type II ont également été identifiées dans le syndrome de Loeys-Dietz responsable lui aussi de valvulopathies (Van Hemelrijk et al., 2010). De plus, le TGF $\beta$  est associé à la différenciation cellulaire de CIV et participe également à l'EMT au cours de la valvulogénèse (Walker et al., 2004; Olivey et al., 2006). La synthèse des composants de la MEC est également régulée par l'activation de la voie du TGF $\beta$ .

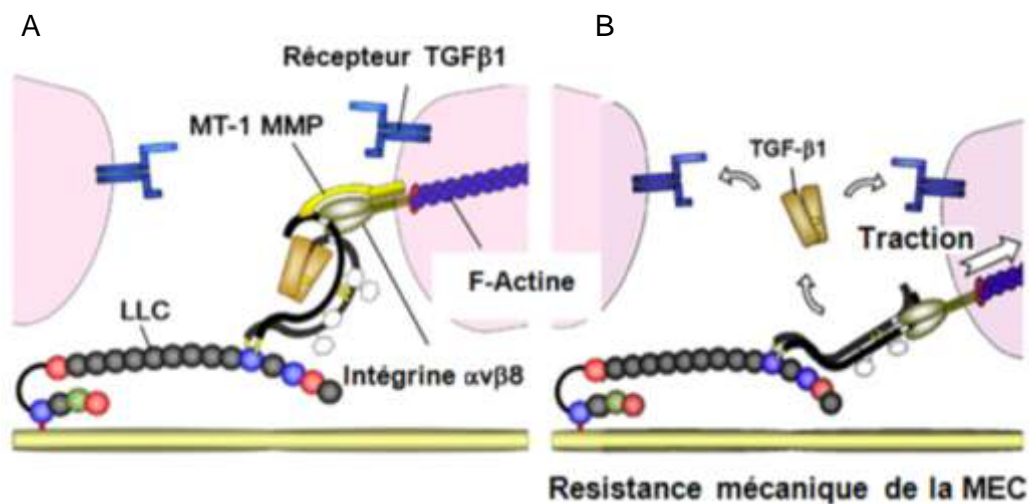
Le TGF $\beta$ 1 est une cytokine essentielle pour les processus fibrotiques. Il se fixe sur le récepteur au TGF de type II activant le récepteur de type I. L'activation de cette voie met en jeu la phosphorylation des effecteurs R-smads qui sont translocés dans le noyau par l'intermédiaire de co-smads. Ces smads phosphorylées vont activer la transcription de gènes de la MEC tel que les collagènes (Mehra and Wrana, 2002; Mishra and Marshall, 2006).

Un dialogue mutuel entre les intégrines et les voies du TGF $\beta$  a été démontré.

D'une part, le TGF $\beta$ 1 est capable d'induire la régulation transcriptionnelle des intégrines et de leurs ligands (Pechkovsky et al., 2008). Le TGF $\beta$ 1 est capable régulé la transcription des intégrines soit par une augmentation (dans le cas de  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 et  $\alpha$ 5 $\beta$ 1) ou une diminution (pour  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 et  $\alpha$ 3 $\beta$ 1) de leur expression (Pechkovsky et al., 2008).

D'autres parts, les intégrines agissent sur la disponibilité du TGF $\beta$  (Figure 38). Ce TGF $\beta$ 1 est séquestré sous forme inactive dans la MEC par un complexe latent formé de 2 protéines *Latency Associated Peptide* (LAP) et *Latent transforming growth factor-beta binding proteins* (LTBP) et les intégrines participant au maintien du TGF $\beta$ 1 dans la MEC en se fixant à ce complexe. Cependant, le complexe latent du TGF $\beta$  dans la MEC peut être dissocié grâce à la fixation des intégrines (Lu et al., 2002; Ludbrook et al., 2003). La libération se réalise de 2 façons, soit par clivage dû à la fixation de MMP sur les intégrines soit par l'intervention des forces de traction de la cellule (Mu et al., 2002; Wipff and Hinz, 2008).

Enfin les intégrines participe à la régulation de la signalisation du TGF $\beta$ 1. En effet, les intégrines peuvent activer les MAPKs agissant sur la voie du TGF $\beta$  (Hayashida et al., 2010; Borthwick et al., 2011). Certaines intégrines peuvent également agir sur l'expression des récepteurs au TGF $\beta$  (Margadant and Sonnenberg, 2010).



**Figure 38 : Activation de la voie du TGFβ par les intégrines.** (A) Activation du complexe latent du TGFβ1 par les métalloprotéinases. (B) L'action de la traction des cellules sur le complexe latent. D'après Wipff, les intégrines libèrent le TGFβ actif après déformation du complexe latent. D'après Wipff and Hinz, 2008.

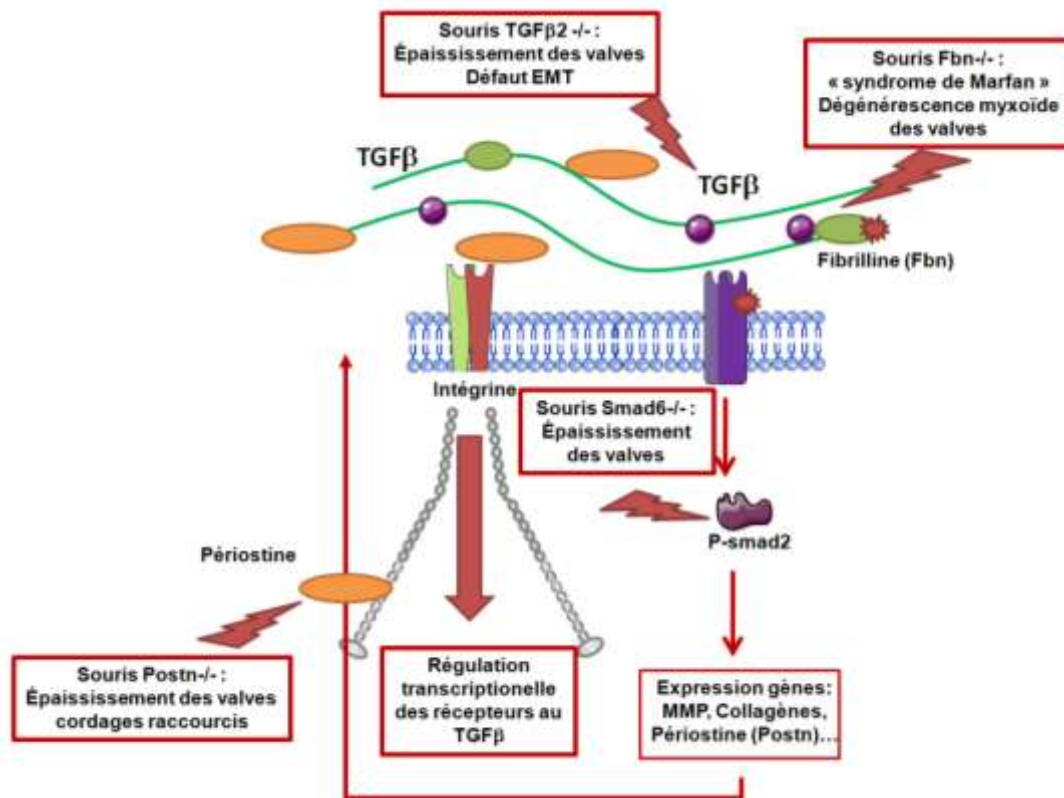
En résumé, les voies de signalisation impliquant le TGFβ et les intégrines sont en constante interaction par des régulations transcriptionnelles. Ainsi lorsqu'une de ces voies ne fonctionnent plus correctement à cause par exemple, de mutations, elle agit sur la seconde induisant des phénomènes pathologiques comme la fibrose. De tels mécanismes de signalisation pourraient être impliqués dans les phénomènes de remodelage de la MEC des valves cardiaques.

Dans cette signalisation du TGFβ, l'étude de modèles animaux montrent l'importance des facteurs solubles de la voie de signalisation du TGF au cours de la valvulogénèse comme le TGFβ1, 2, 3 ou le BMP2 (Kartinen et al., 1995; Yamagishi et al., 1999; Conway et al., 2011). Sanford et al. ont établi un modèle de souris invalidé pour le gène du TGFβ2. Ces souris présentent un épaissement des valves et des défauts de développement du processus d'EMT (Sanford et al., 1997). De plus, le modèle de souris invalidé pour la fibrilline mime le syndrome de Marfan, identifié chez l'homme avec une dégénérescence myxomateuse des valves (Habashi et al., 2006). Dans un autre modèle de souris, l'inactivation des smad6 inhibitrices de la voie du TGFβ montre un épaissement des valves de ces souris (Galvin et al., 2000). Toutes ces études montrent l'importance de la voie du TGFβ dans les processus de développement, de maturation et de pathologie des valves cardiaques. Une étude de l'activation de la voie du TGFβ a été débutée dans les lignées de

mélanome exprimant les FlnA mutantes. Cependant, pour des raisons techniques, la détection des phosphorylations de smad2 n'était pas assez sensible. À l'heure actuelle, nous n'avons pas pu conclure sur l'état d'activation de la voie du TGF. Toutefois, dans la littérature, il a été démontré que les intégrines étaient capables d'activer la transcription des récepteurs au TGF $\beta$  et donc l'activation de sa voie de signalisation (Wang et al., 1999).

L'effet de l'activation de la voie du TGF $\beta$  pourra également être étudié. En effet, l'activation de cette voie peut modifier certaines signalisations comme les MAPKs, agissant sur la transcription de gène de la MEC (Pechkovsky et al., 2008)(Margadant and Sonnenberg, 2010).

La voie de signalisation du TGF $\beta$  et les intégrines sont en relation grâce à une molécule importante dans le développement des valves cardiaques : la périostine, protéine sécrétée dans la MEC (Conway et al., 2011). L'expression de la périostine est induite par le TGF $\beta$ 1 et de nombreuses études ont démontré son rôle dans le remodelage de la matrice valvulaire après EMT au cours de la valvulogénèse (Markwald et al., 2010). Les souris invalidées pour la périostine présentent un épaissement et un raccourcissement des valves avec des cordages tendineux tronqués (Hakuno et al., 2011; Nishiyama et al., 2011). De plus, la périostine permet la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules fibroblastiques productrices de collagène (Norris et al., 2009). Cette protéine agit également sur la migration et l'invasion cellulaire ainsi que sur la capacité de ces cellules à compacter la MEC. Ces processus passent par la fixation de la périostine sur les intégrines  $\alpha$ V $\beta$ 3 et les intégrines  $\beta$ 1, activant la voie Rho/PI3K et permettant l'expression de l'actine musculaire lisse exprimée dans les CIV activées (Butcher et al., 2007). Nous pouvons supposer que les effets des mutations de la FlnA sur la diminution de l'expression des intégrines pourraient moduler la voie de signalisation du TGF $\beta$  et l'expression de la périostine (Figure 39). La régulation de la périostine pourrait alors impliquer une dérégulation de la MEC. Cette hypothèse pourra être testée en étudiant l'activation et la régulation des voies de signalisation du TGF $\beta$  et de la périostine dans les lignées exprimant les FlnA WT et mutantes.



**Figure 39 : La voie du TGFβ et les valvulopathies.** La voie du TGFβ est impliquée dans la physiopathologie des valvulopathies par l'identification de mutations sur les récepteurs au TGFβ et sur la fibrilline qui permet de séquestrer le TGFβ. De plus, des modèles animaux d'inactivation du TGFβ2, la fibrilline, smad6 ou la périostine développent un épaissement des valves.

L'autre voie importante est impliquée dans les mécanismes physiopathologiques des valvulopathies est la voie de la sérotonine (5HT). Ce composé chimique est un neurotransmetteur produit par les cellules intestinales puis stockée dans les plaquettes. En effet, une augmentation du niveau de sérotonine dans le sang induite par des tumeurs carcinoïdes ou une association de médicaments "coupe - faim" comme les fenfluramines et les phentermines peuvent provoquer des valvulopathies médicamenteuses (Elangbam, 2010). Les appareils sous valvulaires des patients sont épaissis par une atteinte fibrotique et les cordages sont raccourcis ne permettant plus une coaptation des valvules correcte induisant des régurgitations mitrales (Connolly et al., 1997). Ces valvulopathies médicamenteuses induites par les fenfluramines aux propriétés anorexigènes se caractérisent par une activation des récepteurs de la sérotonine (Elangbam, 2010). Ces fenfluramines se métabolisent en norfenfluramines qui stimulent la libération de sérotonine et possèdent une forte activité agoniste vis-à-vis des récepteurs 5HT2B. Le transporteur de la sérotonine, quant à lui, permet l'entrée de la sérotonine après l'activation du récepteur.

Dans les valves cardiaques, les sous-types de récepteurs à la sérotonine 5HT1B et 5HT1D sont exprimés alors que les récepteurs 5HT1A, 5HT1E et 5HT1F sont absents. Ainsi les CIV répondent à la signalisation de la sérotonine. Dans des travaux récents en 2006, il a été démontré que les souris invalidées pour le transporteur de la sérotonine (SERT) développent une valvulopathie due à l'activation plus importante des récepteurs à la surface cellulaire (Mekontso-Dessap et al., 2006). Une autre étude de Pavone en 2009 sur un modèle murin a montré une augmentation d'actine musculaire lisse, du récepteur 5HT2A, de la phosphorylation de smad2 et ERK1/2 dans le cœur de ces souris révélant une activation de la voie du TGF $\beta$  (Pavone et al., 2009).

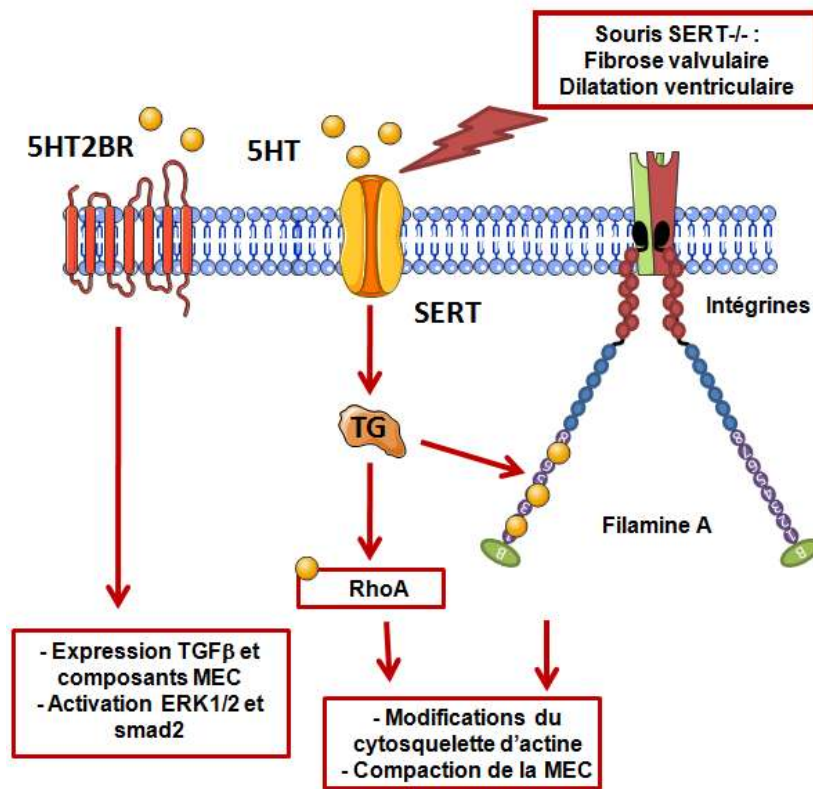
Des travaux précédents ont montré que la voie de signalisation de la sérotonine et celle des intégrines interagissent. Ainsi, une étude de Carneiro et al. dans des plaquettes montre que la régulation du trafic du transporteur de la sérotonine nécessite les intégrines  $\alpha 2\beta 3$  (Carneiro et al., 2008). De plus, la diminution des intégrines par les mutations de la FlnA pourraient moduler l'expression et la régulation du transporteur de la sérotonine.

L'action de la sérotonine est médiée par des récepteurs et le transporteur SERT. L'activation de cette voie de signalisation induit une augmentation des composants de la MEC et active l'expression de TGF $\beta$  (Jian et al., 2002). De plus les CIV expriment les sous unités 5HT1B et 5HT1D des récepteurs à la sérotonine pouvant donc répondre à cette stimulation (Elangbam et al., 2008). De plus, l'activation des récepteurs de la sérotonine est capable d'activer la voie ERK1/2 ainsi que l'expression du TGF $\beta$ . Une étude de Mekontso et al. a montré que des souris invalidées pour le transporteur SERT développaient une fibrose valvulaire avec une dilatation ventriculaire (Mekontso-Dessap et al., 2006). Dans la poursuite de ce projet, il serait intéressant d'étudier l'effet de la sérotonine sur l'activation des voies de signalisation du TGF $\beta$  et de ERK1/2 en utilisant des approches biochimiques (Figure 40).

De plus, la transglutaminase permet de fixer la sérotonine sur les résidus glutamines des protéines et plus particulièrement des GTPases, ce processus s'appelle sérotonylation (Watts et al., 2009). Il a été montré que la sérotonylation se produit aussi sur les protéines de contraction par exemple la FlnA et l'actine musculaire lisse (Watts et al., 2009). Des travaux préliminaires réalisés par Norris et al (communications personnelles) ont montré que les FlnA mutées seraient moins sérotonylées que la FlnA WT qui semble diminuer la compaction des gels de collagène. De plus l'activation prolongée par la sérotonine de cellules musculaires lisses provoque une dégradation de RhoA activée (Guilluy et al., 2007). Les mutations de la FlnA induiraient une modification de sa propre sérotonylation ou celles des GTPases ce qui modifieraient leur capacité de réorganisation de l'actine et donc de remodelage de la MEC. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la voie de la sérotonine sur les



modifications phénotypiques des lignées exprimant les FlnA WT en utilisant les bloqueurs de la sérotonine ou de la transglutaminase.

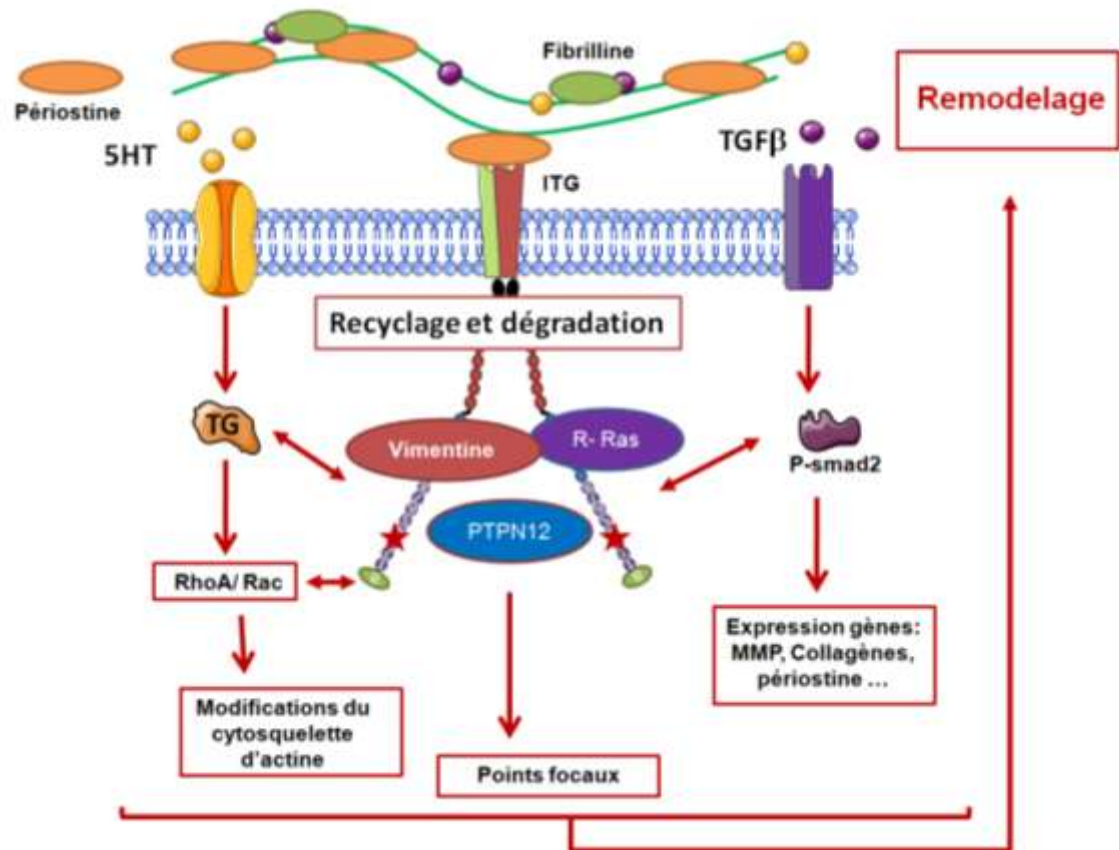


**Figure 40 : La voie de la sérotonine et les valvulopathies.** L'activation des récepteurs de la sérotonine induit l'activation des voies ERK1/2 et smad avec une augmentation de l'expression du TGFβ et des composants de la MEC. La sérotonylation des protéines de contraction telles que RhoA ou la FlnA modifie les capacités de compaction de la MEC et de remodelage du cytosquelette d'actine.

L'utilisation de différents modèles d'études permet d'apporter différentes informations sur les effets des mutations au niveau de la compensation par la FlnB, l'effet de l'étirement ou encore les voies de signalisation spécifique des CIV. Dans ce travail, nous avons utilisé des modèles de cellules cancéreuses de mélanome ou de fibrosarcome permettant d'identifier l'implication de la voie de signalisation des intégrines dans les mécanismes physiopathologiques des valvulopathies. Récemment, un patient atteint de la XMVD a été opéré et des cultures primaires des fibroblastes de peau de ce patient ont été établies. Ces fibroblastes pourront également être dérivés en cellules IPS et différenciés en CIV. Ces deux modèles permettront de travailler sur des cellules natives et qui auront l'avantage d'exprimer seulement la FlnA P637Q. Enfin un modèle d'inactivation dans les cellules non musculaires cardiaques et un modèle de souris *knock in* pour les FlnA mutantes sont mis au point au sein du réseau Leducq. Ces modèles animaux sont essentiels à la compréhension des mécanismes physiopathologiques des valvulopathies permettant de suivre la progression de

la pathologie et son évolution au cours du développement embryonnaire. Les effets des voies de signalisation identifiées précédemment tel que les intégrines, le TGF $\beta$  ou la sérotonine seront étudiés par des traitements pharmacologiques comme dans le cas du Losartan (Habashi et al., 2006; Conway et al., 2011). Dans l'avenir ces modèles animaux de valvulopathies liées à la FlnA pourront nous permettre de développer des stratégies thérapeutiques pour les patients atteints de XMVD.

En conclusion, l'étude fondamentale sur l'effet des mutations de la FlnA a démontré une modification de la signalisation des intégrines pouvant conduire à une modification de la réponse des cellules au stress mécanique dû à l'étirement ainsi aux chemokines séquestrées dans la MEC (Figure 41).



**Figure 41 : Schéma des mécanismes impliquant potentiellement les mutations de la FlnA dans la physiopathologie des valvulopathies.** La FlnA est impliquée dans le recyclage et le transport vésiculaire des récepteurs membranaires tel que les intégrines. De plus, les mutations induisent une diminution des intégrines  $\beta$ 1 éventuellement en les dirigeant vers les voies de dégradation par l'intermédiaire des protéines vimentine ou R-Ras. De la même façon, la FlnA interagirait avec des protéines des points focaux d'adhésion régulant la fixation des cellules et le remodelage de la MEC. Enfin les voies de signalisation de la sérotonine ou du TGF peuvent réguler par les fonctions de stabilisation membranaire et de « mécano-protection » de la FlnA.

# Bibliographie

- Angers-Loustau, A., Côté, J.F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L.A., and Tremblay, M.L. (1999). Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J. Cell Biol.* *144*, 1019–1031.
- Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P., and Humphries, M.J. (2009). Linking integrin conformation to function. *J. Cell. Sci* *122*, 165–170.
- Aupperle, H., Thielebein, J., Kiefer, B., März, I., Dinges, G., and Schoon, H.-A. (2009). An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. *Vet. J* *180*, 88–94.
- Baldassarre, M., Razinia, Z., Burande, C.F., Lamsoul, I., Lutz, P.G., and Calderwood, D.A. (2009). Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration. *PLoS ONE* *4*, e7830.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res* *339*, 269–280.
- Beekman, J.M., van der Poel, C.E., van der Linden, J.A., van den Berg, D.L.C., van den Berghe, P.V.E., van de Winkel, J.G.J., and Leusen, J.H.W. (2008). Filamin A stabilizes Fc gamma RI surface expression and prevents its lysosomal routing. *J. Immunol* *180*, 3938–3945.
- Bel, A., Planat-Bernard, V., Saito, A., Bonnevie, L., Bellamy, V., Sabbah, L., Bellabas, L., Brinon, B., Vanneaux, V., Pradeau, P., et al. (2010). Composite cell sheets: a further step toward safe and effective myocardial regeneration by cardiac progenitors derived from embryonic stem cells. *Circulation* *122*, S118–123.
- Bellanger, J.M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T.P., and Debant, A. (2000). The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat. Cell Biol* *2*, 888–892.
- Bello, N.F., Lamsoul, I., Heuzé, M.L., Métais, A., Moreaux, G., Calderwood, D.A., Duprez, D., Moog-Lutz, C., and Lutz, P.G. (2009). The E3 ubiquitin ligase specificity subunit ASB2beta is a novel regulator of muscle differentiation that targets filamin B to proteasomal degradation. *Cell Death Differ.* *16*, 921–932.
- Berry, F.B., O'Neill, M.A., Coca-Prados, M., and Walter, M.A. (2005). FOXC1 transcriptional regulatory activity is impaired by PBX1 in a filamin A-mediated manner. *Mol. Cell. Biol* *25*, 1415–1424.
- Bonow, R.O., Carabello, B.A., Chatterjee, K., de Leon, A.C., Jr, Faxon, D.P., Freed, M.D., Gaasch, W.H., Lytle, B.W., Nishimura, R.A., O'Gara, P.T., et al. (2008). 2008 focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease). Endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J. Am. Coll. Cardiol* *52*, e1–142.

- Borm, B., Requardt, R.P., Herzog, V., and Kirfel, G. (2005). Membrane ruffles in cell migration: indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament reorganization. *Exp. Cell Res* 302, 83–95.
- Borthwick, L.A., Gardner, A., De Soyza, A., Mann, D.A., and Fisher, A.J. (2011). Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) Driven Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) is Accentuated by Tumour Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) via Crosstalk Between the SMAD and NF- $\kappa$ B Pathways. *Cancer Microenviron*.
- Boström, K.I., Rajamannan, N.M., and Towler, D.A. (2011). The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ. Res.* 109, 564–577.
- Butcher, J.T., Norris, R.A., Hoffman, S., Mjaatvedt, C.H., and Markwald, R.R. (2007). Periostin promotes atrioventricular mesenchyme matrix invasion and remodeling mediated by integrin signaling through Rho/PI 3-kinase. *Dev. Biol* 302, 256–266.
- Calderwood, D.A., Huttenlocher, A., Kiosses, W.B., Rose, D.M., Woodside, D.G., Schwartz, M.A., and Ginsberg, M.H. (2001). Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat. Cell Biol* 3, 1060–1068.
- Carneiro, A.M.D., Cook, E.H., Murphy, D.L., and Blakely, R.D. (2008). Interactions between integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and the serotonin transporter regulate serotonin transport and platelet aggregation in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 118, 1544–1552.
- Carpentier, A. (1983). Cardiac valve surgery--the "French correction." *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 86, 323–337.
- Caswell, P.T., Vadrevu, S., and Norman, J.C. (2009). Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 10, 843–853.
- Chen, H.S., Kolahi, K.S., and Mofrad, M.R.K. (2009). Phosphorylation facilitates the integrin binding of filamin under force. *Biophys. J* 97, 3095–3104.
- Chester, A.H., Misfeld, M., Sievers, H.H., and Yacoub, M.H. (2001). Influence of 5-hydroxytryptamine on aortic valve competence in vitro. *J. Heart Valve Dis* 10, 822–825; discussion 825–826.
- Chiquet, M., Gelman, L., Lutz, R., and Maier, S. (2009). From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 911–920.
- Cho, E.-Y., Cho, D.-I., Park, J.H., Kurose, H., Caron, M.G., and Kim, K.-M. (2007). Roles of protein kinase C and actin-binding protein 280 in the regulation of intracellular trafficking of dopamine D3 receptor. *Mol. Endocrinol.* 21, 2242–2254.
- Clark, A.R., Sawyer, G.M., Robertson, S.P., and Sutherland-Smith, A.J. (2009). Skeletal dysplasias due to filamin A mutations result from a gain-of-function mechanism distinct from allelic neurological disorders. *Hum. Mol. Genet* 18, 4791–4800.
- Clark, K., Pankov, R., Travis, M.A., Askari, J.A., Mould, A.P., Craig, S.E., Newham, P., Yamada, K.M., and Humphries, M.J. (2005). A specific  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J. Cell. Sci* 118, 291–300.

- Combs, M.D. & Yutzey, K.E., 2009. Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circulation Research*, 105(5), p.408-421.
- Connolly, H.M., Crary, J.L., McGoon, M.D., Hensrud, D.D., Edwards, B.S., Edwards, W.D., and Schaff, H.V. (1997). Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N. Engl. J. Med.* 337, 581–588.
- Conway, S.J., Doetschman, T., and Azhar, M. (2011). The Inter-Relationship of Periostin, TGF beta, and BMP in Heart Valve Development and Valvular Heart Diseases. *ScientificWorldJournal* 11, 1509–1524.
- Coughlin, M.F., Puig-de-Morales, M., Bursac, P., Mellema, M., Millet, E., and Fredberg, J.J. (2006). Filamin-a and rheological properties of cultured melanoma cells. *Biophys. J* 90, 2199–2205.
- Cunningham, C.C. (1995). Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J. Cell Biol* 129, 1589–1599.
- Cunningham, C.C., Gorlin, J.B., Kwiatkowski, D.J., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Byers, H.R., and Stossel, T.P. (1992). Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 255, 325–327.
- D'Addario, M., Arora, P.D., Fan, J., Ganss, B., Ellen, R.P., and McCulloch, C.A. (2001). Cytoprotection against mechanical forces delivered through beta 1 integrins requires induction of filamin A. *J. Biol. Chem* 276, 31969–31977.
- Dietz, H.C., Loeys, B., Carta, L., and Ramirez, F. (2005). Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 139C, 4–9.
- Ding, Q., Gladson, C.L., Wu, H., Hayasaka, H. & Olman, M.A., 2008. Focal adhesion kinase (FAK)-related non-kinase inhibits myofibroblast differentiation through differential MAPK activation in a FAK-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(40), p.26839-26849.
- Dreger, S.A., Taylor, P.M., Allen, S.P., and Yacoub, M.H. (2002). Profile and localization of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in human heart valves. *J. Heart Valve Dis* 11, 875–880; discussion 880.
- Dumbauld, D.W., Michael, K.E., Hanks, S.K., and Garcia, A.J. (2009). Focal adhesion kinase-dependent regulation of adhesive force involves vinculin recruitment to focal adhesions. *Biol. Cell*.
- Ehrlicher, A.J., Nakamura, F., Hartwig, J.H., Weitz, D.A., and Stossel, T.P. (2011). Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature*.
- Elangbam, C.S. (2010). Drug-induced valvulopathy: an update. *Toxicol Pathol* 38, 837–848.
- Elangbam, C.S., Job, L.E., Zadrozny, L.M., Barton, J.C., Yoon, L.W., Gates, L.D., and Slocum, N. (2008). 5-hydroxytryptamine (5HT)-induced valvulopathy: compositional

- valvular alterations are associated with 5HT<sub>2B</sub> receptor and 5HT transporter transcript changes in Sprague-Dawley rats. *Exp. Toxicol. Pathol* *60*, 253–262.
- El-Hamamsy, I., Yacoub, M.H., and Chester, A.H. (2009). Neuronal regulation of aortic valve cusps. *Curr Vasc Pharmacol* *7*, 40–46.
- Eliceiri, B.P. (2001). Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ. Res.* *89*, 1104–1110.
- Esue, O., Tseng, Y., and Wirtz, D. (2009). Alpha-actinin and filamin cooperatively enhance the stiffness of actin filament networks. *PLoS ONE* *4*, e4411.
- Feng, Y., Chen, M.H., Moskowitz, I.P., Mendonza, A.M., Vidali, L., Nakamura, F., Kwiatkowski, D.J., and Walsh, C.A. (2006). Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *103*, 19836–19841.
- Feng, Y., and Walsh, C.A. (2004). The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat. Cell Biol* *6*, 1034–1038.
- van der Flier, A., Kuikman, I., Kramer, D., Geerts, D., Kreft, M., Takafuta, T., Shapiro, S.S., and Sonnenberg, A. (2002). Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin [beta] subunits. *J. Cell Biol* *156*, 361–376.
- van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001a). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* *305*, 285–298.
- van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001b). Structural and functional aspects of filamins. *Biochim. Biophys. Acta* *1538*, 99–117.
- Fondard, O., Detaint, D., Iung, B., Choqueux, C., Adle-Biasette, H., Jarraya, M., Hvass, U., Couetil, J.-P., Henin, D., Michel, J.-B., et al. (2005). Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur. Heart J.* *26*, 1333–1341.
- Franzot, G., Sjöblom, B., Gautel, M., and Djinović Carugo, K. (2005). The crystal structure of the actin binding domain from alpha-actinin in its closed conformation: structural insight into phospholipid regulation of alpha-actinin. *J. Mol. Biol.* *348*, 151–165.
- Freed, L.A., Acierno, J.S., Jr, Dai, D., Leyne, M., Marshall, J.E., Nesta, F., Levine, R.A., and Slaugenhaupt, S.A. (2003). A locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 11p15.4. *Am. J. Hum. Genet* *72*, 1551–1559.
- Friedland, J.C., Lee, M.H., and Boettiger, D. (2009). Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* *323*, 642–644.
- Galvin, K.M., Donovan, M.J., Lynch, C.A., Meyer, R.I., Paul, R.J., Lorenz, J.N., Fairchild-Huntress, V., Dixon, K.L., Dunmore, J.H., Gimbrone, M.A., et al. (2000). A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat. Genet* *24*, 171–174.
- Garg, V. (2006). Molecular genetics of aortic valve disease. *Curr. Opin. Cardiol* *21*, 180–184.

- Garg, V., Muth, A.N., Ransom, J.F., Schluterman, M.K., Barnes, R., King, I.N., Grossfeld, P.D., and Srivastava, D. (2005). Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* *437*, 270–274.
- Gawecka, J.E., Griffiths, G.S., Ek-Rylander, B., Ramos, J.W., and Matter, M.L. (2010). R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS ONE* *5*, e11269.
- Gehler, S., Baldassarre, M., Lad, Y., Leight, J.L., Wozniak, M.A., Riching, K.M., Eliceiri, K.W., Weaver, V.M., Calderwood, D.A., and Keely, P.J. (2009). Filamin A-beta1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3224–3238.
- George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H., and Hynes, R.O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* *119*, 1079–1091.
- Glogauer, M., Arora, P., Chou, D., Janmey, P.A., Downey, G.P., and McCulloch, C.A. (1998). The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J. Biol. Chem* *273*, 1689–1698.
- Gorlin, J.B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T.P., Kwiatkowski, D.J., and Hartwig, J.H. (1990). Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J. Cell Biol* *111*, 1089–1105.
- Grande-Allen, K.J., Griffin, B.P., Ratliff, N.B., Cosgrove, D.M., and Vesely, I. (2003). Glycosaminoglycan profiles of myxomatous mitral leaflets and chordae parallel the severity of mechanical alterations. *J. Am. Coll. Cardiol* *42*, 271–277.
- Grau, J.B., Pirelli, L., Yu, P.-J., Galloway, A.C., and Ostrer, H. (2007). The genetics of mitral valve prolapse. *Clin. Genet* *72*, 288–295.
- Gu, X., and Masters, K.S. (2009). Role of the MAPK/ERK pathway in valvular interstitial cell calcification. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *296*, H1748–1757.
- Guilluy, C., Rolli-Derkinderen, M., Tharaux, P.-L., Melino, G., Pacaud, P., and Loirand, G. (2007). Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 2918–2928.
- Habashi, J.P., Judge, D.P., Holm, T.M., Cohn, R.D., Loeys, B.L., Cooper, T.K., Myers, L., Klein, E.C., Liu, G., Calvi, C., et al. (2006). Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* *312*, 117–121.
- Hakuno, D., Kimura, N., Yoshioka, M., and Fukuda, K. (2011). Role of Angiogenetic Factors in Cardiac Valve Homeostasis and Disease. *J Cardiovasc Transl Res.*
- Hart, A.W., Morgan, J.E., Schneider, J., West, K., McKie, L., Bhattacharya, S., Jackson, I.J., and Cross, S.H. (2006). Cardiac malformations and midline skeletal defects in mice lacking filamin A. *Hum. Mol. Genet* *15*, 2457–2467.
- Hartwig, J.H., and Stossel, T.P. (1975). Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages. *J. Biol. Chem* *250*, 5696–5705.



- Hato, T., Pampori, N., and Shattil, S.J. (1998). Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3. *J. Cell Biol* 141, 1685–1695.
- Hayashida, T., Jones, J.C.R., Lee, C.K., and Schnaper, H.W. (2010). Loss of  $\beta$ 1-integrin enhances TGF- $\beta$ 1-induced collagen expression in epithelial cells via increased  $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin and Rac1 activity. *J. Biol. Chem* 285, 30741–30751.
- He, H.-J., Kole, S., Kwon, Y.-K., Crow, M.T., and Bernier, M. (2003). Interaction of filamin A with the insulin receptor alters insulin-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem* 278, 27096–27104.
- Van Hemelrijk, C., Renard, M., and Loeys, B. (2010). The Loeys-Dietz syndrome: an update for the clinician. *Curr. Opin. Cardiol* 25, 546–551.
- Hinton, R.B., Jr, Lincoln, J., Deutsch, G.H., Osinska, H., Manning, P.B., Benson, D.W., and Yutzey, K.E. (2006). Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ. Res* 98, 1431–1438.
- Hinton, R.B., and Yutzey, K.E. (2011). Heart valve structure and function in development and disease. *Annu. Rev. Physiol* 73, 29–46.
- Hotta, A., Kawakatsu, T., Nakatani, T., Sato, T., Matsui, C., Sukezane, T., Akagi, T., Hamaji, T., Grigoriev, I., Akhmanova, A., et al. (2010). Laminin-based cell adhesion anchors microtubule plus ends to the epithelial cell basal cortex through  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. *J. Cell Biol* 189, 901–917.
- Huveneers, S., Truong, H., Fässler, R., Sonnenberg, A., and Danen, E.H.J. (2008). Binding of soluble fibronectin to integrin  $\alpha$ 5  $\beta$ 1 - link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *J. Cell. Sci.* 121, 2452–2462.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110, 673–687.
- Hynes, R.O. (2004). The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol* 23, 333–340.
- Ithychanda, S.S., Hsu, D., Li, H., Yan, L., Liu, D., Das, M., Plow, E.F., and Qin, J. (2009). Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk. *J. Biol. Chem* 284, 35113–35121.
- Itoh, A., Krishnamurthy, G., Swanson, J.C., Ennis, D.B., Bothe, W., Kuhl, E., Karlsson, M., Davis, L.R., Miller, D.C., and Ingels, N.B., Jr (2009). Active stiffening of mitral valve leaflets in the beating heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H1766–1773.
- Izard, T., Evans, G., Borgon, R.A., Rush, C.L., Bricogne, G., and Bois, P.R.J. (2004). Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature* 427, 171–175.
- Jacob, M.-P. (2006). [Extracellular matrix and vascular ageing]. *Med Sci (Paris)* 22, 273–278.

- Jamieson, J.S., Tumbarello, D.A., Hallé, M., Brown, M.C., Tremblay, M.L., and Turner, C.E. (2005). Paxillin is essential for PTP-PEST-dependent regulation of cell spreading and motility: a role for paxillin kinase linker. *J. Cell. Sci* *118*, 5835–5847.
- Jay, D., García, E.J., and de la Luz Ibarra, M. (2004). In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin. *Mol. Cell. Biochem* *260*, 49–53.
- Jeon, Y.J., Choi, J.S., Lee, J.Y., Yu, K.R., Ka, S.H., Cho, Y., Choi, E.-J., Baek, S.H., Seol, J.H., Park, D., et al. (2008). Filamin B serves as a molecular scaffold for type I interferon-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathway. *Mol. Biol. Cell* *19*, 5116–5130.
- Jian, B., Xu, J., Connolly, J., Savani, R.C., Narula, N., Liang, B., and Levy, R.J. (2002). Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am. J. Pathol* *161*, 2111–2121.
- Jiang, P., and Campbell, I.D. (2008). Integrin binding immunoglobulin type filamin domains have variable stability. *Biochemistry* *47*, 11055–11061.
- Jin, Y.-J., Park, I., Hong, I.-K., Byun, H.-J., Choi, J., Kim, Y.-M., and Lee, H. (2011). Fibronectin and vitronectin induce AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression through integrin  $\alpha(5)\beta(1)/\alpha(v)\beta(3)$ -dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Cell. Signal.* *23*, 125–134.
- Johnson, M.S., Lu, N., Denessiouk, K., Heino, J., and Gullberg, D. (2009). Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 779–789.
- Judge, D.P., and Dietz, H.C. (2005). Marfan's syndrome. *Lancet* *366*, 1965–1976.
- Kaartinen, V., Voncken, J.W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genet* *11*, 415–421.
- Kamath, B.M., Spinner, N.B., Emerick, K.M., Chudley, A.E., Booth, C., Piccoli, D.A., and Krantz, I.D. (2004). Vascular anomalies in Alagille syndrome: a significant cause of morbidity and mortality. *Circulation* *109*, 1354–1358.
- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C.L., Baldassarre, M., Wegener, K.L., Campbell, I.D., Yläne, J., and Calderwood, D.A. (2006). The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol. Cell* *21*, 337–347.
- Kim, H., and McCulloch, C.A. (2011). Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion. *FEBS Lett* *585*, 18–22.
- Kim, H., Nakamura, F., Lee, W., Hong, C., Pérez-Sala, D., and McCulloch, C.A. (2010). Regulation of cell adhesion to collagen via beta1 integrins is dependent on interactions of filamin A with vimentin and protein kinase C epsilon. *Exp Cell Res.*
- Kim, H., Nakamura, F., Lee, W., Shifrin, Y., Arora, P.D., and McCulloch, C.A. (2009). Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*

- Kim, L., Kim, D.K., Yang, W.I., Shin, D.H., Jung, I.M., Park, H.K., and Chang, B.C. (2008). Overexpression of transforming growth factor-beta 1 in the valvular fibrosis of chronic rheumatic heart disease. *J. Korean Med. Sci* 23, 41–48.
- Koivisto, L., Heino, J., Häkkinen, L., and Larjava, H. (1994). The size of the intracellular beta 1-integrin precursor pool regulates maturation of beta 1-integrin subunit and associated alpha-subunits. *Biochem. J.* 300 ( Pt 3), 771–779.
- Kong, F., García, A.J., Mould, A.P., Humphries, M.J., and Zhu, C. (2009). Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *J Cell Biol* 185, 1275–1284.
- Ku, D.D., Nelson, J.M., Caulfield, J.B., and Winn, M.J. (1990). Release of endothelium-derived relaxing factors from canine cardiac valves. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 16, 212–218.
- Kyndt, F., Gueffet, J.-P., Probst, V., Jaafar, P., Legendre, A., Le Bouffant, F., Toquet, C., Roy, E., McGregor, L., Lynch, S.A., et al. (2007). Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation* 115, 40–49.
- Kyndt, F., Schott, J.J., Trochu, J.N., Baranger, F., Herbert, O., Scott, V., Fressinaud, E., David, A., Moisan, J.P., Bouhour, J.B., et al. (1998). Mapping of X-linked myxomatous valvular dystrophy to chromosome Xq28. *Am. J. Hum. Genet* 62, 627–632.
- Lad, Y., Jiang, P., Ruskamo, S., Harburger, D.S., Yläne, J., Campbell, I.D., and Calderwood, D.A. (2008). Structural basis of the migfilin-filamin interaction and competition with integrin beta tails. *J. Biol. Chem* 283, 35154–35163.
- Lad, Y., Kiema, T., Jiang, P., Pentikäinen, O.T., Coles, C.H., Campbell, I.D., Calderwood, D.A., and Yläne, J. (2007). Structure of three tandem filamin domains reveals auto-inhibition of ligand binding. *Embo J* 26, 3993–4004.
- Lamsoul, I., Burande, C.F., Razinia, Z., Houles, T.C., Menoret, D., Baldassarre, M., Erard, M., Moog-Lutz, C., Calderwood, D.A., and Lutz, P.G. (2011). Functional and structural insights into ASB2alpha, a novel regulator of integrin-dependent adhesion of hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 286, 30571–30581.
- Lardeux, A., Kyndt, F., Lecointe, S., Marec, H.L., Merot, J., Schott, J.-J., Tourneau, T.L., and Probst, V. (2011). Filamin-A-Related Myxomatous Mitral Valve Dystrophy: Genetic, Echocardiographic and Functional Aspects. *J Cardiovasc Transl Res.*
- Larsen, M., Artym, V.V., Green, J.A., and Yamada, K.M. (2006). The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr. Opin. Cell Biol* 18, 463–471.
- Latif, N., Sarathchandra, P., Taylor, P.M., Antoniow, J., and Yacoub, M.H. (2005). Molecules mediating cell-ECM and cell-cell communication in human heart valves. *Cell Biochem. Biophys* 43, 275–287.
- Legate, K.R., and Fässler, R. (2009a). Mechanisms that regulate adaptor binding to  $\beta$ -integrin cytoplasmic tails. *Journal of Cell Science* 122, 187–198.
- Li, L., Welser, J.V., and Milner, R. (2010). Absence of the alpha v beta 3 integrin dictates the time-course of angiogenesis in the hypoxic central nervous system: accelerated endothelial

- proliferation correlates with compensatory increases in alpha 5 beta 1 integrin expression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *30*, 1031–1043.
- Li, M., Li, C., Weingarten, P., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., and Zhou, Q.Y. (2002). Association of dopamine D(3) receptors with actin-binding protein 280 (ABP-280). *Biochem. Pharmacol* *63*, 859–863.
- Lincoln, J., Lange, A.W., and Yutzey, K.E. (2006). Hearts and bones: shared regulatory mechanisms in heart valve, cartilage, tendon, and bone development. *Dev. Biol* *294*, 292–302.
- Liu, A.C., Joag, V.R., and Gotlieb, A.I. (2007). The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am. J. Pathol* *171*, 1407–1418.
- Liu, G., Thomas, L., Warren, R.A., Enns, C.A., Cunningham, C.C., Hartwig, J.H., and Thomas, G. (1997). Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J. Cell Biol* *139*, 1719–1733.
- Liu, J., He, X., Qi, Y., Tian, X., Monkley, S.J., Critchley, D.R., Corbett, S.A., Lowry, S.F., Graham, A.M., and Li, S. (2011). Talin1 regulates integrin turnover to promote embryonic epithelial morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 3366–3377.
- Lobert, V.H., Brech, A., Pedersen, N.M., Wesche, J., Oppelt, A., Malerød, L., and Stenmark, H. (2010). Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Dev. Cell* *19*, 148–159.
- Lobert, V.H., and Stenmark, H. (2010). Ubiquitination of  $\alpha$ -integrin cytoplasmic tails. *Commun Integr Biol* *3*, 583–585.
- Loo, D.T., Kanner, S.B., and Aruffo, A. (1998). Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J. Biol. Chem* *273*, 23304–23312.
- Lu, M., Munger, J.S., Steadale, M., Busald, C., Tellier, M., and Schnapp, L.M. (2002). Integrin alpha8beta1 mediates adhesion to LAP-TGFbeta1. *J. Cell. Sci* *115*, 4641–4648.
- Ludbrook, S.B., Barry, S.T., Delves, C.J., and Horgan, C.M.T. (2003). The integrin alphavbeta3 is a receptor for the latency-associated peptides of transforming growth factors beta1 and beta3. *Biochem. J* *369*, 311–318.
- Lynch, C.D., and Sheetz, M.P. (2011). Cellular mechanotransduction: filamin a strains to regulate motility. *Curr. Biol.* *21*, R916–918.
- Ma, L., Lu, M.-F., Schwartz, R.J., and Martin, J.F. (2005). Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. *Development* *132*, 5601–5611.
- MacPherson, M., and Fagerholm, S.C. (2010). Filamin and filamin-binding proteins in integrin-regulation and adhesion. Focus on: “FilaminA is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading.” *Am. J. Physiol., Cell Physiol* *298*, C206–208.
- Malfait, F., Wenstrup, R.J., and De Paepe, A. (2010). Clinical and genetic aspects of Ehlers-Danlos syndrome, classic type. *Genet. Med* *12*, 597–605.

- Margadant, C., and Sonnenberg, A. (2010). Integrin-TGF- $\beta$  crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep* 11, 97–105.
- Markwald, R.R., Norris, R.A., Moreno-Rodriguez, R., and Levine, R.A. (2010). Developmental basis of adult cardiovascular diseases: valvular heart diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1188, 177–183.
- Martinez-Fernandez, A., Nelson, T.J., and Terzic, A. (2011). Nuclear reprogramming strategy modulates differentiation potential of induced pluripotent stem cells. *J Cardiovasc Transl Res* 4, 131–137.
- Mehra, A., and Wrana, J.L. (2002). TGF- $\beta$  and the Smad signal transduction pathway. *Biochem. Cell Biol* 80, 605–622.
- Mekontso-Dessap, A., Brouiri, F., Pascal, O., Lechat, P., Hanoun, N., Lanfumey, L., Seif, I., Benhaïem-Sigaux, N., Kirsch, M., Hamon, M., et al. (2006). Deficiency of the 5-hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis and valvulopathy in mice. *Circulation* 113, 81–89.
- Michaud, J.-L.R., Hosseini-Abardeh, M., Farah, K., and Kennedy, C.R.J. (2009). Modulating alpha-actinin-4 dynamics in podocytes. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 166–178.
- Mierke, C.T., Frey, B., Fellner, M., Herrmann, M., and Fabry, B. (2011). Integrin  $\alpha 5\beta 1$  facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J. Cell. Sci.* 124, 369–383.
- Misfeld, M., and Sievers, H.-H. (2007). Heart valve macro- and microstructure. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 362, 1421–1436.
- Mishra, L., and Marshall, B. (2006). Adaptor proteins and ubiquinators in TGF- $\beta$  signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 75–87.
- Mjaatvedt, C.H., Yamamura, H., Capehart, A.A., Turner, D., and Markwald, R.R. (1998). The *Cspg2* gene, disrupted in the *hdf* mutant, is required for right cardiac chamber and endocardial cushion formation. *Dev. Biol.* 202, 56–66.
- Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., and Fässler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat. Med* 14, 325–330.
- Mu, D., Cambier, S., Fjellbirkeland, L., Baron, J.L., Munger, J.S., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Broaddus, V.C., and Nishimura, S.L. (2002). The integrin  $\alpha(v)\beta 8$  mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- $\beta 1$ . *J. Cell Biol* 157, 493–507.
- Muriel, O., Echarri, A., Hellriegel, C., Pavón, D.M., Beccari, L., and Del Pozo, M.A. (2011). Phosphorylated filamin A regulates actin-linked caveolae dynamics. *J. Cell. Sci* 124, 2763–2776.
- Nakagawa, K., Sugahara, M., Yamasaki, T., Kajiho, H., Takahashi, S., Hirayama, J., Minami, Y., Ohta, Y., Watanabe, T., Hata, Y., et al. (2010). Filamin associates with stress signalling kinases MKK7 and MKK4 and regulates JNK activation. *Biochem. J* 427, 237–245.

- Nakamura, F., Hartwig, J.H., Stossel, T.P., and Szymanski, P.T. (2005). Ca<sup>2+</sup> and calmodulin regulate the binding of filamin A to actin filaments. *J. Biol. Chem* 280, 32426–32433.
- Nakamura, F., Heikkinen, O., Pentikäinen, O.T., Osborn, T.M., Kasza, K.E., Weitz, D.A., Kupiainen, O., Permi, P., Kilpeläinen, I., Yläne, J., et al. (2009). Molecular basis of filamin A-FilGAP interaction and its impairment in congenital disorders associated with filamin A mutations. *PLoS ONE* 4, e4928.
- Nakamura, F., Osborn, T.M., Hartemink, C.A., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P. (2007). Structural basis of filamin A functions. *J. Cell Biol* 179, 1011–1025.
- Nakamura, F., Stossel, T.P., and Hartwig, J.H. (2011). The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adh Migr* 5, 160–169.
- Nesta, F., Leyne, M., Yosefy, C., Simpson, C., Dai, D., Marshall, J.E., Hung, J., Slaughter, S.A., and Levine, R.A. (2005). New locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 13: clinical insights from genetic studies. *Circulation* 112, 2022–2030.
- Nishiyama, T., Kii, I., Kashima, T.G., Kikuchi, Y., Ohazama, A., Shimazaki, M., Fukayama, M., and Kudo, A. (2011). Delayed re-epithelialization in periostin-deficient mice during cutaneous wound healing. *PLoS ONE* 6, e18410.
- Nkomo, V.T., Gardin, J.M., Skelton, T.N., Gottdiener, J.S., Scott, C.G., and Enriquez-Sarano, M. (2006). Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* 368, 1005–1011.
- Norris, R.A., Moreno-Rodriguez, R., Wessels, A., Merot, J., Bruneval, P., Chester, A.H., Yacoub, M.H., Hagege, A., Slaughter, S.A., Aikawa, E., et al. (2010). Expression of the familial cardiac valvular dystrophy gene, filamin-A, during heart morphogenesis. *Dev. Dyn* 239, 2118–2127.
- Norris, Russell A, Potts, J.D., Yost, M.J., Junor, L., Brooks, T., Tan, H., Hoffman, S., Hart, M.M., Kern, M.J., Damon, B., Markwald, Roger R & Goodwin, R.L., 2009. Periostin promotes a fibroblastic lineage pathway in atrioventricular valve progenitor cells. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 238(5), p.1052-1063.
- Ohta, Y., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P. (2006). FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat. Cell Biol* 8, 803–814.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 2122–2128.
- Olivey, H.E., Mundell, N.A., Austin, A.F., and Barnett, J.V. (2006). Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev. Dyn* 235, 50–59.
- Oxley, C.L., Anthis, N.J., Lowe, E.D., Vakonakis, I., Campbell, I.D., and Wegener, K.L. (2008). An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *J. Biol. Chem* 283, 5420–5426.

- Panetti, T.S., and McKeown-Longo, P.J. (1993). The alpha v beta 5 integrin receptor regulates receptor-mediated endocytosis of vitronectin. *Journal of Biological Chemistry* 268, 11492 – 11495.
- Paranavitane, V., Coadwell, W.J., Eguinoa, A., Hawkins, P.T., and Stephens, L. (2003). LL5beta is a phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate sensor that can bind the cytoskeletal adaptor, gamma-filamin. *J. Biol. Chem* 278, 1328–1335.
- Paranavitane, V., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2007). Structural determinants of LL5beta subcellular localisation and association with filamin C. *Cell. Signal* 19, 817–824.
- Pavone, L.M., Spina, A., Rea, S., Santoro, D., Mastellone, V., Lombardi, P., and Avallone, L. (2009). Serotonin transporter gene deficiency is associated with sudden death of newborn mice through activation of TGF-beta1 signalling. *J. Mol. Cell. Cardiol* 47, 691–697.
- Pechkovsky, D.V., Scaffidi, A.K., Hackett, T.L., Ballard, J., Shaheen, F., Thompson, P.J., Thannickal, V.J., and Knight, D.A. (2008). Transforming growth factor beta1 induces alphavbeta3 integrin expression in human lung fibroblasts via a beta3 integrin-, c-Src-, and p38 MAPK-dependent pathway. *J. Biol. Chem* 283, 12898–12908.
- Pentikäinen, U., Jiang, P., Takala, H., Ruskamo, S., Campbell, I.D., and Yläne, J. (2011). Assembly of a Filamin Four-domain Fragment and the Influence of Splicing Variant-1 on the Structure. *J. Biol. Chem* 286, 26921–26930.
- Person, A.D., Klewer, S.E., and Runyan, R.B. (2005). Cell biology of cardiac cushion development. *Int. Rev. Cytol* 243, 287–335.
- Playford, M.P., Lyons, P.D., Sastry, S.K., and Schaller, M.D. (2006). Identification of a filamin docking site on PTP-PEST. *J. Biol. Chem* 281, 34104–34112.
- Pober, B.R. (2010). Williams-Beuren syndrome. *N. Engl. J. Med* 362, 239–252.
- Popowicz, G.M., Schleicher, M., Noegel, A.A., and Holak, T.A. (2006). Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci* 31, 411–419.
- Pudas, R., Kiema, T.-R., Butler, P.J.G., Stewart, M., and Yläne, J. (2005). Structural basis for vertebrate filamin dimerization. *Structure* 13, 111–119.
- Puklin-Faucher, E., and Sheetz, M.P. (2009). The mechanical integrin cycle. *J. Cell. Sci.* 122, 179–186.
- Rabkin, E., Aikawa, M., Stone, J.R., Fukumoto, Y., Libby, P., and Schoen, F.J. (2001). Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation* 104, 2525–2532.
- Razinia, Z., Baldassarre, M., Bouaouina, M., Lamsoul, I., Lutz, P.G., and Calderwood, D.A. (2011). The E3 ubiquitin ligase specificity subunit ASB2 $\alpha$  targets filamins for proteasomal degradation by interacting with the filamin actin-binding domain. *J. Cell. Sci.* 124, 2631–2641.

- Régent, M., Planus, E., Bouin, A.-P., Bouvard, D., Brunner, M., Faurobert, E., Millon-Frémillon, A., Block, M.R., and Albiges-Rizo, C. (2011). Specificities of  $\beta 1$  integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength. *Eur. J. Cell Biol.* *90*, 261–269.
- Roberts, W.C., and Ko, J.M. (2005). Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation* *111*, 920–925.
- Robertson, S.P., Jenkins, Z.A., Morgan, T., Adès, L., Aftimos, S., Boute, O., Fiskerstrand, T., Garcia-Miñaur, S., Grix, A., Green, A., et al. (2006). Frontometaphyseal dysplasia: mutations in FLNA and phenotypic diversity. *Am. J. Med. Genet. A* *140*, 1726–1736.
- Robertson, S.P., Twigg, S.R.F., Sutherland-Smith, A.J., Biancalana, V., Gorlin, R.J., Horn, D., Kenwrick, S.J., Kim, C.A., Morava, E., Newbury-Ecob, R., et al. (2003). Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat. Genet* *33*, 487–491.
- Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Adams, R.J., Berry, J.D., Brown, T.M., Carnethon, M.R., Dai, S., de Simone, G., Ford, E.S., et al. (2011). Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* *123*, e18–e209.
- Sacks, M.S., David Merryman, W., and Schmidt, D.E. (2009). On the biomechanics of heart valve function. *J Biomech* *42*, 1804–1824.
- Sacks, M.S., and Yoganathan, A.P. (2007). Heart valve function: a biomechanical perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* *362*, 1369–1391.
- Sakai, K., Nakamura, T., Suzuki, Y., Imizu, T., and Matsumoto, K. (2011). 3-D collagen-dependent cell surface expression of MT1-MMP and MMP-2 activation regardless of integrin  $\beta 1$  function and matrix stiffness. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *412*, 98–103.
- Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* *124*, 2659–2670.
- Sarkisian, M.R., Bartley, C.M., Chi, H., Nakamura, F., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Flavell, R.A., and Rakic, P. (2006). MEKK4 signaling regulates filamin expression and neuronal migration. *Neuron* *52*, 789–801.
- Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K., and Watanabe, K. (2001). Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem* *276*, 17871–17877.
- Sastry, S.K., Lyons, P.D., Schaller, M.D., and Burridge, K. (2002). PTP-PEST controls motility through regulation of Rac1. *J. Cell. Sci.* *115*, 4305–4316.
- Schoen, F.J. (2005). Cardiac valves and valvular pathology: update on function, disease, repair, and replacement. *Cardiovasc. Pathol* *14*, 189–194.



- Schoen, F.J. (2008). Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation* 118, 1864–1880.
- Schroeder, J.A., Jackson, L.F., Lee, D.C., and Camenisch, T.D. (2003). Form and function of developing heart valves: coordination by extracellular matrix and growth factor signaling. *J. Mol. Med* 81, 392–403.
- Scott, M.G.H., Pierotti, V., Storez, H., Lindberg, E., Thuret, A., Muntaner, O., Labbé-Jullié, C., Pitcher, J.A., and Marullo, S. (2006). Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins. *Mol. Cell. Biol* 26, 3432–3445.
- Seck, T., Baron, R., and Horne, W.C. (2003). Binding of filamin to the C-terminal tail of the calcitonin receptor controls recycling. *J. Biol. Chem* 278, 10408–10416.
- Segura, A.M., Luna, R.E., Horiba, K., Stetler-Stevenson, W.G., McAllister, H.A., Willerson, J.T., and Ferrans, V.J. (1998). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation* 98, II331–337; discussion II337–338.
- Sharma, C.P., Ezzell, R.M., and Arnaout, M.A. (1995). Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J. Immunol* 154, 3461–3470.
- Shi, F., and Sottile, J. (2008). Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *J. Cell. Sci* 121, 2360–2371.
- Simon, E.J., and Onoprishvili, I. (2010). The interaction between the mu opioid receptor and filamin A. *Neurochem. Res* 35, 1859–1866.
- Siu, S.C., and Silversides, C.K. (2010). Bicuspid aortic valve disease. *J. Am. Coll. Cardiol* 55, 2789–2800.
- SMITH, D.E., and MATTHEWS, M.B. (1955). Aortic valvular stenosis with coarctation of the aorta, with special reference to the development of aortic stenosis upon congenital bicuspid valves. *Br Heart J* 17, 198–206.
- Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M., and Shapiro, S.S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2, 138–145.
- Swanson, J.C., Krishnamurthy, G., Itoh, A., Escobar Kvitting, J.-P., Bothe, W., Craig Miller, D., and Ingels, N.B., Jr (2011). Multiple mitral leaflet contractile systems in the beating heart. *J Biomech* 44, 1328–1333.
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol* 8, 215.
- Takala, H., Nurminen, E., Nurmi, S.M., Aatonen, M., Strandin, T., Takatalo, M., Kiema, T., Gahmberg, C.G., Ylännä, J., and Fagerholm, S.C. (2008). Beta2 integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood* 112, 1853–1862.

- Tartaglia, M., Gelb, B.D., and Zenker, M. (2011). Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 25, 161–179.
- Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., et al. (2001). Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat. Genet* 29, 465–468.
- Towbin, J.A. (1999). Toward an understanding of the cause of mitral valve prolapse. *Am. J. Hum. Genet* 65, 1238–1241.
- Trochu, J.N., Kyndt, F., Schott, J.J., Gueffet, J.P., Probst, V., Bénichou, B., and Le Marec, H. (2000). Clinical characteristics of a familial inherited myxomatous valvular dystrophy mapped to Xq28. *J. Am. Coll. Cardiol* 35, 1890–1897.
- Ueda, K., Ohta, Y., and Hosoya, H. (2003). The carboxy-terminal pleckstrin homology domain of ROCK interacts with filamin-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 301, 886–890.
- Walker, G.A., Masters, K.S., Shah, D.N., Anseth, K.S., and Leinwand, L.A. (2004). Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ. Res* 95, 253–260.
- Wang, D., Sun, L., Zborowska, E., Willson, J.K.V., Gong, J., Verraraghavan, J., and Brattain, M.G. (1999). Control of Type II Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor Expression by Integrin Ligation. *Journal of Biological Chemistry* 274, 12840–12847.
- Wang, K., Ash, J.F., and Singer, S.J. (1975). Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 72, 4483–4486.
- Watts, S.W., Priestley, J.R.C., and Thompson, J.M. (2009). Serotonylation of vascular proteins important to contraction. *PLoS ONE* 4, e5682.
- Weihing, R.R. (1985). The filamins: properties and functions. *Can. J. Biochem. Cell Biol* 63, 397–413.
- White, D.P., Caswell, P.T., and Norman, J.C. (2007).  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J. Cell Biol.* 177, 515–525.
- Wickström, S.A., and Fässler, R. (2011). Regulation of membrane traffic by integrin signaling. *Trends in Cell Biology* 21, 266–273.
- Wipff, P.-J. & Hinz, B., 2008. Integrins and the activation of latent transforming growth factor [beta]1 - An intimate relationship. *European Journal of Cell Biology*, 87(8-9), p.601-615.
- Wirrig, E.E., and Yutzey, K.E. (2011). Transcriptional regulation of heart valve development and disease. *Cardiovasc. Pathol* 20, 162–167.
- Woo, M.S., Ohta, Y., Rabinovitz, I., Stossel, T.P., and Blenis, J. (2004). Ribosomal S6 kinase (RSK) regulates phosphorylation of filamin A on an important regulatory site. *Mol. Cell. Biol* 24, 3025–3035.

- Wozniak, M.A., Modzelewska, K., Kwong, L., and Keely, P.J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1692, 103–119.
- Xie, Z., Xu, W., Davie, E.W., and Chung, D.W. (1998). Molecular cloning of human ABPL, an actin-binding protein homologue. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 251, 914–919.
- Yamagishi, T., Nakajima, Y., Miyazono, K., and Nakamura, H. (1999). Bone morphogenetic protein-2 acts synergistically with transforming growth factor-beta3 during endothelial-mesenchymal transformation in the developing chick heart. *J. Cell. Physiol* 180, 35–45.
- Yamazaki, M., Furuike, S., and Ito, T. (2002). Mechanical response of single filamin A (ABP-280) molecules and its role in the actin cytoskeleton. *J. Muscle Res. Cell. Motil* 23, 525–534.
- Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., et al. (2002). E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418, 438–442.
- Yoshida, Y., Murakami, A. & Tanaka, K., 2011. Skp1 stabilizes the conformation of F-box proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410(1), p.24-28.
- Zheng, Y., Yang, W., Xia, Y., Hawke, D., Liu, D.X., and Lu, Z. (2011). Ras-induced and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 phosphorylation-dependent isomerization of protein tyrosine phosphatase (PTP)-PEST by PIN1 promotes FAK dephosphorylation by PTP-PEST. *Mol. Cell. Biol.* 31, 4258–4269.
- Zhou, A.-X., Hartwig, J.H., and Akyürek, L.M. (2010). Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol* 20, 113–123.



# ANNEXES

**Filamin-A-Related Myxomatous Mitral Valve Dyrtophy: Genetic,  
Echocardiographic and functional aspects**

## Filamin-A-Related Myxomatous Mitral Valve Dystrophy: Genetic, Echocardiographic and Functional Aspects

Aur lie Lardeux · Florence Kyndt · Simon Lecointe ·  
Hervé Le Marec · Jean Merot · Jean-Jacques Schott ·  
Thierry Le Tourneau · Vincent Probst

Received: 20 May 2011 / Accepted: 10 July 2011  
  Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** Myxomatous dystrophy of the cardiac valves is a heterogeneous group of disorders, including syndromic diseases such as Marfan syndrome and isolated valvular diseases. Mitral valve prolapse, the most common form of this disease, is presumed to affect approximately 2% to 3% of the population and remains one of the most common causes of valvular surgery. During the past years, important effort has been made to better understand the pathophysiological basis of mitral valve prolapse. Autosomal-dominant transmission is the usual inheritance with reduced penetrance and variable expressivity. Three loci have been mapped to chromosomes 16p11-p12, 11p15.4 and 13q31-32, but the underlying genetic defects are not currently known. An X-linked recessive form has been originally described by Monteleone and Fagan in 1969. Starting from one large French family and three smaller other families in which MVP was transmitted with an X-linked pattern, we have been able to identify three filamin A mutations p.Gly288Arg and p.Val711Asp and a 1,944-bp genomic deletion coding for exons 16 to 19. In this review, we describe the genetic, echocardiographic and functional aspects of the filamin-A-related myxomatous mitral valve dystrophy.

**Keywords** Filamin A · Mitral valve prolapse · Genetic · Pathophysiology

A. Lardeux · F. Kyndt · S. Lecointe · H. L. Marec · J. Merot ·  
J.-J. Schott · T. Le Tourneau · V. Probst  
l'institut du thorax, Clinique Cardiologique and Inserm,  
915, CHU de Nantes,  
Nantes, France

V. Probst (✉)  
Service de cardiologie du CHU de Nantes,  
Bd Monod,  
44093 Nantes Cedex 01, France  
e-mail: vincent.probst@chu-nantes.fr

### Introduction

During the past years, important effort has been made to better understand the pathophysiological basis of mitral valve prolapse [1]. One of the most efficient ways to go inside the understanding of a disease is to identify the underlying genetic basis. This strategy has already been proved successful for other cardiac diseases like hypertrophic cardiomyopathy or long QT syndrome. Often, once the first gene is identified, it becomes easier to identify the other genetic defects as most of the diseases follow a final common pathway meaning that the different genes involved in a disease are finally only a part of a same pathophysiological cascade [2]. For these different reasons, the identification of the filamin A (*FLNA*) gene as the first gene of non-syndromic mitral valve prolapse represents the first step to a new field of knowledge and perhaps at term, to new therapeutic strategies.

In this review, we will present the current knowledge on the role of *FLNA* mutations on mitral valve prolapse and valve disease at both cellular and clinical level.

### Genetics of Mitral Valve Prolapse

Myxomatous dystrophy of the cardiac valves is a heterogeneous group of disorders, including syndromic diseases such as Marfan syndrome and isolated valvular diseases. Mitral valve prolapse, the most common form of this disease, is presumed to affect approximately 2% to 3% of the population and remains one of the most common causes of valvular surgery [3–5].

Typical histopathological features of myxomatous valvular dystrophy include fragmentation of collagenous bundles within the valve fibrosa and accumulation of



proteoglycans causing excessive valve tissue that leads to billowing of the valve leaflets, with or without prolapse and regurgitation. The causes of these histological changes remain unknown [6, 7] although recent studies suggest a role of the transforming growth factor- $\beta$  in these changes at least in specific form of the disease [8].

Initially, MVP has been reported in syndromic form in association with many genetic connective tissue disorders, including Marfan syndrome [9] caused by mutations in the gene fibrillin-1 *FBN1*, Loeys–Dietz syndrome caused by mutations in transforming growth factor beta receptor 1 *TGFBR1* and 2 *TGFBR2* [10], Ehlers–Danlos syndrome [11, 12], osteogenesis imperfecta [13] which are associated with collagen mutations in most patients and pseudoxanthoma elasticum [14, 15], which is caused by mutations in the ATP-binding cassette protein *ABCC6* [16]. Despite the association of MVP with these connective tissue disorders, linkage of non-syndromic MVP to fibrillin-1 and several collagen genes has been excluded [17].

Recently MVP has been described co-segregating with aortic dilation and Juvenile polyposis syndrome (JPS) in a family with mutation in *SMAD4*, another gene implicated in the TGF $\beta$  network [18].

#### Non-syndromic Forms of Mitral Valve Prolapse

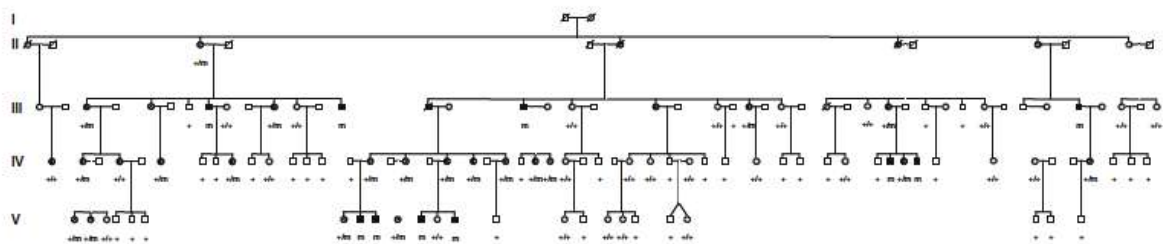
Familial inheritance has been clearly demonstrated for mitral valve prolapse and a familial screening of the first degree relatives is recommended after the identification of an index patient affected by mitral valve prolapse [19]. Autosomal-dominant transmission is the usual inheritance with reduced penetrance and variable expressivity [1]. Three loci have been mapped to chromosomes 16p11-p12, 11p15.4 and 13q31-32 but the underlying genetic defects are not currently known [20–22]. A X-linked recessive form has been originally described by Monteleone and Fagan in 1969 [23].

#### Filamin A Mutations in X-linked Myxomatous Valvular Dystrophy

##### Familial Description

The proband of the large French family underwent aortic replacement for severe regurgitation at age 17 (Fig. 1). He was of normal size and morphology, and a physical examination found no connective tissue or joint abnormalities. Cardiac auscultation suggested aortic regurgitant murmur, and echocardiography showed severe aortic regurgitation. Aortic root dimensions were normal as confirmed by a nuclear magnetic resonance study of the thoracic aorta. Histological examination of the excised valve showed typical features of myxomatous valvular disease (thickness was superior to 4 mm), with marked thickening of the free edge of the valve. Light microscopy using blue alcyan, hemalun–eosin–safran and Weigert stains was performed, showing extensive accumulation of proteoglycan and fragmentation of the collagenous bundle. Aortic root analysis was strictly normal without any aspect of Marfan or Ehlers–Danlos syndrome. His cousin underwent mitral valve repair for severe mitral regurgitation due to mitral valve dystrophy several weeks later. The identification of a mild haemophilia A in these two patients and the familial study led to the identification of a very large family of more than 300 individuals.

In this family, among 44 males, ten suffered from progressive mitral valve prolapse (leaflet displacement relative to the high points of the saddle-shaped mitral annulus) associated in four cases with moderate to severe aortic regurgitation and four had undergone valvular surgery. Among 47 women, ten were considered as affected with mitral and/or aortic valve abnormalities although all were asymptomatic. One child diagnosed at age 10, showed severe aortic regurgitation with aortic stenosis. In all affected members, the valvular disease was associated with a mild haemophilia A (FVIII activity between 15% and 50%). In order to increase



**Fig. 1** Pedigree tree of the French family that led to the identification of the *FLNA* gene as responsible for myxoid valve disease. Female family members are indicated by circles; male family members are indicated by squares. Affected status is indicated by filled symbols; patients with no clinical manifestations of XMVD by unfilled symbols;

and patients with undetermined status by hatched symbols. Obligatory carriers are designated by a dot inside an open circle. Slashes denote deceased family members. Positive symbol indicates the WT allele, and *m* indicates the mutated allele

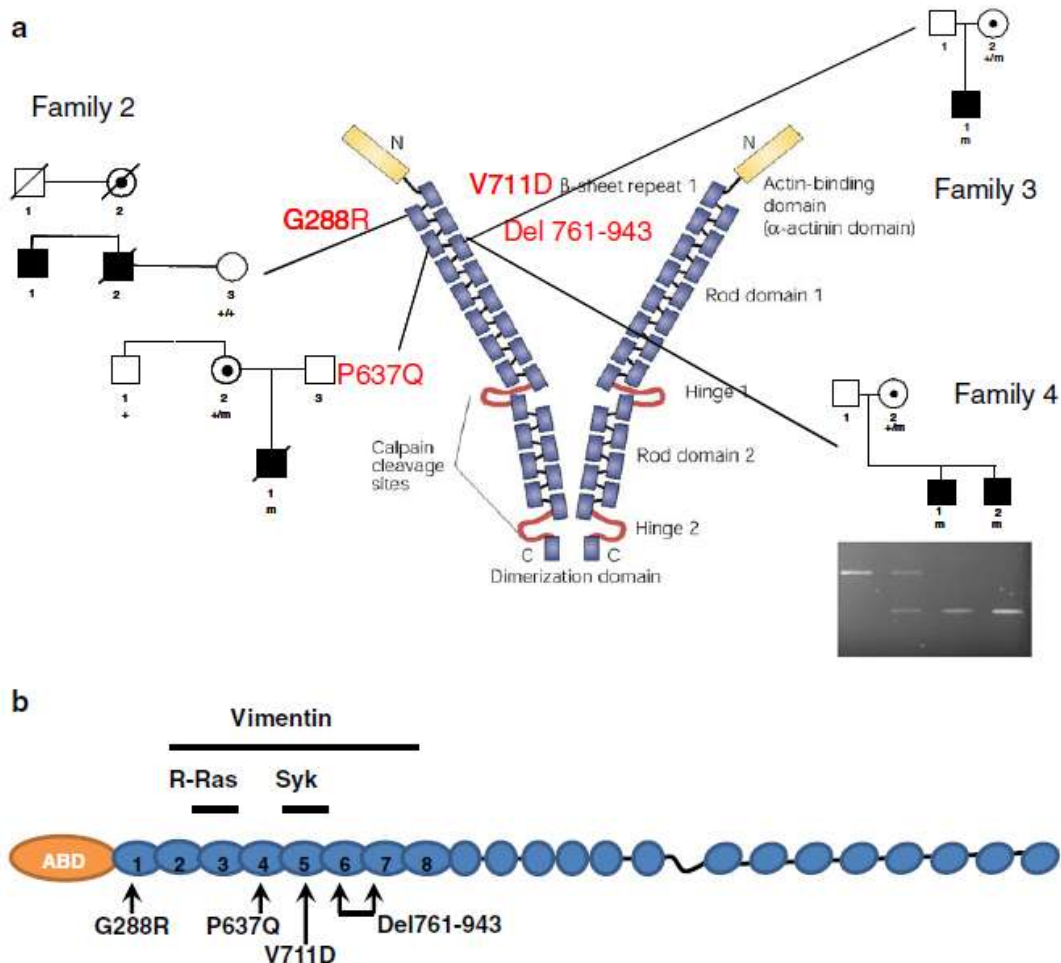


the size of this family to facilitate the identification of the gene responsible for the disease, we have screened our database to identify patients affected by mild haemophilia A and operated for valvulopathy. This led us to identify a new patient operated at age 52 for severe aortic regurgitation and who had also a mild haemophilia A. This patient was deceased at the time of the study but as he originated from the same geographic location than the initial family, we considered that he should be linked to this family and genealogic approach allows us to link the two kindred to a common ancestor born in the eighteenth century. We then performed a familial study. His mother had moderate mitral and aortic regurgitation. Three other males presented with moderate mitral valvular dystrophy and moderate to mild aortic regurgitation. All of them had mild haemophilia A except for one individual whose FVIII activity was normal (>50%) demonstrating that mild haemo-

philia and the myxomatous valvulopathy are two separated entities in the family. Five females were considered as affected with variable mitral and/or aortic regurgitation.

The second family (family 2) was a British family with X-linked myxomatous valvular dystrophy (XMVD) described by Newbury-Ecob R.A. et al. in 1993 [24]. The proband was born with severe congenital valvular disease and died at 24 h of age with severe cardiac failure (Fig. 2). Necropsy showed dystrophy of all four valves and an atrial septal defect. His grandfather underwent a triple valve replacement and closure of a persistent foramen ovale at age 41. At surgery, the mitral and aortic valves showed myxomatous dystrophy. His brother was diagnosed as having mitral and aortic valvular disease at age 30.

Male infant (family 3) was the first child of healthy black African parents (Fig. 2). He was diagnosed antena-



**Fig. 2** a Pedigree of the three other FLNA families and localisation of the mutation within the filamin A gene. b Schematic representation of filamin's actin-binding domain (ABD) and the 24 repeats. The location

of three interacting partners discussed in the text (vimentin, R-Ras and Syk) are indicated together with the XMVD-associated FLNA mutations

tally with abnormally thickened cardiac valves by ultrasound and fetal echocardiography and was born at 38 weeks in good condition. Postnatal echocardiography confirmed moderate tricuspid incompetence, trivial mitral and pulmonary incompetence and mild aortic incompetence. All valves were thickened and dystrophic. At 4 months of age, his growth and developmental assessment were within normal limits and he showed no signs of cardiac failure. An echocardiogram showed excellent ventricular function. The mitral valve remained dystrophic without evidence of regurgitation and only very mild aortic regurgitation. His mother was examined clinically and showed no evidence of cardiac involvement.

Family 4 was of Hong Kong Chinese origin. The two boys, 12 and 4 years old, had both mitral and aortic dystrophy. A heart murmur was identified in the first boy at age 4 months on a routine check. Subsequent echocardiography revealed he had polyvalvular disease with myxomatous thickening of the mitral tricuspid and aortic valves. He had significant mitral and tricuspid regurgitation with mild aortic regurgitation. His brother was shown to have polyvalvular disease with mitral incompetence and stenosis, tricuspid regurgitation and mild aortic regurgitation. Their mother had an essentially normal echocardiogram at age 38 years with mild aortic and pulmonary incompetence.

All four families presented no clinically apparent extracardiac abnormalities, no dysmorphic features and no epileptic seizures.

**Table 1** Main echocardiographic characteristics in mutation carriers of the large family (family 1)

	Males (n=14)	Females (n=31)	P
Age (years)	32±16	32±20	0.79
AML billowing (n (%))	12 (85.7)	4 (12.9)	<0.0001
PML billowing (n (%))	8 (57.1)	1 (3.2)	<0.0001
AML thickness (mm)	5.3±1.2	3.4±0.6	<0.0001
PML thickness (mm)	4.5±0.9	2.8±0.7	<0.0001
Mitral regurgitation (n (%))			<0.0001
Mild	0	20 (64.5)	
Moderate	12 (85.7)	4 (12.9)	
Severe	2 (14.3)	0	
Aortic regurgitation (n (%))			0.006
Mild	6 (42.8)	9 (29.0)	
Moderate	3 (21.4)	3 (9.7)	
Severe	4 (28.6)	1 (3.2)	
Tricuspid regurgitation (n (%))			<0.0001
Mild	9 (64.3)	9 (29.0)	
Moderate	2 (14.3)	1 (3.2)	
Severe	0	0	
Pulmonary regurgitation (n (%))			<0.0001
Mild	4 (28.6)	2 (6.4)	
Moderate	0	1 (3.2)	
Severe	0	0	

Billowing of the mitral leaflets is defined as the systolic displacement of mitral leaflet at  $\geq 2$  mm into the left atrium, relative to a line connecting the mitral annular hinge points in the parasternal long-axis view (i.e. above the superior part of the saddle-shaped mitral annulus)

AML anterior mitral leaflet, PML posterior mitral leaflet

## Genetic

Using linkage analysis, we first mapped the gene on chromosome Xq28 in the large French family [25]. A standard positional cloning approach identified a first mutation (p.Pro637Gln) in the *FLNA* gene in all affected members of this French family (Fig. 1). Three other *FLNA* mutations p.Gly288Arg and p.Val711Asp and a 1,944-bp genomic deletion coding for exons 16 to 19, were identified in the three other families (Fig. 2).

The *FLNA* gene encodes a large cytoskeletal protein, FLNA, that crosslinks actin filaments into a dynamic three-dimensional structure network and links these to the cell membrane. Filamin proteins have an N-terminal actin-binding domain, followed by 24 immunoglobulin-like filamin repeats that fold into antiparallel beta sheets that function as interfaces for protein interactions [26].

Three of the XMVD mutations cause missense changes in highly conserved amino acid residues and alter repeat consensus sequences, which probably leads to significant conformational changes in the protein. The fourth mutation leads to an in-frame deletion of repeats 5 through 7 [27].

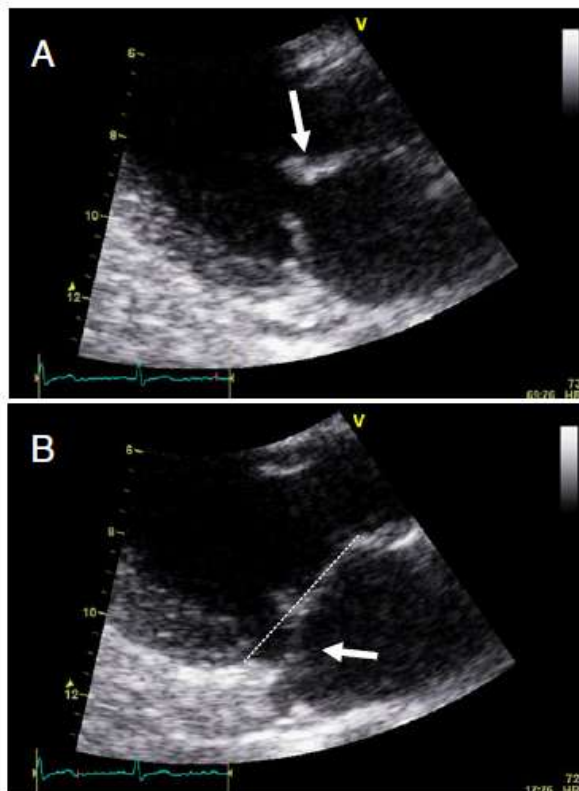
## Echographic Analysis of the *FLNA* Gene Carriers in the French Family

The first finding of our echocardiographic examinations was the preponderance of mitral valve lesions in males compared with female patients (Table 1) in agreement with



an X-linked transmission [28]. Indeed, male patients are hemizygous while female patients are heterozygous for filamin A mutation. Mitral leaflets were clearly dystrophic in all male patients as demonstrated by an increase in anterior and posterior leaflet thickness and leaflet length. Mitral annulus was enlarged in diastole and systole compared with control male patients [28]. Mitral valve billowing was present in all but one male with a moderate backward displacement of the anterior leaflet into the left atrium of  $3.1 \pm 1.5$  mm on average [28]. Mitral regurgitation was graded as moderate or severe in the nine males according to a semi-quantitative criterion (left atrial regurgitant jet area to left atrium ratio). However, only one patient underwent mitral valve repair at 18 years old for severe mitral regurgitation.

By contrast, females had less severe mitral valve dystrophy (Fig. 3) without significant difference in leaflet thickness or length compared with controls. Annulus diameter did not differ from controls. Among 17 heterozygous females, eight had moderate mitral regurgitation and only one had moderate mitral leaflet billowing [28]. None of them underwent cardiac surgery.



**Fig. 3** Filamin A mitral valve dystrophy (P637Q mutation). **a** Thickening of anterior leaflet tip (*arrow*). **b** Marked posterior leaflet prolapse or billowing (*arrow*) and mild anterior leaflet billowing. *Dash line*, annulus line

The second finding was the frequent involvement of the aortic valve with aortic regurgitation. In males aortic regurgitation was found in six of nine carrier patients and was the main reason to refer patients to surgery in three cases. In the three other male patients, aortic regurgitation was considered mild or moderate based on a semi-quantitative approach. Aortic regurgitation was the main aortic valve finding as aortic valve dystrophy is more difficult to ascertain compared with mitral valve dystrophy.

Tricuspid valve and pulmonary valves of males and females were not considered affected by the dystrophic process in this first evaluation. However, a young female had moderate pulmonary regurgitation without left valve defect.

Based on our recent data (Table 1) comprising more patients, mitral regurgitation was moderate in 12 of 14 carrier male patients and severe in two of 14 [27]. Aortic regurgitation was mild in six, moderate in three and severe in four of 14 male patients. Moreover, tricuspid regurgitation was mild in nine and moderate in two of 14 male patients. Finally, pulmonary regurgitation was absent or only of mild grade in males. In females, mitral regurgitation was absent or mild in 27 and moderate in four of 31 carrier patients. Aortic regurgitation was absent or mild in 28 and moderate in only three of 31 female patients. Tricuspid regurgitation was moderate in only one female and pulmonary regurgitation in only one carrier female patient.

To conclude, FLNA mutations can result in various cardiac defects with or without other organ involvement. Filamin-A-related mitral valve dystrophy has been described in a few families around the world; mitral valve lesions predominate in male patients owing to X-linked FLNA inheritance but females can also be affected with minor lesions. The precise mechanism of the development of the disease remains unclear. However, like other X-linked diseases, X chromosome inactivation (XCI) might be a key component of how the disease develops. Disorders caused by defects in the *FLNA* gene often show a skewed XCI pattern [29]. Primarily, the XCI choice is random, but when most of the normal X chromosomes are preferentially inactivated in the target tissues, the carriers will show typical features of X-linked diseases usually observed in male patients. Skewed XCI is known to vary in different tissues and to correlate with age under the pressure of secondary selection [30]. Several mechanisms may contribute to the skewing, including stochastic effects, a selective growth advantage of the cell that carries either the mutated or the normal allele (secondary cell selection) and genetic processes yielding preferential inactivation of specific alleles. During cell proliferation, either in all cells or in a tissue specific manner, cells that carry an active mutated allele may have a significant disadvantage, are gradually lost or selected against, and are thus less represented in the



adult female.[31]. Therefore, it is important to investigate the XCI patterns to understand the pathogenesis of the disease in female carriers. Mitral valve lesions are characterized by leaflet thickening, leaflet elongation and moderate billowing in male patients. Polyvalvular involvement associating mitral valve dystrophy and aortic regurgitation is a frequent finding in these patients but the tricuspid and pulmonary valves can also be affected by the dystrophic process. Further investigations are warranted to determine the overall valvular phenotype of this specific aetiology of valve dystrophy.

#### Functional Consequences of the FLNA Mutations

The human FLNA molecule consists in 24 immunoglobulin-like domains preceded by an N-terminal actin-binding domain of 275 residues, which includes two calponin homology domains that are characteristic of actin-binding proteins. Filamin A stabilizes cortical three-dimensional F-actin networks and links them to cellular membranes thereby conferring membranes integrity and protecting cells against mechanical stress [26]. In addition to actin, FLNA binds to >70 cellular proteins including transmembrane receptors and signalling molecules. FLNA thus exhibits essential scaffolding functions and integrates multiple cellular behaviours during embryonic development, cellular migration or mechanical stress response [32–34].

Not surprisingly, FLNA mutations cause a wide spectrum of congenital anomalies including: Melnick–Needles syndrome (MNS), otopalatodigital syndrome (OPD) and periventricular heterotopia (PVH) [35, 36]. However, although FLNA null mutations causing PVH were associated with neuronal migration failure during fetal development [37] and many mutations causing MNS and OPD were linked to gain of function in actin-binding domain [29], to date, the molecular mechanisms by which FLNA mutations affect cellular behaviours remain largely unknown. The same holds for the mutations which result in XMVD.

Functional analyses through *FLNA* gene knockout studies have provided important information on the role of FLNA during cardiac morphogenesis [38]. Indeed, complete loss of FLNA results in embryonic lethality with pleomorphic array of cardiac malformations involving ventricles, atria and outflow tracts, as well as widespread aberrant vascular patterning [39]. Abnormal epithelial and endothelial organization and aberrant adherent junctions in developing blood vessels in heart and other tissues support the essential roles for FLNA in intercellular junctions and provide possible mechanism for the valvular defects seen in patients [40]. In fact, valvulogenesis is a complex process in which growth factors signal the process of endocardium-to-mesenchyme transformation (EMT) resulting in formation of pre-valvular cushions [41]. The spatio-temporal

distribution of FLNA during cardiac morphogenesis supports its key role in this developmental process. Indeed, FLNA is found in the endothelium and mesenchyme of atrioventricular and outflow tract cushions, the epicardium and the endothelium of the ventricular trabeculae, supporting the idea that, in the developing valves, FLNA participates in endothelial integrity and promotes maturation of the valvular interstitium after EMT [42–44]. However, how FLNA mutations affect valve development remains unresolved.

FLNA appears as a functional hub in many signalling pathway that may contribute to the development of the valvular disease. For example, FLNA is known to modulate TGF- $\beta$  signalling and physically interacts with its intracellular mediators Smads [45]. It may, thus, interfere with the TGF- $\beta$  signalling pathways which are known to contribute to the molecular machinery essential for collagen deposition, and matrix remodelling in the myxomatous valve associated to mitral valve prolapse as this is the case in the Marfan syndrome [8, 46, 47]. However, it is worth noting that most of FLNA binding partners identified to date (including Smads) interact with the C-terminal repeats of the protein whereas XMVD mutations are clustered in the N-terminal 1–8 repeats [32–34], suggesting their pathological effects may arise from interactions with new, yet unknown binding partners or more remote defects in the signalling pathway.

Interestingly, recent studies identified new FLNA binding partners interacting through the N-terminal repeats of the protein that could potentially have physiopathological consequences. These include the small GTPase R-Ras, the spleen tyrosine kinase (Syk) and the intermediate filament protein vimentin (Fig. 2b).

R-Ras is a small GTPase of the Ras family known to regulate many cell functions including apoptosis, cell adhesion, cell spreading, and phagocytosis through the activation of integrin. In a recent study Griffiths and colleagues demonstrated the role of FLNA/R-Ras interactions in cadherin organization at endothelial cell–cell adherens junctions and the regulation of endothelium permeability [48, 49]. Whether the XMV-associated mutations affect FLNA/R-Ras interactions and impact valvulogenesis through abnormal endothelial function and endothelial-mesenchymal transformation as discussed above will require future studies.

Falet and colleagues identified the Syk as a new binding partner of FLNA N-terminal repeats 1–3 and 5 [50]. They showed Syk/FLNA interaction participates in immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) response. In their inducible FLNA knock out model, the ITAM response is severely compromised. FLNA null platelets exhibit decreased  $\alpha$ -granule secretion, integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation, and protein–tyrosine phosphorylation and, in particular, that



of the protein–tyrosine kinase Syk. This study indicates that FLNA contributes to Syk spatial distribution to the cytoplasmic surface of the platelet plasma membrane and facilitates Syk phosphorylation and activation. Interestingly, Syk participates in the regulation of serotonin transporter activity (SERT) which has been widely involved in the development of cardiac fibrosis and valvulopathy [51–57]. Here again, whether XMVD-associated FLNA mutations alter Syk activation, SERT activity and valvular serotonin signalling should be clarified.

The last FLNA binding partner recently identified is vimentin [58]. Vimentin is a member of the intermediate filament family of proteins which is expressed in quiescent valvular interstitial cells and activated myofibroblasts [40]. Vimentin shares several functional features in common with FLNA, including regulation of cell adhesion and motility, enrichment in  $\beta 1$  integrin-containing focal adhesions, reorganization of collagen fibrils, contraction of collagen lattices and mechanical stabilization of cells [59]. One can speculate that a functional defect of vimentin may participate to the pathological portrait of FLNA associated XMVD. Interestingly recent studies described FLNA–vimentin–protein kinase C (PKC $\epsilon$ ) interaction and localized their binding site in the N-terminal repeats of FLNA (repeats 1–8) [60, 61]. They showed FLNA–vimentin interactions modulate cell adhesion to collagen through the regulation of  $\beta 1$  integrin trafficking. Deficient FLNA–vimentin–PKC $\epsilon$  interaction limits vimentin phosphorylation that increases  $\beta 1$  integrin endocytosis and degradation which finally results in reduced  $\beta 1$  integrin plasma membrane expression [62]. Given the crucial role of  $\beta 1$  integrin signalling pathways in cell migration, extracellular matrix remodelling, chemokine signalling pathway (including TGF- $\beta$ ) in response to mechanical stress, makes vimentin–FLNA an interesting duo to consider in XMVD [63].

## Conclusions

MVP appears to be the result of multiple genetic pathways, as illustrated by the identification of several genes in syndromic MVP and three loci for non-syndromic MVP. The identification of FLNA mutations in an X-linked form of valvular dystrophy highlight the importance of the cytoskeleton not only in providing structural integrity but also in critical cellular signalling pathways, specifically the TGF- $\beta$  pathway. As FLNA interacts with a large number of partners involved in several different pathways it is currently difficult to draw a clear picture of the major pathophysiological mechanism involved in the occurrence of mitral valve prolapse. Why the FLNA mutations identified in the MVP lead to a phenotype restricted to the cardiac valves whereas the FLNA is widely expressed

remains unresolved? Interaction with protein partners mainly expressed or functionally important in cardiac valves; and the presence of a pulsatile stretch on the valves not present in the other tissues appears to be the most probable explanations. Advances in DNA sequencing technologies should lead to the identification of the MMVP1, MMVP2 and MMVP3 genes in the near future. Large-scale collections of MVP patients and genome wide association studies will allow identification of additional MVP genes and finally allow to understand the complete pathway (unique or not) leading to the occurrence of mitral valve prolapse.

Identification of the genes involved in the development of MVP is important because the disease typically manifests later in life, and earlier intervention in susceptible individuals could potentially prevent progression to a clinically severe stage. Studies in murine models of Marfan syndrome have shown for the first time that the myxomatous changes characteristic of MVP are pharmacologically preventable, which offers great hope for the development of therapies based on future genetic discoveries.

## References

1. Devereux, R. B., Brown, W. T., Kramer-Fox, R., & Sachs, I. (1982). Inheritance of mitral valve prolapse: effect of age and sex on gene expression. *Annals of Internal Medicine*, *97*, 826–832.
2. Bowles, N. E., Bowles, K. R., & Towbin, J. A. (2000). The "final common pathway" hypothesis and inherited cardiovascular disease. The role of cytoskeletal proteins in dilated cardiomyopathy. *Herz*, *25*, 168–175.
3. Levy, D., & Savage, D. (1987). Prevalence and clinical features of mitral valve prolapse. *American Heart Journal*, *113*, 1281–1290.
4. Freed, L. A., Levy, D., Levine, R. A., et al. (1999). Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *The New England Journal of Medicine*, *341*, 1–7.
5. Waller, B. F., Morrow, A. G., Maron, B. J., et al. (1982). Etiology of clinically isolated, severe, chronic, pure mitral regurgitation: analysis of 97 patients over 30 years of age having mitral valve replacement. *American Heart Journal*, *104*, 276–288.
6. Towbin, J. A. (1999). Toward an understanding of the cause of mitral valve prolapse. *American Journal of Human Genetics*, *65*, 1238–1241.
7. Levine, R. A., Handschumacher, M. D., Sanfilippo, A. J., et al. (1989). Three-dimensional echocardiographic reconstruction of the mitral valve, with implications for the diagnosis of mitral valve prolapse. *Circulation*, *80*, 589–598.
8. Ng, C. M., Cheng, A., Myers, L. A., et al. (2004). TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, *114*, 1586–1592.
9. Keane, M. G., & Pyeritz, R. E. (2008). Medical management of Marfan syndrome. *Circulation*, *117*, 2802–2813.
10. Singh, K. K., Rommel, K., Mishra, A., et al. (2006). TGFBR1 and TGFBR2 mutations in patients with features of Marfan syndrome and Loeys–Dietz syndrome. *Human Mutation*, *27*, 770–777.
11. McDonnell, N. B., Gorman, B. L., Mandel, K. W., et al. (2006). Echocardiographic findings in classical and hypermobile Ehlers–



- Danlos syndromes. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 140, 129–136.
12. Malfait, F., & De Paepe, A. (2005). Molecular genetics in classic Ehlers–Danlos syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 139C, 17–23.
  13. Hortop, J., Tsiouras, P., Hanley, J. A., Maron, B. J., & Shapiro, J. R. (1986). Cardiovascular involvement in osteogenesis imperfecta. *Circulation*, 73, 54–61.
  14. Pyeritz, R. E., Weiss, J. L., Rennie, W. A., & Fine, S. L. (1982). Pseudoxanthoma elasticum and mitral-valve prolapse. *The New England Journal of Medicine*, 307, 1451–1452.
  15. Ringpfeil, F., Leibold, M. G., Christiano, A. M., & Uitto, J. (2000). Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 6001–6006.
  16. Plomp, A. S., Florijn, R. J., Ten Brink, J., et al. (2008). ABCC6 mutations in pseudoxanthoma elasticum: an update including eight novel ones. *Molecular Vision*, 14, 118–124.
  17. Henney, A. M., Tsiouras, P., Schwartz, R. C., Child, A. H., Devereux, R. B., & Leech, G. J. (1989). Genetic evidence that mutations in the COL1A1, COL1A2, COL3A1, or COL5A2 collagen genes are not responsible for mitral valve prolapse. *British Heart Journal*, 61, 292–299.
  18. Andrabi, S., Bekheimia, M. R., Robbins-Furman, P., Lewis, R. A., Prior, T. W., & Potocki, L. (2011). SMAD4 mutation segregating in a family with juvenile polyposis, aortopathy, and mitral valve dysfunction. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 155, 1165–1169.
  19. Cheitlin, M. D., Alpert, J. S., Armstrong, W. F., et al. (1997). ACC/AHA Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Clinical Application of Echocardiography). Developed in collaboration with the American Society of Echocardiography. *Circulation*, 95, 1686–1744.
  20. Disse, S., Abergel, E., Berrebi, A., et al. (1999). Mapping of a first locus for autosomal dominant myxomatous mitral-valve prolapse to chromosome 16p11.2-p12.1. *American Journal of Human Genetics*, 65, 1242–1251.
  21. Freed, L. A., Acicmo, J. S., Jr., Dai, D., et al. (2003). A locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 11p15.4. *American Journal of Human Genetics*, 72, 1551–1559.
  22. Nesta, F., Leyne, M., Yosefy, C., et al. (2005). New locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 13: clinical insights from genetic studies. *Circulation*, 112, 2022–2030.
  23. Monteleone, P. L., & Fagan, L. F. (1969). Possible X-linked congenital heart disease. *Circulation*, 39, 611–614.
  24. Newbury-Ecob, R. A., Zuccollo, J. M., Rutter, N., & Young, I. D. (1993). Sex linked valvular dysplasia. *Journal of Medical Genetics*, 30, 873–874.
  25. Kyndt, F., Schott, J. J., Trochu, J. N., et al. (1998). Mapping of X-linked myxomatous valvular dystrophy to chromosome Xq28. *American Journal of Human Genetics*, 62, 627–632.
  26. Nakamura, E., Stossel, T. P., & Hartwig, J. H. (2011). The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adhesion & Migration*, 5, 160–169.
  27. Kyndt, F., Gueffet, J. P., Probst, V., et al. (2007). Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation*, 115, 40–49.
  28. Trochu, J. N., Kyndt, F., Schott, J. J., et al. (2000). Clinical characteristics of a familial inherited myxomatous valvular dystrophy mapped to Xq28. *Journal of the American College of Cardiology*, 35, 1890–1897.
  29. Robertson, S. P., Twigg, S. R., Sutherland-Smith, A. J., et al. (2003). Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nature Genetics*, 33, 487–491.
  30. Sharp, A., Robinson, D., & Jacobs, P. (2000). Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Human Genetics*, 107, 343–349.
  31. Orstavik, K. H. (2009). X chromosome inactivation in clinical practice. *Human Genetics*, 126, 363–373.
  32. Zhou, A. X., Hartwig, J. H., & Akyurek, L. M. (2010). Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends in Cell Biology*, 20, 113–123.
  33. Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., et al. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2, 138–145.
  34. Baldassarre, M., Razinia, Z., Burande, C. F., Lamsoul, I., Lutz, P. G., & Calderwood, D. A. (2009). Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration. *PLoS One*, 4, e7830.
  35. Parrini, E., Mei, D., Wright, M., Dom, T., & Guerrini, R. (2004). Mosaic mutations of the FLN1 gene cause a mild phenotype in patients with periventricular heterotopia. *Neurogenetics*, 5, 191–196.
  36. Jefferies, J. L., Taylor, M. D., Rossano, J., Belmont, J. W., & Craigen, W. J. (2010). Novel cardiac findings in periventricular nodular heterotopia. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 152A, 165–168.
  37. Sheen, V. L., Dixon, P. H., Fox, J. W., et al. (2001). Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Human Molecular Genetics*, 10, 1775–1783.
  38. Feng, Y., & Walsh, C. A. (2004). The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nature Cell Biology*, 6, 1034–1038.
  39. Feng, Y., Chen, M. H., Moskowitz, I. P., et al. (2006). Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 19836–19841.
  40. Rabkin, E., Aikawa, M., Stone, J. R., Fukumoto, Y., Libby, P., & Schoen, F. J. (2001). Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation*, 104, 2525–2532.
  41. Markwald, R. R., Norris, R. A., Moreno-Rodriguez, R., & Levine, R. A. (2010). Developmental basis of adult cardiovascular diseases: valvular heart diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1188, 177–183.
  42. Norris, R. A., Moreno-Rodriguez, R., Wessels, A., et al. (2010). Expression of the familial cardiac valvular dystrophy gene, filamin-A, during heart morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 239, 2118–2127.
  43. Chiu, Y. N., Norris, R. A., Mahler, G., Recknagel, A., & Butcher, J. T. (2010). Transforming growth factor beta, bone morphogenetic protein, and vascular endothelial growth factor mediate phenotype maturation and tissue remodeling by embryonic valve progenitor cells: relevance for heart valve tissue engineering. *Tissue Engineering. Part A*, 16, 3375–3383.
  44. Armstrong, E. J., & Bischoff, J. (2004). Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circulation Research*, 95, 459–470.
  45. Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K., & Watanabe, K. (2001). Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 17871–17877.
  46. Cushing, M. C., Liao, J. T., & Anseth, K. S. (2005). Activation of valvular interstitial cells is mediated by transforming growth factor-beta interactions with matrix molecules. *Matrix Biology*, 24, 428–437.
  47. Khan, R., & Sheppard, R. (2006). Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in



- cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*, *118*, 10–24.
48. Griffiths, G. S., Grundl, M., Allen Iii, J. S., & Matter, M. L. (2010). R-Ras interacts with filamin A to maintain endothelial barrier function. *Journal of Cell Physiology*, *226*(9), 2287–2296.
  49. Gawecka, J. E., Griffiths, G. S., Ek-Rylander, B., Ramos, J. W., & Matter, M. L. (2010). R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS One*, *5*, e11269.
  50. Falet, H., Pollitt, A. Y., Begonja, A. J., et al. (2010). A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*, 1967–1979.
  51. Pavanetto, M., Zarpellon, A., Borgo, C., Donella-Deana, A., & Deana, R. (2011). Regulation of serotonin transport in human platelets by tyrosine kinase Syk. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *27*, 139–148.
  52. Mekontso-Dessap, A., Brouri, F., Pascal, O., et al. (2006). Deficiency of the 5-hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis and valvulopathy in mice. *Circulation*, *113*, 81–89.
  53. Oyama, M. A., & Levy, R. J. (2010). Insights into serotonin signaling mechanisms associated with canine degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *24*, 27–36.
  54. Donnelly, K. B. (2008). Cardiac valvular pathology: comparative pathology and animal models of acquired cardiac valvular diseases. *Toxicologic Pathology*, *36*, 204–217.
  55. Rothman, R. B., Baumann, M. H., Savage, J. E., et al. (2000). Evidence for possible involvement of 5-HT<sub>2B</sub> receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation*, *102*, 2836–2841.
  56. Rothman, R. B., & Baumann, M. H. (2009). Serotonergic drugs and valvular heart disease. *Expert Opinion on Drug Safety*, *8*, 317–329.
  57. Xu, J., Jian, B., Chu, R., et al. (2002). Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT<sub>2</sub> receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *The American Journal of Pathology*, *161*, 2209–2218.
  58. Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., et al. (2009). Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*, 1763–1771.
  59. Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., et al. (1998). Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *Journal of Cell Science*, *111*(Pt 13), 1897–1907.
  60. Kim, H., Nakamura, F., Lee, W., Hong, C., Perez-Sala, D., & McCulloch, C. A. (2010). Regulation of cell adhesion to collagen via beta1 integrins is dependent on interactions of filamin A with vimentin and protein kinase C epsilon. *Experimental Cell Research*, *316*, 1829–1844.
  61. Kim, H., Nakamura, F., Lee, W., Shifrin, Y., Arora, P., & McCulloch, C. A. (2010). Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *298*, C221–C236.
  62. Ivaska, J., Whelan, R. D., Watson, R., & Parker, P. J. (2002). PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *EMBO Journal*, *21*, 3608–3619.
  63. 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*, 1311–1323.

**Expression of the Familial Cardiac Valvular Dystrophy Gene, Filamin-A, During Heart Morphogenesis**



## Expression of the Familial Cardiac Valvular Dystrophy Gene, Filamin-A, During Heart Morphogenesis

R.A. Norris,<sup>1\*</sup> R. Moreno-Rodriguez,<sup>1</sup> A. Wessels,<sup>1</sup> J. Merot,<sup>2</sup> P. Bruneval,<sup>6</sup> A.H. Chester,<sup>7</sup> M.H. Yacoub,<sup>7</sup> A. Hagège,<sup>3</sup> S.A. Slaugenhaupt,<sup>4</sup> E. Aikawa,<sup>5</sup> J.J. Schott,<sup>2</sup> A. Lardeux,<sup>2</sup> B.S. Harris,<sup>1</sup> L.K. Williams,<sup>1</sup> A. Richards,<sup>1</sup> R.A. Levine,<sup>5†</sup> and R.R. Markwald<sup>1†</sup>

Myxoid degeneration of the cardiac valves is a common feature in a heterogeneous group of disorders that includes Marfan syndrome and isolated valvular diseases. Mitral valve prolapse is the most common outcome of these and remains one of the most common indications for valvular surgery. While the etiology of the disease is unknown, recent genetic studies have demonstrated that an X-linked form of familial cardiac valvular dystrophy can be attributed to mutations in the Filamin-A gene. Since these inheritable mutations are present from conception, we hypothesize that filamin-A mutations present at the time of valve morphogenesis lead to dysfunction that progresses postnatally to clinically relevant disease. Therefore, by carefully evaluating genetic factors (such as filamin-A) that play a substantial role in MVP, we can elucidate relevant developmental pathways that contribute to its pathogenesis. In order to understand how developmental expression of a mutant protein can lead to valve disease, the spatio-temporal distribution of filamin-A during cardiac morphogenesis must first be characterized. Although previously thought of as a ubiquitously expressed gene, we demonstrate that filamin-A is robustly expressed in non-myocyte cells throughout cardiac morphogenesis including epicardial and endocardial cells, and mesenchymal cells derived by EMT from these two epithelia, as well as mesenchyme of neural crest origin. In postnatal hearts, expression of filamin-A is significantly decreased in the atrioventricular and outflow tract valve leaflets and their suspensory apparatus. Characterization of the temporal and spatial expression pattern of filamin-A during cardiac morphogenesis is a crucial first step in our understanding of how mutations in filamin-A result in clinically relevant valve disease. *Developmental Dynamics* 239:2118–2127, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** filamin; cytoskeleton; valve; epicardial; endothelium; cardiac; morphogenesis; development; cushion; mesenchyme

Accepted 24 May 2010

<sup>1</sup>Cardiovascular Developmental Biology Center, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina  
<sup>2</sup>INSERM, UMR 915; CNRS, ERL 3147; Université de Nantes, Faculté de Médecine; CHU Nantes, l'Institut du Thorax, Nantes, France  
<sup>3</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiology, Paris, France  
<sup>4</sup>Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, Boston, Massachusetts  
<sup>5</sup>Department of Cardiology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts  
<sup>6</sup>INSERM, U970 Université de Paris Descartes, Paris, France  
<sup>7</sup>Imperial College of London, Heart Science Centre, Harefield, United Kingdom  
<sup>†</sup>Cardiovascular Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts  
Grant sponsor: NIH-NHLBI; Grant numbers: HL33756, HL084285; Grant sponsor: NIH-NCRR; Grant numbers: COBRE P20RR016434-07, P20RR016434-09S1; Grant sponsor: NSF; Grant numbers: FIERE EP0526854, EPS-0902795; Grant sponsor: Fondation Leducq (Paris, France) Transatlantic Mitral Network of Excellence Grant; Grant number: 207CVD04; Grant sponsor: SC INBRE; Grant number: 5MO1RR001070-28; Grant sponsor: AHA; Grant numbers: GIA-2060075, AHA-GIA 0835460N.

<sup>\*</sup>R. A. Levine and R. R. Markwald are co-senior authors.

<sup>\*</sup>Correspondence to: R.A. Norris, Cardiovascular Developmental Biology Center, Department of Regenerative Medicine and Cell Biology, Children's Research Institute, Medical University of South Carolina, 173 Ashley Avenue, 606 CRI, Charleston, SC 29425. E-mail: norrisra@musc.edu

DOI 10.1002/dvdy.22346

Published online 14 June 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).



## INTRODUCTION

The four chambers of the heart are separated by valves that open to allow unidirectional blood flow. The mitral valve is located between the left atrium and the left ventricle, and the failure of the mitral leaflets to appose normally results in mitral valve prolapse (MVP, MIM 157700). Originally described in the 1960s, MVP is characterized by the systolic displacement or billowing of the mitral leaflets into the left atrium and is often accompanied by mitral regurgitation (MR) (Barlow and Bosman, 1966). MVP is the most prevalent of all mitral valve diseases, affecting as many as 2.4% of the population, and is the leading cause for mitral valve repair operations (Freed et al., 2002a,b). Mitral leaflets in affected individuals exhibit excess tissue growth with myxomatous changes, characterized by altered collagen and elastin composition, proteoglycan accumulation, and disruption of the fibrous backbone. Many of the patients with MVP develop serious complications, including bacterial endocarditis, ruptured chordae tendineae, progressive mitral regurgitation, arrhythmias, and even sudden death (Devereux, 1989; Devereux et al., 1986, 1989). Although the etiology of MVP is unknown, based on preliminary data shown below we hypothesize that MVP is a result of developmental defects during cardiac valvulogenesis, which over time result in clinical expression. If true, normal mature valves are dependent on integration of the molecular signals, cellular responses, and biomechanical stimuli that occur during cardiac morphogenesis.

The initial stages of valvulogenesis commence with the formation of atrioventricular (AV) and outflow cushions that function as primitive valves by blocking retrograde blood flow. The midline superior and inferior AV cushions, as well as the cushions of the distal outflow tract (truncus region) (OFT), form by a well-studied endothelial-to-mesenchymal transformation (EMT) (Bermanke and Markwald, 1982; DeRuiter et al., 1997; Eisenberg and Markwald, 1995; Markwald et al., 1975, 1977; Markwald and Smith, 1972; Mjaatvedt et al., 1987; Mjaatvedt and Markwald, 1989). The fate of the cushions in the AV canal is to fuse

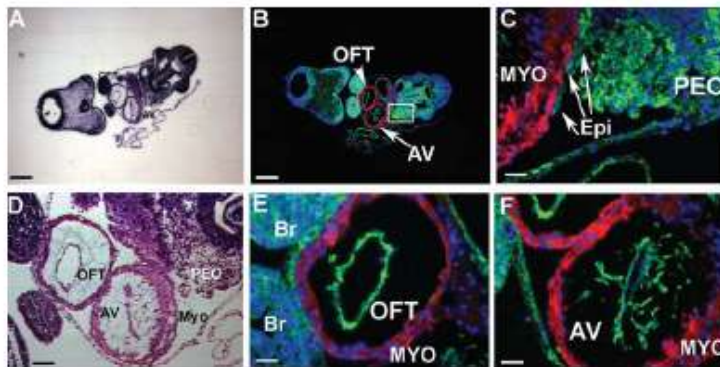
and integrate with mesenchyme of the dorsal mesenchymal protrusion (DMP) and atrial cap to form an AV mesenchymal septal complex (Perez-Pomares et al., 2002; Snarr et al., 2007, 2008). This complex contributes to the development of two of the AV valves (aortic leaflet of the mitral valve and the septal leaflet of the tricuspid valve). The development of the other two AV leaflets (mural leaflets of the tricuspid and mitral valves) involves the formation of "lateral" cushions that are formed at the left and right side of the AV junction (de Lange et al., 2004; Wessels et al., 1996). Similarly, in the OFT, cushions composed of both EMT-derived mesenchyme and neural crest cells integrate to form the aortic and pulmonic (semilunar) prevalvular leaflets. Whereas much is known about the EMT process that gives rise to the major/midline AV and OFT cushions, much less is currently known about the mechanisms driving post-EMT cushion remodeling and maturation of the definitive AV or OFT valves. Adding to the complexity of AV valve morphogenesis are the relatively unknown mechanisms by which the suspensory (tension) apparatus (annulus and tendinous cords) are formed. It is also generally understood that the mature mitral and tricuspid leaflets as well as the aortic and pulmonic valves develop a specific architecture with a trilaminar appearance of elastin, proteoglycans, and collagen I (Cole et al., 1984; Hinton et al., 2006, 2008; Lincoln et al., 2004). The "post-EMT" regulatory mechanisms by which these matrix components and supporting structures are laid down, the timing of their deposition, and the role of the interstitial valve fibroblasts are poorly understood. Disruption of any of these morphogenetic processes during valve development would be expected to affect the overall structure and function of the mature valves. Our understanding of specific genes involved in valve maturation has been somewhat hampered by the lack of relevant clinical data implicating specific gene mutations as causal to mitral valve disease. However, four gene loci have been recently identified by our group as containing putative MVP genes, thus suggesting genetic heterogeneity of this disease (Disse et al., 1999; Freed et al., 2003; Kyndt et al., 1998; Nesta et al., 2005).

One of these loci contained the cytoskeletal actin-binding protein Filamin-A, which was found by genetic approaches to harbor specific mutations that cause myxomatous valves in an X-linked form of familial cardiac valvular dystrophy (Kyndt et al., 2007). Filamin-A is a member of the filamin group of proteins that consists of three members: filamin-A, filamin-B, and filamin-C. The Filamins are present as homo- or heterodimeric Y-shaped cytoplasmic proteins, with each main chain consisting of an actin-binding region at the amino terminus. The core of the protein consists of 24 highly homologous Ig-like repeats followed by a carboxyl integrin-binding domain (Popowicz et al., 2006). The most widely studied function of these large proteins is their ability to cross-link cortical actin filaments into a dynamic three-dimensional structure (Feng and Walsh, 2004). Surprisingly, the filamin-A knock-out mouse exhibits very specific defects in post-EMT cardiac morphogenesis suggesting a crucial developmental role for this protein in regulating valve maturation (Feng et al., 2006; Hart et al., 2006). Additionally, humans with point mutations in the filamin-A gene progressively exhibit "non-syndromic," myxomatous valve defects without other developmental abnormalities. The key question is whether the MVP phenotype is the result of the expression of filamin-A mutations during development. If so, this would suggest that valve degenerative diseases can have "roots" in development. This new information warrants a detailed examination of this gene/protein during valve morphogenesis. Thus, the temporal and spatial pattern of Filamin-A expression during cardiac development presented in this report will serve as essential information that will potentially lead to the identification and characterization of new and relevant molecular and cellular pathways driving valve morphogenesis and will facilitate the discovery of Filamin-A-dependent mechanisms that contribute to the pathogenesis of mitral valve prolapse.

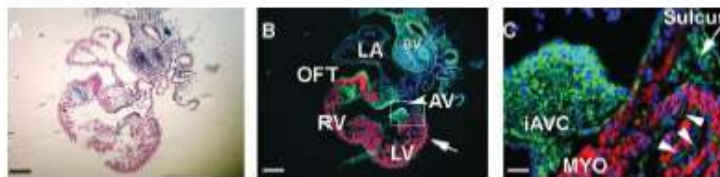
## RESULTS

Cardiac expression of filamin-A at E9.5 is confined to the endocardium



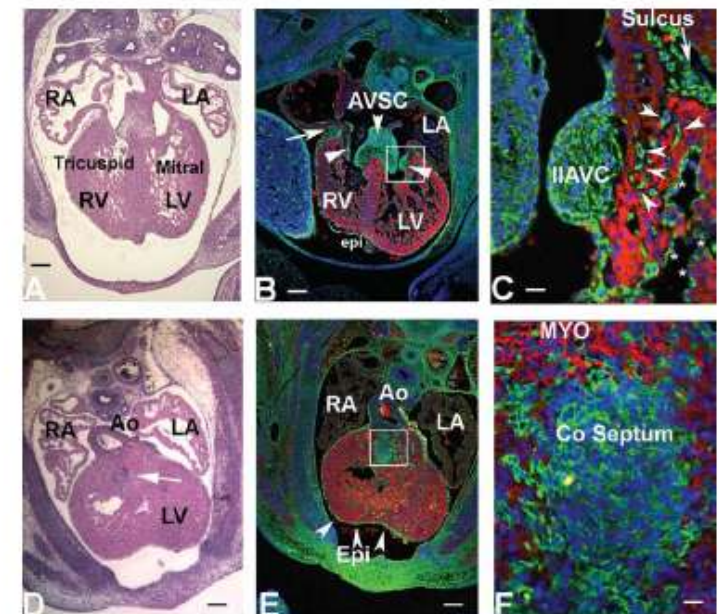


**Fig. 1.** Immunohistochemical analysis of Filamin-A at E9.5. **A,D:** H&E staining showing gross morphology of E9.5 mouse embryo. **B:** Low magnification of Filamin-A (green) and MF20 (myocardium-red) showing widespread expression of Filamin-A in the mouse embryo with high levels seen in the brachial arches (Br), developing facial prominences, outflow tract (OFT), and atrioventricular (AV) regions. **C:** Higher magnification of Filamin-A of boxed area in B, showing robust expression in the proepicardial organ (PEO) and epicardial cells (epi; arrows) emanating from this tissue. **E,F:** Higher magnification of Filamin-A and MF20 expression in the developing brachial arches (Br), OFT, and atrioventricular canal showing robust expression in the endothelium of the OFT and AV cushions and in transformed mesenchyme (arrowheads). Filamin-A expression is absent in the myocardium (MYO). Nuclei, blue (Hoescht stain). Scale bars = (A, B) 200  $\mu$ m, (C-F) 25  $\mu$ m.



**Fig. 2.**

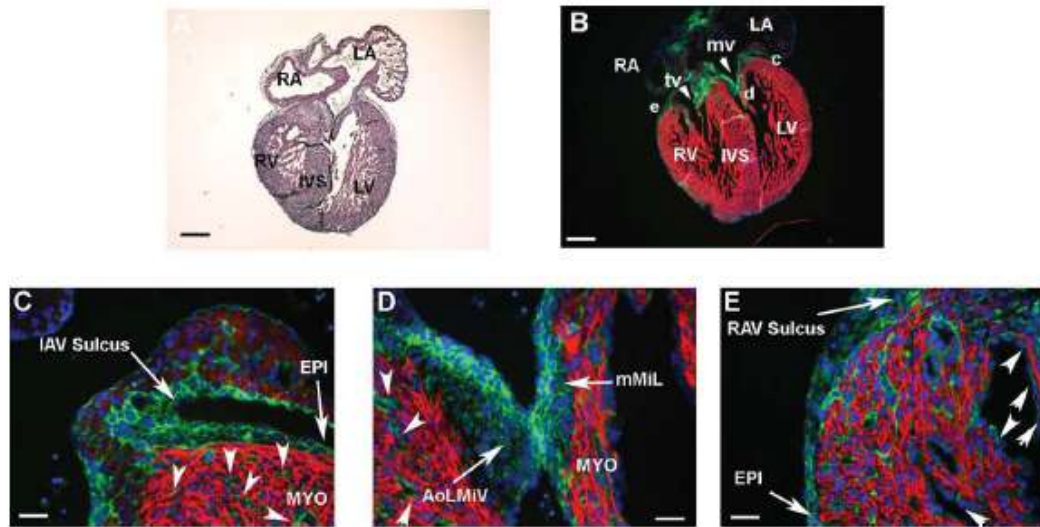
**Fig. 2.** Localization of Filamin-A in the E11.5 mouse heart. **A:** H&E showing gross morphology. **B:** Filamin-A (green) is intensely expressed in the superior and inferior atrioventricular cushions (AV), outflow tract cushions (OFT), epicardium (arrow), and forming trabeculae endothelium in addition to forming blood vessels (BV). **C:** Higher magnification of boxed area in B showing intense Filamin-A expression in the inferior AV cushion (IAVC) endothelium and mesenchyme, AV sulcus (arrow), and trabecular endothelium (arrowheads). Expression is absent in the myocytes (red). Nuclei, blue (Hoescht stain). LA, left atrium; RV, right ventricle; LV, left ventricle. Scale bars = (A, B) 200  $\mu$ m, (C) 25  $\mu$ m.



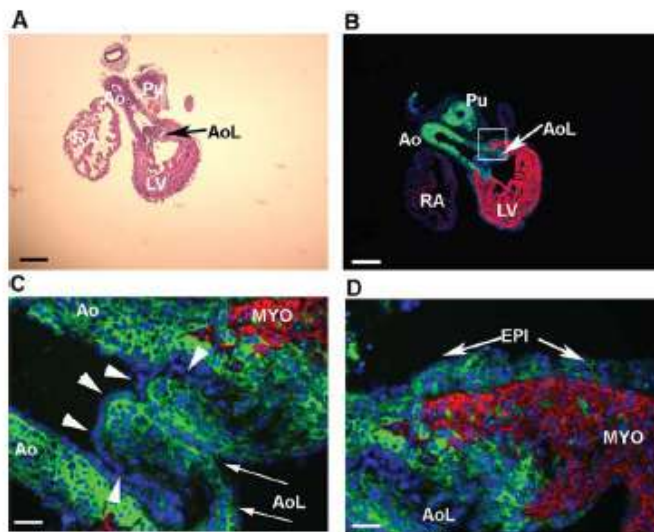
**Fig. 3.**

**Fig. 3.** Filamin-A distribution in the E13.5 mouse heart. **A, D:** H&E showing gross morphology. **B:** Low magnification showing Filamin-A (green) expression in the atrioventricular septal complex (AVSC), the right and left lateral cushions (arrowheads), the AV sulcus (arrow), and epicardium (epi). **C:** Higher magnification of boxed area in B showing Filamin-A expression in the endothelium and mesenchyme of the left lateral cushion (IIAVC), the AV sulcus (arrow), interstitial mesenchyme (arrowheads), and ventricular trabeculae (asterisks), as well as the endothelium and mesenchyme of the fused superior and inferior AV cushions (C, left). **E:** Expression of Filamin-A (green) in the ventral aspect of the heart showing robust expression in the epicardium, the developing conal septum (boxed area), and weak expression in the developing arterial wall. **F:** Higher magnification of boxed area in E showing Filamin-A expression in the mesenchyme of the fused conal cushion with no expression evident in adjacent MF20-positive myocytes (red). Nuclei, blue (Hoescht stain). Ao, aorta; LA, left atrium; RA, right atrium; RV, right ventricle; LV, left ventricle. Scale bars = A, B: 200  $\mu$ m, C: 25  $\mu$ m.





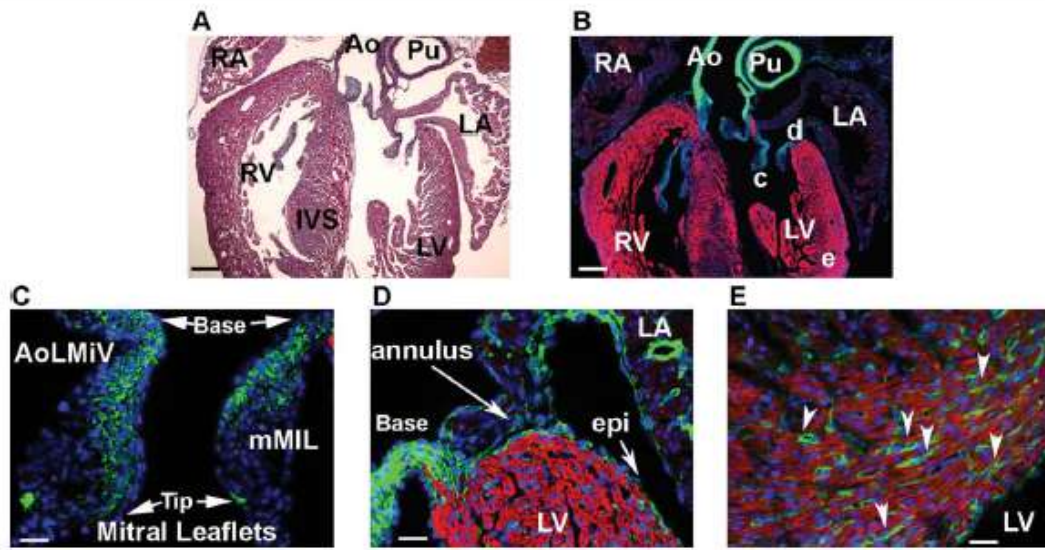
**Fig. 4.** Cardiac expression of Filamin-A at E17.5. **A:** H&E showing gross morphology of the heart. **B:** Low magnification of Filamin-A (green)/MF20 (red) immunostained heart showing intense staining of Filamin-A in the mitral and tricuspid valves (MV and TV, respectively [arrowheads]), and epicardium. "c-e" in B are depicted in higher magnification in bottom panels. **C, E:** Filamin-A is expressed in the left and right AV sulcus (IAV, RAV sulcus), the epicardium (epi), non-myocytes present within the myocardial interstitium (arrowheads in C), and the endothelium of ventricular trabeculae (arrowheads in E). **D:** Filamin-A expression in the forming mitral leaflets is present in both the mural mitral leaflet (mMIL) and the aortic leaflet of the mitral valve (AoLMIV). In these valve leaflets, expression is most intense on the endothelial surface of the ventricular aspects of the valves, with significantly weaker expression in the subendothelial mesenchyme/fibroblasts. Expression is absent within MF20-positive myocytes. Nuclei, blue (Hoescht stain). RA, right atrium; LA, left atrium; RV, right ventricle; LV, left ventricle; IVS, interventricular septum. Scale bars = (A,B) 200  $\mu$ m, (C,E) 25  $\mu$ m.



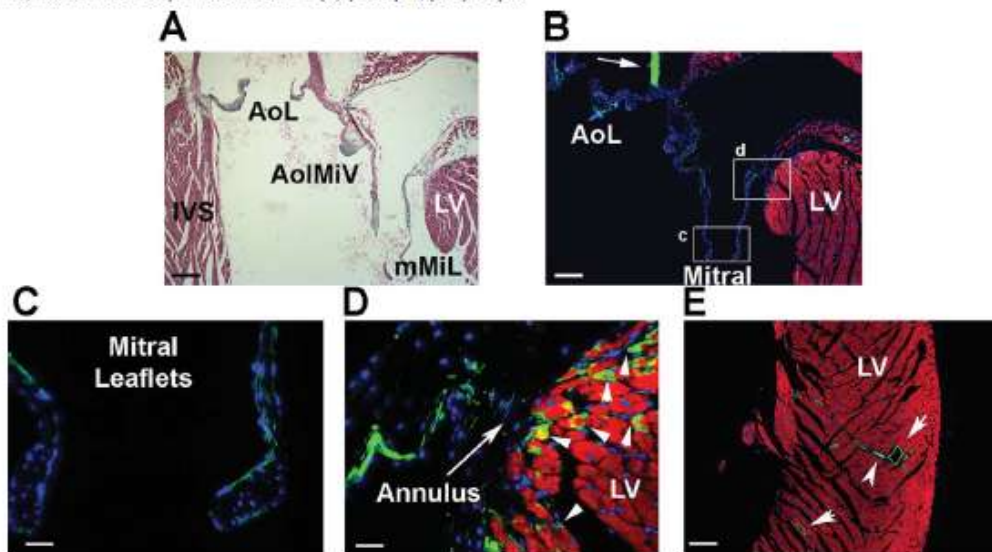
**Fig. 5.** Outflow tract expression of Filamin-A at E17.5. **A:** H&E showing gross morphology of the E17.5 heart. **B:** Low magnification of Filamin-A (green)/MF20 (red) expression cells demonstrating robust Filamin-A expression in the developing aortic leaflets (AoL), the dorsal aorta (Ao), and pulmonary vein (Pu). **C:** Higher magnification of the aortic leaflets represented in B showing a gradient of endothelial and subendothelial mesenchyme/fibroblast expression with more intense staining on the endothelial surface. Also, expression of Filamin-A is more robust on the ventricular aspect of the leaflets (arrows) versus the arterial side (arrowheads). Note intense expression of Filamin-A in the aortic wall (Ao) and no detectable expression in MF20-positive myocytes. **D:** Higher magnification of boxed area in B showing epicardial (epi) expression of Filamin-A. Nuclei, blue (Hoescht stain). RA, right atrium; LV, left ventricle. Scale bars = (A, B) 200  $\mu$ m, (C, D) 25  $\mu$ m.

right AV sulcus and trabecular endothelium (arrows) express filamin-A (Fig. 3A–C). The aortic wall, the forming outflow tract septum, and epicardium all exhibit filamin-A-expressing cells (Fig. 3D–F).

At E17.5, filamin-A is present in all valve leaflets. Within the forming valves, expression is most intense in the interstitial cells on the atrial aspects of the inlet (mitral and tricuspid) leaflets and ventricular aspects of the arterial leaflets (Figs. 4D and 5B,C). Expression is also robust in the mesenchyme of the left and right AV sulcus of the leaflets (arrowheads in Fig. 4C,D), and in the endothelium of the ventricular trabeculae (arrowheads in Fig. 4E). At E17.5, the walls of the aorta and pulmonary arteries strongly express Filamin-A (Fig. 5B). During neonatal life, filamin-A continues to be expressed in all of the leaflets with concentrated expression on the atrial aspect of the mitral leaflets and ventricular aspects of the semilunar valves (Fig. 6). The epicardium, coronary vasculature, aortic and pulmonic walls, annulus fibrosae, and interstitial mesenchymal-like cells within the

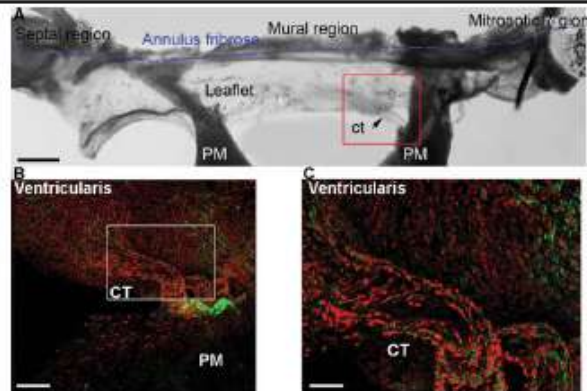


**Fig. 6.** Cardiac expression of Filamin-A during neonatal development. **A:** H&E showing gross morphology of the 1-week-old neonatal heart. **B:** Low magnification of Filamin-A (green)/MF20 (red) expression cells demonstrating robust Filamin-A expression in the aortic and pulmonic walls with significantly lower expression in the mitral, tricuspid, and aortic valves. "c-e" in B are depicted in higher magnification in bottom panels. **C:** Higher magnification of the mural mitral leaflet and the aortic leaflet of the mitral valve (mMIL and AoLMiV, respectively) showing a gradation of expression from base to tip with higher levels of Filamin-A detected in the base and mid regions of the leaflet. Additionally, subendothelial fibroblasts on the atrial aspect of the valve leaflets exhibit the highest level of Filamin-A. At this stage, very weak expression of Filamin-A is detected in the ventricularis at the tips of the mitral leaflets. **D:** Filamin-A is most intense at the base of the mural mitral leaflet, in the annulus fibrosae (arrow) and the epicardium (epi). **E:** Interstitial fibroblasts and coronary vasculature exhibit high levels of Filamin-A expression (arrowheads) with no detectable expression in the MF20-positive myocytes. Nuclei, blue (Hoescht stain). RA, right atrium; LA, left atrium; RV, right ventricle; LV, left ventricle; IVS, interventricular septum. Scale bars = (A,B) 200  $\mu$ m, (C-E) 25  $\mu$ m.



**Fig. 7.** Adult cardiac expression of Filamin-A. **A:** H&E showing gross morphology of the 3-month-old adult heart. **B:** Low magnification of Filamin-A (green)/MF20 (red) expression showing robust Filamin-A expression in the aortic wall (arrow) and weak expression in the mitral and aortic leaflets (AoL). **C:** Higher magnification of the tips of the mitral leaflet showing overall weak expression throughout the leaflet. **D:** Expression of Filamin-A is most intense in the endothelial cells at the base of the mitral leaflet, and in fibroblasts intercalated at the annulus/myocardial border (arrowheads). Weak expression is evident in the annulus fibrosae. **E:** Expression in the myocardial wall is restricted to the coronary vasculature (arrowheads). Nuclei, blue (Hoescht stain). LV, left ventricle; IVS, interventricular septum; AoLMiV, aortic leaflet of the mitral valve; mMIL, mural mitral leaflet. Scale bars = (A,B) 200  $\mu$ m, (C-E) 25  $\mu$ m.

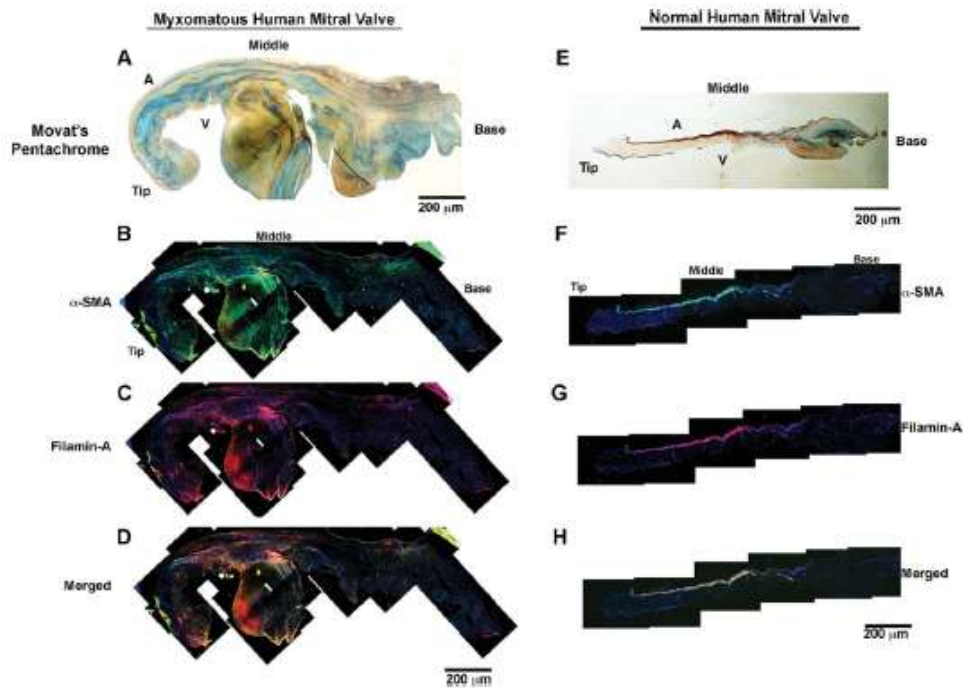




**Fig. 8.** Whole mount confocal analysis of Filamin-A in adult mural mitral leaflet. **A:** Microdissected entire mitral leaflet showing septal, mural, and mitroaortic regions. Valve leaflet, chordae tendineae (ct), annulus fibrosae, and papillary muscles (PM) are denoted. **B:** Whole mount immunolocalization of boxed area in A showing non-uniform expression of Filamin-A in the ventricularis endothelium of the adult mural mitral leaflet (green). Endothelial cells and fibroblasts within the chordae tendineae exhibit uniform distribution of Filamin-A expression. No expression of Filamin-A is evident within the papillary muscle. Asterisks represent autofluorescent blood cells. **C:** Higher magnification of the chordae tendineae represented in B. Scale bars = (A) 500  $\mu$ m, (B) 100  $\mu$ m, (C) 40  $\mu$ m.

myocardial wall exhibit high levels of filamin-A expression. Importantly, by 6 months of age the expression of filamin-A in the leaflets was non-uniform and variable with low expression on both the ventricular and atrial endothelium with even weaker expression evident in subendothelial fibroblasts of the mitral and aortic leaflets. Expression, however, remained robust in the coronary vasculature, the annulus fibrosae, and the chordae tendineae (Figs. 7 and 8). There was no detectable expression of filamin-A in the papillary muscle or cardiac myocytes.

Filamin-A expression was investigated in a myxomatous mitral leaflet isolated from a patient who had undergone valve replacement surgery and compared to that of a non-diseased normal human mitral valve (Fig. 9). Movats pentachrome stain demonstrates clear evidence of a myxoid degeneration with defects in



**Fig. 9.** Movat's pentachrome and immunohistochemical analysis of myxomatous and normal human mitral valve leaflets. **A, E** Movat's pentachrome staining of human myxomatous and normal mitral valve leaflets with collagen (yellow), elastin (black/orange), and proteoglycans (blue-green). Notice the myxomatous valve exhibits significant disorganization of the normal trilaminar structure with disrupted/diminished elastin, excess proteoglycan accumulation, and randomized collagen distribution. A, atrialis; V, ventricularis. **B-D, F-H** Immunohistochemical localization of  $\alpha$ -SMA (green) and Filamin-A (red) demonstrating excessive production of these two proteins throughout the myxomatous valve whereas the control valve exhibits co-expression (yellow) in the mid-portion of the leaflet being restricted to subendothelial valve fibroblasts of the atrialis. Hoechst-nuclei (blue).



stratification of the fibrosa, spongiosa, and atrialis layers (Fig. 9A) as compared to the normal mitral valve (Fig. 9E). Immunohistochemical analysis for  $\alpha$ -SMA and Filamin-A expression indicates extensive activation of these two genes throughout the entire valve leaflet, whereas the control leaflet demonstrates limited expression in the mid-portion of the leaflet being restricted to subendothelial valve fibroblasts of the atrialis (compare Fig. 9B–D with F–H).

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Mutations in the Filamin-A gene were recently shown by genetic studies to cause an X-linked form of myxomatous valvular dystrophy in humans (Kyndt et al., 1998, 2007). Although much is currently known about this cytoskeletal protein, relatively nothing is known about its role(s) in cardiac morphogenesis. This is likely due, in part, to the lack of a thorough study of the tempo-spatial pattern of filamin-A during valve morphogenesis. An understanding of this expression pattern will provide an important step in understanding how filamin-A functions during cardiac development, and may provide insight into how mutations in this gene can result in myxomatous valvular dystrophy. Thus, we performed an immunohistochemical analysis of filamin-A protein expression throughout murine embryonic and postnatal cardiac development. During embryonic development, filamin-A is found in the endothelium and mesenchyme of AV and OFT cushions, the epicardium, the AV sulcus, migrating epicardial-derived cells (EPDCs), the endothelium of the ventricular trabeculae, and neural crest cells. Expression is, however, never detected in the myocardium by either immunohistochemistry or in situ hybridization (data not shown). Cell tracing experiments using mouse models that will detect neural crest-derived cells (Wnt-1 Cre/ROSA26), endothelium-derived cells (Tie2-Cre/ROSA26), and epicardium and epicardial-derived cells (WT1-Cre/ROSA26) demonstrated that Filamin-A is expressed by each of these valve precursor populations (see Supp. Figs. S1–3, which are available online). However, the role of

Filamin-A in these valve progenitor cells is unknown.

Functional analyses through gene knockout studies have provided important yet limited information as to the role of filamin-A during cardiac morphogenesis (Feng et al., 2006; Hart et al., 2006). Hemizygous mice for the filamin-A null allele show embryonic lethality and a wide range of cardiovascular malformations, including: incomplete septation of the outflow tract leading to a common arterial trunk (persistent truncus arteriosus), abnormally thickened and malformed OFT valves, atrial and ventricular septal defects, type B interruption of the aortic arch, abnormal endothelial organization in blood vessels, abnormal vascular permeability, and thickening of the mitral valve. Compensation by the other filamin genes does not seem to occur, nor have cardiovascular defects been described in mouse mutants for either filamin-B or filamin-C. The pleiomorphic array of cardiac malformations and the expression of filamin-A during development would seemingly support filamin-A as having an effect on a multitude of different cell types including neural crest, cushion/valve endocardium, cushion/valve mesenchyme/fibroblasts, and epicardium, which are supported by our data.

In the endothelium of the developing valves and vasculature, it has been proposed that filamin-A is important for maintaining and stabilizing cell-cell contacts and adherens junctions. Lack of filamin-A protein causes loss or disorganization of PECAM and VE-Cadherin resulting in cell-cell instability and endothelial sloughing. Ultrastructural analyses confirmed abnormal endocardial adherens junctions and are a proposed cause of embryonic lethality in the filamin-A mutant mice (Feng et al., 2006; Hart et al., 2006). Whether this putative role of filamin-A is specific for the endocardial epithelium, or can be extrapolated to all epithelia, such as the epicardial epithelium, in which filamin-A is intensely expressed, is unknown.

The defects observed in the outflow tract (i.e., persistent truncus arteriosus, interruption of the aortic arch type B) implicate a significant role for filamin-A in regulating neural crest behavior. However, when filamin-A

was removed from neural crest cells using the neural crest-specific Wnt-1 Cre/ROSA26 mouse line, neural crest cell migration appeared normal. Thus, it was proposed that normal neural crest "function" was disrupted once the filamin-A deficient cells reach the OFT cushions of the heart (Feng et al., 2006). Interestingly, as we demonstrate, filamin-A expression in the extracardiac neural crest cells is relatively weak. Once these cells have migrated into the OFT, filamin-A expression intensified, suggestive of a more crucial role for filamin-A-mediated neural crest cell behavior within the outlet cushions.

The neural crest cells, cushion endothelium, and epicardial epithelium all express high levels of filamin-A and each of these cell types undergoes an endothelial-mesenchymal transformation (EMT) (Dettman et al., 1998; Gittenberger-de Groot et al., 1998; Perez-Pomares et al., 1997; Wessels and Perez-Pomares, 2004). However, data from the filamin-A knock-out mice demonstrate that mesenchyme are present within the AV and OFT cushions, precluding a major role for filamin-A in regulating the EMT process in the cushions. Our data suggest that a major role for filamin-A in the developing valves is twofold: (1) to maintain endothelial integrity and (2) promote maturation of the valvular interstitium after EMT (post-EMT). This is further substantiated by filamin-A knockout mice, which die during post-EMT valve maturation at E14.5 (Feng et al., 2006) or E15.5 (Hart et al., 2006). Importantly, filamin-A expression significantly diminishes in the valve leaflets during postnatal life, suggesting a significant role for filamin-A in regulating embryonic valve maturation during a defined window of post-EMT valve remodeling. The presence of abnormally thickened and malformed OFT valves at E14.5 (Feng et al., 2006) and dysplastic mitral valves at E15.5 (Hart et al., 2006) in the filamin-A null mice are consistent with this hypothesis.

To date Filamin-A is the only gene demonstrated as harboring causal mutations in patients with non-syndromous myxomatous valvular dystrophy. One major question to pose is why these specific point mutations



found in the amino region of the protein cause *only* valve-specific alterations in humans? Interestingly, mutations in other regions of the Filamin-A protein cause a wide spectrum of congenital anomalies including: Melnick-Needles syndrome, frontomeatal-pharyngeal dysplasia, otopalatodigital syndrome, and periventricular heterotopia (Zhou et al., 2010). To date, the molecular mechanisms by which Filamin-A functions during valve morphogenesis are currently unknown, and more importantly how the mutations in Filamin-A that result in X-linked myxoid valvular dystrophy (XMVD) function to cause the disease, are also unknown. However, clues on how these mutations (and normal filamin-A) function during valve development may come from previous reports that filamin proteins appear to serve as hubs, or docking platforms, for second messengers important in signal transduction. To date, over 70 proteins have been identified as being interacting partners with filamin proteins (Zhou et al., 2010). Some of these filamin-A-interacting proteins have been demonstrated as playing a crucial role in promoting TGF $\beta$  and/or BMP signals. These interactions promote phosphorylation and nuclear accumulation of downstream TGF $\beta$  and BMP mediators such as Smads2, 3, and 5 (Sasaki et al., 2001). By regulating these growth factor-mediated responses during valve development, filamin-A could play an essential role in regulating how the valve is built. Clinically, it remains to be determined whether the Filamin-A point mutations found in patients with XMVD positively or negatively affect growth factor signaling. However, it is interesting to note that Fibrillin-1 mutations, which cause Marfan syndrome, result in disrupted TGF $\beta$  signaling in adult valves, contributing to myxomatous valves and mitral valve prolapse (Neptune et al., 2003; Ng et al., 2004; Robinson et al., 2006). In addition to transmitting growth factor-regulated signals, filamin-A has been shown to be a necessary regulator of collagen compaction by instilling tension on collagen fibrils, resulting in active remodeling of the surrounding matrix (Gehler et al., 2009). This regulation is mediated, in part, by the interac-

tion between filamin-A and integrin  $\beta$ 1 (Kim et al., 2008), which together promote assembly of a mechanosensitive complex that bidirectionally senses the tension of the matrix and regulates cellular contractility during embryonic morphogenesis. Through these interactions, filamin proteins can produce enough traction forces to remodel their surrounding extracellular environment, implicating this class of proteins as “mechanotransducers” (Gehler et al., 2009; Glogauer et al., 1998; Jiang and Campbell, 2008; Meyer et al., 1998; Pentikainen and Ylanne, 2009). During post-EMT valve maturation, remodeling of the surrounding valvular microenvironment via collagen compaction is a required biophysical response necessary to achieve a mature valvar form (Butcher et al., 2007). Because collagen compaction is imparted via actin-cytoskeletal remodeling (Farsi and Aubin; 1984), actin and filamin-A may play a significant role in valve-remodeling events due to their ability to promote collagen compaction, although data specifically showing this has not yet been demonstrated.

In addition to regulating collagen compaction during valve maturation, recent work implicates filamin-A and its close association with cortical actin in regulating collagen deposition. This work, initially performed in the tendon, resulted in the discovery of a cellular structure termed “fibripositor” (Canty et al., 2004, 2006; Humphries et al., 2008; Kapacee et al., 2008). Fibripositors are defined as actin-stabilized plasma membrane processes that protrude into the ECM to deposit and organize newly assembled collagen fibrils in parallel alignment with the existing matrix (Canty et al., 2006). Importantly, each of the Filamin-A mutations identified to date that result in non-syndromous MVP are clustered near the actin-binding domain, and are anticipated to disrupt actin stabilization (Kyndt et al., 2007). This disruption could ultimately compromise fibripositor formation resulting in aberrant collagen production, deposition, and faulty organization of the developing valve.

The potential for Filamin-A mutations in humans to disrupt these two processes (matrix compaction and col-

lagen deposition) would be anticipated to have profound effects on the biomechanical function of the cardiac valves. Reports by Grande-Allen et al. (2003) have demonstrated that myxomatous mitral valves and chordae tendineae are biomechanically weaker and more compromised than unaffected valves. This is largely due to biochemical changes in glycosaminoglycans, elastin integrity, and collagen production/distribution. These biochemical changes likely stimulate secondary pathways that lead to further degeneration of the mitral valves and their suspensory apparatus. Coincident with these changes is the observation of  $\alpha$ -SMA positive “activated myofibroblasts” in myxomatous valves (Rabkin et al., 2001; Rabkin-Aikawa et al., 2004). Of relevance, we provide evidence that Filamin-A expression is upregulated in human myxomatous mitral valve leaflets and partially co-localizes with  $\alpha$ -SMA positive myofibroblasts. It is interesting to note that not all Filamin-A-expressing cells are  $\alpha$ -SMA positive indicating the presence of Filamin-A in valve disease may reflect a larger population of altered cell phenotypes. Additionally,  $\alpha$ -SMA (Hinton et al., 2006) and filamin-A (this report) are expressed during normal valve development, and are significantly down-regulated in the mature mitral valve. However, in the context of human myxomatous valves, we demonstrate that these genes are highly up-regulated, and thus consistent with the concept that mitral valve disease may reactivate a developmental process.

We hypothesize that filamin-A mutations, present at conception, result in defects in the molecular machinery essential for TGF $\beta$ -mediated signaling, collagen deposition, and matrix remodeling, ultimately affecting the biomechanical stability of the developing mitral valve. The generation and analysis of unique point mutation knock-in mouse models, in addition to the selective removal of filamin-A in valve progenitor cells (endothelium, neural crest, and/or epicardium), will ultimately test these hypotheses and provide mechanistic insight into pathways governing both normal post-EMT valve development and valve pathogenesis.



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Immunohistochemical Analysis of Filamin-A Protein Expression

Mouse embryos at embryonic day (E) 9.5, 11.5, 13.5, and isolated hearts from E17.5, neonatal (2 weeks), and adult (6 months) were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 5  $\mu$ m. Deparaffinized sections were rehydrated through a graded series of ethanols to phosphate buffered saline (PBS-Sigma, St. Louis, MO). Sections were subjected to antigen unmasking (H-3300; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and treated for 1 hr at room temperature with a blocking buffer of PBS (Sigma, St. Louis, MO) containing 5% normal goat serum, (NGS, Cappel, Malvern, PA), and incubated with both an affinity-purified rabbit anti-human Filamin-A monoclonal antibody (Epitomics, Inc., Burlingame, CA) diluted to 1:250 and a 1:50 dilution of myocyte-specific mouse monoclonal MF20-c (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA) in blocking buffer overnight at 4°C. Following primary antibody incubations, specimens were washed five times in PBS and incubated at room temperature with Alexa Fluor goat  $\alpha$ -rabbit 488 and goat  $\alpha$ -mouse 568 (Invitrogen, Eugene, OR) diluted 1:100 in PBS. Nuclei were stained with Hoechst dye (1:10,000) (Invitrogen) in PBS for 5 min prior to the final washes in PBS. All samples were cover-slipped using Dabco mounting medium (Sigma). Controls for immunohistochemistry included omission of the primary antibody and preabsorption of the primary antibody with the immunopeptide prior to addition on the section (data not shown). Images of immunostained sections were captured with a Leica DM IRB Microscope System (Leica Microsystems, Inc., Exton, PA). Files were transferred to Adobe Photoshop for labeling and figure preparation. Additional staining methods are provided in the supplemental material.

### Histochemical and Immunohistochemical Analysis of Human Valves

Human mitral valve leaflets were collected from explanted hearts, trans-

ported to the laboratory in Media 199, and subsequently fixed in 10% formalin for 24 hr, processed, and embedded into wax blocks. Control human valves were collected from a male donor whose cause of death was given as an intracranial bleed. Myxomatous valves were obtained from a male with severe mitral degenerative valve disease (Barlow's disease). Ethical permission for the collection of valve tissue was given by the Royal Brompton & Harefield NHS Trust Research Ethics Committee. All chemicals for performing the Movat's stain were purchased from Electron Microscopy Sciences. The protocol was followed per the manufacturer's recommendations. Immunohistochemical stainings using an  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) specific antibody (1:500, Sigma) and Filamin-A (1:250, Epitomics) were performed as described above.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank members of the Markwald and Norris labs for critical reading of the manuscript, and Aimee Phelps for excellent technical assistance. This work was sponsored in part by NIH-NHLBI: HL33756 (R.R.M.), NIH-NCRR: COBRE P20RR016434-07 (R.R.M. and B.S.H.), P20RR016434-09S1 (R.R.M. and R.A.N.); National Science Foundation: FIBRE EF0526854 and EPS-0902795 (R.R.M. and R.A.N.); the Foundation Leducq (Paris, France) Transatlantic Mitral Network of Excellence grant 07CVD04 (R.A.N., R.R.M., R.A.L., A.H., S.A.S., J.M., J.J.S.); SC INBRE: 5M01RR001070-28 (R.A.N.); INSERM, UMR 915, Nantes, F-44035, France (J.M. and J.J.S.); CNRS, ERL3147, Nantes F-44035, France (J.M. and J.J.S.); Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, F-44035, France (J.M. and J.J.S.); CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44000, France (J.M. and J.J.S.); NIH-NCRR-P20 RR016434, NIH-HLBI 1R01-HL084285, AHAGIA 09GRNT2060075 (A.W.), and AHAGIA 0835460N (E.A.).

### REFERENCES

Barlow JB, Bosman CK. 1966. Aneurysmal protrusion of the posterior leaflet of the mitral valve. An auscultatory-electrocardiographic syndrome. *Am Heart J* 71:166-178.

Bernanke DH, Markwald RR. 1982. Migratory behavior of cardiac cushion tissue cells in a collagen-lattice culture system. *Dev Biol* 91:235-245.

Butcher JT, McQuinn TC, Sedmera D, Turner D, Markwald RR. 2007. Transitions in early embryonic atrioventricular valvular function correspond with changes in cushion biomechanics that are predictable by tissue composition. *Circ Res* 100:1503-1511.

Canty EG, Lu Y, Meadows RS, Shaw MK, Holmes DF, Kadler KE. 2004. Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibrinoporators) specifies the parallelism of tendon. *J Cell Biol* 165:553-563.

Canty EG, Starborg T, Lu Y, Humphries SM, Holmes DF, Meadows RS, Huffman A, O'Toole ET, Kadler KE. 2006. Actin filaments are required for fibrinoporator-mediated collagen fibril alignment in tendon. *J Biol Chem* 281:38592-38596.

Cole WG, Chan D, Hickey AJ, Wilcken DE. 1984. Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves. *Biochem J* 219:451-460.

de Lange FJ, Moorman AF, Anderson RH, Manner J, Soufan AT, de Gier-de Vries C, Schneider MD, Webb S, van den Hoff MJ, Christoffels VM. 2004. Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circ Res* 95:645-654.

DeRuiter MC, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenberger-de Groot AC. 1997. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res* 80:444-451.

Dettman RW, Denetclaw W, Jr., Ordahl CP, Bristow J. 1998. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 193:169-181.

Devereux RB. 1989. Diagnosis and prognosis of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med* 320:1077-1079.

Devereux RB, Kramer-Fox R, Webb KH, Hochreiter C, Borer JS. 1986. Long-term follow-up of patients with mitral-valve prolapse. *N Engl J Med* 314:1119-1120.

Devereux RB, Kramer-Fox R, Kligfield P. 1989. Mitral valve prolapse: causes, clinical manifestations, and management. *Ann Intern Med* 111:305-317.

Disse S, Abergel E, Berrebi A, Houot AM, Le Heuzey JY, Diebold B, Guize L, Carpentier A, Corvol P, Jeunemaitre X. 1999. Mapping of a first locus for autosomal dominant myxomatous mitral-valve prolapse to chromosome 16p11.2-p12.1. *Am J Hum Genet* 65:1242-1251.

Eisenberg LM, Markwald RR. 1995. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res* 77:1-6.

Farsi JM, Aubin JE. 1984. Microfilament rearrangements during fibroblast-induced contraction of three-dimensional hydrated collagen gels. *Cell Motil* 4:29-40.

Feng Y, Walsh CA. 2004. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol* 6:1034-1038.



- Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ, Walsh CA. 2006. Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19836–19841.
- Freed LA, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Evans JC, Fuller DL, Lehman B, Levine RA. 2002a. Mitral valve prolapse in the general population: the benign nature of echocardiographic features in the Framingham Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 40:1298–1304.
- Freed LA, Levy D, Levine RA, Evans JC, Larson MG, Fuller DL, Lehman B, Benjamin EJ. 2002b. Mitral valve prolapse and atrial septal aneurysm: an evaluation in the Framingham Heart Study. *Am J Cardiol* 89:1326–1329.
- Freed LA, Acierio JS, Jr, Dai D, Leyne M, Marshall JE, Nesta F, Levine RA, Slaughterhaupt SA. 2003. A locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 11p15.4. *Am J Hum Genet* 72:1551–1559.
- Gehler S, Baldaassarre M, Lad Y, Leight JL, Wozniak MA, Riching KM, Eliceiri KW, Weaver VM, Calderwood DA, Keely PJ. 2009. Filamin A-beta1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension. *Mol Biol Cell* 20:3224–3238.
- Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Gourdie RG, Poelmann RE. 1998. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res* 82:1043–1052.
- Glogauer M, Arora P, Chou D, Janney PA, Downey GP, McCulloch CA. 1998. The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J Biol Chem* 273:1689–1698.
- Grande-Allen KJ, Griffin BP, Ratliff NB, Cosgrove DM, Vesely I. 2003. Glycosaminoglycan profiles of myxomatous mitral leaflets and chordae parallel the severity of mechanical alterations. *J Am Coll Cardiol* 42:271–277.
- Hart AW, Morgan JE, Schneider J, West K, McKie L, Bhattacharya S, Jackson LJ, Cross SH. 2006. Cardiac malformations and midline skeletal defects in mice lacking filamin A. *Hum Mol Genet* 15:2457–2467.
- Hinton RB Jr, Lincoln J, Deutsch GH, Osinska H, Manning PB, Benson DW, Yutzey KE. 2006. Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ Res* 98:1431–1438.
- Hinton RB Jr, Alfieri CM, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Benson DW, Yutzey KE. 2008. Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2480–2488.
- Humphries SM, Lu Y, Canty EG, Kadler KE. 2008. Active negative control of collagen fibrillogenesis in vivo. Intracellular cleavage of the type I procollagen propeptides in tendon fibroblasts without intracellular fibrils. *J Biol Chem* 283:12129–12135.
- Jiang P, Campbell ID. 2008. Integrin binding immunoglobulin type filamin domains have variable stability. *Biochemistry* 47:11055–11061.
- Kapacec Z, Richardson SH, Lu Y, Starborg T, Holmes DF, Baar K, Kadler KE. 2008. Tension is required for fibripositor formation. *Matrix Biol* 27:371–375.
- Kim H, Sengupta A, Glogauer M, McCulloch CA. 2008. Filamin A regulates cell spreading and survival via beta1 integrins. *Exp Cell Res* 314:834–846.
- Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, Toquet C, Roy E, McGregor I, Lynch SA, Newbury-Ecob R, Tran Y, Young I, Trochu JN, Le Marec H, Schott JJ. 2007. Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation* 115:40–49.
- Kyndt F, Schott JJ, Trochu JN, Baranger F, Herbert O, Scott V, Fressinaud E, David A, Moisan JP, Bouhour JB, Le Marec H, Benichou H. 1998. Mapping of X-linked myxomatous valvular dystrophy to chromosome Xq28. *Am J Hum Genet* 62:627–632.
- Lincoln J, Alfieri CM, Yutzey KE. 2004. Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos. *Dev Dyn* 230:239–250.
- Markwald RR, Smith WN. 1972. Distribution of mucosubstances in the developing rat heart. *J Histochem Cytochem* 20:896–907.
- Markwald RR, Fitzharris TP, Smith WN. 1975. Structural analysis of endocardial cytodifferentiation. *Dev Biol* 42:160–180.
- Markwald RR, Fitzharris TP, Manasek FJ. 1977. Structural development of endocardial cushions. *Am J Anat* 148:85–119.
- Meyer SC, Sanan DA, Fox JE. 1998. Role of actin-binding protein in insertion of adhesion receptors into the membrane. *J Biol Chem* 273:3013–3020.
- Mjaatvedt CH, Markwald RR. 1989. Induction of an epithelial-mesenchymal transition by an in vivo adheron-like complex. *Dev Biol* 136:118–128.
- Mjaatvedt CH, Lepera RC, Markwald RR. 1987. Myocardial specificity for initiating endothelial-mesenchymal cell transition in embryonic chick heart correlates with a particulate distribution of fibronectin. *Dev Biol* 119:59–67.
- Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC. 2003. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* 33:407–411.
- Nesta F, Leyne M, Yosefy C, Simpson C, Dai D, Marshall JE, Hung J, Slaughterhaupt SA, Levine RA. 2005. New locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 13: clinical insights from genetic studies. *Circulation* 112:2022–2030.
- Ng CM, Cheng A, Myers LA, Martinez-Murillo F, Jie C, Bedja D, Gabrielson KL, Hausladen JM, Mecham RP, Judge DP, Dietz HC. 2004. TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 114:1586–1592.
- Pentikainen U, Ylanne J. 2009. The regulation mechanism for the auto-inhibition of binding of human filamin A to integrin. *J Mol Biol* 393:644–657.
- Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R. 1997. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev Dyn* 210:96–105.
- Perez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Munoz-Chapuli R, Wessels A. 2002. Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol* 247:307–326.
- Popowicz GM, Schleicher M, Noegel AA, Holak TA. 2006. Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 31:411–419.
- Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Schoen FJ. 2001. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation* 104:2525–2532.
- Rabkin E, Aikawa M, Farber M, Aikawa M, Schoen FJ. 2004. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis* 13:841–847.
- Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, Colod-Beroud G, Booms P, De Paepe A, Dietz HC, Guo G, Handford PA, Judge DP, Kielty CM, Loeyz B, Milewicz DM, Ney A, Ramirez F, Reinhardt DP, Tiedemann K, Whiteman P, Godfrey M. 2006. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet* 43:769–787.
- Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, Watanabe K. 2001. Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 276:17871–17877.
- Snarr BS, Wrigg EE, Phelps AL, Trusk TC, Wessels A. 2007. A spatiotemporal evaluation of the contribution of the dorsal mesenchymal protrusion to cardiac development. *Dev Dyn* 236:1287–1294.
- Snarr BS, Kern CB, Wessels A. 2008. Origin and fate of cardiac mesenchyme. *Dev Dyn* 237:2804–2819.
- Wessels A, Perez-Pomares JM. 2004. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 276:43–57.
- Wessels A, Markman MW, Vermeulen JL, Anderson RH, Moorman AF, Lamers WH. 1996. The development of the atrioventricular junction in the human heart. *Circ Res* 78:110–117.
- Zhou AX, Hartwig JH, Akyurek IM. 2010. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol* 20:113–123.

Mécanismes moléculaires et cellulaires des mutations de la filamine A associées à une dystrophie valvulaire héréditaire.

Le gène *FLNA* est le premier identifié dans une dystrophie valvulaire myxoïde liée au chromosome X (XMVD) qui se traduit par un allongement des valvules mitrales et un remodelage de leur matrice extracellulaire (MEC). Ce gène code pour la filamine A (FlnA), une protéine du cytosquelette qui participe à l'organisation du réseau orthogonal d'actine et de multiples voies de signalisation intracellulaire. Le but de mon travail a été 1) d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires des mutations de la FlnA associées à la XMVD 2) des modifications d'interaction avec des protéines partenaires de la FlnA. J'ai établi des lignées stables exprimant les FlnA wild-type ou mutantes (FlnA-G288R et P637Q) dans des cellules de mélanome déficientes en FlnA. Les lignées exprimant les FlnA mutantes présentent des défauts d'étalement, d'adhésion et de migration cellulaire. Les mutations de la FlnA induisent une diminution de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  (ITG $\beta 1$ ), de sa localisation à la membrane et de sa stabilité sans modification du niveau d'ARNm. De plus elles limitent la capacité des cellules à organiser la MEC (fibronectine). La deuxième partie de l'étude m'a permis d'identifier de nouveaux partenaires de la FlnA dans les régions où sont localisées les mutations. J'ai identifié les actinines-1 et -4 et la PTPN12 qui participent à la régulation des points focaux d'adhésion cellulaire. En conclusion mes travaux m'ont permis d'esquisser des mécanismes potentiels dans le développement de la XMVD. En réduisant l'expression des ITG $\beta 1$  les mutations modifieraient la mécanotransduction et de la réponse aux chémokines (TGF $\beta$ ) des cellules interstitielles de valves qui organisent leur MEC.

Mots clés : filamine A, valvulopathies, matrice extracellulaire, migration cellulaire, intégrines

Molecular and cellular mechanisms of filamin A mutation involved in X linked valvular dystrophy.

*FLNA* gene is the first identified in X linked myxomatous valvular dystrophy which show lengthening of mitral valve leaflets and extracellular matrix (ECM) remodeling. This gene encodes filamin A (FlnA) a cytoskeleton protein which participate in organization of orthogonal actin network and multiple intracellular signaling. The aim of this work has been 1) identify molecular and cellular mechanisms of FlnA mutations associated with XMVD 2) modifications of interaction with proteins partners of FlnA. I have established stable cell lines expressing FlnA wild-type or mutants (FlnA-G288R or P637Q) in melanoma deficient FlnA cells. Mutants FlnA cell lines develop defects of spreading, adhesion and cell migration. Mutations of FlnA involved in decrease  $\beta 1$  integrin expression, it localization at the membran and it stability since level mRNA modification. Moreover they limit cell capacities of ECM organization. A second part of this study allow me to identify news partners of FlnA on region of mutations locations. I has identified actinin1/4 and PTPN12 which participate at the regulation of cellular focal adhesion points. In conclusion my works permit to draft potentials mechanisms in the development of XMVD. In reducing ITG $\beta 1$  expression mutations could alter the mechanotransduction and the response of chemokines (TGF $\beta$ ) of valve interstitials cells which organize their ECM.

Key words: filamin A, heart valve diseases, extracellular matrix, cell migration, integrins