

UNIVERSITÉ DE NANTES

UFR DE MÉDECINE

---

ÉCOLE DOCTORALE • BIOLOGIE SANTÉ (ED 502)

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

N° 24

# Etudes des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans des dystrophies valvulaires non syndromiques

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie, Biologie cellulaire et moléculaire

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Damien DUVAL**

*Le 09 Septembre 2014, devant le jury ci-dessous*

*Président :* M LE MAREC Hervé, PU-PH, Université de Nantes

*Rapporteurs :* M. MONASSIER Laurent, PU-PH, Université de Strasbourg  
M. GERMAIN Stéphane, DR INSERM, Université de Paris

*Examineurs :* M. HONORE Eric, DR CNRS, Université de Nice

*Directeurs de thèse:* M. MEROT Jean, CR CNRS, Université de Nantes  
M. SCHOTT Jean-Jacques, DR INSERM, Université de Nantes

*A mes 2 amours, Stéphanie et Léa*

## Remerciements

*Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements au Professeur Laurent Monassier et au Docteur Stéphane Germain d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Merci également Docteur Eric Honoré de m'avoir consacré un peu de votre temps pour être aujourd'hui examinateur de mon travail. Je remercie très chaleureusement le Professeur Hervé Le Marec d'avoir accepté d'être examinateur et de présider ce jury de thèse. Merci aux Docteurs Corinne Albiges-Rizo et Vincent Sauzeau de m'avoir conseillé pour mon suivi de comité de thèse pendant ces 3 années qui ont été riches en enseignement.*

*Je tiens à remercier les Professeurs Pierre Pacaud et Hervé Le Marec, ancien et nouveau directeur de l'Institut du Thorax de m'y avoir accueilli. Merci de votre disponibilité et de votre aide. Merci également au Professeur Thierry Le Tourneau pour son expertise médicale et son soutien dans mon projet de reprise de mes études de médecine.*

*C'est grâce à vous, Jean, qu'il y a maintenant 6 ans que j'ai effectué mes premiers pas au labo pour mon stage de licence 3 dans votre équipe. Merci de m'avoir fait confiance pendant ces 6 années et surtout pour votre décision de me garder en thèse. Merci pour votre confiance indéfectible tout au long de ma thèse sur un projet tant prometteur. Merci de m'avoir apporté votre soutien dans les hauts et les bas tant personnels que professionnels. J'ai énormément appris à vos côtés, et j'espère avoir été à la hauteur de vos espérances. Je vous remercie pour votre patience et pour tous les conseils que vous m'avez donnés dans tous les domaines. **Merci !!!***

*Merci également à Jean-Jacques pour tes conseils et tes réflexions sur le projet ainsi que tout l'aide que tu m'as apporté dans l'élaboration de mon projet. Je tiens à remercier également Thierry pour toute l'aide qu'il m'a apporté dans la compréhension clinique des pathologies du PVM. Merci également pour les conseils précieux que vous m'avez donné dans l'élaboration de mon nouveau projet.*

*Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe 1 avec qui j'ai passé beaucoup de temps. Notamment Flavien et Céline pour leur soutien et leurs remarques constructives ainsi que pour nos discussions dans votre bureau toujours animées !!! Merci également Isabelle Barò et Gildas Loussouarn de m'avoir fait découvrir le patch.*

*Je remercie tous ceux du labo, ancien et nouveau, pour l'ambiance, leur accueil et nos discussions !!!*

*Merci à Sophie, Pauline et Agnès C avec qui j'ai partagé le labo de biochimie et la salle de culture. Je suis désolé de tout ce que je vous ai fait subir durant toutes ces années... Enfin, non, je ne suis pas désolé. J'ai adoré vous avoir embêté, vous avoir choqué avec mes blagues et me moquer de vous lorsque vous faisiez des conneries. Maintenant à vous de poursuivre la relève avec les petits nouveaux. Merci à Antoine, pour tous les moments passés à t'apprendre l'art de la culture cellulaire et de la biochimie.*

*Merci Benjamin, pour sa bonne humeur, ses blagues et ses conseils. Valentine, notre copine « véto » que l'on aime embêter. Virginie et Amandine pour toutes les pauses que l'on a faites dans votre bureau et Sandie pour ta bonne humeur. Merci à vous pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble. A toutes nos discussions que l'on a eues pendant les repas ou les pauses-café sur tout et rien!!!*

*Merci à Jérôme et Fabien. On a passé beaucoup de moments ensemble à parler de tout. Des doutes que l'on a eus avant de commencer la thèse à ceux pendant, en se demandant si l'on avait fait le bon choix. Merci pour votre aide. On a passé de très bons moments pendant lesquels j'ai appris à vous connaître autant professionnellement que personnellement.*

*Merci à tous mes amis de Fac, Kevin, Martin, Thomas, Vanessa, Charles, Claire, Philippe, Julie et Faouzi. Merci pour toutes les soirées passées chez les uns ou les autres et au Briord. Pour m'avoir soutenu durant cette thèse et me permettre de souffler. Claire, toi aussi, tu es bien placée pour savoir ce que c'est que de faire une thèse.*

*Merci à mes 2 « frères », Benjamin, mon lapin et Jean-Max, mon fillot qui m'ont aidé et soutenu durant toutes ces années. Toi, mon lapin qui n'a pas souhaité poursuivre l'aventure de la fac avec moi mais qui aujourd'hui ne s'en porte pas plus mal !!! Et toi, mon fillot qui nous a fait voyager dans toute la France entre Reims et Toulouse et maintenant, tu es au Canada. Vous avez toujours été là pour moi et je vous en remercie !!! Je ne t'ai pas oublié « Copain Margot » pour toutes les soirées et discussions que nous avons eues sur des sujets parfois improbables et surtout de nous avoir aidé à réaliser nos projets !!! Et sans oublier le petit Eliott dont je suis fier d'être le parrain.*

*Merci à ma famille, Papa, Maman, Benoit, Cédric, ma belle-famille et à ceux qui ne sont plus, avec qui j'aurais tant aimé partager l'aboutissement de ces années de travail. Papa, Maman, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci d'avoir soutenu mon choix de carrière et de m'avoir aidé à m'y épanouir. Merci de votre soutien inconditionnel que ce soit au niveau financier ou moral. Votre affection m'a permis d'aller au-delà de mes limites. J'ai de la chance d'avoir des parents comme vous. Rien ne m'est plus cher que la fierté que je lis dans vos yeux. Merci de votre soutien dans la réalisation de mon nouveau projet.*

*Merci à mes 2 amours. Tout d'abord toi, Stéphanie, qui est arrivée à mes côtés au début de ma première année de licence. Tu m'as toujours soutenu dans les moments difficiles et les doutes. Plus d'une auraient pris peur, mais pas toi. Tu es toujours restée à mes côtés et tu as accepté la dure vie d'un étudiant en thèse, les longues journées au labo autant la semaine, le week-end, les jours fériés et les vacances. Merci d'avoir su m'apporter l'équilibre nécessaire pour parvenir à ce stade, d'avoir su m'encourager et m'écouter. Merci de t'être autant intéressée à mon travail jusqu'à en connaître les moindres détails surtout lors de la rédaction où tu m'as grandement aidé en la relisant et la corrigeant. Au fond, tu l'as écrite autant que moi !!! Je suis très heureux de t'avoir à mes côtés et surtout que tu me soutiennes dans mon, notre nouveau projet. **MERCI !!!***

*Enfin toi, ma Léa (« mon Pitbull ») pour tout le bonheur que tu m'apportes depuis que tu es là. Malgré les nuits courtes, tes siestes inexistantes, papa t'aime quand même. Tu m'as permis de redéfinir mes priorités et de me lancer dans mon nouveau projet.*

*« L'important n'est pas de convaincre mais de donner à réfléchir »*

*Bernard Werber*

*« Entre ce que je pense, ce que je veux dire, ce que je crois dire, ce que je dis, ce que vous voulez entendre, ce que vous entendez, ce que vous croyez en comprendre, ce que vous voulez comprendre, et ce que vous comprenez, il y a au moins neuf possibilités de ne pas se comprendre. »*

*Bernard Werber*

*(C'est l'écrivain préféré de ma femme !)*

# Sommaire

REMERCIEMENTS.....	II
SOMMAIRE.....	IV
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	VIII
INDEX DES TABLEAUX .....	X
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XI
AVANT-PROPOS .....	XIII
<b>= INTRODUCTION -</b>	<b>1</b>
1. LES VALVES CARDIAQUES .....	3
1.1. Embryogenèse des valves .....	4
1.1.1. Embryogenèse .....	4
1.1.2. Voies de signalisation .....	5
1.2. Fonction et structure des valves .....	6
1.2.1. Anatomie et fonction.....	6
1.2.2. Structure des valves atrioventriculaires.....	8
1.2.3. Les cellules valvulaires.....	10
1.2.4. Mécanismes d'activation des CIVs.....	13
1.3. Épidémiologie des valvulopathies.....	14
1.4. Le prolapse valvulaire mitral (PVM).....	15
1.4.1. Caractéristique clinique .....	15
1.4.2. Processus pathologique .....	16
1.4.3. Les valvulopathies syndromiques .....	18
1.4.4. Les valvulopathies non syndromiques .....	18
1.5. La dystrophie valvulaire liée aux mutations de la FLNa .....	19
2. LA FILAMINE A (FLNA) .....	21
2.1. Structure de la protéine .....	21
2.1.1. Gènes et isoformes .....	21
2.1.2. Structure Générale .....	22
2.2. Localisation de la FLNa .....	25
2.2.1. Localisation tissulaire.....	25
2.2.2. Localisation cellulaire.....	25
2.3. Fonctions biologiques de la FLNa .....	26
2.3.1. Organisation du cytosquelette d'actine.....	26
2.3.2. Mécanotransduction.....	27
2.3.3. Voies de signalisation et mécanismes.....	28

2.4. Pathologies associées aux mutations de la FLNa .....	31
<b>3. LES PROTEINES PARTENAIRES DE LA FLNa .....</b>	<b>33</b>
3.1. Les protéines G monomériques.....	33
3.1.1. Structure des protéines G monomériques .....	34
3.1.2. Cycle GTPasique et mécanismes régulateurs.....	35
3.1.3. La sous-famille Rho.....	36
3.1.4. Relation FLNa – protéines G monomériques. ....	38
3.2. La protéine FilGAP .....	39
3.2.1. Gènes et isoformes .....	39
3.2.2. Structure de la protéine .....	40
3.2.3. Localisation de FilGAP .....	41
3.2.4. Fonction de FilGAP.....	41
3.3. La tyrosine phosphatase PTP-PEST.....	44
3.3.1. Structure de la protéine .....	44
3.3.2. Mécanismes de régulation de PTP-PEST .....	45
3.3.1. Rôle de la protéine .....	46
<b>= OBJECTIFS - .....</b>	<b>48</b>
<b>= MATERIEL ET METHODES - .....</b>	<b>50</b>
<b>1. CULTURE CELLULAIRE.....</b>	<b>51</b>
1.1. Les cellules de melanome humain (M2/A7) .....	51
1.2. Les cellules de Fibrosarcome (HT1080).....	51
1.3. Les cellules Humain Embryonic Kidney (HEK).....	52
1.4. Les cellules souches urinaires de patient (USC) .....	52
<b>2. TRANSFECTIONS, ANTICORPS ET TRAITEMENT CHIMIQUE.....</b>	<b>53</b>
2.1. Les plasmides.....	53
2.1.1. Purification de l'ADN plasmidique .....	53
2.1.2. Transfections des plasmides.....	53
2.2. Les siRNA.....	54
2.3. Anticorps, réactifs et traitement chimiques .....	54
<b>3. APPROCHES FONCTIONNELLES .....</b>	<b>56</b>
3.1. xCELLigence.....	56
3.2. Comblement de blessure – Wound Healing.....	57
3.3. Redistribution de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) .....	57
3.4. Compaction de gel de collagène I.....	60

4.	<b>APPROCHES BIOCHIMIQUES</b> .....	62
4.1.	Extraction protéique.....	62
4.2.	Séparation par affinité – « Pull Down ».....	63
4.2.1.	Production des protéines recombinantes.....	63
4.2.2.	Le Pull Down.....	64
4.3.	Co-immunoprecipitation.....	64
4.3.1.	Principes.....	64
4.3.2.	Protocoles.....	64
4.4.	Test d'interaction lipide-protéine.....	65
4.5.	Le western blot.....	66
5.	<b>IMMUNOMARQUAGE</b> .....	67
6.	<b>STATISTIQUES</b> .....	67
=	<b><u>RESULTATS</u></b> - .....	<b>68</b>

**PROJET N°1 : ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRE ET CELLULAIRE LIEE AUX MUTATIONS DE LA FLNA IMPLIQUEE DANS DES DYSTROPHIES VALVULAIRES**..... 69

1.	<b>INTRODUCTION</b> .....	70
2.	<b>L'ARTICLE</b> .....	71
3.	<b>MISE EN EVIDENCE D'UN AUTRE MECANISME PHYSIOPATHOLOGIQUE</b> .....	84
3.1.	Identification d'une nouvelle protéine : La tyrosine phosphatase PTP-PEST.....	84
3.1.1.	Technique de Double Hybride.....	85
3.1.2.	Technique de Pull down.....	87
3.1.3.	Technique d'Immunoprécipitation.....	88
3.2.	Impact de la perte d'interaction de PTP-PEST.....	89
3.2.1.	Modification de l'activité de p190RhoGAP.....	90
3.2.2.	Modification de l'activité des protéines associées à la voie Ras.....	91
4.	<b>DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MODELE CELLULAIRE</b> .....	93
4.1.1.	Les USC : un modèle pertinent pour les valvulopathies ?.....	94
4.1.2.	Remodelage de la matrice du collagène.....	96
5.	<b>DISCUSSION</b> .....	98
5.1.	La pertinence du modèle cellulaire.....	99
5.2.	Implication de la voie sérotoninergique.....	102
5.3.	Implication de la voie du TGF- $\beta$ .....	105

**PROJET N°2 : IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU GENE DANS LE PROLAPSUS MITRAL VALVULAIRE :  
ETUDES DES MECANISMES MOLECULAIRES LIEES AUX MUTATIONS DE LA PROTEINE FILGAP .. 108**

1. INTRODUCTION .....	109
2. L'ARTICLE.....	110
- <b><u>DISCUSSION GENERALE -</u></b>	<b><u>144</u></b>
- <b><u>BIBLIOGRAPHIE -</u></b>	<b><u>151</u></b>
- <b><u>ANNEXE -</u></b>	<b><u>169</u></b>

## Table des illustrations

<u>Figure 1</u> : Anatomie du cœur en vue frontale.....	2
<u>Figure 2</u> : Représentation schématique de l'embryogenèse du cœur .....	3
<u>Figure 3</u> : Transformation épithéliale en mésenchymale et maturation des valves .....	4
<u>Figure 4</u> : Voie de régulation de la valvulogenèse .....	6
<u>Figure 5</u> : Représentation schématique des valves. ....	7
<u>Figure 6</u> : Structure stratifiée des valves atrioventriculaires. ....	9
<u>Figure 7</u> : Représentation schématique des différents types de cellules interstitielles de valves et leurs fonctions. ....	12
<u>Figure 8</u> : Photographie de valves pathologiques identifiées dans les PVM.....	16
<u>Figure 9</u> : Représentation schématique des différents processus pathologiques. ....	17
<u>Figure 10</u> : La dystrophie valvulaire liée aux mutations de la FLNa. ....	20
<u>Figure 11</u> : Structure de la FLNa.....	22
<u>Figure 12</u> : Représentation schématique de l'interaction entre la FLNa et l'Actine F .....	23
<u>Figure 13</u> : Représentation schématique de l'effet du stress mécanique sur le cytosquelette d'actine. ....	28
<u>Figure 14</u> : Structure monomérique de la FLNa et son interaction avec certains partenaires .....	29
<u>Figure 15</u> : Localisation des mutations associées aux différentes pathologies de la FLNA.....	32
<u>Figure 16</u> : Structure moléculaire des protéines de la superfamille de Ras.....	34
<u>Figure 17</u> : Représentation schématique des mécanismes régulateurs des petites protéines G.....	36
<u>Figure 18</u> : Voie de signalisation des petites protéines G de la sous-famille de Rho.....	37
<u>Figure 19</u> : Structure des 4 isoformes de FilGAP.....	39
<u>Figure 20</u> : Représentation schématique de la libération de FilGAP lors d'un stress mécanique .....	42
<u>Figure 21</u> : Représentation schématique de la structure de PTP-PEST.....	45
<u>Figure 22</u> : Voies de signalisation de PTP-PEST .....	46
<u>Figure 23</u> : Représentation schématique du fonctionnement de L'xCELLigence.....	56
<u>Figure 24</u> : Représentation schématique du mécanisme de FRAP.....	58
<u>Figure 25</u> : Exemple d'une feuille d'analyse de FRAP.....	59
<u>Figure 26</u> : Représentation de la compaction des gels de collagène .....	61
<u>Figure 27</u> : Représentation schématique des membranes de PIP Strips .....	66
<u>Figure 28</u> : Représentation schématique du mécanisme du double hybride en levure .....	85
<u>Figure 29</u> : Modification de l'interaction entre la FLNa et PTP-PEST.....	86
<u>Figure 30</u> : Perte de l'interaction entre la FLNa-P637Q et PTP-PEST.....	87
<u>Figure 31</u> : Co-Immunoprecipitation de PTP-PEST et de la FLNa.....	89
<u>Figure 32</u> : Mesure de l'activité de p190RhoGAP. ....	90
<u>Figure 33</u> : Niveau de phosphorylation de ERK et de SRC. ....	91

<u>Figure 34</u> : Morphologie des USC en culture.....	94
<u>Figure 35</u> : Processus d'adhésion et d'étalement des USC .....	95
<u>Figure 36</u> : Co-immunoprecipitation FLNa-FilGAP .....	96
<u>Figure 37</u> : Compaction des gels de collagène avec les USC.....	97
<u>Figure 38</u> : Schéma récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans la dystrophie valvulaire liée aux mutations de la FLNa .....	98
<u>Figure 39</u> : Coupe histologique de valves des souris KO pour la FLNa. ....	101
<u>Figure 40</u> : Hypothèse de la voie de la sérotonine dans le développement pathologique. ....	104
<u>Figure 41</u> : Hypothèse de la voie du TGF- $\beta$ dans le développement pathologique.....	106
<u>Figure 42</u> : Comparaison des phénotypes de PVM liés aux mutations de la FLNa ou de FilGAP .....	147

## **Index des tableaux**

<u>Tableau 1</u> : Famille des petites protéines G.....	33
<u>Tableau 2</u> : Liste des différents réactifs utilisés .....	54
<u>Tableau 3</u> : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés lors des différentes expériences .....	55
<u>Tableau 4</u> : Récapitulatif des différents volumes de réactifs pour réaliser les gels de collagène avec un exemple pour un gel de collagène de 1 ml à 1,5 mg.ml <sup>-1</sup> .....	60
<u>Tableau 5</u> : Composition des différents tampons de lyse et du volume utilisé en fonction de la boîte.	62

## Liste des abréviations

5-HT : Sérotonine  
A7 : Cellule de mélanome humaine ré-exprimant la filamine A  
ABD : « Actin Binding Domain » ou domaine de liaison à l'actine  
ARC : Attaché de Recherche Clinique  
ARHGAP : « *Aplysia Ras-Related homologue GAP* »  
BMP : « Bone Morphogenetic Protein »  
BSA : « Bovine Serum Albumin »  
CAV : Canal AtrioVentriculaire  
CC : Domaine « Coil-Coiled »  
CEV : Cellule Endothéliale de Valve  
CIV : Cellules Interstitielle de Valve  
DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-Phénylindole  
DMEM : « Dulbecco's Modified Eagle Medium »  
DO : densité Optique  
DTT : DiThioThrèitol  
EGF : « Epithelial Growth Factor »  
EMT : « Epithelial to Mesenchymal Transformation »  
ERK 1-2 : « Extracellular signal Regulated Kinases  
F-actine : Actine filamenteuse  
FAK : « Focal Adhesion Kinase »  
FBS : « Fœtal Bovin serum »  
FITC : « Fluorescein IsoThioCyanate  
FGF : « Fibroblast Growth Factor »  
FLNa,b,c : Filamine A, B ou C  
FRAP : « Fluorescen Recovery After Photobleaching »  
G418 : Généticine  
GAG : GlycoAminoGlycane  
GAP : « GTPase-Activating Protein »  
GEF : « Guanine Exchange Factor »  
GFP : « Green Fluorescent Protein »  
GTPases : enzyme hydrolysant le GTP en GDP  
HRP : « HorseRadish Peroxidase »  
IPTG : « IsoPropyl  $\beta$ -D-1-ThioGalactopyranoside »  
IPS : « Induced Pluripotent Stem-cell »

KO : « Knock-Out »  
LB : « Lysogeny Broth »  
M2 : Cellule de mélanome humaine n'exprimant pas la filamine A  
MAPK : « Mitogen-Activated Protein Kinase »  
MEC : Matrice ExtraCellulaire  
MMP : « Matrix MetalloProteinase »  
NO : Monoxyde d'azote  
OFT : « OutFlow Tract » ou tractus d'éjection  
PFA : ParaFormAldéhyde  
PAK : « p21 Activated Kinase »  
PBS : « Phosphate Buffer Saline »  
PCR : « Polymerase Chain Reaction »  
PDGF : « Platelet Derived Growth Factor »  
PECAM : « Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule »  
PH : Domaine d'homologie à la pleckstrine  
PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5) Phosphate  
PKA-C : « Protein Kinase A or C »  
PTP-N12 : « Protein Tyrosin Phosphatase –Non receptor 12»  
PVM : Prolapse Valvulaire Mitrale  
RAC : Rétrécissement Aortique Calcifié  
Refilin : « REgulator of FILamin proteIN »  
ROCK : « Rho associated protein Kinase »  
ROI : « Region Of Interest »  
SDS : « Sodium DocecylSulfate »  
SPARC : « Secreted Protein Acidic et Rich in Cysteine »  
SVF : Sérum de veau Fœtal  
SV-NN : Sérum de veau nouveau-né  
Syk : « spleen tyrosine kinase »  
TBS : « Tris Buffer Saline »  
TG2 : Transglutaminase 2  
TIMP : « Tissu Inhibitor of MetaloProteinase »  
TGF-β : « Transforming Growth factors »  
TPH1 : « tryptophan Hydroxylase 1 »  
USC : « Urine Stem Cell » ou cellules souches urinaires  
VEGF : « Vascular Endothelial Growth Factor »

## Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut du Thorax, UMR1087-CNRS 6291 au sein de l'équipe de génétique des maladies héréditaires dirigée par Jean-Jacques SCHOTT. Il s'agit d'une équipe pluridisciplinaire comprenant chercheurs, médecins, ingénieurs et techniciens, attachés de recherche clinique et doctorants. Notre équipe collabore avec différents laboratoires dans le cadre de réseaux internationaux comme le réseau d'excellence de la fondation Leducq ou le réseau européen Eurostars<sup>TM</sup>.

Les premiers travaux de l'équipe concernent l'identification des origines génétiques des arythmies cardiaques (Syndrome du QT long,...). Depuis une dizaine d'années, nous nous sommes intéressés aux origines génétiques des maladies valvulaires notamment les valvulopathies dégénératives non syndromiques.

Les valvulopathies sont des pathologies fréquentes et en constante augmentation avec le vieillissement de la population dans les pays développés (prévalence : 2-3 % de la population française) dont les causes ne sont pas encore connues. Parmi ces pathologies, on étudie principalement le Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM) et le Rétrécissement Aortique Calcifié (RAC). Ces 2 pathologies constituent la première cause de chirurgie valvulaire qui reste la seule option thérapeutique efficace à ce jour. Les mécanismes physiopathologiques des valvulopathies non syndromiques sont peu ou pas connus à l'instar des valvulopathies syndromiques où certains gènes associés à des voies de signalisation sont connus.

**Notre objectif est d'identifier les bases moléculaires de maladies valvulaires dégénératives rares par des approches génétiques, épidémiologiques et physiopathologiques.**

Notre stratégie de recherche est basée sur le fait que l'on considère un grand nombre de pathologies comme des maladies du vieillissement alors qu'il existe une prédisposition génétique liée à un gène majeur.

Pour identifier les gènes et les voies de signalisation responsables de ces valvulopathies, l'équipe s'organise dans une démarche de recherche translationnelle : patient  $\Rightarrow$  gène  $\Rightarrow$  mécanismes physiopathologiques. Cette complémentarité multidisciplinaire est répartie en 4 équipes différentes :

1) Une équipe Clinique : L'équipe de cardiologie du CHU de Nantes réalise les examens cliniques et échocardiographiques chez des patients présentant une valvulopathie de forme familiale ou sporadique. Ils recrutent les patients ainsi que leurs familles pour nous permettre l'identification de gènes potentiellement responsables.

2) Une équipe Epidémio-génétique : Elle permet le développement de nouveaux outils d'analyse pour améliorer nos approches basées sur des études familiales et/ou sporadiques pour mettre en place des stratégies de prévention dans la population et au sein des hôpitaux.

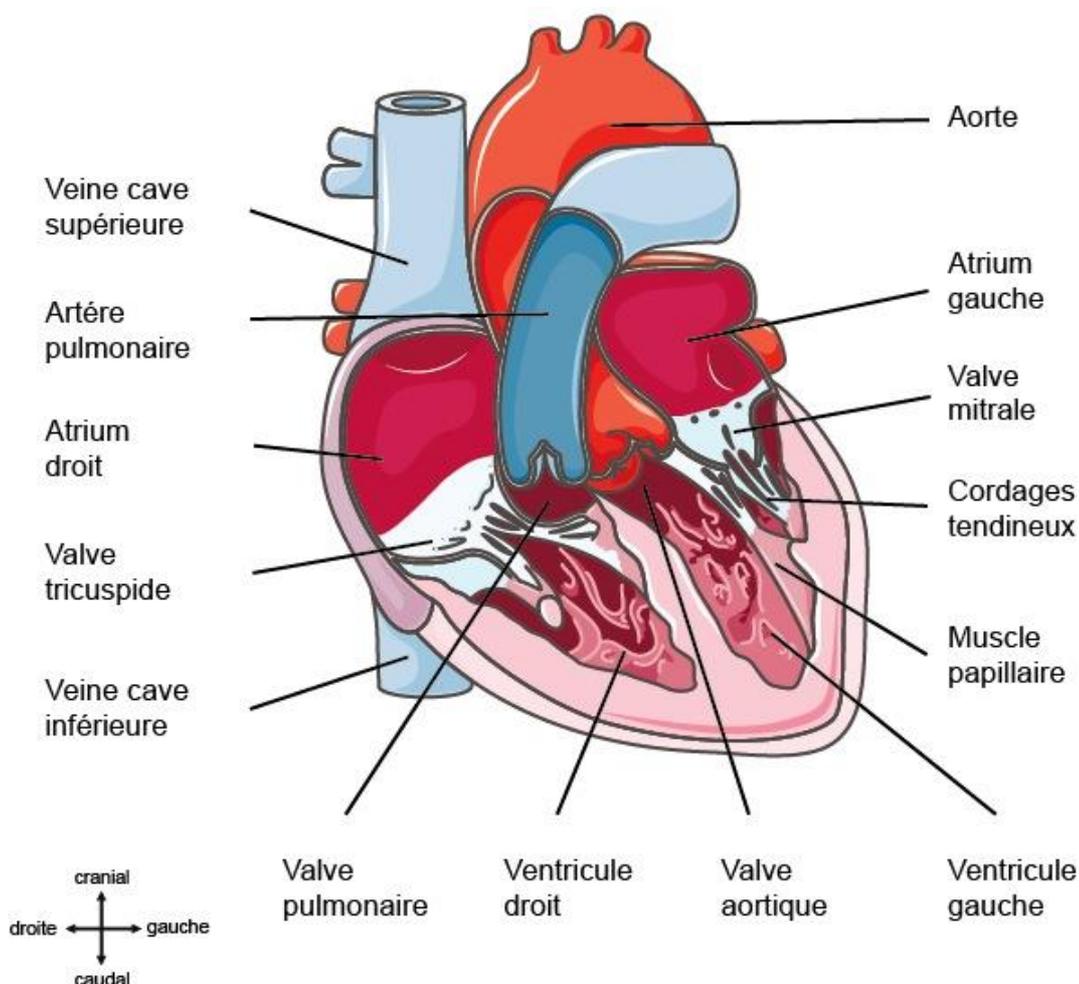
3) Une équipe Génétique moléculaire : Elle est axée sur l'identification de nouveaux gènes en utilisant différentes approches de séquençages des exons du génomes entier (« Whole exome sequencing ») sur des formes familiales ou par association de gène sur des formes sporadiques.

4) Une équipe Fonctionnelle : Après l'identification du gène, nous étudions les mécanismes moléculaires physiopathologiques associées aux mutations par différentes approches moléculaires et cellulaires. En plus de comprendre le développement de la pathologie, cela permettra d'identifier des voies potentielles de thérapies, une alternative moins invasive que la chirurgie valvulaire.

Mon travail de thèse s'inscrit dans l'axe fonctionnel avec l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de ces dystrophies valvulaires non syndromiques. Mon premier projet concerne les mutations du gène *FLNA* que nous avons identifié au laboratoire en 2007 (Kyndt et coll., 2007). Ce fut le premier gène identifié dans cette pathologie et depuis j'ai pu mettre en évidence certains mécanismes moléculaires impliqués. Mon deuxième projet concerne l'étude d'un nouveau gène (gène *ARHGAP24*) très récemment identifié dans une forme familiale de prolapse mitral.

**- Introduction -**

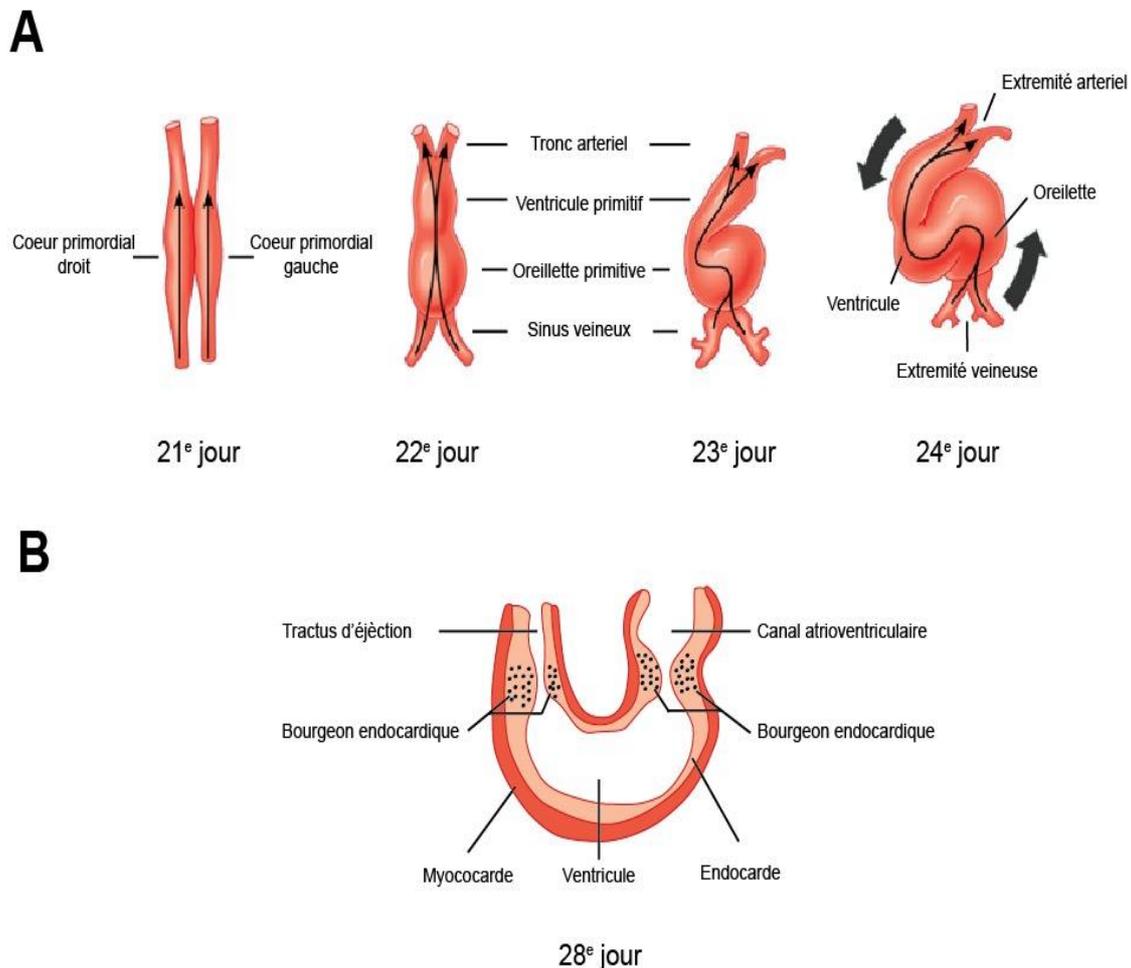
Le cœur est un organe central de l'organisme. Il a pour fonction de faire circuler le sang de façon unidirectionnelle afin de fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Le cœur est assimilé à une pompe composée de 4 cavités : 2 atriums (oreillettes) communiquant chacune avec un ventricule (figure n°1) qui éjecte le sang soit dans la circulation pulmonaire (ventricule droit) soit dans la circulation systémique (ventricule gauche). Il alterne les cycles de systole (contraction) et de diastole (relaxation) pour permettre une distribution optimale du sang. En moyenne, le cœur a un cycle de 70 battements par minute pour un volume expulsé de 5 litres de sang. La circulation pulmonaire permet d'oxygéner le sang alors que la circulation systémique va desservir tout l'organisme. Le cœur possède un système de valve qui assure une distribution unidirectionnelle du sang. Les conséquences d'une atteinte de ce système deviennent délétères au cours du temps avec la mise en place d'une insuffisance cardiaque aboutissant, le plus souvent, à un décès du patient s'il n'y a pas de prise en charge à temps.



**Figure 1 : Anatomie du cœur en vue frontale.** Le cœur est représenté sous forme schématique en coupe frontale. Les 2 Atriums sont séparés des ventricules par les valves atrioventriculaires. Les valves semi-lunaires sont situées à la base des gros vaisseaux (aorte et artère pulmonaire). Adaptation du schéma « Servier Medical art ».

## 1. Les valves cardiaques

Le cœur est le premier organe fonctionnel lors de l'embryogenèse. La fusion des tubes cardiaques primitifs lors du 21<sup>e</sup> jour de gestation conduit à la création d'un cœur primitif qui distribue le sang dans tout l'embryon. Au 22<sup>e</sup> jour, le cœur est formé de 4 cavités primitives : le sinus veineux, l'oreillette primitive, le ventricule primitif et le bulbe primitif. Les 3 semaines suivantes permettent de structurer de façon définitive le cœur par différents mécanismes de torsion et de remodelage (figure n°2). A partir du 2<sup>e</sup> mois de gestation, le cœur continue de croître jusqu'à la naissance où il fonctionnera normalement avec une circulation unidirectionnelle. Lors de ce processus, la formation des valves commence à la 5<sup>e</sup> semaine de gestation (28<sup>e</sup> jour). Le cœur présente une structure définitive et fonctionnelle au cours de la 8<sup>e</sup> semaine de gestation (Bruneau, 2008).

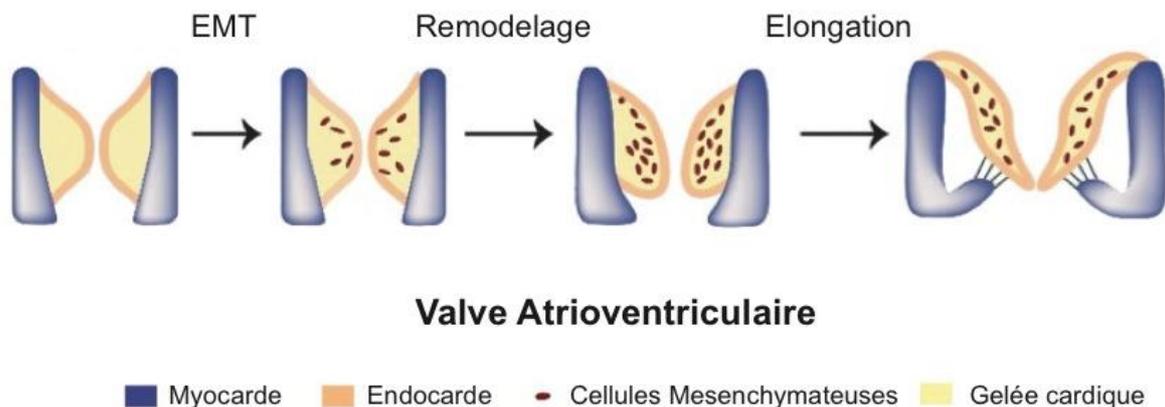


**Figure 2 : Représentation schématique de l'embryogenèse du cœur.** A. Le cœur subit de nombreux mécanismes de torsions entre le 21<sup>e</sup> et le 24<sup>e</sup> jour. B. Coupe frontale du cœur primitif montrant les différentes structures : L'endocarde à l'intérieur et le myocarde à l'extérieur. La formation des bourgeons endocardiques apparaît au niveau de la base des 2 tractus d'éjection. D'après (Person et coll., 2005).

## 1.1. Embryogenèse des valves

### 1.1.1. Embryogenèse

Comme décrit précédemment, les valves cardiaques commencent à se former au début de la 5<sup>e</sup> semaine de gestation, juste après la formation du canal atrio-ventriculaire (CAV) et du tractus d'éjection (OFT) (figure n°2B). A ce stade, le cœur est composé d'une couche myocardique (couche extérieure) et d'une couche endocardique (couche intérieure). A partir du 28<sup>e</sup> jour, la formation des bourgeons endocardiques se produit à la naissance du tronc atrioventriculaire et du tractus d'éjection (figure n°2B). Au niveau de ces bourgeons, les cellules de l'endocarde vont subir un processus dit de transformation épithéliale en mésenchymale (EMT). Durant ce processus, une partie des cellules endocardiques quitte la surface de l'endocarde et se différencier en cellules mésenchymales en migrant vers le myocarde. Ceci forme la gelée cardiaque où les cellules mésenchymales vont proliférer et sécréter de la matrice extracellulaire. Cela conduit à l'allongement et au remodelage de la valve primitive. Ces 2 processus sont dus à la combinaison d'une prolifération cellulaire importante sur le front de migration et une apoptose au niveau du bourgeon endocardique (figure n° 3). Les valves mitrale et tricuspide proviennent du bourgeon endocardique du canal atrioventriculaire alors que les valves semi-lunaires proviennent du tractus d'éjection (figure n°2B) (Lin et coll., 2012).



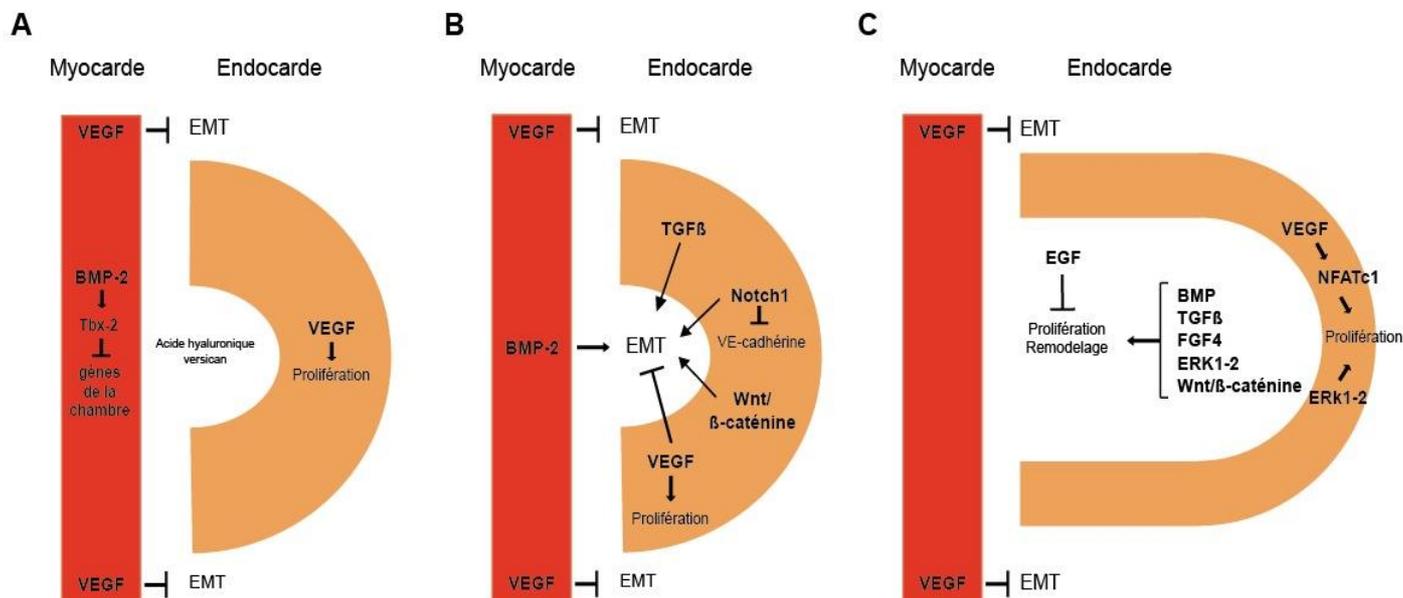
**Figure 3 : Transformation épithéliale en mésenchymale et maturation des valves.** Représentation schématique du mécanisme d'EMT qui se déroule dans le bourgeon cardiaque. Les cellules endothéliales vont subir le processus d'EMT et générer des cellules mésenchymales. Ces cellules vont remodeler la matrice pour permettre l'élongation et donner une valve primitive puis mature. Adaptation d'après (Lin et coll., 2012).

### 1.1.2. Voies de signalisation

La genèse des valves est un mécanisme hautement régulé mettant en jeu différentes voies de signalisation. Les cellules progénitrices des valves (décrites dans le paragraphe 1.2.3) proviennent majoritairement de l'endocarde et de la crête neurale. Une fois le processus d'EMT enclenché, les cellules de l'endocarde vont perdre leurs molécules d'adhésion (PECAM-1 ; VE-Cadherine) rendant plus facile leur migration dans la gelée cardiaque pour se différencier. Ce processus est sous le contrôle de nombreux facteurs sécrétés par le myocarde sous-jacent et l'endocarde lui-même. Parmi ces facteurs, on trouve les « Bone Morphogenetic Proteins 2 et 4 (BMP) », les « Transforming Growth Factor  $\beta$  2 et 3 (TGF $\beta$ ) » et le « Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ». En réponse à la sécrétion de ces facteurs, l'endocarde du bourgeon va exprimer des récepteurs tels que les BMP-r1a, TGF $\beta$ -r1, VEGF-r ou des effecteurs tels que Notch1 et  $\beta$ -caténine associés à des voies de signalisation spécifiques. La contrepartie est que les cellules du myocarde expriment des gènes répresseurs de l'expression de facteurs (*Tbx2*, *BMP2*, *Nfatc2-4*) impliqués dans la formation de la chambre cardiaque et produisent des molécules régulatrices de l'EMT et de la MEC (Collagène, Ténascine, Aggrécane) pour initier la formation des valves. L'ensemble de ces processus est orchestré et fortement régulé d'un point de vue spatio-temporel (figure n°4). Un défaut de l'une de ces voies conduit à une malformation des valves. La complexité de ces processus de valvulogenèse réside dans l'enchevêtrement des voies de signalisation qui se régulent entre elles. La maturation des valves se poursuit grâce à des processus de synthèse/dégradation de la MEC néo-synthétisée. Elle est réalisée par les cellules interstitielles de valves (CIV) (Person et coll., 2005; Combs et Yutzey, 2009)

De nombreuses avancées ont été réalisées dans l'identification des protéines clés nécessaires à l'initiation et à la maturation des valves. Cependant, très peu de choses sont connues sur le rôle que peuvent tenir les facteurs environnementaux, comme le stress mécanique, dans ces processus de développement. Depuis quelques temps, certains laboratoires ont montré l'importance du stress mécanique lors de la valvulogenèse (Santhanakrishnan et Miller, 2011). Il est vrai que l'environnement hémodynamique de l'embryon est en permanente évolution mais n'affecte pas la physiologie des valves qui s'adaptent en formant un tissu fin et fibreux présentant une grande résistance au stress mécanique (Butcher et Markwald, 2007; Kruithof et coll., 2007; Buskohl et coll., 2012b). Néanmoins, le développement du cœur peut être altéré au niveau de la réponse à un stress mécanique local et/ou au niveau de l'activité myocardique lorsque les flux hémodynamiques varient (Bartman et coll., 2004; Vermot et coll., 2009). Récemment, Balachandran et collaborateurs ont montré que le stress mécanique avait un impact sur le processus d'EMT au niveau des bourgeons endocardiques. En effet, un faible flux laminaire active préférentiellement la voie du TGF- $\beta$  alors qu'un flux élevé active la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. L'effet sur l'EMT est en partie expliqué par la rupture de l'endothélium sous l'effet des flux hémodynamiques. La façon dont le stress est appliqué sur les cellules endothéliales va conduire à une rupture de leurs jonctions et donc favoriser l'EMT. Les

cellules endothéliales présentent également une activité contractile lorsqu'elles sont soumises à un fort stress mécanique qui n'est pas présent à l'état basal. L'ensemble de ces travaux montre qu'un défaut de réponse au stress mécanique peut conduire à la formation d'une valve pathologique. (Balachandran et coll., 2011).



**Figure 4 : Voie de régulation de la valvulogénèse.** A. Voies de signalisation impliquées dans la formation du bourgeon cardiaque. B. Voies de signalisation impliquées dans EMT. C. Voies de signalisation impliquées dans l'élongation et le remodelage de la valve primitive. Le myocarde est représenté en rouge et l'endocarde en orange. D'après (Combs et Yutzey, 2009)

## 1.2. Fonction et structure des valves

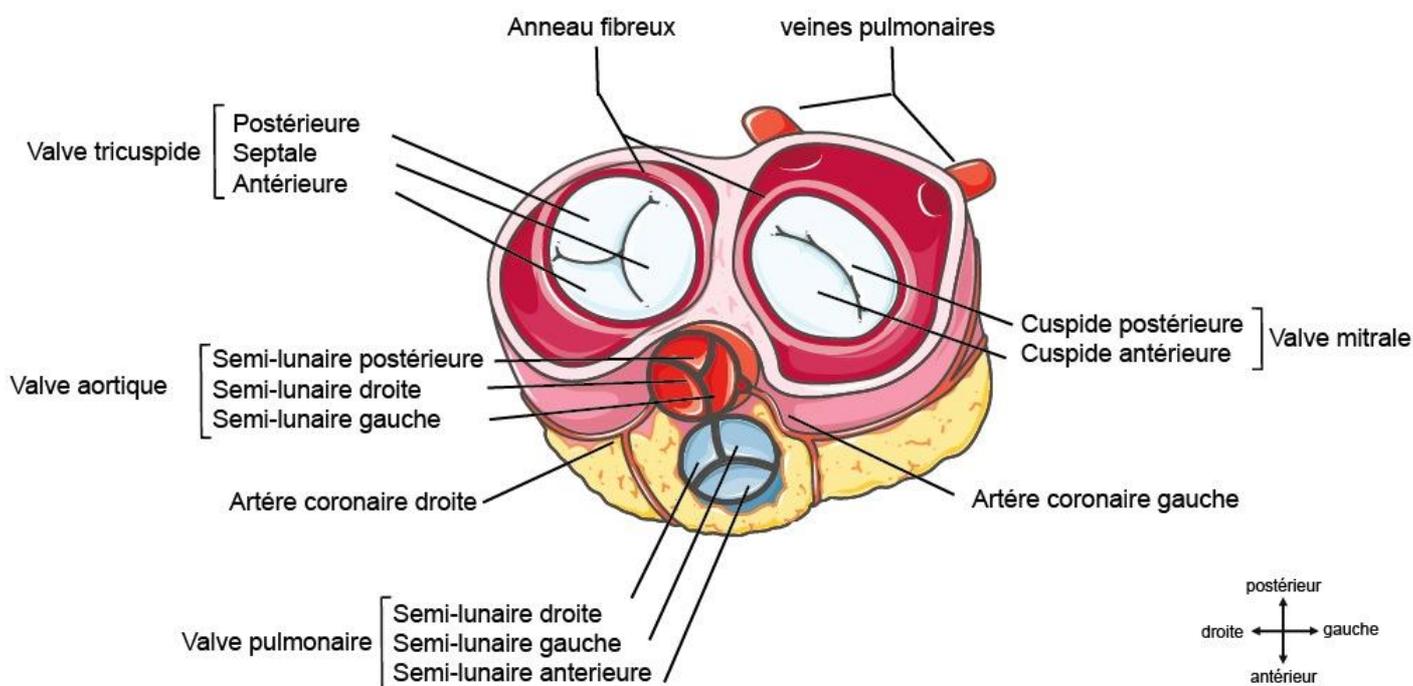
### 1.2.1. Anatomie et fonction

Pour une irrigation correcte de tous les organes, le sang doit circuler de façon unidirectionnelle. Pour cela, les valves servent de barrage à un retour du sang dans les oreillettes ou dans les ventricules après chaque contraction cardiaque. Il existe 4 valves cardiaques qui vont s'ouvrir et se fermer en réaction aux variations de la pression sanguine exercée sur leurs surfaces. Comme indiqué sur le schéma du cœur ci-dessous (figure n°5), il y a 2 valves atrioventriculaires et 2 valves semi-lunaires.

- Les valves atrioventriculaires : ces valves sont situées à la jonction des atriums et des ventricules correspondants. Elles vont empêcher le sang de retourner dans les atriums lors de la contraction des ventricules. La valve tricuspide, située dans le cœur droit, est composée de 3 feuillets ou cuspides (postérieure, septale et antérieure). La valve mitrale, située dans le cœur gauche est

composée de 2 cuspides (postérieure et antérieure). La valve est ancrée à sa base sur un anneau fibreux alors que son extrémité libre est reliée aux muscles papillaires par des cordages tendineux (figure n°1).

Lorsque le cœur est en diastole, les valves « pendent » de façon inerte dans le ventricule pour le remplir. Le ventricule va ensuite se contracter à partir de l'apex, faire remonter le sang contre les valves atrioventriculaires et le diriger dans les grosses artères. La fermeture des valves s'effectue au niveau de la jonction des bords libres. Les muscles papillaires et les cordages tendineux maintiennent les valves dans une position optimale. Si ces systèmes n'étaient pas présents, les valves ne seraient plus étanches et le sang retournerait dans l'atrium. La cinétique de contraction des muscles papillaires est importante puisqu'ils se contractent avant le ventricule pour mettre les cordages en tension et augmenter la résistance des valves à la pression sanguine. La pression exercée à ce moment-là sur la valve mitrale est d'environ 120 mmHg tandis que pour la valve tricuspide, la pression est de l'ordre de 25 mmHg (Sacks et coll., 2009).



**Figure 5 : Représentation schématique des valves.** Vue de la face supérieure du cœur montrant les 2 paires de valves atrioventriculaires et semi-lunaires. Les 2 valves atrioventriculaires sont situées entre les oreillettes et les ventricules. Les valves semi-lunaires sont situées entre les ventricules et les artères qui en émergent. Adaptation du schéma « Servier Medical art ».

- Les valves semi-lunaires : Elles sont également appelées valve pulmonaire et valve aortique et sont situées à la base du tronc pulmonaire (cœur droit) et de l'aorte (cœur gauche), respectivement. De la même manière que pour les valves atrioventriculaires, elles vont empêcher le retour du sang dans

les ventricules. Chacune de ces valves est constituée de 3 valvules semi-lunaires en forme de croissant. Elles sont ancrées à la paroi du tronc aortique et pulmonaire sur un anneau fibreux. Il n'existe pas d'appareil sous-valvulaire (muscle papillaires et cordages tendineux).

Cependant, leur fonctionnement diffère des valves atrioventriculaires. Lorsque les ventricules se contractent, la pression augmente et devient supérieure à celle qui règne dans les 2 gros vaisseaux. Cela provoque l'ouverture de valves semi-lunaires qui vont se plaquer contre la paroi des vaisseaux et laisser passer le sang vidant ainsi le ventricule. Lors de la diastole ventriculaire, la pression diminue dans ce dernier attirant ainsi le sang. La structure anatomique de la valve fait qu'elle se referme pour empêcher un retour sanguin dans le ventricule. La pression exercée à ce moment-là sur la valve aortique est d'environ 80 mmHg tandis que la pulmonaire subit 20 mmHg (Sacks et coll., 2009). A noter l'absence de valve au niveau des veines caves et pulmonaires qui arrivent dans les atriums.

Comme décrit précédemment, les valves du cœur gauche subissent des pressions plus importantes que celles du cœur droit. Toutes ces variations de pression et de stress mécaniques (force de friction, cisaillement, tension...) conduisent à une adaptation de leur structure pour améliorer leur résistance et leur efficacité. Un problème lors de la fermeture de ces valves va conduire à un retour du sang dans le mauvais compartiment. Ce retour, appelé régurgitation, va devenir à long terme pathologique s'il n'est pas pris en charge assez tôt (décrit dans le chapitre 1.3).

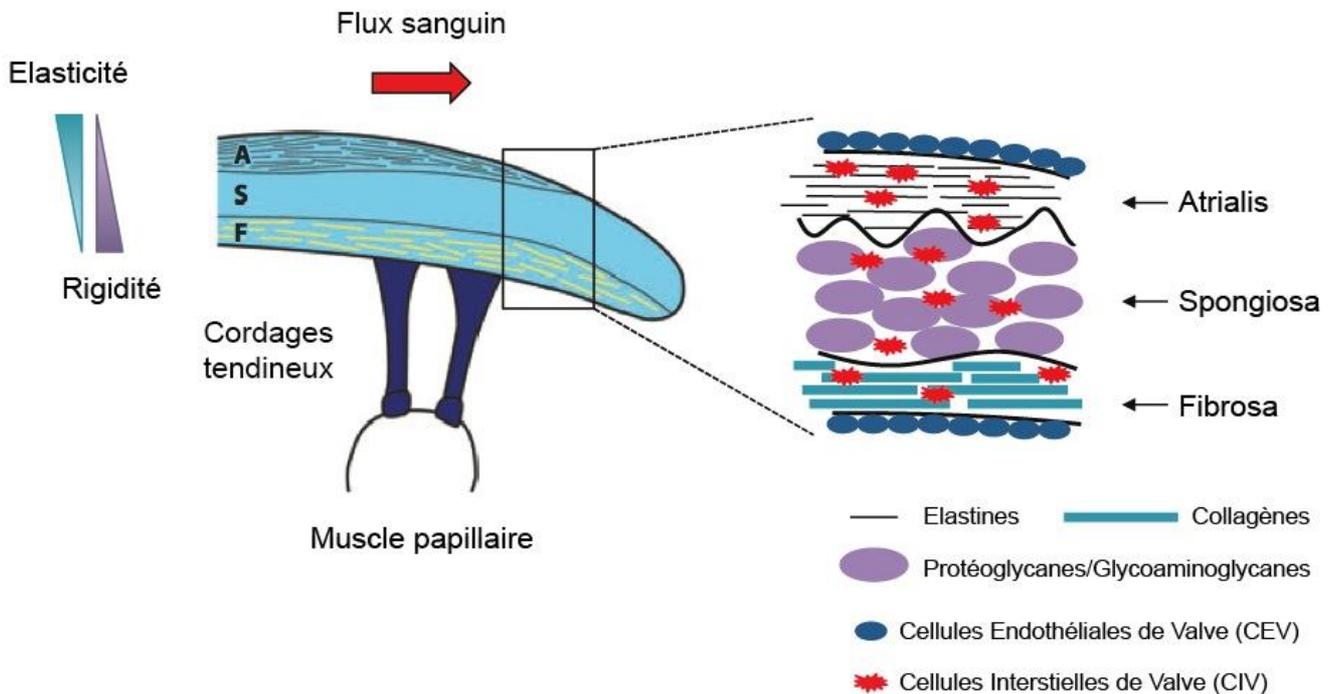
Dans la partie suivante, je vais me focaliser sur la structure et composition des valves atrioventriculaires.

### 1.2.2. Structure des valves atrioventriculaires

L'architecture de la valve est très conservée chez tous les vertébrés. L'épaisseur moyenne des valves est d'environ 1 mm avec l'existence d'un gradient entre le bord libre de la valve (plus épais) et l'ancrage sur l'anneau fibreux (moins épais) dû à l'adaptation aux flux hémodynamiques. Elles présentent une structure stratifiée dont la composition est le reflet de leur rôle d'opposition aux forces mécaniques. Cela confère à la valve un équilibre nécessaire entre élasticité, rigidité, compressibilité et durabilité. Ces capacités sont dues à une composition de la MEC hautement organisée et compartimentée. Les valves sont composées de 3 feuillets plus ou moins distincts : Atrialis (Ventricularis pour les valves semi-lunaires), Spongiosa et Fibrosa (figure n°6) (Lincoln et coll., 2006)

- La couche Atrialis : Elle est localisée sur la face atriale de la valve. Sa caractéristique principale est son élasticité, car elle subit directement les variations hémodynamiques. Elle est très riche en fibres d'élastine orientées de façon parallèle au gret axe de la valve ainsi que de quelques fibres de collagène organisées de façon radicalaire pour contrer les effets du stress mécanique. Ces fibres d'élastine lui confèrent une capacité d'étirement et de rétraction à chaque cycle d'ouverture et de fermeture. En comparaison, la structure de cette matrice est proche de celle retrouvée dans les cordages tendineux, tendons et ligaments.

- La couche Spongiosa : Sa caractéristique est sa capacité de compressibilité. Elle est composée principalement de protéoglycanes et de glycoaminoglycanes (GAG) tel que l'aggrécane, le versicane, la ténascine, le perlécane et l'acide hyaluronique. A noter également la présence de collagènes II et XI. Ces protéines permettent de résister à des forces compressives lorsque les valves sont fermées, mais aussi de maintenir l'intégrité structurelle de la valve à chaque cycle valvulaire. En comparaison, la structure de cette matrice est proche de celle retrouvée dans le cartilage.
- La couche Fibrosa : Elle fait face au ventricule. Sa caractéristique est sa résistance aux forces exercées et sa rigidité. Elle est composée d'un réseau de fibres de collagène I très dense dont le rôle est de résister aux forces de tension exercées sur les valves fermées. Il y a la présence de quelques protéoglycanes tel que la ténascine. La structure de cette matrice est très proche de celle retrouvée dans les tendons et les os.



**Figure 6 :** Structure stratifiée des valves atrioventriculaires. Représentation schématique d'un feuillet valvulaire atrioventriculaire. La couche Atrialis (A) en contact avec le flux sanguin est riche en élastine. La Spongiosa (B), juste en dessous, est composée de protéoglycanes et de glycoaminoglycanes. La fibrosa (C) est quant à elle composée de fibres de collagène I. Le pourtour de la valve est recouvert de cellules endothéliales de valves et les différentes couches sont composées de cellules interstitielles de valves. Adaptation du schéma de (Orton et coll., 2012).

Les valves ont souvent été considérées comme des structures passives qui se déplaçaient uniquement en réponse aux forces hémodynamiques générées par les contractions cardiaques. Cependant, il a été montré que les valves atrioventriculaires possédaient des structures nerveuses qui se comportent comme des senseurs primaires et autonomes. Les valves sont capables de produire de légères contractions durant le cycle cardiaque ce qui permet de faire de légers ajustements influençant le temps et l'efficacité de fermeture de la valve (Marron et coll., 1996). Ces plexus nerveux sont localisés selon un gradient décroissant de la couche atrialis vers la couche fibrosa et sont 2 fois plus présents dans la cuspside antérieure par rapport à la cuspside postérieure de la valve mitrale (Misfeld et Sievers, 2007). Ces signaux nerveux déclenchent une réponse des cellules interstitielles de valves quiescentes ou actives dans des cas pathologiques (décrit dans le paragraphe 1.3).

Les valves adultes saines sont avasculaires. Les cellules présentes dans les valves reçoivent les nutriments et les facteurs de croissance au niveau des couches superficielles via des mécanismes d'imbibition où ils seront stockés principalement dans la spongiosa. Néanmoins, l'apparition de vaisseaux est associée à des processus pathologiques modifiant la balance entre les facteurs pro-angiogéniques (VEGF) et anti-angiogéniques (Chondromoduline-I) (Soini et coll., 2003). En effet, le VEGF est retrouvé uniquement dans la couche endothéliale de la valve alors que la Chondromoduline-I est présente dans ses 3 couches. Des souris KO pour la Chondromoduline-I montrent une augmentation de la sécrétion du VEGF par les cellules endothéliales de la valve avec une angiogenèse importante qui entraîne une calcification de la valve aortique (Yoshioka et coll., 2006). En plus de ces 2 protéines, l'endostatine et la protéine SPARC ont été identifiées comme facteurs anti-angiogéniques dans des cas de rétrécissements aortiques (Chalajour et coll., 2004; Charest et coll., 2006).

La matrice des valves est un équilibre hautement régulé entre synthèse et dégradation. Cet équilibre nécessite l'intervention des cellules de la valve qui permettent la régulation de la matrice. Un déséquilibre dans cette régulation est constaté dans la majorité des atteintes valvulaires (décrit dans le paragraphe 1.2.4).

### 1.2.3. Les cellules valvulaires

Les valves sont des structures cellularisées composées de 2 grandes catégories de cellules qui vont avoir des fonctions particulières : les cellules interstitielles de valves (CIV) et les cellules endothéliales (CEV). Ces cellules vont maintenir l'intégrité structurelle de la valve en adaptant la réponse au stress mécanique par la synthèse et/ou la dégradation de la MEC (Taylor et coll., 2003; Liu et coll., 2007).

- Les cellules interstitielles de valves : Ce sont les cellules majoritaires des valves. Il a été identifié 5 sous types cellulaires apparaissant à différents stades du développement. Elles présentent des phénotypes particuliers avec des fonctions bien spécifiques, essentielles pour le maintien de l'homéostasie valvulaire (figure n°7).

1) *Les cellules progénitrices endothéliales/mésenchymales* : Ces cellules sont à l'origine de la formation de la valve. Durant les premiers stades embryonnaires, les cellules de l'endocarde vont subir le processus d'EMT. Sous l'effet de facteurs de croissance et du stress mécanique, elles colonisent le bourgeon endocardique. A ce stade, les cellules de l'endocarde deviennent des cellules progénitrices de valve (Armstrong et Bischoff, 2004). Elles vont commencer à remodeler la matrice extracellulaire pour initier l'extension de la valve. L'ensemble de ces processus est sous le contrôle de la voie du TGF- $\beta$ , des BMP, du VEGF et de la voie Notch (figure n°4, décrit dans le paragraphe 1.1.2) (Noseda et coll., 2004). Ces cellules ont été décrites pour avoir un rôle potentiel dans la physiopathologie des valves. Les voies de signalisation de l'EMT intervenant durant l'embryogenèse sur les cellules endothéliales de l'endocarde réapparaissent lors d'un défaut de réponse à des stress mécaniques ou dans des pathologies (Paranya et coll., 2001). Une fois activées, elles se différencient en CIV quiescentes (Liu et coll., 2007).

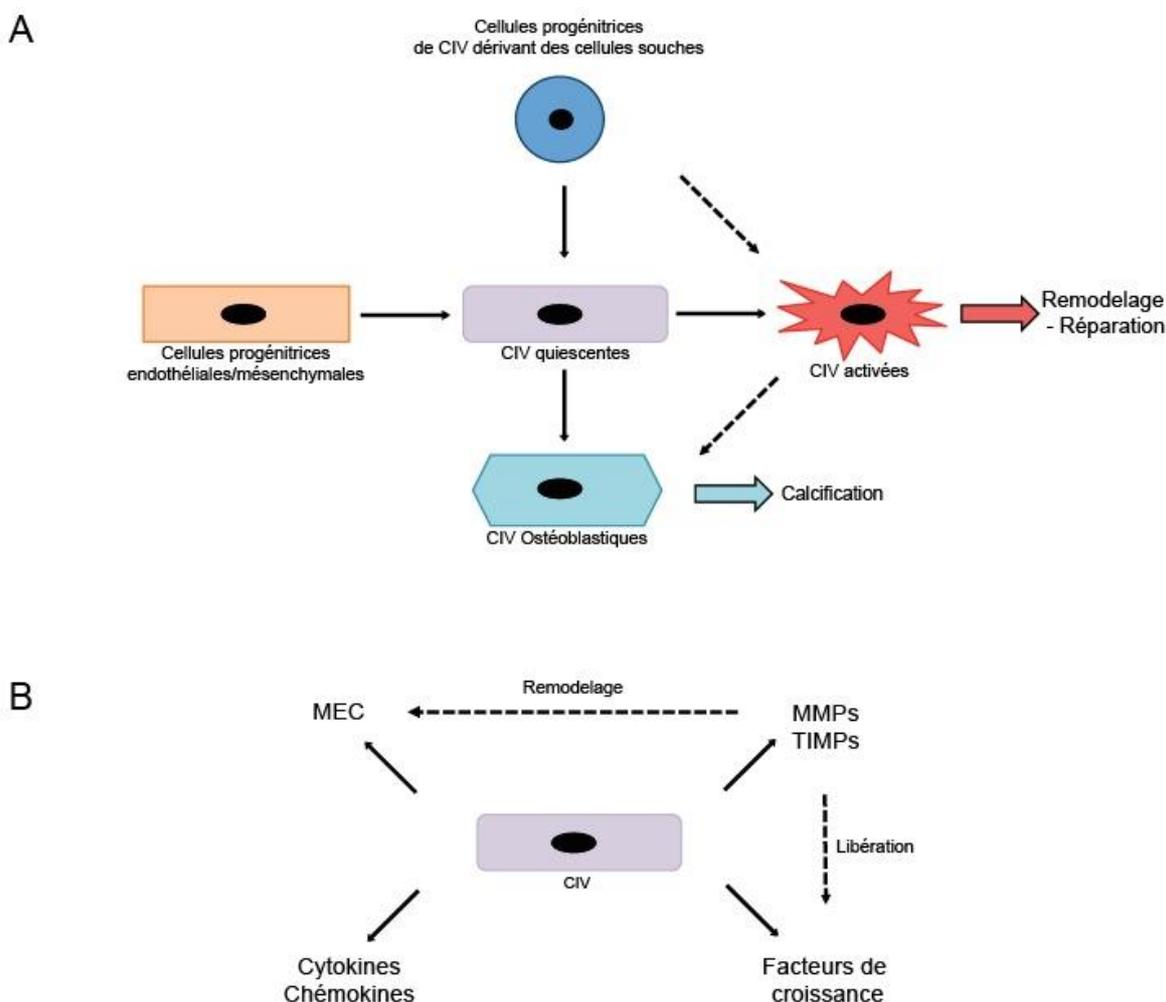
2) *Les CIV quiescentes* : Elles sont les plus abondantes de la valve adulte et sont réparties entre les 3 feuillets. Leur rôle est de maintenir la structure et les fonctions physiologiques de la valve. Elles sont dites quiescentes car une étude réalisée chez le rat montre une activité mitotique faible (Willems et coll., 1994). Elles communiquent entre elles à l'aide de jonctions communicantes (connexine 26 et 45) et d'adhésions. L'hypothèse sous jacente est que ces cellules forment un réseau tout le long de la valve pour une meilleure régulation de l'homéostasie (Filip et coll., 1986; Latif et coll., 2006). L'organisation de ces CIV entre les 3 feuillets montre une réponse différente vis-à-vis de l'endothélium lésé (Lester et coll., 1993). Une étude a montré que ces cellules jouent un rôle dans le maintien de l'inhibition de l'angiogenèse dans la valve. L'apparition de néo-vaisseaux est observée dans des cas pathologiques suite à une levée de l'inhibition de ces cellules au niveau de la valve aortique (décrit dans le paragraphe 1.2.2) (Soini et coll., 2003).

3) *Les CIV activées* : Dans les valves lésées ou pathologiques, les CIV quiescentes deviennent actives suite à différents stimuli. Elles présentent des caractéristiques semblables aux myofibroblastes telles que la présence de fibres de stress, l'expression d'actine musculaire lisse  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) ou la capacité à se contracter (Tamura et coll., 2000). La conséquence directe de cette activation est un remodelage excessif de matrice (synthèse/dégradation) avec la sécrétion d'enzymes régulatrices tels que les métalloprotéinases ou les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (Durbin et Gotlieb, 2002). Une fois la valve réparée, les CIV activées meurent par apoptose. Cependant, une dérégulation de ce mécanisme couplée à une synthèse excessive de matrice conduit à une fibrose pathologique, une

angiogénèse et une calcification de la valve (Jian et coll., 2003). Ces cellules sont la cible d'agents thérapeutiques pour limiter l'apparition d'atteintes valvulaires.

4) *Les CIV ostéoblastiques* : Ce sont des cellules CIV différenciées en ostéoblaste qui conduisent à la calcification des valves notamment au niveau des valves aortiques. Elles présentent des caractéristiques chondrogéniques et ostéogéniques en exprimant certaines protéines caractéristiques telles que l'ostéopontine, la phosphatase alcaline ou BMP2 (Mohler et coll., 2001).

5) *Les cellules progénitrices* : Lors de lésions endothéliales, le nombre de CIV est augmenté dans la valve via une prolifération plus importante et une diminution de l'apoptose. Une partie de ces cellules est issue de cellules souches valvulaires provenant de la moelle osseuse ou circulantes ou encore de cellules progénitrices résidentes dans les valves (Yoder et coll., 2007). Parmi ces cellules endothéliales, on distingue 2 sous-populations : les cellules progénitrices endothéliales et les cellules progénitrices dendritiques. Elles sont présentes dans des cas de sténoses aortiques calcifiées (Skowasch et coll., 2005).



**Figure 7 :** Représentation schématique des différents types de cellules interstitielles de valves et leurs fonctions. A. Les 5 types de CIV et les liens qui les relient entre elles. B. Les différentes fonctions réalisées par les CIV. D'après (Liu et coll., 2007).

- Les cellules endothéliales de valve : les cellules endothéliales valvulaires (CEV) recouvrent toute la surface de la valve. Elles expriment un marqueur endothéliale, PECAM (CD31+) et réalisent une grande majorité des fonctions de celle que nous connaissons à propos des cellules endothéliales vasculaires. Cependant, elles diffèrent par leur profil transcriptionnel en exprimant des gènes que l'on associe à la chondrogenèse (Butcher et coll., 2006). Du fait de leur localisation, elles subissent en premier l'impact du flux sanguin et doivent s'adapter en modulant la réponse des CIV sous jacentes. Une autre différence avec les cellules endothéliales vasculaires réside dans leur orientation en réponse au stress mécanique. En effet, les cellules endothéliales vasculaires vont s'orienter de façon parallèle au sens du flux alors que les CEV vont s'organiser de façon perpendiculaire (Butcher et coll., 2004; Butcher et Nerem, 2006).

#### 1.2.4. Mécanismes d'activation des CIVs

Le TGF- $\beta$  fait partie des facteurs de croissance qui différencient les CIV quiescentes en CIV actives en augmentant l'expression de protéines tel que  $\alpha$ -SMA. Les CIV expriment à leur surface les récepteurs au TGF- $\beta$  de type I et II activant la voie des protéines Smad puis les facteurs de transcriptions associés (Dijke et Hill, 2004). En parallèle à la voie des Smad, la TGF- $\beta$  active la voie des protéines kinases activée par le mitogène (MAPK) qui régule la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la sécrétion de cytokine et la régulation de la MEC (Singh et Ramji, 2006). Walter et collaborateurs ont montré l'importance du TGF- $\beta$  dans la différenciation des CIV. Lorsqu'elles sont cultivées en présence de TGF- $\beta$  exogène, l'expression de la  $\alpha$ -SMA est augmentée ainsi que la contractilité et le remodelage de la fibronectine (Walker et coll., 2004). La synthèse du TGF- $\beta$  est régulée par la sérotonine (5-HT). La 5-HT a été associée à des prolapses mitraux avec une augmentation de la synthèse de la MEC.

Les CIV sont présentes dans un environnement 3D qui subit différentes forces mécaniques (pressions, tension et cisaillement). L'activation des CIVs en réponse aux forces mécaniques est dépendante des CEV et de la MEC mais également des forces mécaniques exercées. En effet, en fonction du type de force mécanique mais aussi de la durée et du degré de l'étirement, les CIV ne répondent pas de la même façon. Les CIV des valves mitrale et aortique, où les contraintes mécaniques sont les plus fortes, présentent une augmentation de l'expression de l' $\alpha$ -SMA et de la quantité de collagène III sécrétée alors qu'il n'y a pas de variation pour le collagène I (Merryman et coll., 2006). En effet, Les premiers tests réalisés *ex vivo* sur des valves aortiques de mouton dans un bioréacteur montrent qu'il n'y a pas de modification de la couche d'élastine mais une augmentation du collagène sécrété ainsi que la présence de nombreuses CIV activées (Balachandran et coll., 2006). Une partie de la réponse des CIV vis-à-vis du stress mécaniques passe par les CEV. Comme elles sont les premières à subir les effets du stress mécaniques, elles s'organisent

de façon perpendiculaire au flux pour limiter son impact et libérer des facteurs tels que le NO ou l'endothéline-1 qui vont limiter l'activation des CIV (Mebazaa et coll., 1993). Les travaux de Butcher ont montré que les CIV de porc en culture soumissent à un stress mécanique expriment l' $\alpha$ -SMA et la vimentine (marqueurs CIV activée) alors que la co-culture avec des CEV diminue drastiquement l'expression de ces protéines suggérant un rôle régulateur des CEV en limitant l'activation des CIV (Butcher et Nerem, 2006).

### **1.3. Épidémiologie des valvulopathies**

Selon les derniers chiffres de l'INSERM, les maladies cardiovasculaires représentent la 2<sup>e</sup> cause de mortalité en France juste après les cancers (site internet de l'INSERM). Cette diminution de la mortalité est due à une meilleure prise en charge des patients et à la prévention des facteurs aggravants tels que le tabagisme, l'obésité, la sédentarité et le stress. Parmi les maladies cardiovasculaires, on note l'émergence des cardiopathies valvulaires dont la prévalence est élevée dans les pays développés. Les 2 principales atteintes valvulaires sont : 1) la sténose ou le rétrécissement qui conduit à une diminution du flux sanguin par un manque d'ouverture de la valve que l'on associe principalement à la valve aortique. 2) l'insuffisance de la valve caractérisée par une fuite lors de leur fermeture associée principalement à la valve mitrale. Les valves principalement touchées sont les valves mitrales et aortiques étant donné qu'elles subissent les plus grandes contraintes mécaniques. Les origines de ces valvulopathies sont diverses et variées. Elles peuvent être d'origine dégénératives c'est-à-dire liée au vieillissement, infectieuses (endocardites), inflammatoires (rhumatiques), médicamenteuses (le cas « du Médiator® » des laboratoires Servier) ou fonctionnelles.

La prévalence de ces valvulopathies est estimée à environ 2% de la population. Ce chiffre pourrait être sous-estimé du fait du caractère silencieux de la maladie. La sténose aortique a une prévalence estimée à 2% chez les personnes de plus de 65 ans et représente la première cause de remplacement valvulaire. Au cours du temps, la valve va progressivement se calcifier en étant associée à une activation plus importante des cellules ostéoblastiques valvulaires. Le prolapsus mitral affecte 2,4% de la population et il est reconnu comme une cause importante de mortalité et de morbidité (Avierinos et coll., 2002). Il se caractérise par une fermeture de la valve dans l'oreillette, au-delà de l'anneau mitral, lors de la systole ventriculaire. Cela a pour conséquence un retour du flux sanguin dans l'atrium gauche qui une fois, mis en place, va entraîner une insuffisance cardiaque.

Les patients sont surveillés et sous traitement préventif lorsque la pathologie est peu évoluée. En revanche, dans les stades les plus graves, le seul traitement est la chirurgie réparatrice avec, par exemple, la mise en place d'une bioprothèse (Go et coll., 2014).

Les cliniciens classent les valvulopathies en fonction de leur étiologie. Elles sont présentes dans des cas syndromiques où elles sont associées à d'autres symptômes et dans des cas non

syndromiques (isolés ou sporadiques) où le patient ne présente aucun autre symptôme qu'une atteinte valvulaire.

## **1.4. Le prolapse valvulaire mitral (PVM)**

### **1.4.1. Caractéristique clinique**

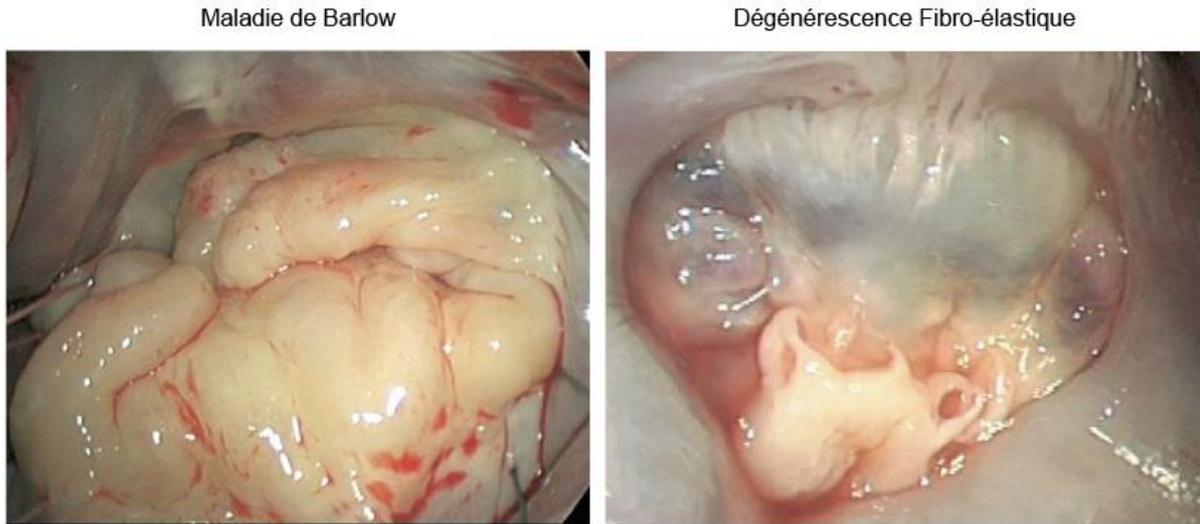
Le prolapse mitral est défini par une atteinte du tissu conjonctif de la valve qui empêche son fonctionnement normal. Lorsque le PVM est associé à de graves régurgitations, il fait partie des principales recommandations de chirurgie valvulaire (réparation ou remplacement).

L'identification du 1<sup>er</sup> cas remonte dans les années 1880 où les patients présentes des murmures cardiaques. Cependant, il a fallu attendre les années 1960-70 pour avoir les premières hypothèses concernant ces murmures. C'est le Dr Barlow, en 1963, qui a caractérisé en premier le PVM chez des patients atteints de murmures cardiaques lors de leurs auscultations (Barlow et Pocock, 1963). Ils sont dus à des régurgitations dans l'atrium expliquées par une mauvaise coaptation des feuillets valvulaires. Depuis, il a été identifié 2 types de PVM :

- La maladie de Barlow : Elle est caractérisée par un excès de tissus conjonctif au niveau des feuillets valvulaires dû à une infiltration myxoïde (décrite dans le paragraphe 1.4.2). L'infiltration myxoïde touche les 3 feuillets de la valve avec des altérations des composants de la MEC (figure n°8). Les cordages sont épais et peuvent être fusionnés et/ou calcifiés. Ils sont majoritairement plus allongés et que très rarement rompus. En ce qui concerne l'étiologie de la pathologie, on ne connaît que très peu de choses. Il existe des cas de formes familiales mais la majorité d'entre eux sont des formes sporadiques et sont présentes chez des sujets jeunes (<50 ans) (Hayek et coll., 2005). Ces PVM sont accompagnés de dysfonctions ventriculaires et/ou atriales, palpitations, syncopes, fatigue et dyspnées (Enriquez-Sarano et coll., 2005).

- La dégénérescence fibro-élastique : Elle a été identifiée à partir de tissus valvulaires excisés après un remplacement de valve et différenciée de la maladie de Barlow (Carpentier et coll., 1980). Elle est caractérisée par une déficience en tissu conjonctif avec un défaut de synthèse de matrice (collagène, élastine et protéoglycanes). Il en résulte une valve plus fine que la normale néanmoins les 3 feuillets valvulaires sont conservés (figure n°8). Les cordages sont très fins ce qui entraîne leur rupture. La pathologie est identifiée lorsque les cordages sont rompus. En ce qui concerne l'étiologie de la pathologie, il existe des cas de formes familiales mais la majorité d'entre eux sont des formes sporadiques. Elles sont considérée comme une pathologie associée au vieillissement (>50 ans) (Fornes et coll., 1999; Anyanwu et Adams, 2007).

Ces 2 types de PVM ne sont pas que des pathologies isolées, elles sont également décrites dans différents syndromes (décrit dans le paragraphe 1.4.3)



**Figure 8 :** Photographie de valves pathologiques identifiées dans les PVM. Vue supérieure de la valve mitrale d'un patient atteint de la maladie de Barlow caractérisé par un feuillet valvulaire épais (gauche). Vue supérieure de la valve mitrale d'un patient atteint de la dégénérescence fibro-élastique caractérisés par un feuillet valvulaire fin (droite) (Anyanwu et Adams, 2007).

#### 1.4.2. Processus pathologique

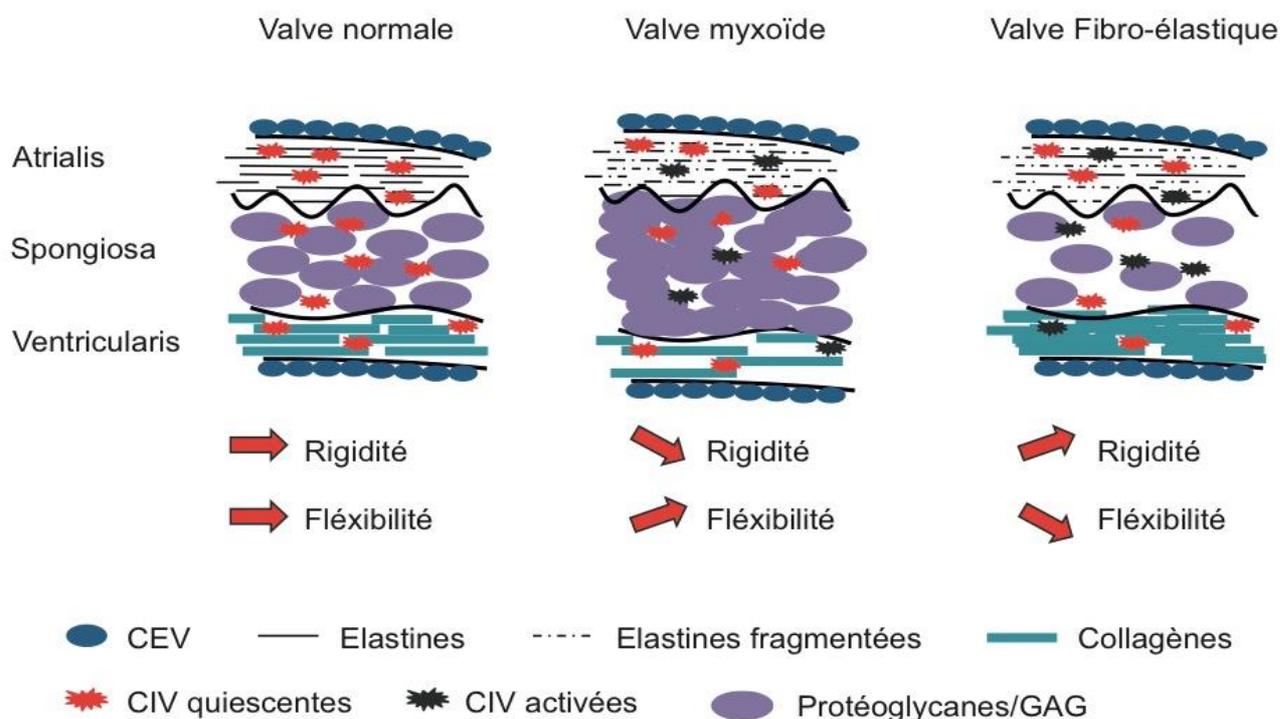
Les atteintes valvulaires décrites ci-dessus se manifestent par un remodelage aberrant de la matrice extracellulaire. Dans la plupart des cas, ce remodelage est dû à une activation et une différenciation des CIV. Il a été caractérisé 2 types de remodelages pathologiques de la MEC (figure n°9) :

- La dégénérescence myxoïde : Elle est caractérisée par une fragmentation des fibres d'élastine de l'Atrialis, une synthèse excessive de protéoglycanes de la spongiosa et une dégradation des fibres de collagène de la fibrosa. Ce remodelage est accentué par une sécrétion importante des métalloprotéinases (MMP-2 et 9) et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP). Ces protéines de la matrice et leurs régulateurs sont sécrétés par les CIV activées lors du processus pathologique. Cela entraîne une diminution de la rigidité de la valve et, par conséquent, de la résistance au stress mécanique. Les valves « prolabent » progressivement dans l'oreillette entraînant des régurgitations. On note également un allongement des cordages tendineux qui luttent pour contrer le flux sanguin et limiter la ballonnisation des valves. Ce processus est majoritairement présent dans les prolapsus de la valve mitrale et surtout dans la maladie de Barlow (décrit dans le chapitre 1.4) (Grande-Allen et coll., 2003; Aupperle et coll., 2009).

- La dégénérescence fibro-élastique : Elle diffère de la dégénérescence myxoïde par un remodelage différent de la matrice. Les fibres d'élastine de l'Atrialis sont fragmentées, les protéoglycanes de la spongiosa sont dégradés et les fibres de collagène sont accumulées dans la

fibrosa. Les CIV majoritairement présentes sont les cellules ostéoblastiques ce qui entraînent une calcification de la valve. La conséquence directe est une augmentation de la rigidité de la valve limitant ses mouvements et empêchant sa fermeture. Ce processus est retrouvé dans les sténoses aortiques (Kim et coll., 2008).

A ces différents processus s'ajoute une dégradation des CEV qui facilite l'infiltration des macrophages, lymphocytes et plaquettes. Cette infiltration peut participer à l'activation et à la différenciation des CIV quiescentes en CIV activées ou en CIV ostéoblastiques. Les voies de signalisation impliquées dans ces différents processus ne sont pas encore clairement identifiées. L'une des hypothèses est l'implication de la sérotonine libérée par les plaquettes après une lésion de CEV pouvant déclencher la différenciation des CIV (hypothèse développée dans la Discussion) (Walker et coll., 2004)



**Figure 9 :** Représentation schématique des différents processus pathologiques. A. La valve normale composée de ces 3 feuillets avec ces différents composants. B. La valve myxoïde présente une fragmentation des fibres d'élastine, une accumulation de protéoglycanes et une dégradation du collagène. C. La valve fibro-élastique est caractérisée par la dégradation de l'élastine et des protéoglycanes et une accumulation de collagène. D'après (Orton et coll., 2012).

### 1.4.3. Les valvulopathies syndromiques

Dans les formes syndromiques, les atteintes valvulaires sont associées à d'autres signes cliniques ou symptômes. Elles ne sont pas l'unique cause mais peuvent en être une conséquence. La majorité des syndromes affecte des protéines de la matrice extracellulaire. Voici une liste non exhaustive des principaux syndromes où une valvulopathie est présente :

- Le syndrome de Marfan: c'est une maladie autosomique dominante du tissu conjonctif qui affecte principalement le squelette, l'œil et le système cardiovasculaire à des degrés divers. Cette pathologie est due à une mutation du gène de la fibrilline-1 sur le chromosome 15. La fibrilline est une protéine de la MEC qui va permettre aux intégrines de s'y lier lors des processus de migration. La voie du TGF- $\beta$  est impliquée dans le développement de cette pathologie puisque la fibrilline permet de séquestrer le TGF- $\beta$  dans la matrice. Au niveau du cœur, le symptôme prépondérant est un prolapse de la valve mitrale dû à un excédent de tissu valvulaire ainsi qu'un déchirement de l'aorte. Ce prolapse est présent dans plus de la moitié des cas (Dietz et coll., 1991).

- Le syndrome d'Ehler-Danlos de type IV : Ce syndrome, dit vasculaire, est une maladie génétique touchant le gène de la chaîne  $\alpha$  du collagène de type 3. Cette mutation entraîne une faiblesse du tissu conjonctif avec une fragilité très importante au niveau des vaisseaux. Du point de vue cardiaque, le symptôme dominant est une dissection aortique. Le prolapse de la valve mitrale est moins fréquent (Superti-Furga et coll., 1988).

- Le syndrome de Loeys-Dietz : Proche du syndrome d'Ehler-Danlos, le syndrome de Loeys-Dietz est caractérisé par des mutations au niveau des récepteurs au TGF $\beta$  1 et 2. La voie du TGF $\beta$  est importante lors de l'embryogenèse ce qui conduit à une atteinte valvulaire (Loeys et coll., 2006).

- Le syndrome de Noonan : C'est une maladie héréditaire touchant le gène *PTP-N11*. Ce gène code pour une protéine tyrosine phosphatase (PTP) qui participe à la régulation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires notamment celles impliquées lors de la valvulogenèse. Ces patients présentent une cardiopathie congénitale associée à des retards de croissance. Ils présentent également un prolapse de la valve mitrale dû à un excédent tissulaire (Toshiyuki Arakia et coll., 2009). Ce syndrome est classé dans les « Rasopathies » affectant les protéines de la famille Ras (décrit dans la partie 3.1)

### 1.4.4. Les valvulopathies non syndromiques

Contrairement aux valvulopathies syndromiques, il y a très peu de choses connues concernant l'étiologie des valvulopathies non syndromiques. L'efficacité du diagnostic et de la prise en charge des patients permet l'amélioration de leurs conditions de vie. Les études familiales à partir de ces patients ont permis de mettre en évidence la possibilité d'un caractère héréditaire. Cette suspicion du caractère héréditaire des valvulopathies est confortée par la présence de la pathologie chez des sujets jeunes remettant en cause l'hypothèse selon laquelle ces valvulopathies seraient dues au vieillissement

(Grau et coll., 2007). Les avancées technologiques au niveau de la génétique ont permis d'identifier des locus, voire des gènes potentiellement impliqués. Dans le cas de la sténose aortique, les gènes *NOTCH1* et *ACTA2* ont été identifiés (Garg et coll., 2005; Garg, 2006).

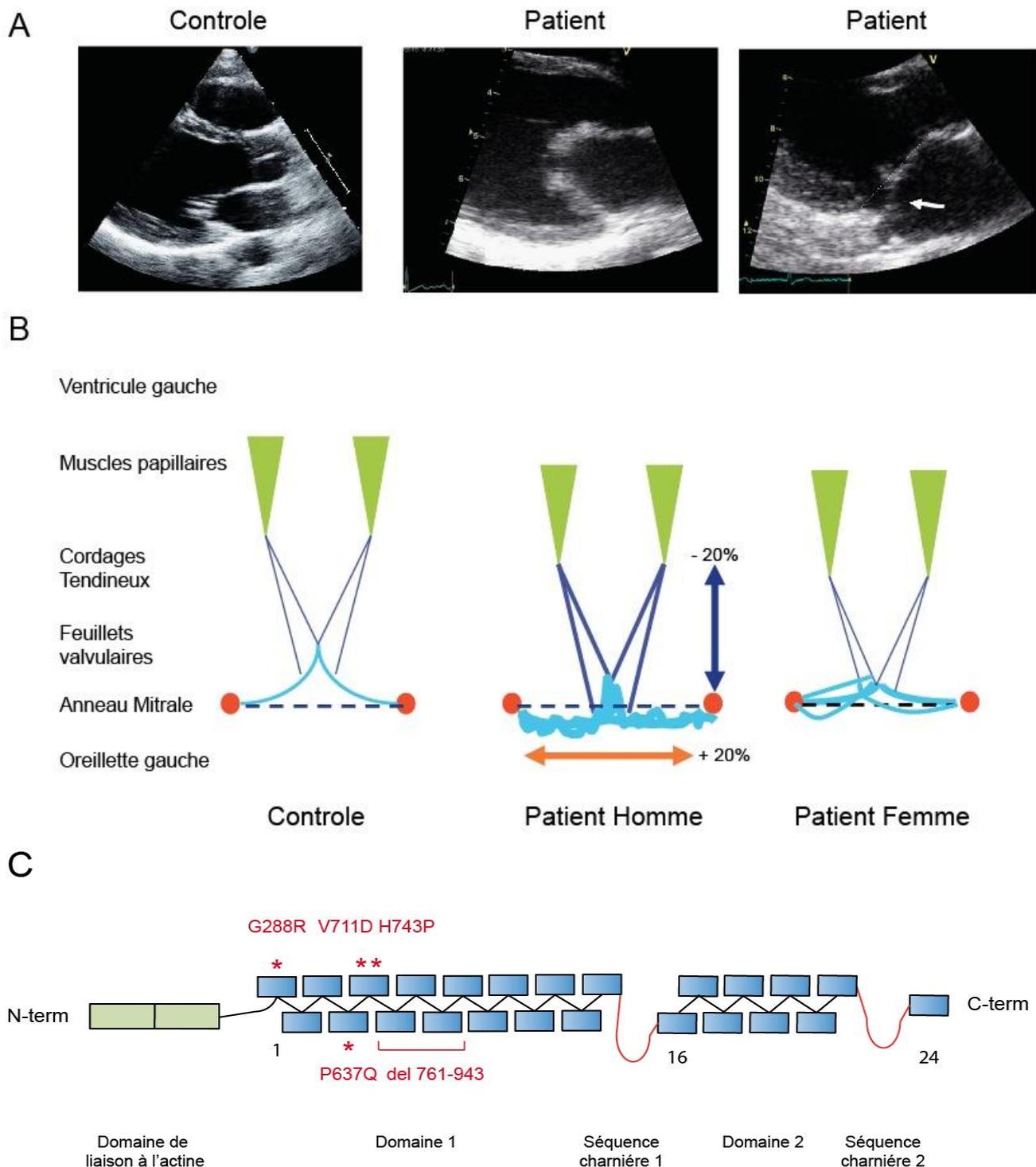
Pour le prolapsus de la valve mitrale, l'idée d'une transmission héréditaire a été suggérée en 1999 par l'équipe de Towbin (Towbin, 1999). Depuis cette hypothèse, il a été identifié 3 locus localisés en 11p15.4, 13q31-32 et 16p11-13 mais aucun gène associé (Disse et coll., 1999; Freed et coll., 2003; Nesta et coll., 2005). C'est dans cette optique que notre équipe s'est intéressée à l'origine génétique du prolapsus mitral. En 2007, nous avons identifié le premier gène responsable d'une dystrophie valvulaire non syndromique. Il s'agit du gène *FLNA* localisé sur le chromosome X (Kyndt et coll., 2007). Grâce aux avancées technologiques et au recrutement de patients, nous avons identifié d'autres gènes potentiellement impliqués dont le gène *ARHGAP24* que j'ai étudié (décrit dans la partie Résultat-Projet 2).

### **1.5. La dystrophie valvulaire liée aux mutations de la FLNa**

Au CHU de Nantes, l'équipe de cardiologie s'est intéressée au cas d'un patient de 17 ans présentant une dystrophie valvulaire. Une étude de ses antécédents familiaux a permis de mettre en évidence un cousin présentant le même phénotype. Les premières analyses génétiques ont été réalisées sur une grande famille française d'environ 300 individus. Parmi ces membres, 10 hommes sur 44 présentent un prolapsus mitral progressif avec la présence de régurgitations aortiques pour 4 d'entre eux. En revanche, pour les femmes, seulement 10 sont atteintes. L'une des caractéristiques de ces patients était la présence d'une hémophilie modérée de type A. Cette hémophilie a permis de réaliser une analyse de liaison pour localiser l'intervalle chromosomique impliqué. Cet intervalle est localisé sur le chromosome X en position q28 (Kyndt et coll., 1998; Trochu et coll., 2000). Il y a également 3 autres familles qui présentent les mêmes caractéristiques pathologiques pour lesquelles on a retrouvées d'autres mutations dans la même région. Cette région correspond au gène *FLNA*, codant pour la Filamine A.

Les données échographiques de ces patients recueillies au CHU de Nantes ont montré une diminution de la distance entre l'anneau mitral et les muscles papillaires, un épaissement des cordages tendineux et des feuillets valvulaires ainsi qu'un élargissement de l'anneau mitral (figure n°10a et b). Ce phénotype est moins sévère chez les femmes que chez les hommes. Ceci est sûrement dû à la présence de 2 chromosomes X chez les femmes.

Le séquençage du gène *FLNA* de ces familles atteintes de dystrophie valvulaire a permis de mettre en évidence 4 mutations (G288R, P637Q, V711, H743P) et une délétion de 182 acides aminés (figure n°10c). Il faut noter également que d'autres mutations de ce gène sont associées à des pathologies du développement (décrit dans le paragraphe 2.4) (Kyndt et coll., 2007). Ce gène code pour la protéine Filamine A (décrit dans le paragraphe 2).



**Figure 10 : La dystrophie valvulaire liée aux mutations de la FLNa.** A. Échographie d'un patient contrôle à gauche et d'un patient muté en P637Q pour les 2 autres. On distingue sur celle du milieu un épaississement du bord libre de la valve comparé au contrôle. Sur celle de droite, on note la fermeture des valves derrière la limite de l'anneau mitrale. B. représentation schématique des phénotypes valvulaires de patient contrôle et porteur de la mutation (homme et femme). C. Représentation schématique de la structure monomérique de la FLNa (décrite plus en détails dans la partie 2.1). Les 4 mutations et la délétion (en rouge) sont localisées sur les 8 premiers domaines.

## 2. La Filamine A (FLNa)

La Filamine a été identifiée de façon fortuite par Stossel et son équipe en 1975 pendant leurs travaux sur les canaux calciques présents dans les macrophages de poulet. Elle est identifiée, dans un premier temps, lors de la précipitation de l'actine F et nommée Filamine (FLN) en référence à sa forme filamenteuse (Stossel et Hartwig, 1975). Elle est présente dans de nombreuses autres cellules ainsi que dans de nombreux organismes tel que la drosophile où elle reste très conservée (Stossel et coll., 2001). La filamine fait partie de la famille des protéines de liaison au cytosquelette d'actine (« Actin binding protein ») dont le rôle est de former et de maintenir le cytosquelette d'actine. Dans la même famille, on retrouve l' $\alpha$ -actinine, la spéctrine ou la dystrophine. Son autre rôle est de réguler de façon dynamique la morphologie cellulaire et la locomotion en réponse à un stimulus externe par l'interaction avec de nombreuses protéines intracellulaires (Cunningham et coll., 1992; Marti et coll., 1997). En raison de ses diverses fonctions chez l'homme, une mutation délétère peut entraîner une variété de malformations au niveau des os, du cerveau et du cœur (décrite dans le chapitre 2.4). Depuis cette découverte, il a été identifié 3 isoformes de la filamine (FLNa, b et c).

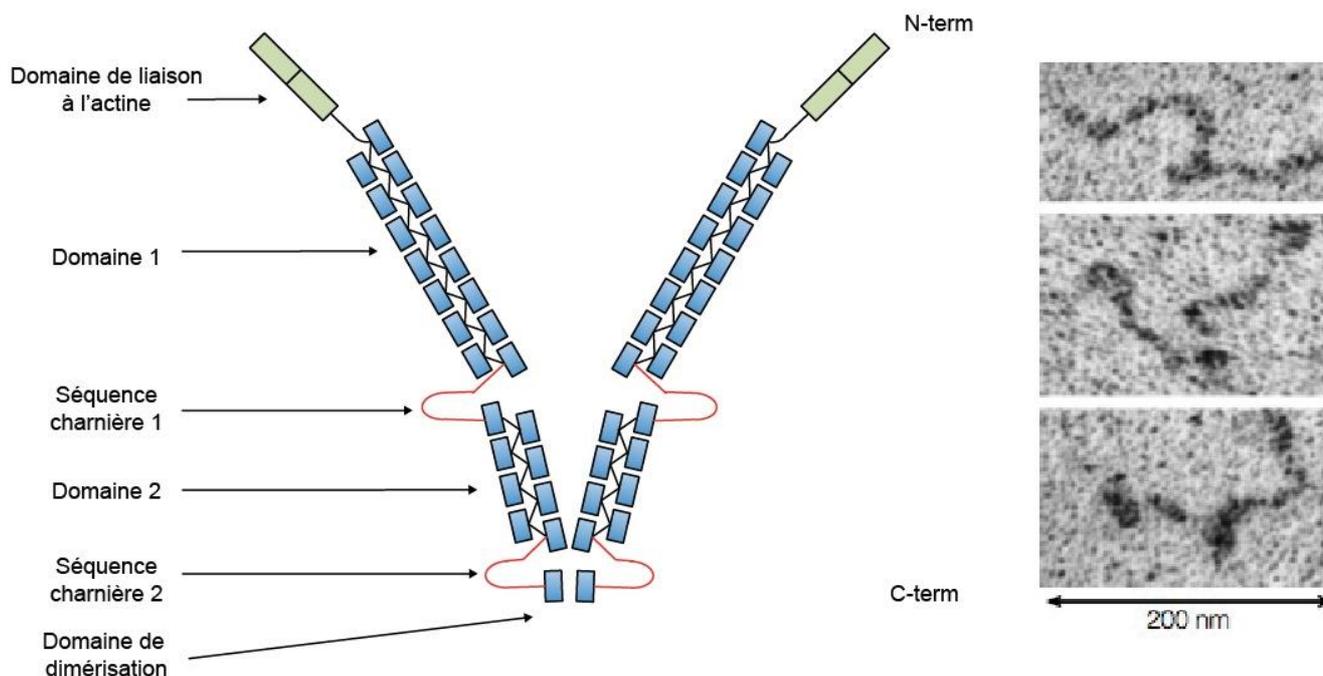
### 2.1. Structure de la protéine

#### 2.1.1. Gènes et isoformes

La famille des filamines est complexe du fait de la taille des gènes et de la mise en place de différents mécanismes d'épissages. Chez l'homme, 3 gènes codant pour les 3 isoformes de la FLN ont été identifiés sur des régions différentes du génome. Le gène *FLNA* est localisé sur le chromosome X en position q28 tandis que les gènes *FLNB* et *FLNC* sont sur les chromosomes 3p14 et 7q32, respectivement. Ces 3 gènes sont très conservés ce qui conféré une homologie de séquence d'environ 70% au niveau des acides-aminés pour les protéines synthétisées. La différence entre ces protéines réside au niveau de séquences charnières (description ci-dessous) où l'homologie de séquence atteint seulement les 45% entre les 3 isoformes (van der Flier et Sonnenberg, 2001). En revanche, il n'a pas été mis en évidence de relation entre l'organisation génomique intron-exon et la structure en domaine répété de la protéine. La présence de nombreux ARNm due à un phénomène d'épissage alternatif très important induit une grande diversité dans cette famille. La majorité des ARNm possède toujours le domaine de liaison à l'actine, mais la partie qui interagit avec ses nombreux partenaires est plus ou moins tronquée. Cependant, ces formes tronquées jouent un rôle important dans le développement puisque des formes de la FLNb où la séquence charnière 1 est absente, sont indispensables pour la formation des tissus musculaires (van der Flier et coll., 2002; Pentikäinen et coll., 2011). L'expression de ces variants diffère selon le type de tissu et surtout la localisation cellulaire (Stossel et coll., 2001).

### 2.1.2. Structure Générale

Les filamines sont des protéines de 2647 acides-aminés ( $\approx 280$  kDa) qui s'associent principalement en homodimère (décrit dans le paragraphe 2.2) (Gorlin et coll., 1990a). La structure est très conservée entre ces membres malgré les 30% de différences entre les séquences. Des images de microscopie électronique de FLNa isolée ont montré qu'elle présente une forme allongée en forme de « V » donnant ainsi une structure flexible d'environ 160 nm (figure n°11).

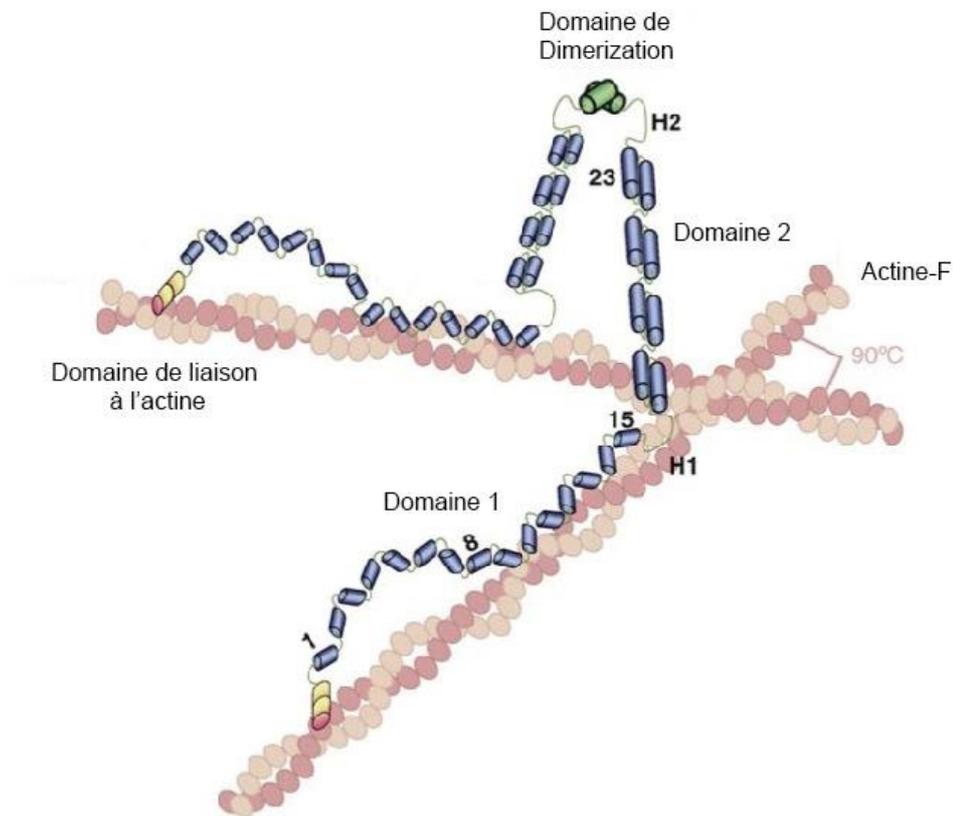


**Figure 11 : Structure de la FLNa.** A. Représentation schématique de la FLNa sous forme dimérique avec ces 3 régions : le domaine de liaison à l'actine (en vert) suivi des 24 domaines répétés (en bleu) et des 2 séquences charnières (en rouge). B. Images de microscopies électroniques de la FLNa. D'après (Stossel et coll., 2001).

La structure de la FLNa comporte 3 grands domaines :

- Le domaine de liaison au cytosquelette d'actine (ABD) : Situé dans la partie N-terminale, ce domaine permet de lier le cytosquelette d'actine F. C'est l'une de ces principales fonctions. La liaison de la FLNa sur les fibres d'actine corticale permet de les organiser en un réseau orthogonal dynamique. Une délétion de ce domaine diminue la capacité de réticulation de l'actine soluble (Nakamura et coll., 2005). Les 2 domaines de liaisons au cytosquelette d'actine des homodimères de FLNa déterminent la capacité à fixer 2 fibres d'actine F. Il est structuré de la même façon que les autres protéines de liaison au cytosquelette d'actine. La base du domaine repose sur 2 domaines d'homologie à la calponine (CH1-CH2). Chaque domaine contient 110 résidus structurés en 4 hélices  $\alpha$ . Une région d'une dizaine d'acides-aminés dans le domaine hydrophobe du domaine CH1 permet l'interaction avec l'actine F (Lebart et coll., 1994). Un second site de liaison au cytosquelette

d'actine est composé des domaines répétés 9 à 15. Ce site, d'une affinité moindre que le domaine en N-terminal, participe à la stabilisation des fibres d'actine lors du stress mécanique (van der Flier et Sonnenberg, 2001).



**Figure 12 :** Représentation schématique de l'interaction entre la FLNa et l'Actine F. Les dimères de FLNa (bleu) organisent le réseau d'actine (orange) en interagissant, en premier, avec le domaine de ABD puis avec les domaines 9 à 15. D'après (Zhou et coll., 2010).

- Les domaines répétés: Ces domaines, au nombre de 24, forment le corps de la protéine selon 3 grandes parties : la partie 1 composée des domaines 1 à 15, la partie 2 composée des domaines 16 à 23 et la dernière partie composée du 24<sup>e</sup> domaine. Ces 3 parties sont reliées entre elles par 2 séquences charnières (figure n°11). Chaque partie de la protéine à une fonction spécifique.

Chaque domaine répété est constitué d'environ 96 résidus sous forme de feuillets  $\beta$  qui sont reliés entre eux par de courtes séquences d'acides aminés. Ces feuillets ont une structure proche de celles des immunoglobulines. Les domaines répétés de la FLNa ont été classés en fonction de leur alignement de séquence (Ithychanda et coll., 2009).

Comme décrit précédemment, les domaines 1 à 15 participent à la fixation du cytosquelette d'actine F. En effet, les domaines 1 à 8 vont donner une certaine flexibilité à la FLNa qui peut aligner correctement les domaines 9-15 sur l'actine F. Ce 2<sup>e</sup> site de fixation permet d'augmenter l'adhésion au cytosquelette d'actine et de le maintenir lors de stress mécaniques (Nakamura et coll., 2007). Les domaines répétés 16 à 24 n'interagissent pas avec le réseau d'actine, mais permettent, en revanche,

l'interaction avec de nombreuses protéines partenaires (figure n°12). Le fait que ce domaine soit libre permet d'expliquer pourquoi la majorité des protéines identifiées pour interagir avec la FLNa le font dans cette région. La présence de séquence charnière entre les domaines (15-16 et 23-24) augmente la flexibilité de la FLNa. La séquence charnière 1 joue un rôle important dans la régulation au stress mécanique en maintenant les propriétés viscoélastiques du réseau d'actine alors que la séquence charnière 2 intervient dans la dimérisation de la protéine (Gardel et coll., 2006). Ces régions charnières sont sensibles à la calpaïne, une protéase qui clive la FLNa en différents fragments. Le clivage par la calpaïne peut-être diminué par la phosphorylation des sérines/thréonines présentes autour des sites charnières notamment la sérine 2152. Ceci suggère un mécanisme de régulation de la FLNa pour contrôler son activité (Stossel et coll., 2001).

- Le site de dimérisation : Le 24<sup>e</sup> domaine répété, situé à l'extrémité C-terminale, constitue la 3<sup>e</sup> partie de la FLNa. Ce domaine permet la dimérisation de la FLNa via des liaisons non covalentes qui s'organisent de façon parallèles. Cela augmente ainsi son avidité pour les fibres d'actine qui permet une organisation structurée du réseau d'actine de façon à le stabiliser soit en forme de T, de X ou de L. Le 24<sup>e</sup> domaine suffit à lui seul à la dimérisation de la FLNa mais la séquence charnière 2 permet d'augmenter l'efficacité de dimérisation (Himmel et coll., 2003). Chaque monomère de FLNa est capable de lier une fibre d'actine différente. L'association en dimère de la FLNa augmente l'affinité pour les fibres d'actine grâce à un alignement optimal des 24<sup>e</sup> domaines. La constante de dissociation est de l'ordre du  $\mu\text{M}$  (environ  $2,5 \mu\text{M}$ ) et correspond, en moyenne, à la concentration cellulaire de la FLNa. Une mutation d'un acide aminé dans le 24<sup>e</sup> domaine (M2669D) augmente la constante de dissociation de 3 mM en modifiant l'interaction entre ces domaines. L'équilibre monomère/dimère de FLNa est important pour la régulation de son activité. En effet, lors de l'activation des plaquettes, la FLNa est clivée par la calpaïne au niveau de la séquence charnière 2 ce qui augmente la constante de dissociation. Les plaquettes peuvent ainsi passer la barrière endothéliale en déstructurant le cytosquelette d'actine. Ce mécanisme déplace l'équilibre monomère/dimère et modifie ainsi les fonctions de la FLNa (Pudas et coll., 2005). La constante de dissociation est également dépendante de l'interaction avec d'autres protéines. Les protéines interagissant avec la FLNa modifient l'équilibre en faveur d'un maintien de la forme de dimère. Des travaux de Hartwig réalisés en 1981 ont montré que l'efficacité de dimérisation est dépendante de la présence de tous les domaines répétés et pas uniquement du 24<sup>e</sup> domaine (Hartwig et Stossel, 1981).

## 2.2. Localisation de la FLNa

### 2.2.1. Localisation tissulaire

Au niveau tissulaire, les FLNa et FLNb sont exprimées de façon ubiquitaire. La FLNc, quant à elle, est exprimée majoritairement dans les muscles squelettique et cardiaque. L'équipe de Norris a identifié la localisation de la FLNa lors de l'embryogenèse cardiaque chez la souris (Norris et coll., 2010). À 9 jours  $\frac{1}{2}$  de gestation, la FLNa est exprimée majoritairement dans l'endocarde et dans le mésenchyme du CAV et de l'OFT. La FLNa est ensuite retrouvée dans les coussins endocardiaques qui vont donner naissance aux valves. Au 17<sup>e</sup> jour de gestation, la FLNa est exprimée dans tous les feuillets valvulaires. Elle est majoritaire dans les feuillets les plus en contact avec le stress mécanique (couche Atrialis des valves AV et ventricularis des valves SL). Après la naissance, l'expression de la FLNa est hétérogène au niveau cardiaque puisqu'elle est absente des muscles papillaires et des cardiomyocytes où l'on retrouve la FLNc.

Le fait d'une expression commune des différentes isoformes de la FLNa dans certains types cellulaires suppose une possibilité d'hétérodimérisation. L'hétérodimère de FLNa et FLNb dans les neurones jouent un rôle important lors la formation du cortex et de la migration des neurones (Sheen et coll., 2002). L'hétérodimérisation de la FLNa avec la FLNc existe durant l'embryogenèse surtout lors de la formation des myotubes. Les 2 formes sont colocalisées au niveau des stries Z jusqu'au remplacement graduel de la FLNa par la FLNc (Himmel et coll., 2003).

### 2.2.2. Localisation cellulaire

La FLNa est localisée le long des fibres de stress d'actine F, sur l'actine corticale (support mécanique de la membrane plasmique) et sur le front de migration (Nakamura et coll., 2011).

En ce qui concerne les fibres de stress et les adhésions, la FLNa est recrutée lors de l'engagement des intégrines durant la phase précoce d'adhésion ou lors d'un stress appliqué (Glogauer et coll., 1998; Calderwood et coll., 2001). La localisation de la FLNa au niveau des adhésions focales permet de les maintenir fonctionnelles et de les stabiliser lors d'un stress mécanique (Lynch et coll., 2011). Elle est également présente au niveau des protrusions membranaires durant la migration. Lors de l'étalement membranaire, la FLNa est présente au niveau des filopodes et des lamellipodes. De nombreux travaux ont montré qu'un KO de la FLNa diminue le nombre d'extensions membranaires (Kim et coll., 2010a). La FLNa fragmentée par la calpaïne est présente au niveau du noyau et de son enveloppe pour réguler l'activité transcriptionnelle de certains gènes en retenant ou en accumulant des facteurs de transcription dans le noyau ou dans le cytoplasme (Zhou et coll., 2010)

En ce qui concerne la FLNc, elle est localisée majoritairement au niveau des stries Z des fibres sarcomériques des muscles squelettiques, au croisement des fibres fines d'actine et dans les disques intercalaires (van der Ven et coll., 2000).

## 2.3. Fonctions biologiques de la FLNa

Comme décrit dans la partie 2.1, la structure de la FLNa est composée 2 parties qui lui confèrent ses fonctions : la 1<sup>ère</sup> fonction est d'organiser le réseau d'actine (domaine 1) et la 2<sup>e</sup> fonction est de participer à la régulation de nombreux processus cellulaires (domaine 2) en interagissant avec de nombreux partenaires.

### 2.3.1. Organisation du cytosquelette d'actine

Le premier rôle identifié de la FLNa est sa capacité à organiser le cytosquelette d'actine à l'aide de son domaine de liaison. La constante d'affinité de la FLNa pour l'actine est de l'ordre du  $\mu\text{M}$  et elle est capable de se lier avec 8 à 12 filaments d'actine (Gorlin et coll., 1990b). Cependant, il a été démontré qu'il suffit d'un seul dimère de FLNa pour une fibre d'actine pour obtenir une réticulation du réseau d'actine (Ito et coll., 1992). La structure du réseau d'actine est dépendante d'un équilibre entre la quantité de FLNa et d'actine présente dans la cellule. En effet, un ratio FLNa/Actine de 1 : 10-50 permet d'organiser le réseau d'actine de façon parallèle alors qu'un ratio 1 : 150-740 permet de l'organiser de façon orthogonale. Pour avoir une structuration optimale de l'actine, le ratio FLNa/Actine doit être maintenu entre 1 : 80 et 1 : 140. Lors de la stabilisation du réseau orthogonal d'actine, les FLNa sont localisés au niveau des intersections conférant ainsi une certaine flexibilité et en même temps une certaine résistance au cytosquelette (Brotschi et coll., 1978).

La FLNa fixe les fibres d'actine robustes pour renforcer les structures naissantes (filopodes, lamellipodes). Elle est localisée principalement dans les lamellipodes où il y a une forte concentration d'actine ainsi qu'au niveau des fibres de stress. En effet, au niveau du front de migration, la FLNa est présente aux jonctions des fibres d'actine en forme de X, Y et T. Ce sont des zones de remodelage rapide où le cytosquelette d'actine est en perpétuelle restructuration. Cela est expliqué par la faible concentration de FLNa qui le structure moins. En revanche, au niveau des fibres de stress, la FLNa est en grande concentration pour maintenir et renforcer le cytosquelette (La Flanagan et coll., 2001). La FLNa est à opposer à la protéine Arp2/3, une autre protéine de liaison à l'actine, qui fixe préférentiellement les fins filaments. Par exemple, lors de la migration des cellules neuronales, Arp2/3 initie les nouveaux branchements du réseau d'actine au niveau du front de migration. Alors que la FLNa est située juste en amont pour renforcer ces nouveaux branchements (La Flanagan et coll., 2001).

Certains mécanismes permettent de réguler la fixation de la FLNa sur l'actine. En effet, La fixation de la FLNa sur l'actine est dépendante de la présence du complexe Calmoduline/ $\text{Ca}^{2+}$ . L'association  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline entre en compétition avec la FLNa pour lier l'actine et conduit ainsi à la dissociation du couple FLNa/actine (Feng et Walsh, 2004; Nakamura et coll., 2005). La protéine PAK1, effecteur de Rac permet la phosphorylation de la FLNa sur la serine 2152 qui la protège de la calpaïne donc de la dégradation renforçant les lamellipodes (Vadlamudi et coll., 2002).

La FLNa est recrutée par différentes protéines au niveau des filaments d'actine pour les structurer. Par exemple, la protéine RalA, un effecteur de la protéine Cdc42 recrute la FLNa au niveau de filopodes pour les stabiliser durant leurs formations (Ohta et coll., 1999). A cela s'ajoute l'interaction de la FLNa avec les effecteurs de petites protéines G tels que ROCK, Trio ou FilGAP impliquées dans la régulation de l'activité du cytosquelette d'actine (Bellanger et coll., 2000; Ohta et coll., 2006).

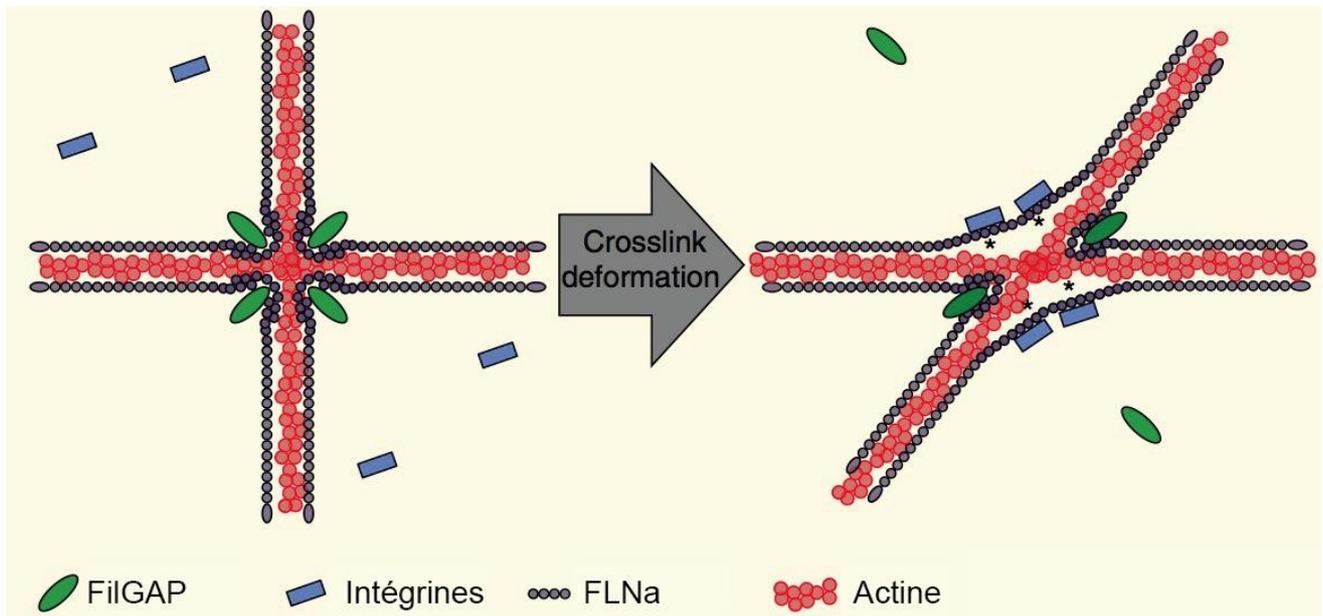
A noter que la FLNa est capable de lier également la vimentine, composant majeur des filaments intermédiaires. Cette interaction permet la phosphorylation de la vimentine par la PKC (protéine interagissant avec la FLNa) qui rompt les filaments intermédiaires et permet l'extension du lamellipodes (Nakamura et coll., 2005).

### 2.3.2. Mécanotransduction

Durant l'application de forces mécaniques, la cellule réorganise le cytosquelette d'actine pour maintenir l'intégrité de la membrane plasmique et adapter l'interaction avec la MEC en renforçant les points focaux d'adhésion (Yamazaki et coll., 2002). En modifiant les cascades de signalisation en réponse à un stress mécanique, la cellule va s'adapter et c'est ce que l'on nomme le phénomène de mécanoprotection. En interagissant et en structurant les fibres d'actine, la FLNa est considérée comme un mécanosenseur. En réponse aux forces mécaniques ressenties, elle stabilise le cytosquelette d'actine en le structurant de façon optimale et en régulant les cascades de signalisation associées (Stossel et coll., 2001).

Les domaines répétés de la FLNa modifient leurs alignements sous l'effet d'un stress mécanique pour permettre une réponse adaptée de la cellule. Lors de faibles contraintes mécaniques, la FLNa transduit le signal grâce à des changements de conformation modifiant l'interaction avec ses protéines partenaires. Ces changements exposent de nouveaux sites d'interactions pour d'autres protéines (Razinia et coll., 2012). Par exemple, sous l'effet d'un stress mécanique, la FLNa est relocalisée dans la cellule au niveau de la membrane pour renforcer les points focaux d'adhésions. Ces points focaux maintiennent le lien entre la MEC et le cytosquelette d'actine et stabilisent la membrane plasmique (Glogauer et coll., 1998). Un des éléments clés de la chaîne de mécanotransduction est la protéine intégrine. Elles font le lien entre la MEC et la cellule et sont décrites pour interagir avec la FLNa dans la partie C-terminale de la protéine (domaine 21) (Loo et coll., 1998). Lorsque des forces mécaniques sont appliquées sur les intégrines, le recrutement de la FLNa est augmenté pour stabiliser le cytosquelette d'actine et empêcher la dislocation des points focaux (Kainulainen et coll., 2002). Cette stabilisation passe par la protéine FilGAP. Elle est décrite pour interagir avec la FLNa dans la partie C-terminale. Lorsque la cellule ne subit pas de contraintes mécaniques, FilGAP est liée à la FLNa. Lors d'un stress mécanique, la FLNa libère FilGAP démasquant les sites d'interactions pour les

intégrines qui vont stabiliser la cellule. FilGAP diminue l'activité de Rac pour limiter les processus d'étalement cellulaire (figure n°13) (Ehrlicher et coll., 2011a).



**Figure 13 :** Représentation schématique de l'effet du stress mécanique sur le cytosquelette d'actine. A l'état de base, la FLNa (gris) est liée à l'actine (rouge) tout en piégeant FilGAP (vert). Lors d'une déformation, le cytosquelette d'actine s'étire entraînant avec lui la FLNa qui libère FilGAP. Cela va démasquer des sites d'interaction pour les intégrines qui vont renforcer les points d'ancrages. D'après (Ehrlicher et coll., 2011b).

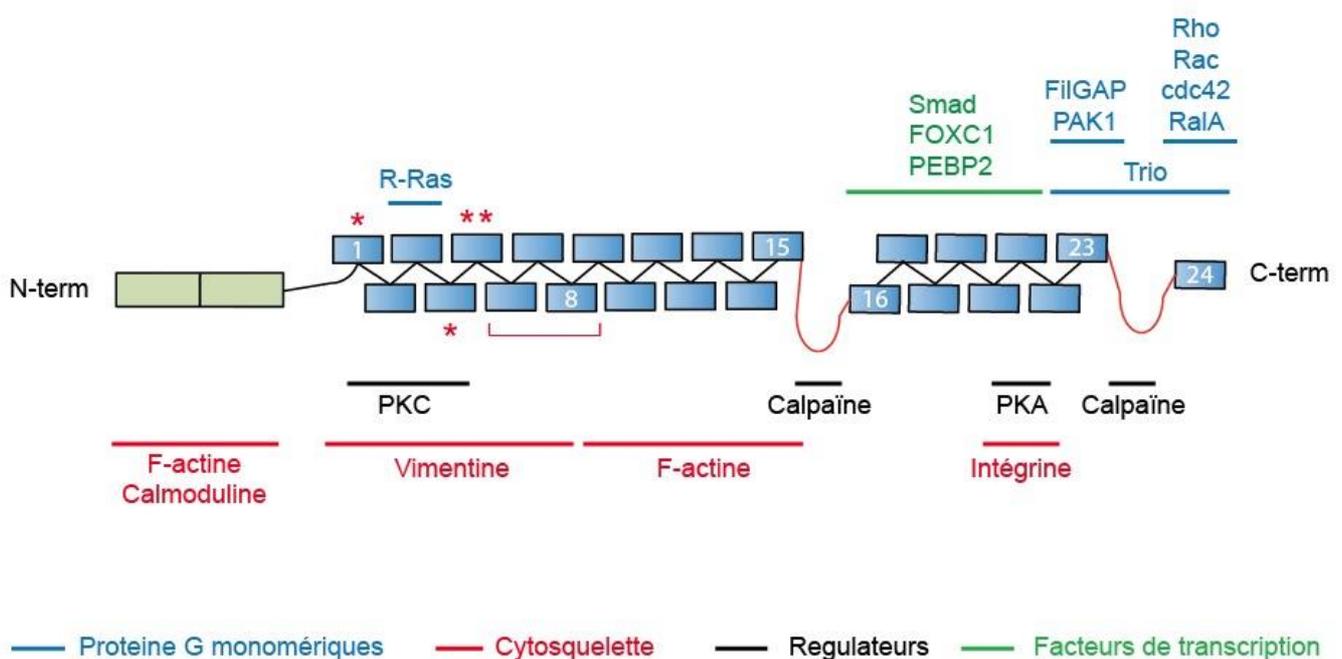
L'application de forces mécaniques induit la régulation de l'activité de certains gènes (Wang et coll., 2009). La FLNa interagit avec la protéine refilin au niveau du domaine répété 21 pour former et stabiliser les fibres parallèles d'actine périnucléaire reliant le noyau à la membrane plasmique (Gay et coll., 2011). L'actine périnucléaire et membrane nucléaire transmettent les variations de forces exercées sur la cellule au noyau pour réguler la transcription de certains gènes et ainsi adapté sa réponse (Luxton et coll., 2010). La FLNa participe également à la mécanoprotection en limitant l'apoptose cellulaire et en favorisant la formation et la maturation de la MEC (Shifrin et coll., 2012; Pinto et coll., 2014).

### 2.3.3. Voies de signalisation et mécanismes

Le domaine 2 de la FLNa interagit avec diverses protéines pour réguler différentes de voies de signalisation. A ce jour, une soixantaine de partenaires ont été identifiés pour interagir avec la FLNa. Elle est considérée comme une protéine « d'échafaudage » (Scaffold Protein) car elle contrôle spatialement et temporellement ses différents partenaires. La majorité des protéines interagit au niveau des domaines 16 à 24 de la partie C-terminale (figure n°11 et 14). Ces protéines sont des récepteurs transmembranaires (Intégrines), des protéines G monomériques avec leurs régulateurs et leurs

effecteurs, des facteurs de transcription et des protéines impliquées dans la mécanotransduction. L'interaction est dépendante de l'état de phosphorylation de la FLNa et de ces partenaires, des processus de protéolyse notamment via la calpaïne, du stress mécanique exercé et de la compétition entre ces différents partenaires (Nakamura et coll., 2011).

La majeure partie des partenaires de la FLNa interagit entre les 16<sup>e</sup> et 24<sup>e</sup> domaines de la FLNa. Cependant, quelques protéines ont été identifiées pour interagir dans les premiers domaines répétés. Les quelques protéines décrites sont des protéines impliqués dans la régulation du cytosquelette (calmoduline, vimentine) et dans la réponse au stress mécanique (R-ras, PKC) (figure n°11 et 14).



**Figure 14 : Structure monomérique de la FLNa et son interaction avec certains partenaires.** Les protéines interagissant avec la FLNa sont localisées majoritairement dans la partie C-terminale. Parmi ces protéines, on trouve les protéines G monomériques et leurs régulateurs (Bleu), les protéines régulant le cytosquelette (Rouge), les protéines régulatrices de la FLNa (Noir) et les facteurs de transcription (Vert). Les étoiles rouges et le crochet représentent la localisation des mutations de la FLNa.

Son interaction avec ses partenaires lui permet de réguler de nombreux processus cellulaires :

- **La stabilité membranaire :** La FLNa participe au maintien de la stabilité membranaire en mettant en relation le réseau d'actine avec les protéines transmembranaires. Ce rôle a été démontré dans un modèle de mélanome humain n'exprimant pas la FLNa. L'absence de FLNa conduit à une instabilité du réseau d'actine et à la formation de bulles (« blebs ») à la membrane. Lorsque la FLNa est ré-exprimée, il y a une disparition de ces « blebs » (Cunningham, 1995). La conséquence de son absence est une instabilité de l'actine corticale et une faiblesse des fibres d'actine via une dérégulation

de l'activité des protéines régulatrices du cytosquelette liées à la FLNa (Lynch et coll., 2011). Parmi ces protéines régulatrices, la voie RhoA/ROCK conduit à la formation de blebs en permettant la contraction de la myosine et l'inhibition de l'activité de Rac impliquée dans la polymérisation de l'actine (Sanz-Moreno et coll., 2008). La diminution de l'activité de Rac est due à la protéine FilGAP décrite comme interagissant avec la FLNa (Kawaguchi et coll., 2014a).

Outre le fait de stabiliser la membrane plasmique en régulant l'organisation du cytosquelette d'actine, la FLNa permet la localisation et le maintien des protéines transmembranaires à la membrane. Elle maintient les intégrines, les récepteurs aux facteurs de croissance et les canaux ioniques activés par le stress mécanique à la membrane (Nakamura et coll., 2011).

- L'activité transcriptionnelle : La FLNa régule de façon positive et/ou négative la transcription de gènes. Son interaction avec différents facteurs de transcription permet de les retenir dans le cytoplasme ou de les localiser dans le noyau. Par exemple, la FLNa maintient les facteurs de transcription PEBP2/CBF dans le cytoplasme limitant le développement de cancers myéloïdes (Yoshida et coll., 2005; Wee et coll., 2008). Au contraire, les facteurs Smad2-3 et Smad5 sont accumulés dans le noyau par la FLNa une fois phosphorylés par leurs récepteurs (Sasaki et coll., 2001). La régulation des protéines Smad par la FLNa est associée au processus myxomateux des valves car les protéines Smad font parties de la voie du TGF- $\beta$  impliquée dans la synthèse des composants de la MEC (Derynck et Zhang, 2003). Le facteur de transcription FOXC1 est accumulé dans le noyau par la FLNa. Il est important lors de la valvulogénèse car il régule l'activité des cellules de la crête neurale (Berry et coll., 2005). La FLNa peut directement entrer dans le noyau après avoir été clivée par la calpaïne au niveau de la 1<sup>ère</sup> séquence charnière entre le 15<sup>e</sup> et 16<sup>e</sup> domaine répété. Par exemple, le fragment de 90 kDa va être associé à la protéine BCRA2 en réponse à des dommages de l'ADN (Yuan et Shen, 2001).

- La motilité cellulaire : la régulation spatio-temporelle de nombreuses protéines ainsi que l'organisation du cytosquelette d'actine font que la FLNa est associée au phénomène de motilité et de migration. Après une stimulation des cellules par différents facteurs tels que les facteurs de croissance, les cytokines et le stress mécanique mettent en place de points focaux pour stabiliser la cellule. Ce processus permet l'établissement d'un lien entre la MEC et la cellule.

Les intégrines sont les premiers facteurs impliqués dans la cascade de transduction de la motilité. Ces récepteurs transmembranaires permettent la création de points focaux d'adhésion pour maintenir la cellule sur son support. Les intégrines recrutent les FLNa au niveau de ces points focaux pour y stabiliser les fibres d'actine (Calderwood et coll., 2001). La FLNa régule de façon positive l'activité des intégrines. En effet, la déplétion de la FLNa diminue l'activité des intégrines et, par conséquence réduit le nombre de point focaux (Kiema et coll., 2006). La FLNa participe également à la régulation des protéines associées aux points focaux d'adhésion. L'engagement des intégrines permet le recrutement de nombreuses protéines et notamment des kinases (FAK et SRC) pour renforcer les points focaux d'adhésion et activer les voies de signalisation associées

(Chen et coll., 2009). Parmi ces protéines, certaines ont été décrites comme étant régulées par la FLNa : la vinculine, la paxilline, l' $\alpha$ -actinine ou la protéine R-Ras. La protéine R-ras est impliquée dans les processus de migration en se liant à la FLNa au niveau du 3<sup>e</sup> domaine répété. La conséquence de cette interaction est une diminution de l'engagement des intégrines, augmentant ainsi la migration cellulaire (Gawecka et coll., 2010).

La régulation de ces processus est en partie dépendante de l'expression de la FLNa. En effet, une diminution de l'expression de la FLNa conduit à une instabilité membranaire et à un défaut de migration. De même, une surexpression de la FLNa au niveau des neurones limite fortement leur migration car la phosphorylation de la FLNa la protège de la dégradation. Ce qui a pour conséquence de maintenir les adhésions focales en place (Sarkisian et coll., 2006).

#### **2.4. Pathologies associées aux mutations de la FLNa**

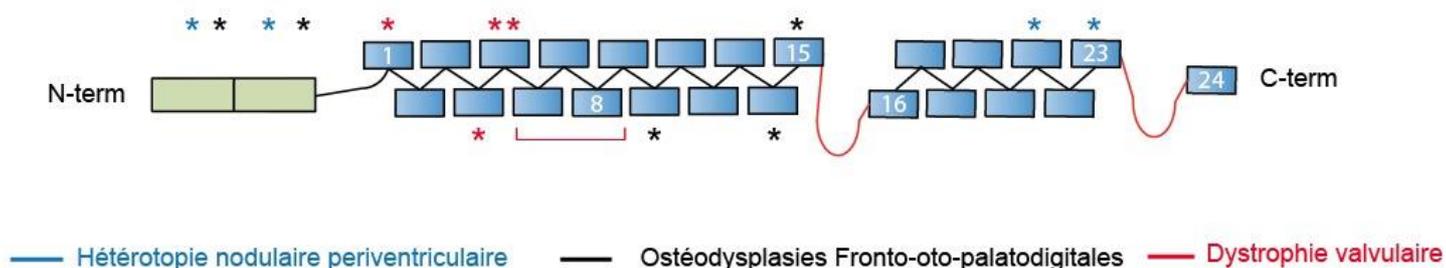
L'implication de la FLNa dans de nombreux processus cellulaires fait qu'une mutation conduit à une variété de pathologies congénitales notamment à des malformations cérébrales, osseuses, des membres et du cœur (Feng et Walsh, 2004). Voici une liste non exhaustive des principales pathologies associées à des mutations de la FLNa (figure n°15) :

L'hétérotopie nodulaire périventriculaire (PVNH) : Cette pathologie est caractérisée par un défaut de migration radiale des neurones au moment de l'embryogenèse. En effet, l'expression de la FLNa dans les neurones diminue au cours du temps ce qui limite leur migration créant de légers retards mentaux et des crises d'épilepsie. Les mutations identifiées sont dites « perte de fonction » donnant lieu à un épissage anormal et à une protéine tronquée de la FLNa. En plus des anomalies neuronales, les patients présentent également des malformations cardiaques avec des accidents vasculaires cérébraux, des valves aortiques bicuspidées ou un canal artériel persistant. Cette pathologie est retrouvée uniquement chez les femmes, car elle est létale pour les hommes (Fox et coll., 1998; Guerrini et Parrini, 2010).

- Les ostéodysplasies fronto-oto-palatodigitales : Cette pathologie regroupe différents syndromes affectant le squelette et les membres. Les mutations faux-sens de la FLNa conduisent au syndrome oto-palato-digitale (OPD), à la dysplasie fronto-metaphyseale et au syndrome de Melnick-Needles. Ces syndromes sont caractérisés par une dysplasie cranio-faciale, une fissure du palet, des retards mentaux et une surdité. Au niveau cardiaque, les patients présentent des anévrismes de l'aorte et des défauts des séptations cardiaques. Les mutations de la FLNa identifiées sont dites « gains de fonction ». Une partie de ces mutations est située dans le domaine de liaison au cytosquelette d'actine (domaine CH1-CH2) qui augmente l'affinité de ce dernier pour l'actine. Les autres sont situées sur les domaines 10, 14 et 15 modifiant l'interaction avec ses partenaires. Cependant, ces mutations sont différentes de celles de la PVNH et les patients ne présentent pas d'atteintes cérébrales suggérant ainsi des mécanismes développementaux différents (Robertson et coll., 2003).

En résumé, les mutations de la FlnA conduisent à une grande diversité de pathologies liées à des anomalies congénitales. Cependant, au niveau du système cardiovasculaire, les atteintes valvulaires ne sont pas prédominantes contrairement à celle présentes dans les pathologies liées aux mutations de la FlnA ou de FilGAP. À l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à ces anomalies congénitales sont encore mal connus. La localisation des mutations de la FlnA est spécifique à chaque pathologie décrite précédemment. Par exemple, dans le cas de la PVHN, elles sont localisées dans la partie C terminale de la FlnA alors que pour les OFD, elles sont plutôt dans le domaine de liaison à l'actine. Les effets des mutations de la FlnA sont différents en fonction des régions affectées ce qui reflète le rôle complexe de la FlnA au cours du développement et de l'interaction avec ses nombreux partenaires (figure n°15).

Il existe également des pathologies des FLN<sub>b</sub> et FLN<sub>c</sub> qui touchent le squelette et les muscles, respectivement.



**Figure 15 :** Localisation des mutations associées aux différentes pathologies de la FLNA. Les étoiles représentent la localisation des mutations identifiées dans les différentes pathologies. En bleu, les mutations de l'hétérotopie nodulaire périventriculaire localisées sur le domaine de liaison à l'actine et dans la partie C-terminale. En noir, les mutations de l'ostéodysplasie fronto-oto-palatodigitale localisées sur le domaine de liaison à l'actine et au niveau des domaines 10, 14 et 15. En rouge, les mutations de la dystrophie valvulaire localisées dans les 8 premiers domaines répétés

### 3. Les protéines partenaires de la FLNa

La FLNa participe à la régulation de nombreux processus cellulaires en interagissant avec divers partenaires. Je me focaliserai sur 3 principaux partenaires de la FLNa dont j'ai étudié les implications dans le développement de la pathologie : Les protéines G monomériques, la protéine FilGAP et la tyrosine phosphatase PTP-N12.

#### 3.1. Les protéines G monomériques

Les protéines G monomériques sont des GTPases formant une superfamille de 166 membres dont le membre principal est la protéine Ras. La dénomination GTPase détermine la capacité de ces protéines à hydrolyser le GTP (Guanosine Tri-Phosphate) en GDP (Guanosine Di-Phosphate). Ces protéines sont des commutateurs moléculaires oscillant entre une forme inactive (GDP) et une forme active (GTP). Cette oscillation permet d'activer différents signaux intracellulaires impliqués dans divers processus cellulaires (Vetter et Wittinghofer, 2001). Elles sont à opposer aux protéines G trimériques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) car elles sont composées uniquement de la sous-unité  $\alpha$ .

Dans les années 60, l'équipe de Scolnick a mis en évidence, pour la première fois, la protéine Ras dans l'étude de rétrovirus oncogéniques. Ils ont décrit plus tard que cette protéine a la capacité de lier le GTP (Shih et coll., 1980). Depuis, leurs caractérisations n'ont cessé de progresser montrant l'implication de ces protéines dans de nombreux processus cellulaires. Du fait de leur importance, une dérégulation conduit à diverses pathologies notamment au niveau cardiaque (Loirand et coll., 2013). La famille des protéines G monomériques est composée 5 branches identifiées et classées en fonction de leurs homologues (tableau n°1) :

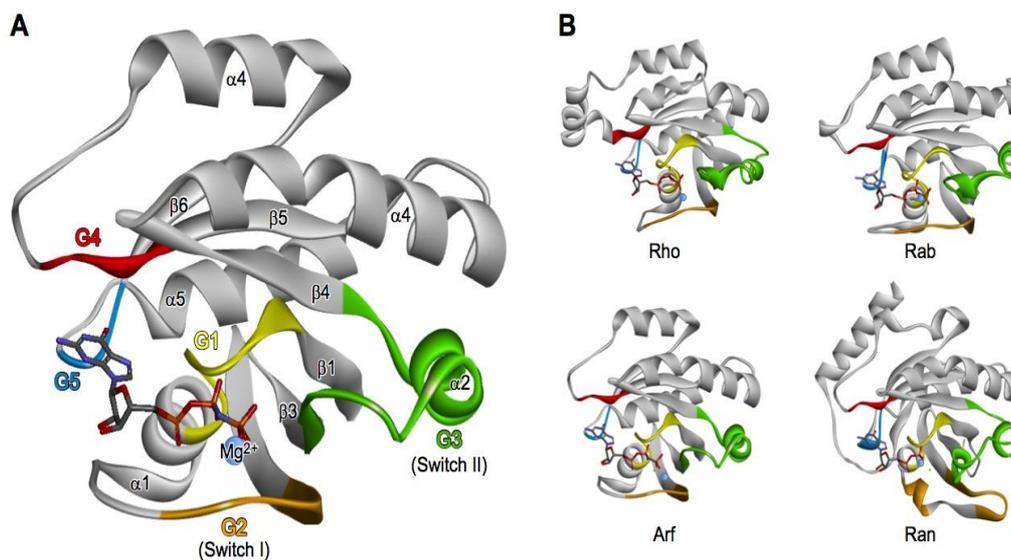
Sous Groupe	Nombres	GEF	GAP	GDI	Fonctions cellulaires
Ras	36	29	15	1	Expression génique
Rho	20	80	70	3	Expression génique et organisation du cytosquelette
Arf	28	18	31		Transport vésiculaire
Rab	64	53	38	3	Transport vésiculaire
Ran	1	1	1		Transport nucléaire et régulation du cycle cellulaire
Autres	11				

**Tableau 1 : Famille des petites protéines G.** Tableau récapitulatif des différents membres de la famille des petites protéines G regroupant le nombre de membres, le nombre de protéines régulatrices et leurs fonctions cellulaires (Loirand et coll., 2013).

### 3.1.1. Structure des protéines G monomériques

Les 5 sous familles qui composent la superfamille Ras possèdent une homologie de séquence d'environ 50 % vis-à-vis de la protéine Ras alors qu'il y a moins de 30% d'homologie pour les protéines de la sous-famille de Rho. Les protéines G monomériques possèdent néanmoins des séquences consensus responsables de la liaison GDP/GTP et de l'activité GTPasique.

Ces protéines sont composées de 6 feuillets  $\beta$  et de 5 hélices  $\alpha$  entrelacés formant le domaine G qui lie les résidus guanines. Ces différents éléments sont reliés entre eux par 5 chaînes polypeptidiques (G1-G5) maintiennent du GTP et du  $Mg^{2+}$ , co-facteur nécessaire pour augmenter l'affinité des résidus guanosides. Les 2 zones charnières (Switch 1 et 2) correspondent aux chaînes G2 et G3 permettant le changement conformationnel de la protéine pour ajuster son interaction avec ses effecteurs (figure n°16) (Takai et coll., 2001). Les protéines G actives interagissent avec leurs effecteurs lorsqu'elles sont localisées à la membrane. Cette localisation membranaire est permise grâce à un motif CAAX dans leur partie C-terminale. Cependant, ce motif n'est pas présent chez les protéines Ran. Cette séquence va être reconnue par 2 enzymes (la farnésyltransférase et la géranylgéranyltransferase) pour favoriser l'ajout de chaînes lipidiques hydrophobes pour les intégrer dans la membrane plasmique. Cette région HVR et le motif CAAX permettent une localisation subcellulaire particulière et une interaction spécifique avec leurs effecteurs et régulateurs (Ahearn et coll., 2012). Ces 2 motifs expliquent à eux seuls la diversité des protéines G monomériques.



**Figure 16 : Structure moléculaire des protéines de la superfamille de Ras.** A. La structure 3D de la protéine Rho est composée des 6 feuillets  $\beta$  et 5 hélices  $\alpha$  (en gris). Les domaines conservés (G1-G5 en couleur) entourent la molécule de GTP. B. Représentation 3D des 4 autres membres de la superfamille de Ras. (Loirand et coll., 2013)

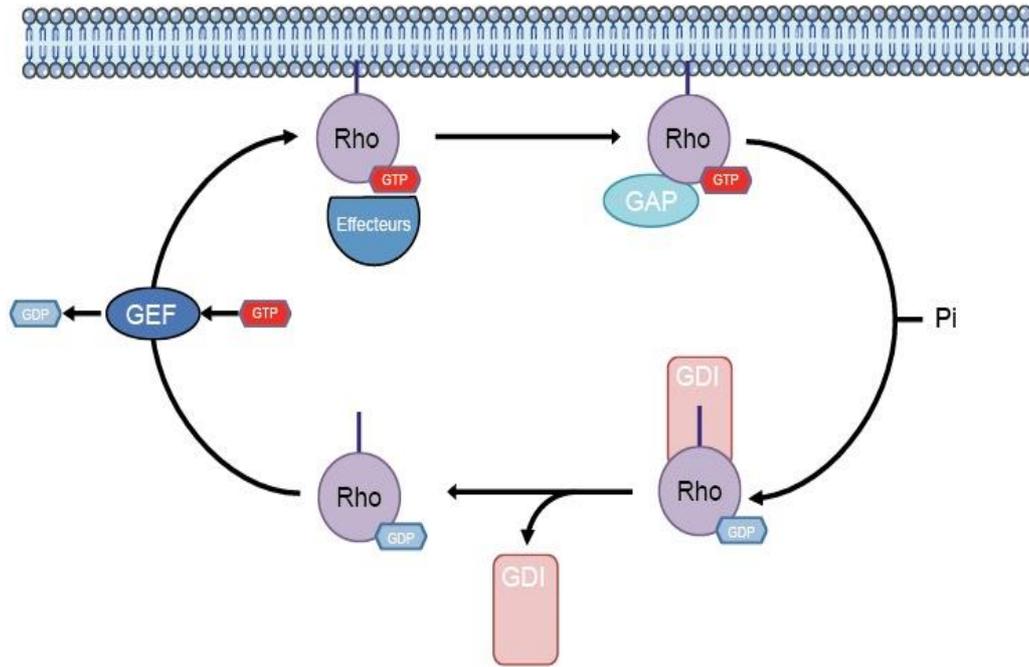
### 3.1.2. Cycle GTPasique et mécanismes régulateurs

Les petites protéines G agissent comme des interrupteurs moléculaires oscillant entre 2 formes inter-convertibles : un état actif (« On ») lié au GTP et un état inactif (« Off ») lié au GDP. En fonction de leur état, elles sont situées dans l'un des 3 compartiments cellulaires (membrane-cytosol-noyau). Elles permettent de transduire et d'intégrer un stimulus extracellulaire en une activité intracellulaire adaptée. Ce passage d'un état à l'autre nécessite des mécanismes régulateurs modulant le signal. Ces mécanismes sont indispensables puisque le GDP se lie fortement aux petites protéines G et que le GTP est hydrolysé très lentement (Cherfils et Zeghouf, 2013). Pour cela, il existe 3 mécanismes différents (figure n°16) :

- Les Facteurs d'Echange Guanyliques (GEF) : Ces protéines participent à la fixation et à la stabilisation du GTP sur les protéines G monomériques en remplaçant le GDP. Ces protéines sont nécessaires du fait de l'affinité importante du GDP pour les protéines G monomériques. Cette affinité importante rend le remplacement par le GTP plus lent et donc nécessite l'aide d'un activateur. Les GEF, en nombres conséquent dans les cellules (plus de 80 pour la famille Rho), possèdent une structure très variée. il existe néanmoins quelques similitudes. Les GEF possèdent 2 principaux domaines : 1) un domaine d'homologie au Dlb (domaine DH) qui permet de catalyser l'échange de GDP en GTP et 2) un domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine PH) qui permet l'interaction protéines-lipides pour localiser la GEF à proximité de la protéine G au niveau des membranes cellulaires (Schmidt et Hall, 2002).

- Les Activateurs de l'Activité GTPasique (GAP) : La réaction de catalyse du GTP est une réaction très lente. Les GAP permettent d'augmenter la vitesse de catalyse des protéines G monomériques et par conséquent, abolir les voies de signalisation sous-jacentes. Les GAP interagissent au niveau du domaine GTPase de la protéine pour faciliter l'hydrolyse du GTP. La structure des GAP se rapproche de celle des GEF par la présence de domaines DH, PH ainsi que de régions riches en proline. Ce domaine a pour rôle de recruter la protéine à la membrane en interagissant avec les charges négatives des groupements phosphates des phosphatidylinositides membranaires. Ces différentes régions servent à la localisation subcellulaire des GAP mais également à la régulation de leur activité. Tout comme les GEF, il y a plus de 70 GAP identifiées uniquement pour la famille RhoA (Bernards et Settleman, 2004).

- Les inhibiteurs de dissociation guanylique (GDI) : Les GDI sont la dernière classe de régulateurs découverts. À ce jour, 3 GDI ont été identifiées pour bloquer l'activité des protéines G de la famille Rho. Leur action principale est de maintenir les petites protéines G dans le cytosol en les éloignant des GEF. Les GDI protègent la partie hydrophobe des GTPases et empêcher leur interaction avec la membrane (Seabra et Wasmeier, 2004).



**Figure 17 :** Représentation schématique des mécanismes régulateurs des petites protéines G. Les protéines de la famille RhoA sont couplées au GDP dans le cytosol. Une fois activée par les GEF, elles vont se localiser dans la membrane plasmique pour stimuler différents effecteurs. L'intervention des GAP rend inactive ces protéines qui retournent dans le cytosol sous la forme GDP. Le GDI les maintient dans le cytosol en l'empêchant de se localiser dans la membrane plasmique. D'après (Loirand et coll., 2013).

### 3.1.3. La sous-famille Rho

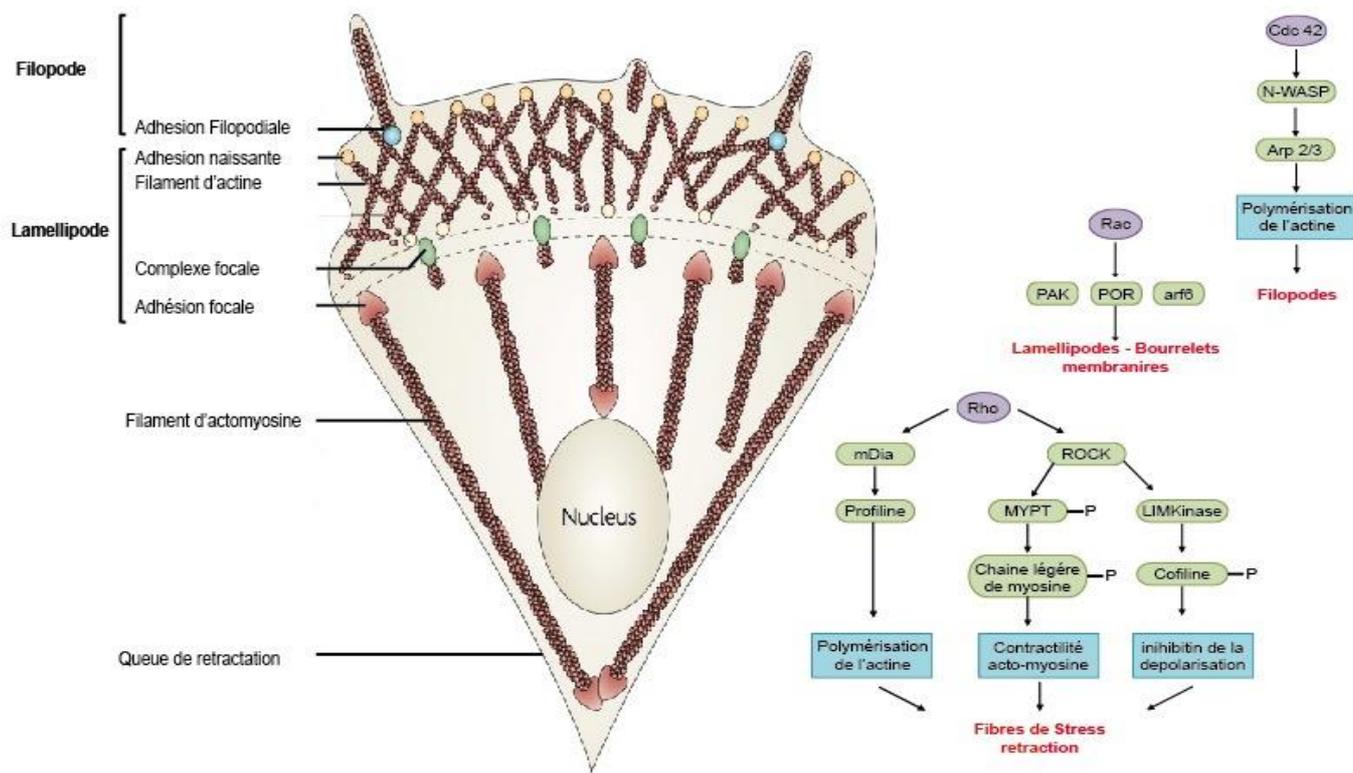
La sous-famille de Rho est l'une des sous-familles des GTPases monomériques les plus étudiées. Le nom Rho provient de Ras homologue du fait de l'homologie de séquence avec la protéine Ras lors de sa découverte. La protéine RhoA fut la première identifiée en 1985 et depuis, 20 membres ont été identifiés chez l'homme (Madaule et Axel, 1985). Ainsi, elles sont exprimées dans une grande variété de cellules à des niveaux qui varient d'un type à l'autre. Ces protéines sont localisées dans les membranes plasmiques lorsqu'elles sont activées et dans le cytosol à l'état inactif. La fonction principale des GTPases est de réguler l'organisation du cytosquelette d'actine :

1) En assemblant les filaments contractiles d'actomyosine grâce à la protéine RhoA et son principal effecteur ROCK (Rho Kinase). ROCK phosphoryle différents partenaires associés tels que les kinases ou les phosphatases des chaînes légères de myosine (MLCK et MLCP) pour permettre la contraction, la formation des fibres de stress et l'assemblage d'adhésions focales. Cette voie est importante dans la réponse au stress mécanique (Li et coll., 1999).

2) En participant aux différents processus de migration grâce à la formation de filopodes (cdc42), de lamellipodes et de protrusions membranaires (Rac) au niveau du front de migration. Dans une moindre mesure, Rac et cdc42 régulent l'assemblage des adhésions focales avec RhoA.

L'effecteur principal de Rac est la protéine PAK1 et celui de Cdc42 est Arp 2/3 (figure n°18) (Etienne-Manneville et Hall, 2002).

Les protéines G régulent également l'expression de gène, le cycle cellulaire et les processus de polarité et de migration (Takai et coll., 2001).



**Figure 18 :** Voie de signalisation des petites protéines G de la sous-famille de Rho. Structure du réseau d'actine dans les lamellipodes, filopodes et filaments d'actine ainsi que les voies de signalisation associées aux petites protéines G impliquées (Parsons et coll., 2010).

Le nombre de protéines régulatrices (GEF-GAP-GDI) ainsi que leurs interactions avec la FLNa suppose une régulation spatio-temporelle très contrôlée des protéines G monomériques. Ce contrôle est retrouvé dans le processus de migration. Par exemple, un stimuli externe (facteur de croissance, stress mécanique ou chimiotactisme) active la protéine cdc42 qui stimule ses effecteurs notamment la protéine Arp2/3 pour créer de nouveaux branchements d'actine F au niveau du filopode. Le filopode sert de senseur à la cellule pour déterminer la direction à suivre. Une fois le filopode ancré par la création de nouvelles adhésions, la protéine Rac active son effecteur PAK pour former de nouvelles protrusions membranaires donnant naissance à un lamellipode. La protéine Rho permet le renforcement et la maturation des adhésions focales par la fixation des fibres de stress d'actine. En revanche, à l'opposé du front de migration, la protéine RhoA active la contraction des fibres

d'actomyosines. Cette contraction détache les adhésions focales libérant la cellule pour lui permettre d'avancer.

#### 3.1.4. Relation FLNa – protéines G monomériques.

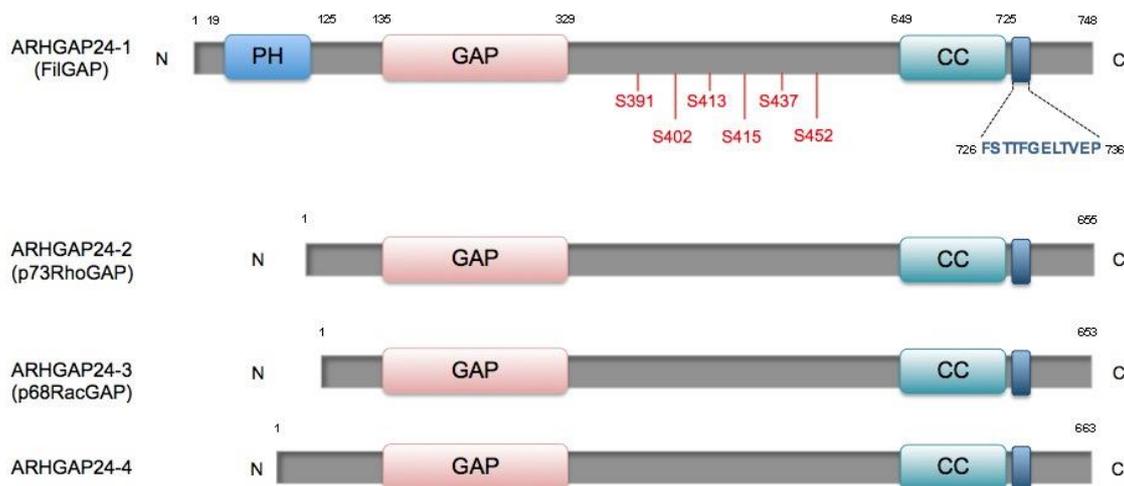
A la vue des nombreux processus cellulaires régulés par les protéines G monomériques, la notion de coordination entre ses différentes protéines devient une nécessité. Cette coordination est, en partie, effectuée par la protéine FLNa. L'interaction de la FLNa avec les protéines G monomériques et leurs régulateurs permet une localisation optimale ainsi qu'une modulation de leur activité en les rapprochant physiquement entre eux dans la cellule. Par exemple, l'activité de la protéine Rac et de son effecteur PAK1 est dépendante de la présence de la FLNa. En effet, la FLNa permet à PAK1 d'être activée par Rac en les colocalisant tous les 2. En retour, PAK1 protège la FLNa de la dégradation par la calpaïne en la phosphorylant (sérine 2152). La FLNa, ainsi protégée, stabilise les nouveaux branchements au niveau des protrusions membranaires (Vadlamudi et coll., 2002). La polymérisation et la stabilisation du cytosquelette d'actine sont dépendantes de la présence de la FLNa mais également des protéines interagissant avec elle. Parmi ces protéines, on note la présence des protéines Trio, Lbc (effecteurs de Rac) ou bien ROCK, FilGAP ou p190RhoGAP (Bellanger et coll., 2000; Ueda et coll., 2003). Par exemple, p190RhoGAP est accumulée dans la membrane plasmique par la FLNa durant les phases précoces de l'étalement et induit la formation des protrusions membranaires diminuant l'activité de RhoA (Arthur et Burridge, 2001). Des mécanismes de régulations similaires impliqués la protéine FilGAP qui est libérée lors de l'étirement de la FLNa lors d'un stress mécanique. FilGAP ainsi libérée diminue l'activité de Rac et renforcer les adhésions focales (Ohta et coll., 2006).

### 3.2. La protéine FilGAP

La régulation des protéines G monomériques est un processus fortement contrôlé par différents mécanismes (décrit dans le paragraphe 3.1.2). La protéine FilGAP est un membre des protéines GAP qui diminuent l'activité de Rac. Elle fait partie de la famille ARHGAP (*Aplysia Ras-Related homologue GAP*) composée de 3 membres : ARHGAP 22, ARHGAP 24 (FilGAP) et ARHGAP 25. Le membre principal de cette famille, la protéine FilGAP régule de façon spatiotemporelle et dynamique l'activité de la protéine rac pour limiter son effet. Le nom FilGAP provient de son association avec la Filamine A et de sa fonction GAP (Sanz-Moreno et coll., 2008; Saito et coll., 2012). Pour agir sur l'activité de Rac, FilGAP doit préalablement être phosphorylée par la voie RhoA/ROCK et localisée adéquatement dans la cellule.

#### 3.2.1. Gènes et isoformes

Cette famille est composée de 3 gènes, *ARHGAP22*, *ARHGAP24* et *ARHGAP25* localisés sur les chromosomes 10, 4 et 2 respectivement. Le premier gène identifié est *ARHGAP24* en 2004 par l'équipe de Katoh mais il a fallu attendre 2006 pour identifier son rôle (Katoh et Katoh, 2004; Tcherkezian et Lamarche-Vane, 2007). Le gène *ARHGAP24* subit un épissage alternatif conduisant à 4 isoformes : FilGAP, p73RhoGAP, p68RacGAP et ARHGAP24-4. Ces isoformes ne diffèrent que de quelques acides aminés au niveau du domaine d'homologie à la pleckstrine dans la partie N-terminale (Figure n°19).



**Figure 19 :** Structure des 4 isoformes de FilGAP. La partie N-terminale est composée d'un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH ; orange), d'un domaine GTPasique (GAP, rose), des 6 principaux sites de phosphorylation, du domaine de dimérisation (CC, vert) et de la séquence d'interaction avec la FLNa (bleu). La structure varie essentiellement au niveau du domaine d'homologie à la pleckstrine. D'après (Nakamura, 2013)

### 3.2.2. Structure de la protéine

La structure et le rôle de FilGAP sont caractérisés pour la première fois en 2006 (Ohta et coll., 2006). Elle est composée de 750 acides-aminés (80 kDa) et comporte de 3 principaux domaines (Figure n°19) :

- Le domaine d'homologie à la Pleckstrine (PH) : Comme la majorité des protéines GAP, elle possède un domaine PH, en position N-terminale, participant à sa localisation à la membrane. Ce recrutement rapproche FilGAP de la protéine Rac-GTP pour diminuer son activité. Le domaine PH interagit préférentiellement avec les phospholipides membranaires PIP2 (3,4) et le PIP3. Cependant, ce domaine PH n'est pas présent dans les 3 autres isoformes (Kawaguchi et coll., 2014a).

- Le domaine GAP : Il est situé juste après le domaine PH et donne sa fonction à la protéine. Il permet de diminuer l'activité de Rac en augmentant la cinétique d'hydrolyse du GTP en GDP. Le domaine GAP est sous le contrôle de différents sites de phosphorylation situés juste après du côté C-terminale. Ces sites sont phosphorylés par la Rho-Kinase (ROCK), l'effecteur principal de RhoA. Elles ont lieu sur 6 sérines différentes dont la principale est la sérine S402. Ces sites de phosphorylation sont importants pour l'activité GAP de la protéine puisque une construction où ces sites ont été substitués par des alanines conduit à une protéine dominante négative c'est-à-dire sans effet sur l'activité de Rac (Ohta et coll., 2006).

- Le domaine « coil-coiled » (CC) : Le domaine CC situé en C-terminal favorise la dimérisation de la protéine. Cette dimérisation est nécessaire pour que la protéine FilGAP soit fonctionnelle. En effet, une délétion du domaine CC de FilGAP ne diminue plus l'activité de Rac du fait d'un défaut de localisation cellulaire (Ohta et coll., 2006). Ce défaut de localisation est dû à une courte séquence de 10 acides aminés située juste après le domaine CC. Elle est impliquée dans l'interaction avec les 23<sup>e</sup> domaines répétés de la FLNa. Cette séquence contrôle l'activité de FilGAP en le maintenant ou le libérant lorsque cela est nécessaire. Cette interaction nécessite une coopération complète entre FilGAP et la FLNa. Elle est similaire à celle des intégrines  $\beta$  ou des glycoprotéines 1b $\alpha$  avec les domaines répétés 21 et 17 de la FLNa, respectivement (Nakamura et coll., 2009). La protéine FilGAP interagit uniquement avec la FLNa car les 23<sup>e</sup> domaine répète des FLNb et c sont différents (Razinia et coll., 2012).

### 3.2.3. Localisation de FilGAP

L'expression tissulaire de FilGAP est liée à son interaction avec la FLNa. En effet, les tissus qui expriment la FLNa expriment également la protéine FilGAP. Elle est présente dans les reins et les valves cardiaques où des pathologies liées à des mutations de FilGAP ont pu être identifiées (Akilesh et coll., 2011). L'isoforme 2 (p73RhoGAP) est retrouvé de la même façon dans les muscles lisses vasculaires et dans l'endothélium (Su et coll., 2004).

La localisation cellulaire de FilGAP est influencée par son rôle. Elle est localisée dans les structures enrichies en actine filamenteuse (lamellipodes) en même temps que la FLNa. Elle est également présente au niveau des adhésions focales et de la membrane plasmique pour agir sur l'activité de Rac (Ohta et coll., 2006; Akilesh et coll., 2011; Saito et coll., 2012).

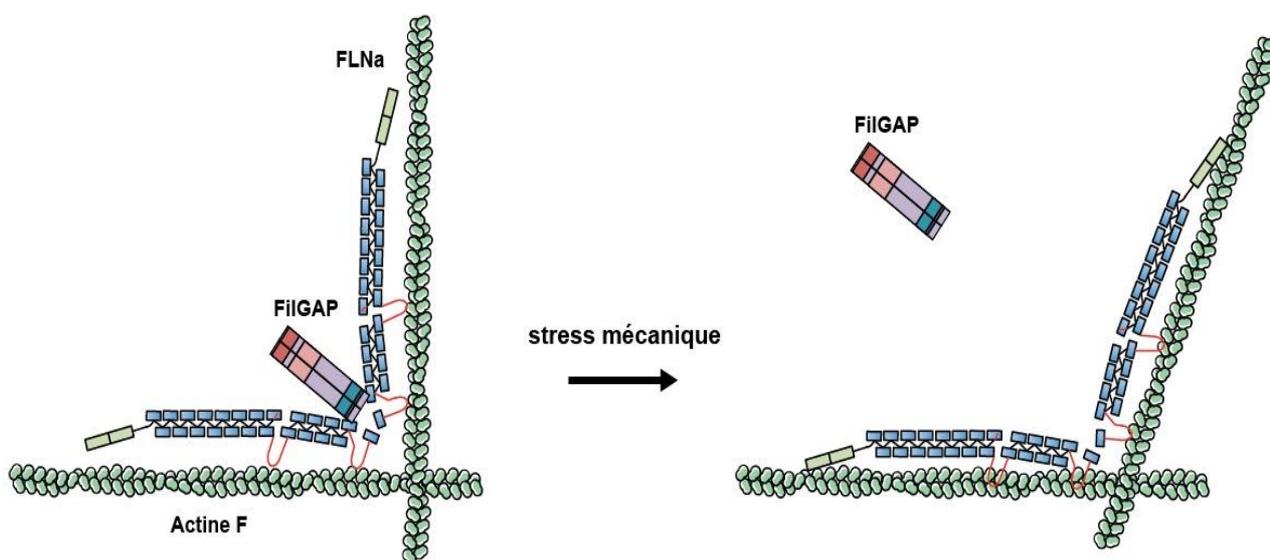
### 3.2.4. Fonction de FilGAP.

La fonction principale de FilGAP est de diminuer l'activité de Rac. La conséquence directe sur le cytosquelette d'actine est une diminution de la formation des protrusions membranaires. Les 3 domaines (PH, GAP et CC) de FilGAP ont leur importance dans la diminution l'activité de Rac puisqu'une délétion de l'un de ces 3 domaines conduit à une protéine inactive. En effet, une délétion du domaine PH de FilGAP ne diminue plus l'activité de Rac à cause d'un défaut d'adressage à la membrane (Kawaguchi et coll., 2014a). Le domaine GAP est sous la dépendance de sites de phosphorylation. Ces sites sont phosphorylés par la voie Rho/ROCK et participe également à son association avec d'autres composants cellulaires notamment la protéine Arf6 ou bien de se libérer de son interaction avec la FLNa (Kawaguchi et coll., 2014b). In vivo, l'activité GTPasique de FilGAP est dépendante de la présence de la FLNa. Lorsque la FLNa est co-exprimée avec FilGAP, l'activité de Rac diminue de façon drastique alors que l'absence de FLNa n'affecte pas l'activité de Rac (Ohta et coll., 2006).

La diminution de l'activité de Rac par FilGAP intervient surtout lors de la réponse à un stress mécanique pour le renforcement des adhésions focales. Le rôle mécanosenseur de FilGAP a été mis en évidence par Shifrin et collaborateurs (Shifrin et coll., 2009). Dans des conditions où les cellules ne sont pas soumises à un stress mécanique, La FLNa est liée au cytosquelette d'actine pour l'organiser et le stabiliser. Dans le même temps, elle interagit également avec FilGAP dans sa partie C-terminale. Lors d'un stress mécanique, la déformation du cytosquelette d'actine étire la FLNa ce qui à pour conséquence de rompre l'interaction FLNa-FilGAP. FilGAP est alors libérée à proximité de la membrane plasmique pour diminuer l'activité de Rac. Ce mécanisme est important dans la réponse au stress mécanique puisqu'une fois FilGAP libérée, la FLNa interagit avec les intégrines  $\beta$  pour renforcer le lien la membrane et le cytosquelette (figure n°13 et n°20) (Ehrlicher et coll., 2011b).

Cependant, le comportement de FilGAP est dépendant de sa localisation cellulaire et de sa disponibilité. Il a été démontré une différence d'action lorsque FilGAP est située au niveau du réseau

d'actine ou au niveau des adhésions focales. Lors de l'assemblage des lamellipodes, la concentration de FLNa et d'actine corticale est élevée pour permettre de structurer le lamellipode. La FLNa retient FilGAP limitant son effet sur Rac. Au niveau des adhésions focales, la FLNa se lie fortement aux intégrines pour maturer ces sites d'adhésions et maintenir l'intégrité de la cellule. Dans ce cas précis, FilGAP n'étant plus associée à la FLNa, elle se lie avec les phospholipides membranaires pour diminuer l'activité de Rac (Ehrlicher et coll., 2011b; Shifrin et coll., 2012). La contraction des fibres actomyosines produite lors du démantèlement des adhésions focales libère FilGAP qui est recyclée dans différentes zones de la cellule atténuant ainsi son effet sur Rac. Cela permet le renforcement des nouvelles protrusions en facilitant la polymérisation de l'actine par Rac.



**Figure 20 :** Représentation schématique de la libération de FilGAP lors d'un stress mécanique. La FLNa (en bleu) interagit avec les filaments d'actine (en vert) de façon à les maintenir structurés. Dans des conditions non stressées, la FLNa retient FilGAP dans sa partie C-terminale. Lors d'un stress mécanique, les filaments d'actine F s'écartent entraînant la FLNa avec eux. Cela diminue l'interaction FLNa-FilGAP et libère FilGAP dans la cellule. D'après (Ehrlicher et coll., 2011b).

FilGAP est impliquée dans les processus de migration et notamment dans les transitions amoéboïdes et mésenchymales observées dans les cellules cancéreuses. La migration mésenchymale est caractérisée par l'allongement du front de migration sous la dépendance de l'activité de Rac. À l'opposé, la migration amoéboïde est caractérisée par des cellules rondes avec de nombreux « blebs » membranaires indiquant un manque de polarité et une instabilité de la membrane plasmique. Lorsque l'expression de FilGAP est diminuée à l'aide d'un siRNA, les cellules présentent une migration de type mésenchymale alors que sa surexpression conduit à une migration de type amoéboïde (Sanz-Moreno et coll., 2008; Saito et coll., 2012). Ces observations sont cohérentes avec les effets de

FilGAP sur l'activité de Rac et l'impact que cela a sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Ces observations ont également été montrées grâce à des constructions dominantes négatives de FilGAP. En effet, lorsque le domaine PH ou le domaine GAP de FilGAP est retiré, le nombre de « blebs » à la membrane diminue suggérant l'implication de FilGAP dans la régulation du cytosquelette et la stabilité membranaire (Kawaguchi et coll., 2014b).

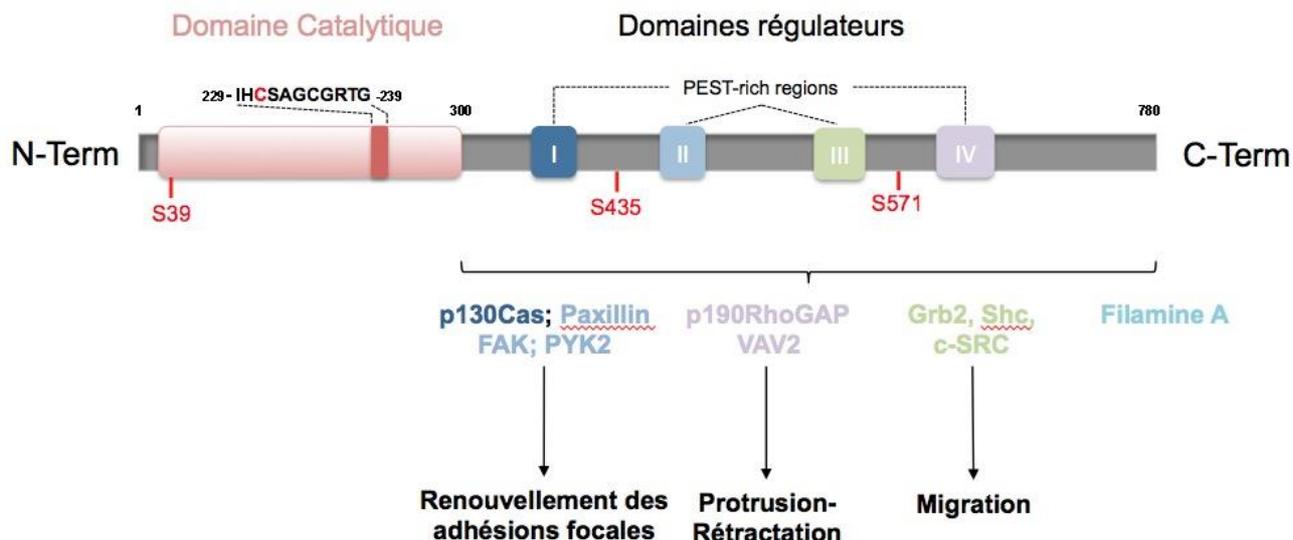
### 3.3. La tyrosine phosphatase PTP-PEST

Le contrôle de la phosphorylation des protéines est très important puisqu'une régulation aberrante de la phosphorylation conduit à une instabilité de la protéine, une altération des interactions protéine-protéine souvent identifiées dans des processus pathologiques tels que les cancers (Hunter, 2009). Cette régulation de la phosphorylation est assurée par les tyrosines phosphatases. Il existe plus d'une centaine de membres codés par le génome humain (Alonso et coll., 2004). Ces tyrosines phosphatases sont classées en 2 groupes : les récepteurs transmembranaires et les protéines libres dans le cytosol (Tonks, 2006). Ces protéines déphosphorylent de nombreux partenaires leur conférant ainsi un rôle important dans la régulation de différents processus cellulaires. Parmi tous ces membres, la tyrosine phosphatase PTP-PEST a été identifiée pour interagir avec la FLNa dans les 8 premiers domaines répétés (décrit dans la partie projet n°1-résultats complémentaires).

#### 3.3.1. Structure de la protéine

La protéine PTP-PEST fait partie de la classe des tyrosines phosphatases libres dans le cytosol. Le gène *PTPN12* est localisé sur le chromosome 7 et code pour la protéine tyrosine phosphatase-PEST. Elle est composée de séquences riches en proline (P), glutamate (E), sérine (S) et thréonine (T) (Takekawa et coll., 1992; Yang et coll., 1993). Elle est composée 720 acides aminés comportant 2 parties principales distinctes. La première partie, située du côté N-terminale, contient le domaine catalytique de la protéine qui est composé de 300 acides aminés. Ce domaine catalytique confère à la protéine son activité phosphatase. Il contient une signature particulière entre les acides aminés 229 et 239 correspondant à un domaine phosphatase spécifique contre certaines protéines. La cystéine en position 232 joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'activité phosphatase. La seconde partie, située quant à elle dans la partie C-terminale, contient la partie régulatrice de la protéine avec les séquences PEST. Le rôle de cette région est de réguler l'interaction de PTP-PEST avec ses substrats et ses protéines adaptatrices (Davidson, 2001). La protéine PTP-PEST possède également 3 sites de phosphorylation sur des sérines qui régulent son activité. La FLNa a été décrite comme interagissant au niveau du domaine IV de la partie régulatrice (figure n°21) (Playford et coll., 2006).

. La protéine PTP-PEST est exprimée de façon ubiquitaire dans une grande variété de tissus. Cependant, son niveau d'expression est plus élevé dans le système hématopoïétique (thymus, rate et foie), le cerveau et le cœur. Elle joue un rôle important lors de l'embryogenèse puisque son absence entraîne une mort in utero avec notamment des défauts de vascularisation et des malformations hépatiques (Sirois et coll., 2006)



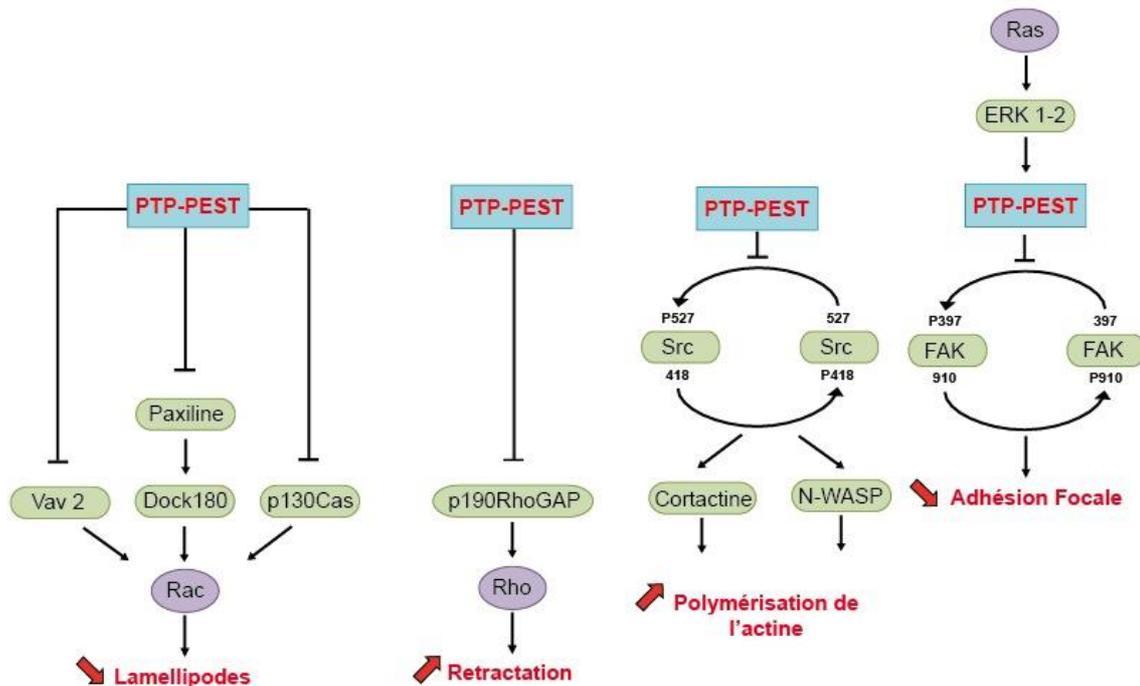
**Figure 21 :** Représentation schématique de la structure de PTP-PEST. La partie N-terminale contient le domaine catalytique de la protéine (en rose) où une séquence de 10 acides-aminés est essentielle pour son activité notamment la cyétsine (en rouge). La 2<sup>e</sup> partie contient 4 domaines PTP-PEST (I-IV) qui vont interagir avec de nombreux partenaires. Le domaine IV est celui qui interagit avec la FLNa. Elle possède également 3 sites de phosphorylation (S39-S435-S571). D'après (Veillette et coll., 2009)

### 3.3.2. Mécanismes de régulation de PTP-PEST

La protéine PTP-PEST est aussi sujette à un certain nombre de mécanismes régulateurs. La protéine PTP-PEST est phosphorylée sur les sérines 39, 435 et 571 par la PKA et la PKC. Seule la phosphorylation sur la sérine 39 est indispensable à l'activité phosphatase de la protéine. En effet, une fois phosphorylée, elle conduit à une diminution de l'activité phosphatase de PTP-PEST en réduisant son affinité pour ses substrats (Garton et Tonks, 1994). Récemment, il a été démontré que la phosphorylation de PTP-PEST sur la sérine 571 est réalisée via la voie RAS/ERK1-2. L'effet direct de cette phosphorylation est d'augmenter son interaction avec la « Focal Adhésion Kinase (FAK) ». La tyrosine 397 de la protéine FAK est alors déphosphorylée ce qui favorise la migration métastatique (figure n°22) (Zheng et coll., 2009). La protéine PTP-PEST est oxydée sur le résidu cystéine du domaine catalytique ce qui le rend inactif. Ce processus est réversible et permet un contrôle de la protéine dans des conditions de stress oxydatif (Tonks, 2005). La protéine PTP-PEST subit également le processus de protéolyse. Ce phénomène est observé durant l'apoptose où PTP-PEST est clivée par la caspase 3. Cela permet le détachement de la cellule en dégradant les points focaux (Halle et coll., 2007).

### 3.3.1. Rôle de la protéine

En régulant la phosphorylation de nombreuses protéines, PTP-PEST participe de façon importante aux processus d'étalement et de migration notamment via la régulation des adhésions focales (Östman et coll., 2006). Les adhésions focales favorise le contact entre la MEC et le cytosquelette d'actine, sont le siège de nombreuses phosphorylations/déphosphorylations réalisées par des kinases et des phosphatases. La protéine PTP-PEST régule l'activité de protéines telle que FAK, p130cas, paxilline et SRC. Par exemple, une fois les intégrines activées par la MEC, la protéine FAK s'auto-phosphoryle permettant l'interaction avec la protéine SRC qui s'auto-phosphoryle à son tour. La phosphorylation de ces 2 kinases, FAK et SRC active des effecteurs tels que p130Cas pour adapter la réponse cellulaire à l'engagement des intégrines en renforçant les adhésions focales. La tyrosine PTP-PEST intervient dans le contrôle de la déphosphorylation de ces protéines ce qui limite la formation des adhésions focales et améliore la migration (figure n°22) (Garton et coll., 1996; Shen et coll., 2000).



**Figure 22 : Voies de signalisation de PTP-PEST.** PTP-PEST est impliquée dans la régulation des points focaux. PTP-PEST va limiter la formation des lamellipodes en bloquant les GEF de Rac et en favorisant la rétraction à l'arrière de la cellule tout en maintenant Rho actif. Elle intervient dans la régulation du cytosquelette d'actine et permettent sa polymérisation. Elle participe au processus de migration cancéreuse en diminuant la formation des adhésions focales.

De plus, PTP-PEST agit sur l'activité des protéines G monomériques en permettant un couplage coordonné des phénomènes de protrusions membranaires et rétractation de la cellule lors des processus de migration. La protéine PTP-PEST limite l'activité de Rac à travers la déphosphorylation

de la protéine Vav 2, l'une GEF de Rac. Elle agit également sur l'activité de RhoA à travers la déphosphorylation de p190RhoGAP qui est incapable d'inhiber RhoA (figure n°22).

Ainsi, la protéine PTP-PEST participe à la régulation spatio-temporelle des protéines G monomériques lors des différents processus cellulaires (Sastry et coll., 2006).

**- Objectifs -**

Ces dernières années, l'avancée de nouvelles technologies dans le domaine de la génétique mais aussi grâce à l'efficacité de recrutement des patients isolés ou familiaux présentant un PVM au CHU de Nantes, nous ont permis d'identifier de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans le développement de ces atteintes valvulaires non syndromiques. L'objectif de notre travail est de mettre en évidence des relations entre les mutations des gènes identifiées et les mécanismes physiopathologiques sous-jacents. En 2006, notre équipe a été la première à identifier le gène *FLNA* comme responsable d'une dystrophie valvulaire non syndromique. Cependant, à cette époque, aucun lien direct n'a pu être établie entre les mutations d'une protéine de liaison au cytosquelette d'actine et de graves régurgitations mitrales dans le cadre de du PVM.

C'est dans ce contexte qu'au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à identifier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces atteintes valvulaires non syndromiques.

Mon premier projet a porté sur l'étude des mutations G288R et P637Q de la FLNa dans un modèle de mélanome humain. Cette étude a permis de mettre en évidence une dérégulation de l'activité des protéines G monomérique en faveur d'une augmentation de l'activité de RhoA et d'une diminution de l'activité de Rac. Cette dérégulation est due à la protéine FilGAP dont l'interaction avec la FLNa est diminuée (publication n°1). La suite de ce travail a permis de mettre en évidence un mécanisme plus complexe via la perte d'interaction entre les FLNa mutées et la tyrosine phosphatase PTP-PEST. J'ai également participé au développement d'un nouveau modèle cellulaire plus physiologique que le modèle de mélanome humain grâce aux cellules souches urinaires de patient (USC).

Mon deuxième projet a consisté à étudier les mécanismes physiopathologiques de nouvelles mutations identifiées sur le gène *ARHGAP24* dans 3 familles atteintes de PVM. Ce gène code pour la protéine FilGAP décrit précédemment pour être impliquée dans la physiopathologie des mutations de la FLNa. Les mutations de FilGAP conduisent à des protéines non fonctionnelles qui ne permettent plus d'inhiber l'activité de Rac (publication en cours de soumission).

**- Matériel et méthodes -**

## **1. Culture cellulaire**

L'une des difficultés de ces projets repose sur le fait d'utiliser un modèle cellulaire adéquat pour identifier des mécanismes physiopathologiques potentiels liés aux mutations de la FLNa ou de FilGAP. Par exemple, le fait que la FLNa soit une protéine ubiquitaire rend la tâche plus difficile pour trouver un modèle pertinent pour étudier les effets des mutations. Dans le cadre du projet FLNa, le modèle cellulaire principalement utilisé est le mélanome humain dont la caractéristique est l'absence d'expression de la FLNa. Dans le cadre du projet FilGAP, le modèle utilisé est le modèle HEK car le niveau d'expression de FilGAP est faible et il est facilement transfectable pour identifier l'impact de ces mutations.

### **1.1. Les cellules de mélanome humain (M2/A7)**

En 1992, Cunningham et son équipe ont étudié le comportement d'une lignée de mélanomes humains dont la caractéristique principale est l'absence d'expression de la FLNa (la lignée M2). La restauration de la FLNa sauvage dans cette lignée a permis la création d'une nouvelle (la lignée A7) (Cunningham et coll., 1992). Ces lignées cellulaires ont été obtenues auprès du Dr Nakamura de l'Université de Harvard à Cambridge. La lignée M2 a été utilisée pour réaliser des clones stables exprimant la FLNa WT, G288R et P637Q. Ces cellules sont cultivées dans un milieu minimum de culture (MEM $\alpha$ ) supplémenté avec du sérum de veau nouveau né (8% SVNN), du sérum de veau fœtal (2% de SVF) ainsi que 100 unité.ml<sup>-1</sup> de pénicilline et 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de streptomycine. Un agent de sélection, la Généticine (G418) à 200  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>, est présent pour maintenir l'expression de la FLNa sauvage ou mutée. Elles sont maintenues en culture sous une atmosphère contrôlée de 5% de CO<sub>2</sub> et une température de 37°C. Les cellules ne nécessitent pas de support d'adhésion particulier (collagène ou fibronectine) pour la culture continue.

### **1.2. Les cellules de Fibrosarcome (HT1080)**

La lignée de fibrosarcome HT1080 a été obtenue auprès du Dr Lutz de l'Université de Toulouse. Ces cellules incorporent de façon stable un plasmide codant pour un shRNA contre la FLNa (Baldassarre et coll., 2009). Les FLNa shRNA résistante sauvage ou mutée sont ainsi ré-exprimées de façon transitoire. Le milieu de culture est composé de DMEM (Gibco), 10% de SVF, 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de streptomycine et 100 unité.ml<sup>-1</sup> de pénicilline. L'agent de sélection utilisé pour maintenir l'expression du shRNA est la puromycine (2  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>, Sigma). Elles sont cultivées sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub> et une température de 37°C et ne nécessite pas de support particulier pour d'adhésion.

### **1.3. Les cellules Humain Embryonic Kidney (HEK)**

Les cellules HEK proviennent de cellules embryonnaires de rein humain qui ont été immortalisées par transfection avec l'antigène T d'un mutant du virus SV40. Elles ont été utilisées principalement dans l'étude des mutations de FilGAP. Les conditions de culture sont identiques à celles des HT1080 excepté pour l'agent de sélection qui n'est pas ajouté.

### **1.4. Les cellules souches urinaires de patient (USC)**

Les cellules souches urinaires (USC) sont obtenues à partir de l'urine de patient. L'intérêt de ce modèle est l'expression endogène de la mutation ainsi que la nature non invasive de leur obtention. Nous travaillons en collaboration avec l'équipe de Karim Si-Tayeb (*L'institut du thorax*, U1087) qui s'est spécialisée dans l'obtention de ces cellules pour les différencier en IPS pour les reprogrammer par la suite (Zhang et coll., 2008; Bharadwaj et coll., 2011). Etant donné la difficulté d'obtenir des IPS, nous avons décidé d'utiliser les USC comme un modèle pertinent pour mettre en évidence un mécanisme physiopathologique.

Les urines de patients (30-200 ml) sains ou atteints de valvulopathies sont collectées dans un tube stérile par les médecins/ARC du CHU. Il faut noter que le délai d'isolement doit être rapide car les cellules « baignent » dans un environnement acide, avec des métabolites toxiques et une pression osmotiques anormales. Les échantillons sont centrifugés à 400g durant 10 min à température ambiante puis resuspendus dans un milieu de culture d'épithélium rénale et de cellules mésenchymateuses (RE/MC) contenant un kit de différents facteurs de croissance REGM (Renal Epithelial Growth Medium, Lonza), du DMEM concentré en glucose (4,5 g.L<sup>-1</sup>) et supplémenté avec 10% sérum fœtale de bovin (FBS), 1% de GlutaMAX, 1% d'acides-aminés non essentiels, 100 unité.ml<sup>-1</sup> de pénicilline et 100 µg.ml<sup>-1</sup> de streptomycine, 5 ng.ml<sup>-1</sup> b-FGF, 5 ng.ml<sup>-1</sup> PDGF-AB et 5 ng.ml<sup>-1</sup> EGF. Ce milieu doit être protégé de la lumière et utilisé rapidement car les facteurs de croissance se dégradent. Les USC sont mises à adhérer dans un puits de plaque 12 puits recouvert de 0,1% de gélatine. Les premières cellules apparaissent au bout de 4 jours de culture et sont amplifiées jusqu'à 80-90% de confluence. Elles sont décollées avec de la trypsine-LE (Gibco), centrifugées à 500g pendant 2 minutes puisensemencées dans des boîtes de culture pour être amplifiées. Elles sont soit utilisées soit congelées. Elles prolifèrent de façon importante durant les 4 premiers passages puis cela s'estompe vers les passages 6 à 7 (Zhou et coll., 2012).

## 2. Transfections, anticorps et traitement chimique

### 2.1. Les plasmides

#### 2.1.1. Purification de l'ADN plasmidique

Les séquences codantes pour les différentes protéines étudiées sont insérées dans différents vecteurs plasmidiques. Ces plasmides sont introduits dans les bactéries selon 2 procédés différents :

- Choc thermique : 50  $\mu\text{l}$  de bactéries d'E.coli XL1-blue one sont chauffées à 42°C pendant 35 secondes pour y incorporer entre 1-10 ng de plasmides. Les bactéries sont placées dans la glace pendant 2 min.
- Électroporation : 50  $\mu\text{l}$  de bactéries d'E.coli BL21 électrocompétentes sont mélangées avec 1-10 ng de plasmides. Le mélange est placé dans une cuve à électroporation puis soumis à un courant de 1,8 kV et une capacitance de 2,5 M $\Omega$  durant 4,3 ms.

Une fois le plasmide incorporé (choc thermique ou électroporation), les bactéries sont resuspendues dans 10 ml de milieu LB pendant 1h à 37°C avant d'en étaler quelques  $\mu\text{L}$  sur une boîte de LB-agar contenant l'antibiotique de sélection (100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'ampicilline ou kanamycine). Après une nuit à 37°C, une colonie de bactérie est prélevée puis amplifiée toute la nuit dans 200 ml de LB - antibiotique. Les plasmides amplifiés par les bactéries sont purifiés selon le protocole de « Maxiprep » ou de « Miniprep » de la société Quiagen. La concentration des plasmides est déterminée par la lecture de la densité optique à 280 nm (Nanodrop). Les plasmides sont aliquotés à une concentration de 1  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  et sont conservés à -20°C.

#### 2.1.2. Transfections des plasmides

Les cellules sont transfectées grâce à 2 agents différents présentant des taux de transfections variables en fonction du type cellulaire utilisé. Pour les lignées stables, les cellules sontensemencées à 80 % de confluence (entre 6 à 8.10<sup>5</sup> cellules pour un puits 35 mm de  $\varnothing$ ). Après 16h de culture, elles sont transfectées soit avec de la « Lipofectamine 2000 » (Invitrogen) soit avec de la « Genecellin » (BioCellChallenge). En ce qui concerne la lipofectamine, le ratio utilisé de lipofectamine ( $\mu\text{l}$ ) - plasmide ( $\mu\text{g}$ ) est de 1 : 1 (3  $\mu\text{g}$  pour 3  $\mu\text{l}$  pour un puits 35 mm de  $\varnothing$ ). La lipofectamine et les plasmides sont complexés pendant 30 min à température ambiante dans 500  $\mu\text{l}$  de milieu optiMEM (Gibco) avant d'être déposés sur les cellules. Pour la Genecellin, le ratio utilisé de Genecellin ( $\mu\text{l}$ ) – plasmide ( $\mu\text{g}$ ) est de 4 :1 (8  $\mu\text{l}$  pour 2  $\mu\text{g}$  pour un puits 35 mm de  $\varnothing$ ). Les complexes sont formés pendant 15 minutes dans de l'optiMEM puis déposés sur les cellules.

Elles sont utilisables 24h à 48h après la transfection. La seule exception concerne les expériences de FRAP (décrit dans le paragraphe 3.5) où l'on ne dépasse pas 16h de transfection pour

éviter une surexpression trop importante de la protéine. Le taux de transfection est estimé, en fonction du plasmide, par fluorescence et le niveau d'expression de la protéine par western blot.

L'avantage de la Genecellin est sa faible toxicité comparée à celle de la lipofectamine. Elle n'affecte que très peu la morphologie cellulaire et présente un taux de transfection supérieur à 70% (estimation à partir de la fluorescence). L'inconvénient majeur est que ces 2 agents de transfections ne sont pas efficaces sur les lignées primaires. La lipofectamine est utilisée préférentiellement pour les expériences de biochimies et la Genecellin pour les expériences fonctionnelles.

## 2.2. Les siRNA

Les siRNA sont utilisés pour diminuer voir éteindre l'expression de diverses protéines. Les siRNA ont été obtenus auprès de la société Eurogentec. La transfection des siRNA est effectuée avec de la « Lipofectamine RNAi max » (Invitrogen). Semblable à la lipofectamine 2000, le ratio siRNA (pMoles) - Lipofectamine ( $\mu$ l) est de 100 : 3 (100 pMoles pour 3  $\mu$ l pour un puits 35 mm de  $\varnothing$ ). Ils sont complexés dans de l'OptiMEM pendant 30 min avant d'être déposés sur les cellules. L'effet des siRNA est visible au bout de 36h et est estimé par western blot.

## 2.3. Anticorps, réactifs et traitement chimiques

Les tableaux, ci-dessous, répertorient les différents réactifs utilisés dans les expériences :

**Tableau 2 : Liste des différents réactifs utilisés**

Produits	Fonction	Reference	Fournisseur	Concentration utilisée
Fibronectine	"coating"	F2006	Sigma	20 $\mu$ g.ml <sup>-1</sup>
Collagène	"coating"	A1048301	Gibco	1,5 mg.ml <sup>-1</sup> ; 20 $\mu$ g.ml <sup>-1</sup>
Y27632	inhibiteur de ROCK	Y-0503	Santa Cruz	10 $\mu$ M
NSC 23766	inhibiteur de Rac	2161	Tocris	10 $\mu$ M
EHT 1864	inhibiteur de Rac	3872	Tocris	10 $\mu$ M
Lipofectamine 2000	agent de transfection plasmide	11668019	Sigma	
Lipofectamine RNAi max	agent de transfection siRNA	13778075	Gibco	
Genecellin	agent de transfection plasmide	GC1000	BioCellChallenge	

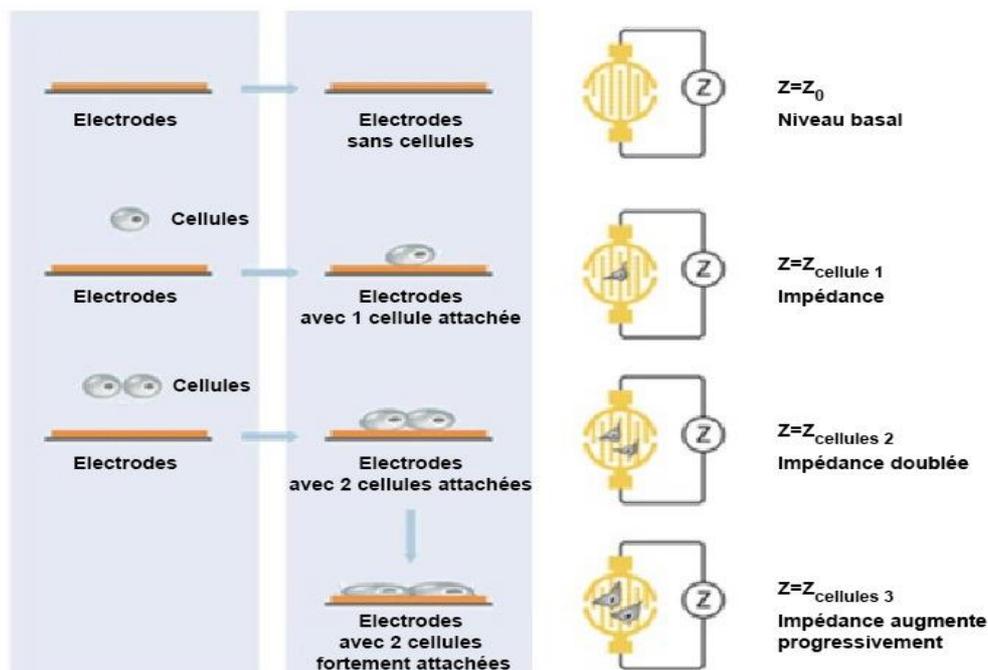
**Tableau 3 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés lors des différentes expériences**

<u>Anticorps</u>	<u>Références</u>	<u>Fournisseur</u>	<u>Espèces</u>	<u>WB</u>	<u>IF</u>
Anti $\beta$ -Actin	A5316	Sigma	Souris	1/500	
Anti CD31	550300	BD bioscience	Souris	1/250	1/250
Anti eGFP	632569	clontech	Souris	1/500	1/1000
Anti Erk	sc-93	Santa Cruz	Lapin	1/500	
Anti FAK	6543	Millipore	Lapin	1/500	
Anti Filgap	HPA014288	Sigma	Lapin	1/500	
Anti FLNa	Mab 1678	Millipore	Souris	1/500	1/1000
Anti GAPDH	sc-32233	Santa Cruz	Souris	1/10000	
Anti HA	clone 3F10	Roche	Rat	1/1000	1/1000
Anti ICAM	sc-7891	Santa Cruz	Lapin	1/250	1/250
Anti MYC	clone 4A6	Millipore	Mouse	1/500	
Anti MYPT	sc-25618	Santa Cruz	Lapin	1/500	
Anti p190RhoGAP	610150	BD bioscience	Souris	1/500	
Anti phosho MYPT	sc-17556	Santa Cruz	Lapin	1/500	
Anti phospho ERK	9106	Cell Signalling	Souris	1/500	
Anti phospho FAK	clone 18, 05-1140	Millipore	Souris	1/250	
Anti phospho SRC	2101	Cell Signalling	Lapin	1/500	
Anti PTPN12	clone AG25, 05-1417	Millipore	Lapin	1/1000	
Anti R-ras	sc-523	Santa Cruz	Lapin	1/500	
Anti Rac	610650	BD bioscience	Souris	1/250	
Anti Rho	67B9	Cell Signalling	Lapin	1/250	
Anti SRC	2108	Cell Signalling	Lapin	1/500	
Anti VCAM-1	sc-1504	Santa Cruz	Chèvre	1/500	1/250
Anti VE-Cadherine	D87F2	Cell Signalling	Lapin	1/500	1/250
Anti Chèvre HRP	sc-2768	Santa Cruz		1/10000	
Anti Lapin HRP	sc-2004	Santa Cruz		1/10000	
Anti Rat HRP	sc-2006	Santa Cruz		1/10000	
Anti Souris HRP	sc-2005	Santa Cruz		1/10000	
Anti Souris Alexa 488	A-11001	Invitrogene			1/2000
Anti Lapin Alexa 568	A-11011	Invitrogene			1/2000
Anti Rat Alexa 488	A-11006	Invitrogene			1/2000

### 3. Approches Fonctionnelles

#### 3.1. xCELLigence

La technologie xCELLigence® (Roche) permet de mesurer la capacité d'adhésion, d'étalement et de prolifération cellulaire en mesurant des variations d'impédance (Keogh, 2010; Rahim et Üren, 2011). Les cellules, transfectées ou non, sont décollées à l'aide d'Acutase (Gibco). Une fois décollée, les cellules sont comptées (10 000 par puits) puis sont déposées en triplicata dans une plaque 96 puits recouverte de microélectrodes d'or. La plaque est ensuite fixée sur un analyseur situé dans un incubateur. Il mesure les variations d'impédance entre les microélectrodes et les traduit en « *Cell Index (CI)* ». Le *CI* est mesuré toutes les minutes. Les valeurs obtenues sont représentées sous forme de courbes évoluant sur une période de 3 heures traduisant ainsi les processus d'adhésion et d'étalement. La pente de la courbe ( $dCI/dT$ ) entre 30 min et 1h30 permet de déterminer une vitesse d'adhésion cellulaire. Ainsi, plus la pente est forte plus les cellules adhèrent (figure n°23). Les différents agents pharmacologiques sont ajoutés en même temps que les cellules dans le puits.



**Figure 23 :** Représentation schématique du fonctionnement de L'xCELLigence. Lorsque les cellules ne sont pas présentes, l'impédance traduite en « *Cell Index* » ( $Z$ ) est à zéro. Plus les cellules vont adhérer au fond plus le *Cell Index* augmente. Les processus de prolifération et de mort cellulaire sont également observables à travers de variations du « *Cell Index* ».

### 3.2. Comblement de blessure – Wound Healing

Le technique du comblement de brèche ou « *Wound healing* » consiste à observer le comportement et la vitesse des cellules lors de la migration. Les cellules sontensemencées de façon à former un tapis cellulaire au bout de 24h. Une brèche est réalisée au centre de cette monocouche à l'aide d'un cône de pipette « p200 » puis les cellules décollées sont rincées avec du PBS. La migration des cellules pour combler la brèche est observée sous un vidéo-microscope inversé à contraste de phase (Leica DMLB) dans une enceinte à température et à atmosphère contrôlées. Des images sont prises toutes les 15 minutes sur 4 champs différents et par conditions pendant 24h. Le montage des films et l'analyse de la surface de comblement de la brèche sont réalisés à partir du logiciel FIJI.

### 3.3. Redistribution de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

Le retour de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) consiste en l'extinction localisée de la fluorescence après une exposition temporaire à un laser de forte intensité. Cette technique permet de mesurer le retour de la fluorescence dans la zone éteinte et de déterminer ainsi la motilité de la protéine marquée dans la cellule (Reits et Neefjes, 2001).

La technique de FRAP a été utilisée dans le cadre du projet 2 pour étudier la motilité de la protéine FilGAP. Le FRAP est effectué sur des cellules HT1080 à l'aide d'un microscope confocal Nikon (A1-R-Si, Plateforme d'imagerie micropicell) équipée d'un objectif à immersion d'huile (x60 N.A 1,4). Les cellules HT1080, au nombre de 50 000 par chambre d'une lame Ibidi ( $\mu$ -slide 8 chambres, Ibidi) sont transfectées avec le plasmide d'intérêt (décrite dans le paragraphe 2.1.2). L'environnement est sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C et le milieu de culture est remplacé par du milieu sans rouge phénol pour s'affranchir de l'auto-fluorescence.

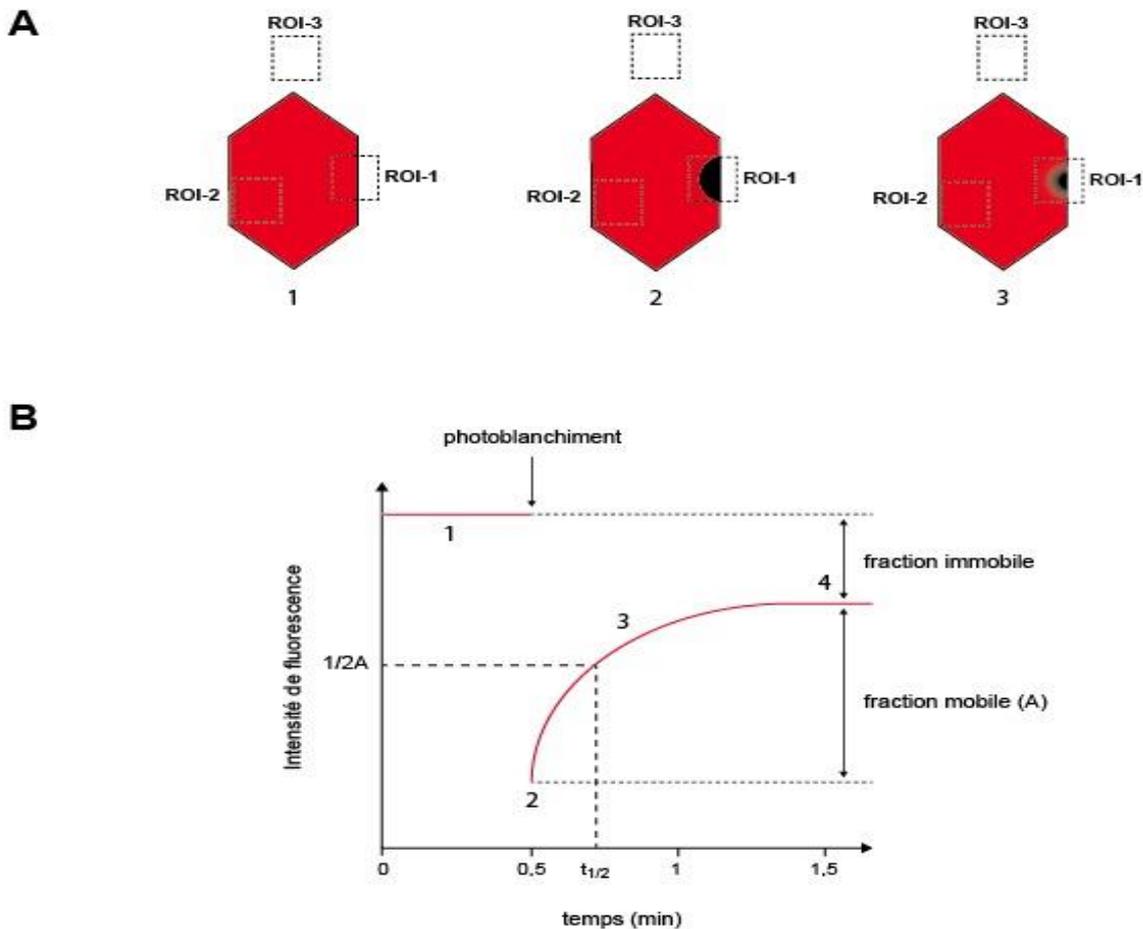
Une zone de la membrane cellulaire d'environ 1  $\mu\text{m}^2$  (Region of interest, ROI) est dessinée sur la surface cellulaire. Cette ROI est excitée par des lasers argon 488 et 568 nm pendant un laps de temps court (500 ms). La séquence d'acquisition est composé de 3 phases : 1) La mesure de l'intensité de fluorescence de base pendant 30 s à une fréquence d'acquisition d'une image toutes les 5 secondes. 2) Le photoblanchiment de la ROI par les lasers durant 500 ms. 3) La mesure du retour de l'intensité de fluorescence pendant 1 min à une fréquence d'acquisition d'une image toutes les 5 secondes (figure n°24).

L'analyse des images est effectuée avec le logiciel FIJI. Les mesures d'intensité sont effectuées sur 3 ROI différentes de taille similaire ( $\approx 1\mu\text{m}^2$ ) : Une ROI sur la zone de photoblanchiment (ROI-1), une ROI dans une zone éloignée de la ROI-1 pour déterminer l'effet du photoblanchiment (ROI-2) et une ROI en dehors de la cellule pour déterminer le bruit de fond (ROI-3) (figure 24 A). Pour obtenir la valeur moyenne de fluorescence, les valeurs de ROI-3 et ROI-2 sont soustraites à la valeur de la ROI-1. Les valeurs de fluorescence avant le photoblanchiment sont ensuite

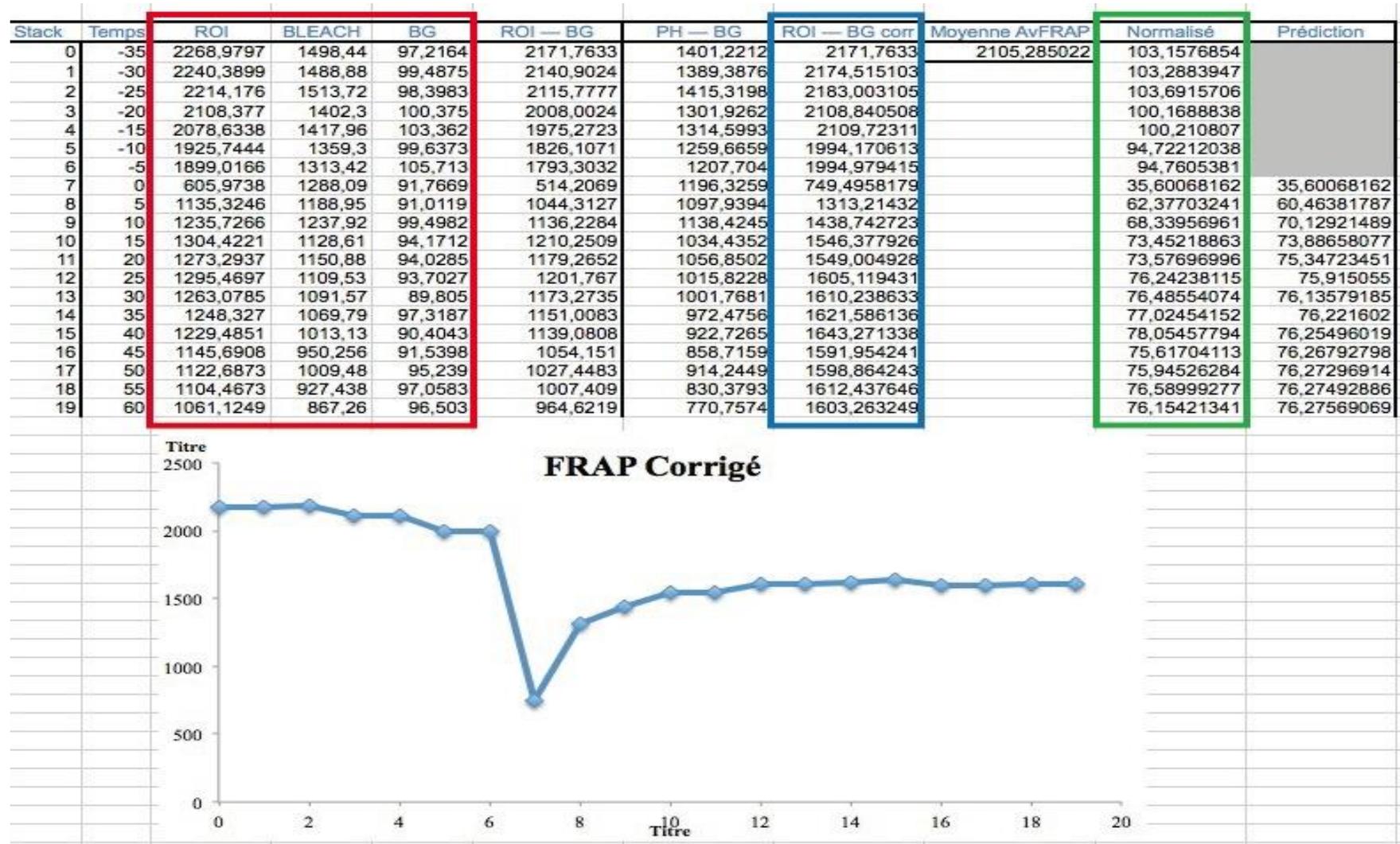
normalisées à 100% et l'évolution de l'intensité de fluorescence est exprimée en fonction de ce pourcentage (figure 25). Le blanchiment est considéré comme efficace lorsque 60 à 80% de la fluorescence est éteinte. A partir de ces mesures une courbe représentant le déroulé de la fluorescence en fonction du temps est tracée. Elle suit un déroulé monoexponentiel d'équation :

$$f(t) = A(1 - e^{-\tau t})$$

Où : A correspond à la fraction mobile,  $\tau$  correspond à la vitesse de l'exponentielle, t correspond au temps. A partir de cette équation, la fraction mobile et immobile de la protéine ainsi que le  $t_{1/2}$  ont été déterminés (figure n°24 B et figure n°25).



**Figure 24 :** Représentation schématique du mécanisme de FRAP. L'intensité de fluorescence des cellules exprimant les protéines fluorescentes est mesurée pendant 30 secondes avant d'éteindre la fluorescence. Le retour de la fluorescence est ensuite mesuré jusqu'à atteindre un plateau. Cette courbe nous permet de mesurer la fraction mobile et immobile ainsi que la  $t_{1/2}$  correspondant au temps pour obtenir 50% de la fraction mobile.



**Figure 25 :** Exemple d'une feuille d'analyse de FRAP. Les valeurs d'intensité obtenues pour chaque ROI (en rouge) permettent de déterminer l'intensité de fluorescence réelle en fonction du temps (en bleu). Ces valeurs sont ensuite normalisées exprime en pourcentage par rapport à l'intensité de fluorescence avant le blanchiment (en vert). A partir de ces valeurs, on détermine la phase de plateau ainsi que le  $t_{1/2}$

### 3.4. Compaction de gel de collagène I

Cette technique est utilisée pour étudier l'activité contractile des cellules ainsi que leurs capacités à réorganiser la matrice au sein d'un environnement 3D.

Les cellules sontensemencées à une concentration voulue ( $500\ 000\ \text{cellules.ml}^{-1}$ ) dans un volume de collagène I à une concentration finale de  $1,5\ \text{mg.ml}^{-1}$ . Pour un gel de collagène à une concentration X et de volume Y, les quantités de réactifs nécessaires sont :

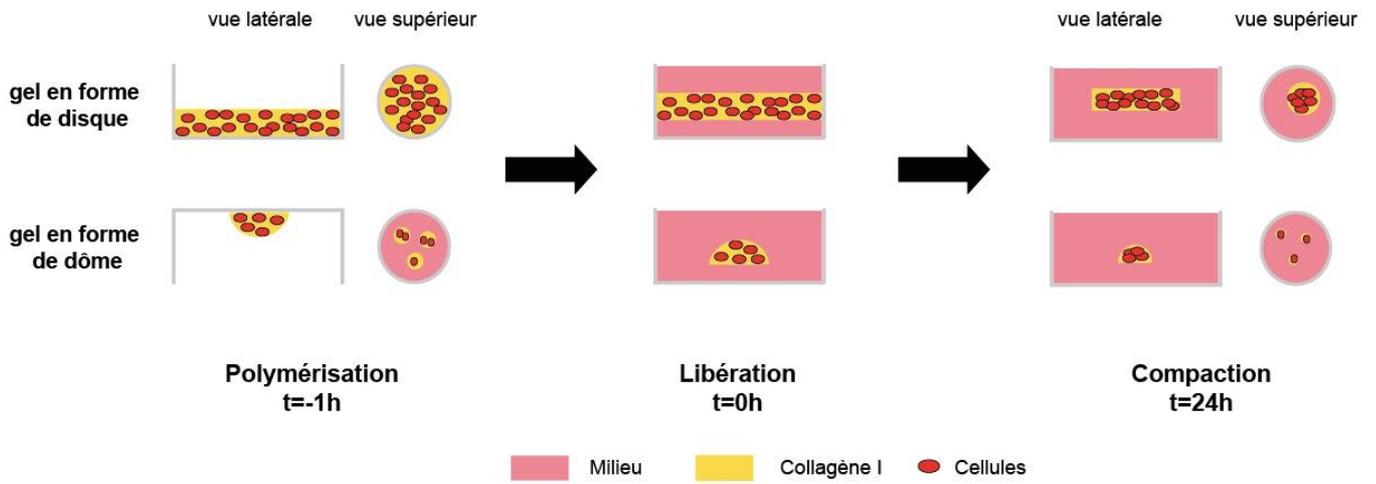
**Tableau 4 : Récapitulatif des différents volumes de réactifs pour réaliser les gels de collagène avec un exemple pour un gel de collagène de 1 ml à  $1,5\ \text{mg.ml}^{-1}$ .**

	Pour un gel de concentration X et de volume finale Y	Pour un gel à $1,5\ \text{mg.ml}^{-1}$ et de volume finale de 1 ml	
Collagène I ( $5\ \text{mg.ml}^{-1}$ ) V1	$(X) \times (Y)$ Concentration initiale de collagène	$\frac{1,5 \times 1}{5}$	0,3
PBS 10X (pH4,4) V2	V1/10	0,3 /10	0,03
NaOH 1N V3	V1 x 0,025	0,3 x 0,025	0,0075
Cellules ( $500\ 000\ \text{cellules.ml}^{-1}$ ) + milieu de culture	Y - (V1+V2+V3)	1 - (0,3+0,03+0,0075)	0,5925

Le mélange est réalisé dans un tube stérile où le collagène, le PBS et le NaOH sont mélangés. Ce mélange est complété avec le volume nécessaire de milieu et de cellules pour avoir une concentration de  $500\ 000\ \text{cellules.ml}^{-1}$  (tableau 4). Les gels de collagène sont coulés au fond des boîtes de culture selon 2 procédés :

- Soit 1 gel de  $500\ \mu\text{l}$  est coulé dans un puits de 16 mm de  $\varnothing$  puis libéré à l'aide d'une pipette pasteur stérile dont l'extrémité a été rodée pour faciliter son glissement au fond de la boîte de culture et éviter de déchirer le gel. Ceci permet de former un disque d'environ  $500\ \mu\text{m}$  d'épaisseur. Le disque contient  $250\ 000$  cellules.
- Soit plusieurs gels de  $40\ \mu\text{l}$  sont coulés au fond d'un puits de 35 mm de  $\varnothing$ . La boîte est retournée pour que la gravité facilite la formation d'un dôme. Les dômes sont libérés à l'aide de la pipette pasteur. Chaque dôme contient  $20\ 000$  cellules.

Le mélange est mis à polymériser 1h à  $37^\circ\text{C}$  sous une atmosphère de 5% de  $\text{CO}_2$ . Une fois polymérisé, le milieu de culture est ajouté et les gels sont remis dans l'incubateur pour que les cellules s'adaptent à leur environnement 3D. Au bout de 24h, le gel est détaché du fond de la boîte où il va flotter librement (figure n°26). Le gel est photographié à différents temps pour déterminer le diamètre des gels au cours du temps. Le diamètre est mesuré à l'aide du logiciel Fiji et est exprimé en fonction du diamètre à  $t_0$ . Il est possible de réaliser un immunomarquage sur les gels une fois qu'ils sont fixés



**Figure 26 : Représentation de la compaction des gels de collagène.** Les gels (en jaune) contenant les cellules (en rouge) polymérisent 1 h avant d’être libérés. Le milieu (en rose) est ajouté à ce moment là entrainant la flottaison des gels. Les schémas sont représentés en vue supérieure et en vue latérale.

## 4. Approches biochimiques

### 4.1. Extraction protéique

Les cellules sont rapidement rincées avec du PBS 1X à 4°C pour limiter la déphosphorylation et la dégradation de protéines. Elles sont lysées de façon mécanique à l'aide d'un grattoir dans un volume de tampon de lyse adéquat (tableau n°5). Le choix du tampon de lyse est déterminé en fonction du type d'expérimentation. La lyse se poursuit par une agitation à 4°C pendant 5 min afin d'augmenter son efficacité. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min, à 15 000g et à 4°C pour séparer les débris cellulaires et les noyaux du surnageant. La concentration protéique de chaque échantillon est déterminée par la méthode de coloration protéique basée sur l'acide bicinchonique (BCA, Pierce-Thermoscientific) en la comparant à une gamme étalon de BSA (0 à 2 mg.ml<sup>-1</sup>). Ceci permet d'effectuer les expériences sur des quantités normalisées de protéines (25 µg). Le dosage est effectué sur 10 µl d'échantillon dilué au 1/10<sup>e</sup> en duplicata auquel on ajoute du réactif BCA. Après une incubation de 30 min à 37°C, la densité optique est lue à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Victor X3). Tous les lysats cellulaires sont homogénéisés et aliquotés à une concentration de 1µg.µl<sup>-1</sup>, soit pour être utilisés directement soit pour être congelés à -20°C.

**Tableau 5 : Composition des différents tampons de lyse et du volume utilisé en fonction de la boîte.** Les tampons de lyse reposent sur la base d'un sel, d'un détergent et d'un tampon pH. Différents cocktails d'inhibiteurs de phosphatases sont ajoutés extemporanément. Le choix du tampon de lyse dépend de l'expérience réalisée par la suite. Le volume du tampon de lyse dépend des conditions de culture.

RhoGEF Buffer		NETF Buffer		RBD Buffer	
NaCl	150 mM	NaCl	100 mM	NaCl	500 mM
Hepes (pH7.5)	20 mM	Tris HCl (pH7.8)	50 mM	Tris HCl (pH7.8)	50 mM
Triton X-100	1%	Nonidet P-40	1%	Triton X-100	1%
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	EGTA	2 mM	SDS	0,10%
DTT	1 mM	NaF	50 mM	Déoxycholate	0,50%
PMSF	1 mM	PMSF	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
AP	1X	AP	1X	PMSF	1 mM
		Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	2 mM	AP	1X

Laemmli	
Tris HCl (pH 6,8)	65 mM
Glycérol	10%
SDS	2%
DTT	10 mM
H <sub>2</sub> O	qsp
bleu de bromophenol	pointe

Boite	Volume
6 puits (9,4 cm <sup>2</sup> )	200 µl
60 mm Ø (21,3 cm <sup>2</sup> )	600 µl

## 4.2. Séparation par affinité – « Pull Down »

Cette technique consiste à vérifier l'interaction entre différents partenaires *in vitro* grâce à des constructions peptidiques. Ces constructions peptidiques sont couplées à la Glutathione S-Transferase (GST) permettant de les lier à des billes d'agarose-glutathione.

Par exemple pour mesurer l'activité de petites protéines G monomériques, j'utilise des constructions GST-Rothekine pour RhoA (GST-RTK) et des constructions PAK Binding Domain (GST-PBD) pour Rac qui sont des cibles de ces 2 GTPases. Les constructions GST-RhoA Q63L et GST-Rac Q61L sont des constructions dominantes positives où la mutation d'un acide aminé empêche l'hydrolyse du GTP. Elles permettent de mesurer l'activité des GEF et GAP qui se fixent sur elles. Ces constructions ont été obtenues auprès de l'équipe de Gervaise Loiret de UMR 1087 – *L'Institut du thorax* (Guilluy et coll., 2011).

### 4.2.1. Production des protéines recombinantes

Les protéines de fusion ainsi que la protéine GST seule (contrôle négatif) sont produites à partir de culture bactérienne de BL 21 transformées. Un clone isolé d'une boîte de pétri est mis en pré-culture dans 50 ml de milieu LB – Ampicilline (100 µg/ml) pendant toute la nuit. Les 50 ml de bactéries sont ensuite dilués dans 500 ml de LB – Ampicilline pendant 2h à 37°C pour être amplifiées. La croissance bactérienne est mesurée toutes les 15 minutes par la mesure de la densité optique (DO). La DO de départ est au environ de 0,05 et lorsqu'elle atteint 0,8, les bactéries sont considérées en phase exponentielle de croissance. A ce moment là, la synthèse du plasmide par les bactéries est induite par l'ajout de 100 µM d'IPTG toute la nuit mais à une température de 24°C. Les bactéries induites sont aliquotées par 50 ml puis sont centrifugées à 5000g pendant 15 min à 4°C. A ce stade, les culots bactériens induits peuvent être soit lysés directement soit congelés à -20°C (conservation 1 à 2 mois).

Le culot bactérien est lysé dans 5 ml de tampon RhoGEF buffer (tableau n°5). Une fois resuspendu, il est soniqué pendant 1 min à 40% de charge à une fréquence d'1 Hz dans un bac de glace. Les lysats sont ensuite centrifugés à 27 000g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant bactérien contenant la protéine de fusion est ensuite incubé avec 500 µl billes d'agarose-glutathion (Macherey-Nagel) préalablement équilibrées dans le tampon de lyse adéquate pendant 1h à 4°C. Les billes couplées aux protéines sont lavées 3 fois avec du tampon de lyse après chaque centrifugation à 1500 g pendant 1min à 4°C. Les billes couplées aux protéines de fusion sont congelées à -20°C et conservées au maximum pendant 3 semaines dans 50% de glycérol.

Le niveau de purification des protéines de fusion est vérifié par électrophorèse pour estimer la concentration protéique fixée sur les billes en la comparant à une gamme étalon de BSA. Le gel d'électrophorèse est coloré grâce à une solution de bleu de Coomassie (65% eau, 30% méthanol, 5% acide acétique, 0.025% bleu de Coomassie) pendant toute la nuit puis décoloré dans une solution

contenant (65% eau, 30% méthanol, 5% acide acétique) jusqu'à ce que des bandes apparaissent. Une autre alternative à la coloration au bleu de Coomassie consiste à utiliser des gels à gradient « *Stain free* » (Biorad). Cette technologie permet de marquer tous les résidus tryptophanes présents et de faire apparaître les bandes grâce aux UV.

#### 4.2.2. Le Pull Down

Les cellules sont lysées dans un tampon adapté dépendant du type d'expérience réalisée. En effet, le RhoGEF buffer est utilisé pour la mesure de l'activité des effecteurs de RhoA et de Rac (GST-Rho Q63L et GST-Rac Q61L) et le RBD buffer pour la mesure de l'activité de RhoA ou de Rac (GST-RTK et GST-PBD) (décrit dans le paragraphe 4.1). Les protéines dosées sont incubées avec des billes couplées à 300 µg de protéines de fusion pendant 45 min. Le volume de bille utilisé est dépendant de la quantité de protéines de fusion fixée dessus. 25 µg de lysat total de chaque échantillon sont conservés afin de quantifier la forme totale de la protéine d'intérêt étudiée. Les billes de GST seules vont permettre de déterminer les signaux aspécifiques. Les complexes billes-protéines sont lavés 3 fois avec 1 ml de tampon de lyse et centrifugés à 1500g pendant 1 min à 4°C entre chaque lavage. Les complexes sont repris dans 50 µl de tampon de Laemmli puis chauffés à 95°C pendant 5 min pour décrocher les protéines fixées aux protéines recombinantes. Les lysats totaux et ceux issus de la séparation sont déposés sur des gels d'électrophorèse et un western blot est réalisé par la suite.

### 4.3. Co-immunoprecipitation

#### 4.3.1. Principes

Cette méthode a été mise au point initialement pour enrichir les solutions protéiques en protéines d'intérêt. Cependant, elle permet également de mettre en évidence des protéines interagissant, directement ou indirectement, avec la protéine d'intérêt.

#### 4.3.2. Protocoles

Après transfection et/ou stimulation, les cellules sont lysées dans du tampon de lyse NETF (décrit dans le paragraphe 4.1). Après le dosage protéique, une partie est prélevée (25 µg) pour déterminer la fraction totale présente dans l'échantillon et une quantité égale de protéines (entre 250 et 500 µg) est utilisée pour réaliser les immunoprecipitations. Les immunoprecipitations sont réalisées selon 2 protocoles différents :

- L'immunoprecipitation « classique » : Pour chaque échantillon, j'associe 30 µl de billes magnétiques recouvertes de protéines G (Invitrogen) avec 6 µg de l'anticorps d'intérêt. Dans un premier temps, les billes magnétiques sont rincées 3 fois avec du PBS (pH 7,4) puis incubées avec les

anticorps spécifiques des protéines à immunoprécipiter pendant 40 min à température ambiante sous une légère agitation. Les complexes billes-anticorps (B – A) sont rincés 3 fois avec 1 ml de PBS - 0,1% tween 20. Dans un second temps, les complexes B – A sont incubés avec 250 µg ou 500 µg de protéines pendant 2h à 4°C sous agitation. En parallèle, un lysat cellulaire est incubé avec un autre anticorps du même isotype que la protéine à immunoprécipiter afin de détecter le signal non spécifique (contrôle négatif). Les complexes protéines – B – A sont récupérés grâce à un portoir aimanté et lavé 3 fois comme précédemment. Les billes magnétiques sont resuspendues dans 50 µl de Laemmli (décrit dans le paragraphe 4.1) sans DTT puis elles sont chauffées 5 min à 95°C afin de décrocher les protéines des complexes billes-anticorps. Les surnageants contenant les protéines sont re-dénaturés en présence de 1 mM de DTT pendant 5 min à 95°C. Les surnageants sont déposés sur un gel d'électrophorèse (décrit dans le paragraphe 4.5) pour détecter les protéines susceptibles de former des interactions avec les protéines immunoprécipitées.

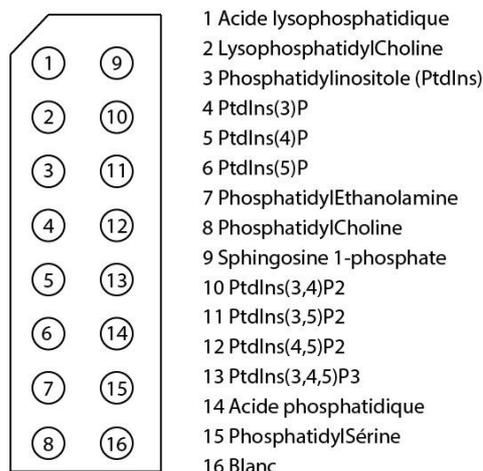
- L'immunoprécipitation « commerciale » : Le principe est le même que précédemment excepté que le complexe B – A est prêt à l'emploi (séquence HA, GFP ou C-myc). Les lysats cellulaires dosés (250 µg ou 500 µg) sont associés avec 50 µl de billes magnétiques - anticorps (Kit Milteny) pendant 30 min à 4°C. Les complexes billes magnétiques - anticorps ainsi formés sont déposés sur des colonnes préalablement équilibrées. Les colonnes sont rincées avec du tampon de rinçages (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5 % Sodium déoxycholate, 0,1% SDS, 50 mM tris HCl pH 6,8) Les protéines sont ensuite éluées dans 50 µl de tampon d'éluion proche du Laemmli (50 mM Tris HCl pH 6,8, 50 mM de DTT, 1% SDS, 1 mM EDTA, 10% glycerol, bleu de bromophénol) à 95°C. Les éluions sont déposées sur un gel d'électrophorèse (décrit dans le paragraphe 4.5).

#### **4.4. Test d'interaction lipide-protéine**

Le kit de « PIP Strips » (P-6001 10pk, Echelon) est constitué de membranes hydrophobes (2 x 6 cm) de nitrocellulose où ont été déposés différents « spot » de 100 pmoles de 8 phosphoinositides et de 7 autres lipides biologiques importants (figure n°27). Ces membranes permettent de déterminer si une protéine d'intérêt interagit avec un ou plusieurs lipides présents.

Les cellules transfectées transitoirement avec les différentes constructions étudiées sont lysées dans du tampon NETF (tableau 5) puis dosées. La membrane de nitrocellulose est préalablement saturée 1h dans un volume de TBS-T (≈25 ml) composé de 150 mM NaCl, de 10 mM de Tris-HCl à pH 8 et de 0,1% de tween 20 auquel 3% de BSA est ajoutée. Chaque membrane est incubée dans un volume de 2 ml de TBS-T 3% de BSA contenant 25 µg de lysats cellulaires ainsi que l'anticorps primaire spécifique (tableau n°2). Elles sont incubées toute la nuit à 4°C sous une légère agitation. La membrane est rincée 3 fois toutes les 10 min avec environ 20 ml TBS-T puis incubée avec l'anticorps secondaire spécifique couplé à la HRP pendant 1h dans 20 ml de TBS-T 3% de BSA. La membrane

est encore rincée 3 fois toutes les 10 min avec environ 20 ml TBS-T puis révélée avec le kit de détection ECL. En parallèle, un western blot est réalisé avec 25 µg de lysats cellulaires pour s'assurer d'avoir déposé la même quantité de protéines pour chaque condition (décrit dans le chapitre 4.5).



**Figure 27 :** Représentation schématique des membranes de PIP Strips. La disposition des « spots » de lipides est représentée par des ronds numérotés sur le schéma. Chaque spot contient 100 pmoles d'un lipide.

#### 4.5. Le western blot

La technique de western blot permet de révéler le niveau d'expression d'une ou de plusieurs protéines dans des lysats à l'aide d'anticorps spécifiques.

Le lysat protéique dénaturé est déposé sur un gel d'acrylamide dont le pourcentage varie en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêts (4-15%, 10% ou 12%). Le gel est alors soumis à un courant électrique d'ampérage constant (20 mA par gel). Les protéines chargées négativement par le SDS présent dans le laemmli et dans le gel d'acrylamide migrent d'autant plus rapidement qu'elles sont de faible poids moléculaire. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Transblot, Biorad) qui est ensuite incubée dans une solution de rouge Ponceau pendant 30 sec. Cette étape permet de vérifier l'efficacité du transfert et, à titre indicatif, de l'homogénéité des dépôts. Les membranes sont incubées dans une solution de tampon TBS à 0,1% de Tween 20 auquel on ajoute 5% de lait pendant 30 min afin de saturer les sites non spécifiques. Elles sont ensuite incubées toute la nuit avec l'anticorps spécifique de la protéine recherchée dilué dans une solution de TBS-T 5% de lait (tableau n°2). Les membranes sont lavées 3 fois pendant 10 min puis incubées dans une solution de TBS-T 5% de lait contenant un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire (tableau n°2). À nouveau, 3 lavages de 10 min sont nécessaires pour éliminer l'excédant d'anticorps secondaire. Cet anticorps secondaire est couplé à la HRP (Horse Raddish Peroxidase) qui émet une luminescence en présence d'un réactif de révélation ECL (Enhanced ChemiLuminescence). Cette luminescence peut

être visualisée à l'aide d'une caméra (système Imager de GE Healthcare). Les images obtenues sont analysées à l'aide du logiciel FIJI.

## 5. Immunomarquage

Les cellules sontensemencées (50 000 cellules) sur des lames de verre recouvertes de fibronectine à 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . La durée de la phase d'adhésion et d'étalement est variable en fonctions des différentes expériences. Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  puis fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 min. Une fois fixées, Elles sont rincées avec du PBS et perméabilisées à l'aide de Triton X-100 à 0,1% mélangé à 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Les lamelles sont incubées avec l'anticorps primaires à différentes dilutions en présence de 2 % de BSA pou saturer les sites aspécifiques pendant 1h. Après 3 rinçages au PBS, les anticorps secondaire couplés à différents fluorochromes sont incubés, toujours avec 2% de BSA, pendant 1 h. Des molécules de phalloïdine couplé à de la rhodamine (fluorochrome rouge) ont été utilisées pour marquer les filament d'actine F et le DAPI quant à lui a permis de marquer le noyau des cellules en bleu. Les lamelles sont montées sur des lames de verre à l'aide de « *Prolongold* » (Invitrogen). Les images sont prises sur un microscope à épifluorescence Zeiss ou sur un microscope confocal Nikon.

## 6. Statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme d'histogramme ou de courbe avec les erreurs standard à la moyenne (SEM) et les étoiles représentant le degré de significativité ( $p < 0.05$  au minimum). Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois (n précisé dans la légende). Les tests non paramétriques de Mann et Whitney, de Kruskal-Wallis ainsi que l'Analyses de Variance à 2 voies (Two-ways ANOVA) ont été utilisés en fonction des différentes expériences.

- **Résultats** -

**Projet n°1**

**Etude des mécanismes moléculaire et cellulaire liée**  
**aux mutations de la FLNa impliquée dans des**  
**dystrophies valvulaires**

## 1. Introduction

La prévalence des PVM non syndromiques est en constante progression dans les pays développés cependant aucun mécanisme physiopathologique n'a encore été mis en évidence. Cette pathologie fait partie des dystrophies valvulaires non syndromiques et est caractérisée par une augmentation de la longueur, de l'épaisseur et de la rigidité des feuillets valvulaires due à un remodelage de la matrice extracellulaire. Les mutations du gène *FLNA* ont été identifiées dans une dystrophie valvulaire liée au chromosome X (Kyndt et coll., 2007). Ce gène code pour la FLNa connue pour réguler le cytosquelette d'actine et de nombreuses voies de signalisation.

L'objectif de cette étude est de comprendre les mécanismes physiopathologiques liés aux mutations de la FLNa.

Pour analyser l'impact de ces mutations, nous avons établi des lignées cellulaires exprimant de façon stable les FLNa-WT, G288R ou P637Q dans un modèle de mélanome humain n'exprimant pas de façon endogène la FLNa (Cunningham et coll., 1992). Les cellules KO pour la FLNa présente une désorganisation du réseau cortical d'actine ce qui conduit à la formation de « blebs ». La formation des blebs est associée à une migration amœboïde, une activité de RhoA et une activité contractile augmentée. La réexpression des FLNa-WT ou mutée supprime la formation des blebs suggérant une réorganisation du cytosquelette d'actine corticale. Cependant, les cellules exprimant les FLNa mutées ont une surface cellulaire plus petite avec des défauts d'adhésion, d'étalement et de migration. De façon intéressante, l'ajout d'un inhibiteur de la Rho kinase permet de restaurer les capacités d'adhésion et d'étalement des cellules exprimant les FLNa mutées. En utilisant la technique de Pull down, j'ai mis en évidence une dérégulation de ces protéines en faveur d'une augmentation de l'activité de la protéine RhoA et d'une diminution de l'activité de Rac.

L'ensemble de ces données indique que les mutations de la FLNa modifient la balance RhoA/ Rac en faveur de l'augmentation de l'activité de RhoA. La FLNa a été décrite comme interagissant avec la protéine FilGAP et participe à la régulation de l'activité de Rac (Ohta et coll., 1999; 2006). Les mutations modifient l'interaction avec la protéine FilGAP.

La régulation de la balance RhoA/rac est cruciale pour la réponse cellulaire lors du stress mécanique. Les mutations de la FLNa dérégulent cette balance et par conséquent participent à une réponse non adaptée lors du stress mécanique.

## 2. L'article

Biochimica et Biophysica Acta 1843 (2014) 234–244



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbamcr](http://www.elsevier.com/locate/bbamcr)



# Valvular dystrophy associated filamin A mutations reveal a new role of its first repeats in small-GTPase regulation



D. Duval<sup>a,1</sup>, A. Lardeux<sup>a,1</sup>, T. Le Tourneau<sup>a</sup>, R.A. Norris<sup>b</sup>, R.R. Markwald<sup>b</sup>, V. Sauzeau<sup>a</sup>, V. Probst<sup>a</sup>, H. Le Marec<sup>a</sup>, R. Levine<sup>c</sup>, J.J. Schott<sup>a</sup>, J. Merot<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut du Thorax, INSERM UMR1087, CNRS UMR 6291, 8 Quai Moncoussu 44007 Nantes Cedex, France

<sup>b</sup> Department of Regenerative Medicine and Cell Biology, Cardiovascular Developmental Biology Center, Children's Research Institute, Medical University of South Carolina, 171 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425, USA

<sup>c</sup> Noninvasive Cardiac Laboratory, Department of Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114, USA

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 July 2013

Received in revised form 26 October 2013

Accepted 28 October 2013

Available online 4 November 2013

### Keywords:

Mitral valve prolapse

Filamin A

Rac1

RhoA

FilGAP

## ABSTRACT

Filamin A (FlnA) is a ubiquitous actin binding protein which anchors various transmembrane proteins to the cell cytoskeleton and provides a scaffold to many cytoplasmic signaling proteins involved in actin cytoskeleton remodeling in response to mechanical stress and cytokines stimulation. Although the vast majority of FlnA binding partners interact with the carboxy-terminal immunoglobulin like (Igl) repeats of FlnA, little is known on the role of the amino-N-terminal repeats. Here, using cardiac mitral valvular dystrophy associated FlnA-G288R and P637Q mutations located in the N-terminal Igl repeat 1 and 4 respectively as a model, we identified a new role of FlnA N-terminal repeats in small Rho-GTPases regulation. Using FlnA-deficient melanoma and HT1080 cell lines as expression systems we showed that FlnA mutations reduce cell spreading and migration capacities. Furthermore, we defined a signaling network in which FlnA mutations alter the balance between RhoA and Rac1 GTPases activities in favor of RhoA and provided evidences for a role of the Rac1 specific GTPase activating protein FilGAP in this process. Together our work ascribed a new role to the N-terminal repeats of FlnA in Small GTPases regulation and supports a conceptual framework for the role of FlnA mutations in cardiac valve diseases centered around signaling molecules regulating cellular actin cytoskeleton in response to mechanical stress.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The Filamin gene family consists of three highly related homologous proteins produced from three separate gene loci. Filamin's A (alpha), B (beta), and C (gamma) share similar molecular organization consisting of a conserved N-terminal actin binding region followed by 24 immunoglobulin-like (Igl) repeated domains among which the 24th is involved in non-covalent protein dimerization [1–3]. Filamin A (FlnA) is the first actin filament cross-linking protein identified in non-muscle cells and organizes actin filaments in orthogonal networks to stabilize the cellular actin cortex [4].

Many previous studies defined central roles for FlnA in mechano-protection, cell adhesion, spreading and migration [1–3,5,6], cell survival, morphogenesis, wound healing and human disease pathogenesis [6,7]. In addition to its interactions with actin, FlnA functions also depend on

its cell and tissue-specific association with numerous binding partners. To date, over 90 FlnA-binding partners have been identified many of which participate in the regulation of intracellular signaling pathways to promote cytoskeleton remodeling. Some of these partners include small GTPases and their regulators, integrins receptors and associated kinases [3,8]. Although the structural features underlying the binding of specific partners to the C-terminal Igl repeats are becoming better understood, there is a paucity of information regarding functional determination of the N-terminal FlnA region for which few protein partners have been identified [9–11]. One that does interact with the 3rd Igl repeat of N-terminal FlnA is R-Ras which is known to participate in the maintenance of endothelial cell barrier function [12,13]. The intermediate filament protein vimentin and PKCε which participate in cell adhesion also interact with FlnA 1–8 repeats whereas the tyrosine kinase Syk binds the fifth repeat of FlnA and participates in platelet activation [11,14,15].

Human mutations in the *FLNA* gene cause a wide spectrum of congenital anomalies including: periventricular heterotopy (PVH), Melnick–Needles syndrome (MNS), otopalatodigital syndrome (OPD), and myxomatous valvular dystrophy [16–18]. Causal FlnA mutations that contribute to each of these diseases are found throughout the encoded protein, further suggesting tissue-specific function of the affected FlnA subdomains. Whereas mutations that cause PVH, MNS,

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 28 08 01 64.

E-mail addresses: [damien.duval@etu.univ-nantes.fr](mailto:damien.duval@etu.univ-nantes.fr) (D. Duval),

[aurelie.lardeux@gmail.com](mailto:aurelie.lardeux@gmail.com) (A. Lardeux), [thletourneau@yahoo.fr](mailto:thletourneau@yahoo.fr) (T. Le Tourneau),

[norrisra@muscc.edu](mailto:norrisra@muscc.edu) (R.A. Norris), [markwald@muscc.edu](mailto:markwald@muscc.edu) (R.R. Markwald),

[vincent.sauzeau@inserm.fr](mailto:vincent.sauzeau@inserm.fr) (V. Sauzeau), [vincent.probst@chu-nantes.fr](mailto:vincent.probst@chu-nantes.fr) (V. Probst),

[herve.lemarec@univ-nantes.fr](mailto:herve.lemarec@univ-nantes.fr) (H. Le Marec), [RLEVINE@PARTNERS.ORG](mailto:RLEVINE@PARTNERS.ORG) (R. Levine),

[jjschott@univ-nantes.fr](mailto:jjschott@univ-nantes.fr) (J.J. Schott), [jean.merot@univ-nantes.fr](mailto:jean.merot@univ-nantes.fr) (J. Merot).

<sup>1</sup> D.D., and A.L. equally contributed to this work.

and OPD are clustered primarily in the well-studied C-terminus of FLNA, myxomatous valvular dystrophy is caused by mutations in the poorly studied N-terminus. In the present study, we have analyzed the functional effects of two N-terminal mutations (FlnA–G288R and P637Q) that cause X-linked myxomatous valvular dystrophy (XMVD) [19,20]. We demonstrate that these mutations alter the balance of the small GTPases, RhoA and Rac1, and alter their potential to remodel the actin cytoskeleton during cell adhesion, spreading and migration and present candidate mechanisms by which this may contribute to the pathogenesis of mitral valve prolapse.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Polyclonal antibodies for GAPDH (1:10,000); RhoA (1:500) and HRP-conjugated antibodies (1:10 000) were purchased from Santa Cruz. Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 were purchased from Life Technologies. Monoclonal antibodies were purchased from Chemicon (anti-filamin A, 1:1000), BD Transduction Laboratories (anti-Rac1, 1:500), Sigma-Aldrich (FilGAP, 1:250;  $\beta$ -actin, 1:500), Roche (anti-HA, 1:1000), Clontech (GFP, 1:1000). Y27632 and NSC23766 were purchased from Santa Cruz and human plasma Fibronectin from Sigma-Aldrich.

### 2.2. Cell culture, stable cell lines and transfection

The FlnA-deficient human melanoma cell line (M2) and the stably FlnA–WT transfected subclone (A7) were obtained from Dr. F Nakamura (Harvard University, Cambridge, MA) and shRNA knockdown HT1080 from Dr Calderwood (Yale University, New Haven, USA) [21]. M2 cells were cultured in minimum essential medium  $\alpha$  (MEM $\alpha$ ) supplemented with 8% newborn calf serum, 2% fetal calf serum (FCS) and HT1080 cells in DMEM supplemented with 10% FCS and 2  $\mu$ g/ml puromycin. To establish stable cell lines expressing FlnA–WT, G288R and P637Q, M2 cells were transfected with pcDNA3–FlnA–WT, pcDNA3–FlnA–G288R and pcDNA3–FlnA–P637Q plasmids using Fugene6 (Roche–Applied Science). The clones were selected and then grown in the presence of G418 (800  $\mu$ g/ml for selection and 200  $\mu$ g/ml for routine culture).

### 2.3. Plasmid and siRNA

FlnA–WT cDNA was cloned in pcDNA3 and G288R or P637Q mutations introduced using QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). GFP tagged shRNA resistant FlnA–WT cDNA was a kind gift of Dr D Calderwood (Yale University, New Haven CT, USA) in which G288R and P637Q were introduced by site directed mutagenesis [21]. The pCMV5 HA–FilGAP WT was a gift of Dr Yasutaka Ohta (Division of Cell Biology, Kitasato University, Kitasato, Japan). To deplete endogenous FilGAP, siRNA oligonucleotide duplexes targeting the sequence 5'-AAGATAGAGTATGAGTCCAGGATAA-3' (nt 1975–1999 of FilGAP) were used [22]. Control siRNA duplexes targeting GFP were used (sense 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3', antisense 5'-GAACUUCAGGGU CAGCUUGCCG-3'). The cells were transfected according to the suppliers' guidelines (Eurogentec) and used 48 hours post transfection.

### 2.4. Adhesion and spreading assays

In adhesion assays,  $2.5 \times 10^4$  cells were seeded on coverslips coated with 25  $\mu$ g/ml fibronectin and incubated at 37 °C for 45 min followed by two consecutive PBS washes. Adherent cells were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA), stained with DAPI and counted in 10 fields under microscopic observation (10 $\times$  objective). Alternatively, the impedance measurement technology of the xCELLigence system was used to monitor cell adhesion and spreading [23].  $1 \times 10^4$  cells per well were plated into 96-wells E-Plates (Roche Diagnostics, GmbH), placed on the Real Time Cell Analyzer and incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cell

adhesion and spreading were measured as the changes in the electrical impedance between the microelectrodes lining the bottom of the wells and expressed as a *Cell Index* (CI) according to the manufacturer's guidelines. For inhibitor assays, Y27632 (10  $\mu$ M) and NSC23766 (10  $\mu$ M) were added to the culture medium when the cells were seeded in the 96-wells E-Plate. Impedance measurements were taken every 1 min for 3 hours. The slope of CI changes (dCI/dt) was calculated between  $t_{30\text{min}}$  and  $t_{1\text{h}30\text{min}}$ .

### 2.5. Migration assays: wound healing and "Transwell" assays

In wound healing assays, confluent cell monolayers were scratched with a pipette tip, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and cell migration monitored using a Leica DMI6000B microscope equipped for time-lapse video microscopy. Wound closure was monitored for 24–28 h on 3 fields per well and the data are presented as % of closure of FlnA–WT cells monolayer wound closure at  $t = 24$  hrs. Transwell migration assays were performed using 8  $\mu$ m pore size bottom filter chambers (Corning, Costar Corp).  $5 \times 10^4$  cells were serum-starved overnight and seeded in 200  $\mu$ l of serum-free MEM into the upper chamber, whereas the lower compartment was filled with MEM supplemented with 10% serum. After 8 hours at 37 °C, cells remaining on the upper surface of the filter were wiped out with a cotton swab, and the cells that had migrated on the lower surface of the filter were fixed, stained with DAPI and counted in ten microscopic fields.

### 2.6. Immunofluorescence microscopy

Cells were seeded on coverslips, washed three times with PBS and subsequently fixed in 2% PFA for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100, incubated with primary antibodies (dilution: 1/1000) in 1% of bovine serum albumin for 1 h and then with Alexa 594 or 488 conjugated secondary antibody for 1 h. Rhodamine conjugated-phalloidin (1  $\mu$ g/ml, Invitrogen) was added for 20 min to detect actin cytoskeleton and nuclei were counterstained with DAPI for 10 min. Coverslips were mounted in Prolonggold (Invitrogen) and observed on a Zeiss Axiovert microscope.

### 2.7. Co-immunoprecipitation and immunoblotting

Cells transfected with FilGAP-HA were lysed in NETF buffer containing: 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaF, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 $\times$  protease inhibitor cocktail (Roche) and lysates clarified by centrifugation (15,000  $\times$ g for 15 min at 4 °C). The cell lysates (500  $\mu$ g) were incubated with 6  $\mu$ g of anti-HA for 2 h at 4 °C and then with 30  $\mu$ l of protein A conjugated beads (Dynabeads, Invitrogen) for 1 h at 4 °C. The immunoprecipitates were washed four times with NETF buffer and separated by SDS-PAGE transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad Transblot). Immunoblots probed with appropriate antibodies and revealed using enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare). Chemiluminescence signals were quantified using an Imager system (Roche Diagnostic) and the data normalized with respect to GAPDH.

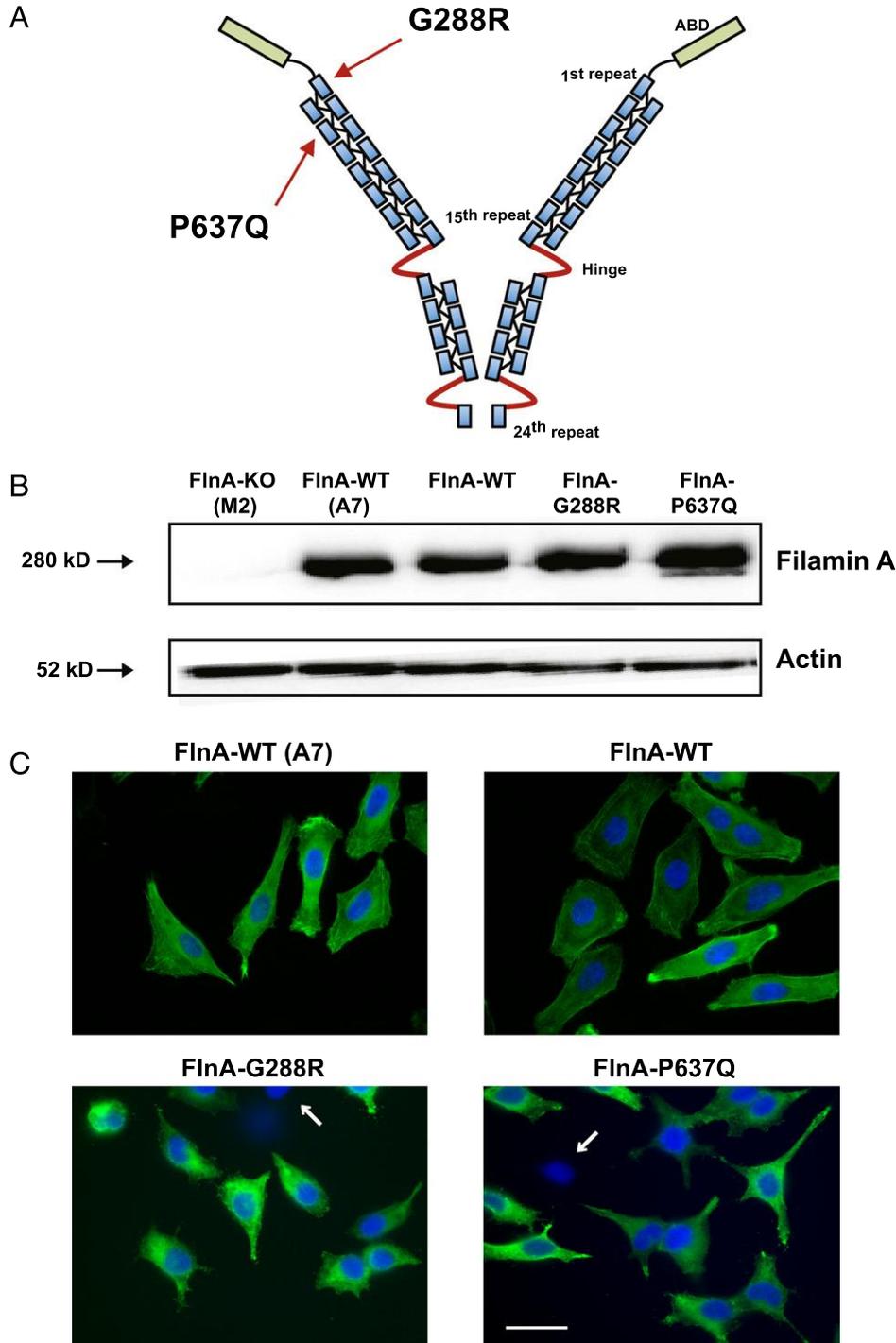
### 2.8. Glutathione-S-transferase (GST) protein purification and GST pull-down

GST–Rothekin (GST–RTK) or GST–Crib containing the Cdc42/Rac Interactive Binding (Crib) region of p21 activated kinase were produced in BI21 *E. coli* treated overnight with 1 mM IPTG at 25 °C. The GST–Rac1–Q61L fusion protein used to analyze FilGAP activity in a Rac1–GAP activity pull down assay, was a kind gift of Dr C. Guilluy and K Burrigge (Institut du Thorax, Nantes, France) [24]. The GST-fusion proteins were purified using Glutathione Agarose 4B beads (Macherey–Nagel). Cells grown for 2–4 hrs after seeding were lysed in NETF buffer. The cell lysates were centrifuged at 15,000  $\times$ g for 15 min at 4 °C. 500  $\mu$ g of cleared cell lysates were incubated with GST-tagged

proteins (30 µg) and rotated (18 rpm) for 1 h at 4 °C. The beads were washed four times with cell lysis buffer and bound proteins separated by SDS-PAGE. Bound Rac1 and RhoA were detected by immunoblotting as describe above. In Rac1–GAP activity assay, FlnA–WT, G288R and P637Q stable cell lines were transfected with FilGAP–HA and pulled down FilGAP quantified by western blotting.

## 2.9. Statistical analysis

Each assay presented here was performed at least three times. Graphs depict mean values ± SEM of sample size *n*. Images presented here are representative of each sample analyzed. Data were analyzed using Prism (GraphPad Software) and *P*-values were generated using



**Fig. 1.** Screening of stable melanoma cell lines expressing FlnA-WT, G288R or P637Q. **A.** Schematic representation of human Filamin A. The N-terminal actin-binding domain (ABD) is followed by 24 Igl repeats. The Igl repeats are interrupted by two hinges regions (in red). FlnA–G288R and P637Q mutations associated to dystrophy valvular are located on repeats 1 and 4, respectively. **B.** Western blot analysis of total cell extracts (25 µg) from original M2 (FlnA-deficient), A7, FlnA–WT, G288R and P637Q cell lines. Only clones with a FlnA/actin expression ratio comparable to the original A7 cell line were conserved. **C.** Selection of FlnA stable cell lines: Immunostaining of the original FlnA–WT expressing cell line A7 (upper left) and those established in the present study FlnA–WT (upper right), G288R and P637Q (lower images) (anti-FlnA antibody, green). Only clones exhibiting over 80% of FlnA positive cells were selected and the arrows indicate the few non-expressing cells in mutant FlnA clones. The nuclei were stained with DAPI (blue) (scale bar: 20 µm).

a Mann–Whitney test or two-way ANOVA test: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3. Results

#### 3.1. FlnA mutants restore mesenchymal morphology of FlnA deficient melanoma cells

The FlnA-deficient melanoma cell line (M2) is a tractable cell line for analyzing the function of the two FlnA mutations (G288R and P637Q) and is commonly used as a model to study FlnA effects on cell behavior (Fig. 1A) [25]. We thus established cell lines stably expressing FlnA–G288R or FlnA–P637Q. In addition, to avoid any bias linked to the use of a FlnA plasmid construct different from that used to establish the original FlnA–WT-reconstituted cell line (A7), we also established FlnA–WT stable cell lines [25]. As illustrated in Fig. 1B and C, only clones exhibiting over 80% of FlnA positive cells and a FlnA/ $\beta$ -actin ratio comparable to that of the wild-type melanoma cell line (A7) were selected. Three clones of each FlnA construct were amplified and further analyzed. They gave similar results in the different experiments made throughout the study and the data were thus pooled together. Importantly, the FlnA–WT clones produced and studied here were indistinguishable from the original A7 clone.

Previous studies established the critical role of FlnA in the organization of the cortical actin network in M2 cells [8]. Specifically, FlnA-deficient M2 cells exhibited an amoeboid morphology with a prolonged surface blebbing when plated on culture dishes (6 hrs after plating, see arrows in Fig. 2A). On the contrary, neither A7, FlnA–WT, G288R nor P637Q cells exhibited blebs during spreading (Fig. 2A). All the FlnA expressing cells exhibited a mesenchymal-like morphology with cellular protrusions at their periphery. Nevertheless, FlnA–G288R and P637Q expressing cells were smaller than A7 and FlnA–WT cells, both during spreading (6 hours) and at “steady” state (Fig. 2A and B, respectively). Of note, FlnA–WT expressing cells developed more and larger lamellipodia like structures during spreading than G288R and P637Q cells (see arrowheads in Fig. 2A and right-hand histogram in 2B). These observations suggested that actin organization, when compared to that of null cells, was at least partially restored by FlnA mutants during the active remodeling phase of cell spreading. This notion was further corroborated by adhesion kinetic analysis (Xcelligence data below). Also, FlnA localization was not significantly modified by the mutations either and remained co-localized with actin along the cell plasma membranes (Fig. 2C).

To ascertain our observations were not limited to and dependant on the melanoma cells used, another cell model was tested. shRNA FlnA knockdown HT1080 cells were transiently transfected with GFP tagged shRNA-resistant FlnA–WT, G288R and P637Q constructs. As illustrated in Fig. 3A, transient transfection of shRNA resistant filamins restored their expression in HT1080 KO cells. Importantly, as observed in melanoma cells, FlnA–WT transfected cells were larger than mutant FlnA cells during the spreading phase. Also, large lamellipodia were readily observed in FlnA–WT cells and seldom in FlnA–G288R and P637Q mutants (right-hand histogram in Fig. 3B).

Together these data suggest that although the ability of FlnA to organize actin cytoskeleton is maintained in FlnA–G288R and P637Q mutants, the latter may affect actin network during spreading. Because actin dynamics are intimately associated with cell adhesion to a substratum and migration, these properties were analyzed in details.

#### 3.2. FlnA mutations affect cell adhesion and migration capacities

To investigate cell adhesion capacities stably transfected melanoma cells were allowed to adhere for 45 min on fibronectin coated coverslips, the non-adherent cells were then washed away and adherent cells were counted. As shown in Fig. 4A, whereas FlnA–WT expression significantly

increased the number of cells adhering in 45 min ( $\times 2.4$  compared to FlnA–KO (M2)  $P < 0.01$   $n = 4$ ), FlnA mutations did not significantly improve adhesion when compared to the FlnA–KO cells (Fig. 4A).

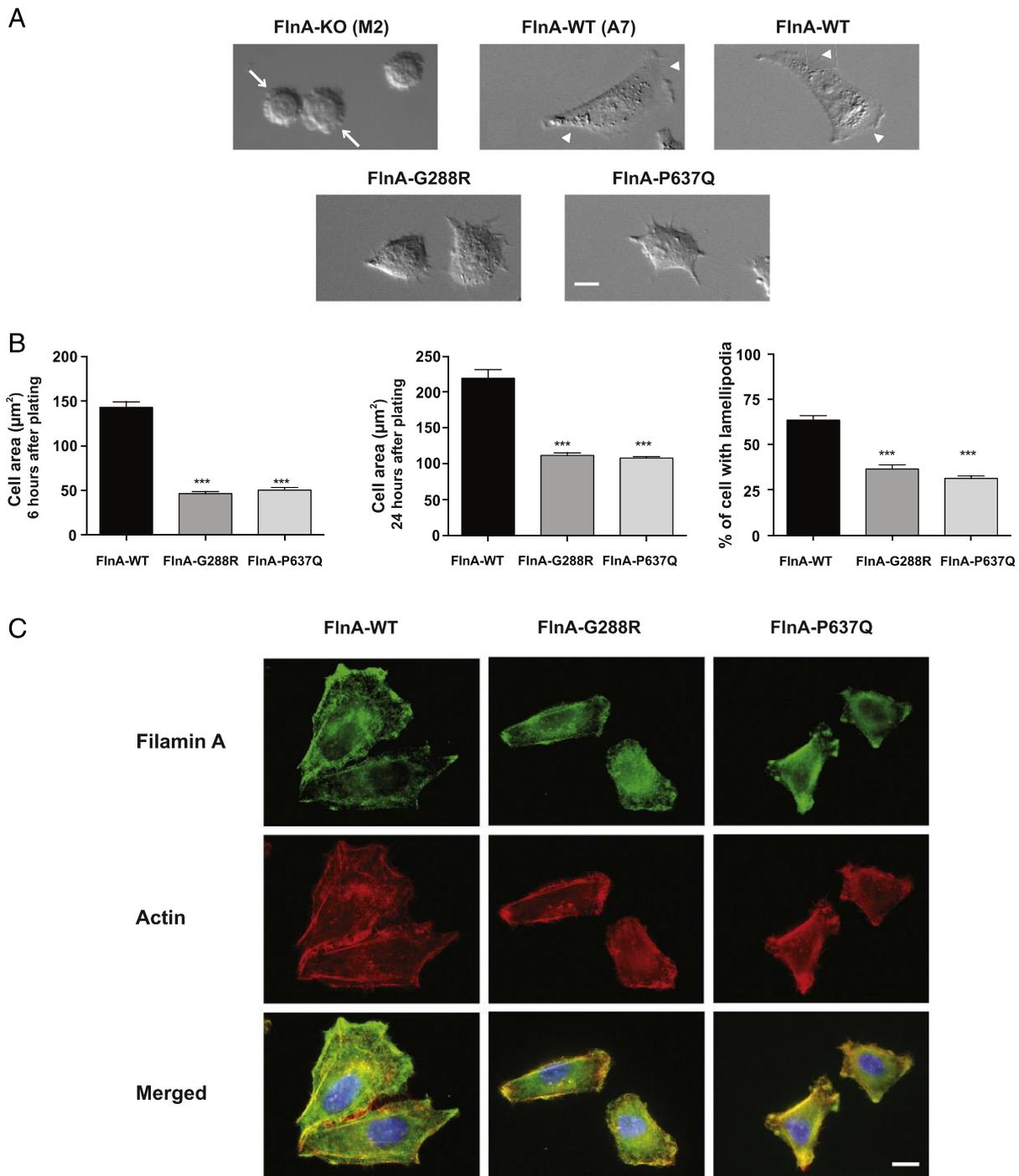
Cell migration properties were evaluated in Ussing chambers and in wound closure assays. As shown in Fig. 4B, cell migration through a porous filter was significantly increased in only FlnA–WT expressing cells when subjected to a serum gradient ( $\times 2.2$   $P < 0.01$   $n = 3$ ). Similarly, only FlnA–WT cells were able to close a “scratch” made in a confluent cell monolayer within 24 hrs (Fig. 4C).

These data support a mechanism by which FlnA–G288R and P637Q mutations do not significantly affect actin organization and patterning, but do affect overall cell morphology, adhesion, and migration capacities. These data indicate a putative role for these mutations in the activation and remodeling of the actin cytoskeleton. Because small GTPases of the Rho family are key regulators of actin-remodeling reactions governing cell adhesion, migration and morphology, we investigated the influence of these FlnA mutations on RhoA and Rac1 GTPase activities.

#### 3.3. FlnA mutations affect the balance of RhoA–Rac1 activities during spreading

In a first step, we focused on the FlnA–P637Q mutations and performed pull down experiments using GST–Rothekin (GST–RTK) or GST–Cdc42/Rac Interactive Binding (GST–Crib) fusion proteins to evaluate RhoA and Rac1–GTPases activities, respectively. As illustrated in Fig. 5A, Rac1 activity measured in FlnA–P637Q was reduced by more than 50% with respect to that measured for FlnA–WT cells. Conversely, RhoA activity was significantly higher in FlnA–P637Q vs FlnA–WT cells (Fig. 5B). To analyze the impact of these small GTPases activities on the kinetics of cell adhesion and spreading, we used the impedance measurement technology of the xCELLigence system. As illustrated in Fig. 6A (left panel), the wild type FlnA “cell index” (CI) rapidly increased after seeding the cells on the E-plate. However, and as expected from the above data, the CI of FlnA–P637Q cells remained lower than that of FlnA–WT cells throughout the experiments. Lower “steady state” CI at 2 hours (before the cells started to divide) corroborated the smaller size of FlnA–P637Q cells we observed (Fig. 2). Also, the slopes of the curves were significantly lower for P637Q vs FlnA–WT cells ( $dCI/dt = 0.14 \pm 0.02$  CI/min and  $0.27 \pm 0.03$  CI/min, \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 4$ , respectively). This was consistent with the lower spreading capacities of FlnA–P637Q cells and their lower Rac1 activities. In fact, treatment with the Rac1 specific inhibitor NSC23766 (10  $\mu$ M) altered the CI of FlnA–WT cells but had no effect on FlnA–P637Q cells (Fig. 6A, left panel). NSC23766 significantly decreased the kinetics and the stationary CI values of FlnA–WT cells down to those of FlnA–P637Q cells. FlnA–WT  $dCI/dt$  decreased from  $0.27 \pm 0.03$  CI/min ( $n = 4$ ) to  $0.18 \pm 0.04$  CI/min ( $n = 3$ ,  $P < 0.01$ ) in the presence of 10  $\mu$ M NSC23766. Values not significantly different from those of FlnA–P637Q cells in the presence and the absence of the inhibitor ( $dCI/dt = 0.14 \pm 0.03$  CI/min ( $n = 3$ ) and  $dCI/dt = 0.14 \pm 0.02$  CI/min;  $n = 4$ , respectively).

We then tested the effects of the Rho associated kinase inhibitor (Y27632). In the presence of Y27632 (10  $\mu$ M), FlnA–P637Q and WT adhesion kinetics were undistinguishable (Fig. 6A, right panel) and both cell lines spread much faster and to a higher extend than untreated FlnA–WT cells ( $dCI/dt = 0.44 \pm 0.07$  CI/min and  $0.49 \pm 0.04$  CI/min  $n = 4$  non-significant difference, for FlnA–P637Q and WT respectively). Together these data are consistent with a higher RhoA/ROCK signaling activity in FlnA–P637Q cells compared to FlnA–WT expressing cells, which in turn reduces Rac1 activity. This is supported by microscopic observations showing that treatment of FlnA–P637Q cells with Y27632 rescued the cellular morphology and resulted in the de novo formation of large lamellipodia like structures comparable to the WT cells (Fig. 6B). Together, these data support a mechanism by which FlnA–P637Q mutation causes deregulation of the RhoA–Rac1 balance in favor of higher RhoA activity.

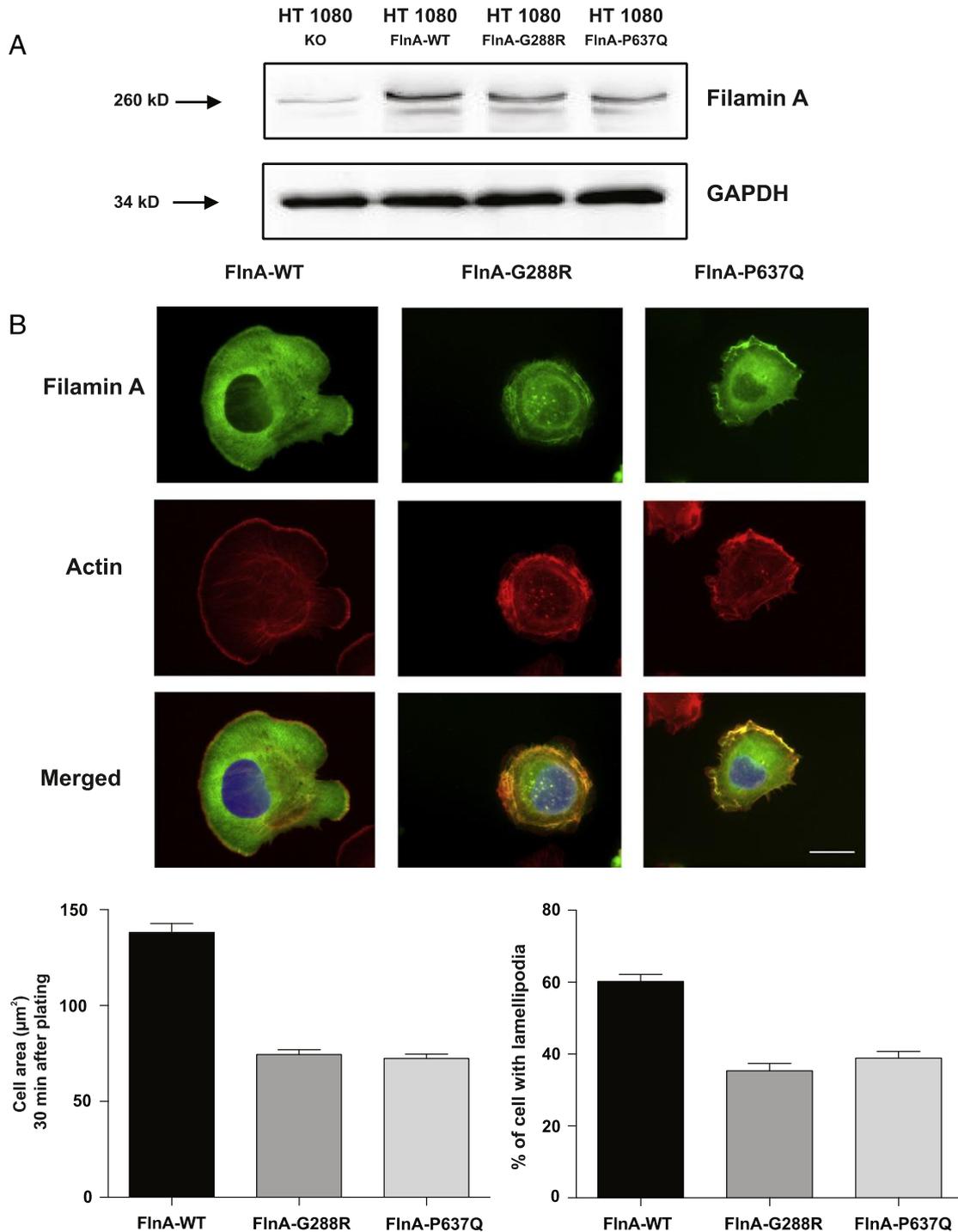


**Fig. 2.** Filamin A mutations affect cell morphology and size. **A.** Differential interference contrast images of M2, A7, FlnA-WT, G288R and P637Q cell lines 6 hours after plating. Note the presence of membrane blebs at the surface of FlnA deficient M2 cells only (arrows). A7 and FlnA-WT cells exhibit large lamellipodia structures with membrane ruffles (arrow heads). Scale bar is 10  $\mu\text{m}$ . **B.** Cells expressing FlnA-G288R and P637Q are smaller than FlnA-WT cells. Histograms indicate the area of the cells ( $\mu\text{m}^2$ ) grown for 6 hrs (left-hand) or 24 hrs (middle). At least 100 cells were measured in 3 experiments. Right-hand histogram indicates the number of cells exhibiting lamellipodia 6 hrs after plating. Error bars show SEM,  $***P < 0.001$  versus FlnA-WT cells. **C.** Co-localization of FlnA (green) and actin (phalloidin labeling in red) in FlnA-WT, G288R and P637Q cell lines. Note FlnA immunostaining decorates cell plasma membrane. Co-localization of actin and FlnA appears in yellow in the merged images (scale bar 10  $\mu\text{m}$ ).

This mechanism also holds for FlnA-G288R cells which exhibited, like FlnA-P637A cells, the same CI features and sensitivity to Rac1 and ROCK inhibitors (NSC23766 and Y27632, Fig. 6C left and right panels, respectively). Importantly, similar adhesion defects of mutant FlnA expressing cells were also observed in shRNA FlnA-knockdown HT1080 cells using the xCELLigence system (Supplementary Fig. S1).

#### 3.4. FlnA FilGAP interactions are not affected by FlnA mutations

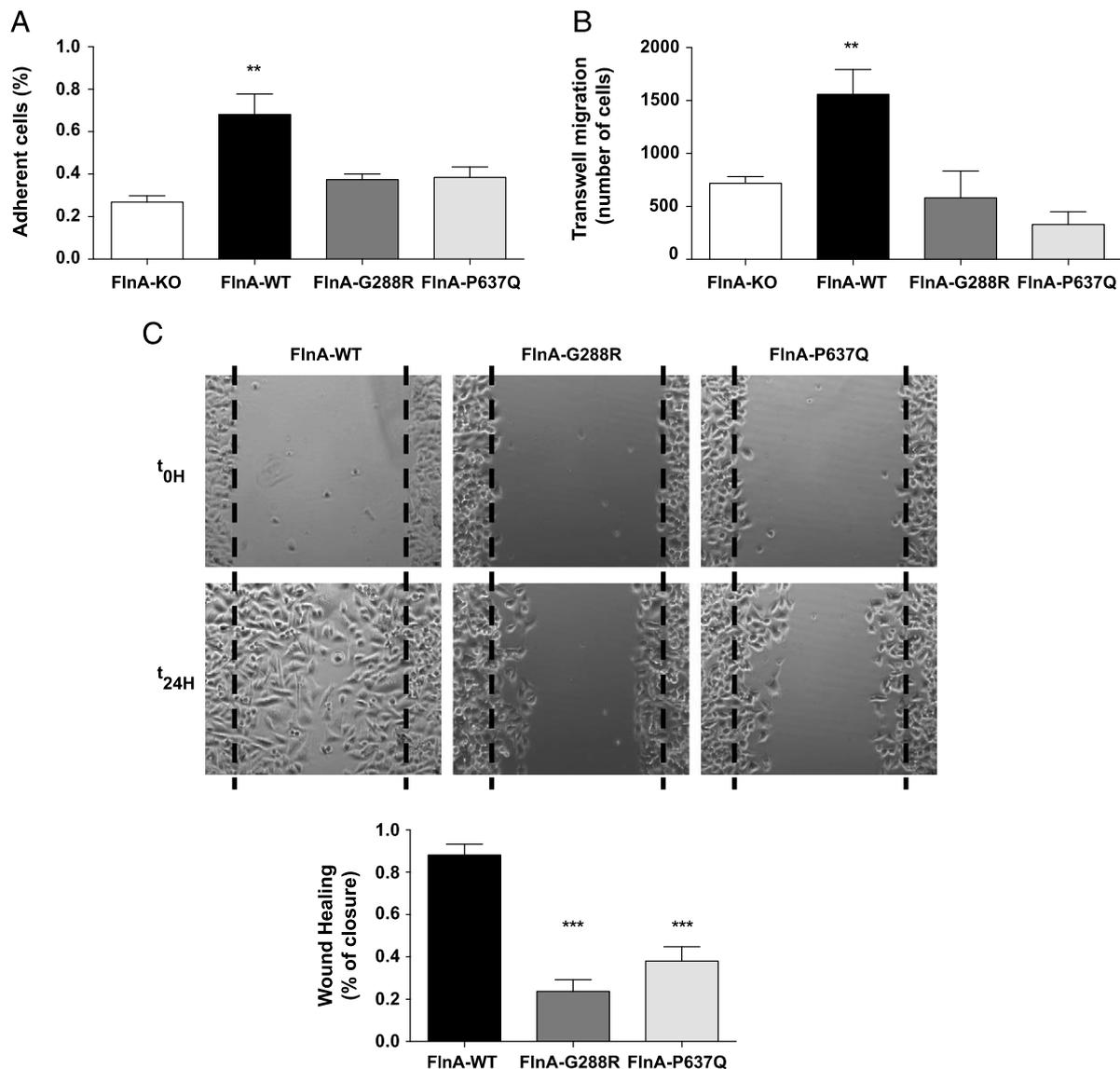
Previous studies demonstrated that the reciprocal balance of low Rac1 activity by elevated RhoA/ROCK activity involves GTPase Activating Proteins (GAPs) like ARHGAP22 and a closely related Rac1-specific GAP protein, FilGAP. FilGAP appeared as an interesting candidate



**Fig. 3.** Filamin A mutations also affect morphology and size of HT1080 cells. A. Western blots of shRNA knockdown FlnA HT1080 cells (first lane) and transfected with shRNA-resistant FlnA-WT, G288R and P637Q. The blot probed with anti-FlnA shows FlnA expression is restored. B. Immuno-localization of GFP-tagged FlnAs using anti-GFP antibody (green) and actin (phalloidin in red, scale bar 10 μm). Cells transfected with mutant FlnA-G288R and P637Q were smaller and exhibited less lamellipodia (left and right-hand histograms, respectively). \*\*\* $P < 0.001$  versus FlnA-WT transfected cells ( $n = 170$  cells).

because it is known to interact with FlnA and its GAP activity to be regulated by ROCK phosphorylation [26,27]. Indeed, using specific siRNA to silence FilGAP normalized spreading kinetics of both FlnA-P637Q and G288R cells with respect to FlnA-WT cells. As illustrated in Fig. 7A, siRNA treatment efficiently decreased FilGAP expression and FilGAP extinction had a small but significant effect on the early adhesion kinetics of FlnA-WT cells ( $dCI/dt = 0.23 \pm 0.05$  vs  $0.22 \pm 0.04$  CI/min  $n = 4$ ) but had no effect on steady state CI. On the other hand, consistent with the increased RhoA-ROCK signaling, FilGAP extinction clearly

increased both adhesion kinetics and steady state CIs in FlnA-P637Q (from  $dCI/dt = 0.12 \pm 0.02$  to  $0.19 \pm 0.04$  CI/min,  $n = 4$ ) and G288R (from  $dCI/dt = 0.12 \pm 0.02$  to  $0.22 \pm 0.03$  CI/min,  $n = 4$ ) cells (Fig. 7A, left and right panels respectively). Together these data suggest that increased RhoA-ROCK pathway increases the GAP activity of FilGAP which in turn contributes to imbalanced RhoA-Rac1 activities in FlnA-P637Q and G288R cells and participates in the down regulation of Rac1 during the process of cell attachment. In fact, this idea is consistent with the result of Rac1 GAP activity pull down assays performed



**Fig. 4.** Filamin A mutations impede cell adhesion and migration. **A.** Percentage of adherent cells remaining on coverslips coated with fibronectin after two washes. Nuclei were stained with DAPI and counted on 10 fields,  $n = 4$ , error bars show SEM,  $**P < 0.01$  versus FlnA-KO cells. **B.** Percentage of cells seeded in the upper chamber of “transwell” filters that migrated overnight in the lower chamber. The cells that had migrated were counted on 6 fields from three experiments  $n = 3$ , error bars show SEM,  $**P < 0.01$  versus FlnA-KO (M2) cells. **C.** Typical images of a wound made at the beginning ( $t_0$ ) and 24 hrs later ( $t_{24h}$ ). Wound healing closure was calculated as the surface of the wound covered by the cells at  $t_{24h}$  and is expressed in % in the histogram,  $n = 3$ , error bars show SEM,  $***P < 0.001$  versus FlnA-WT cells.

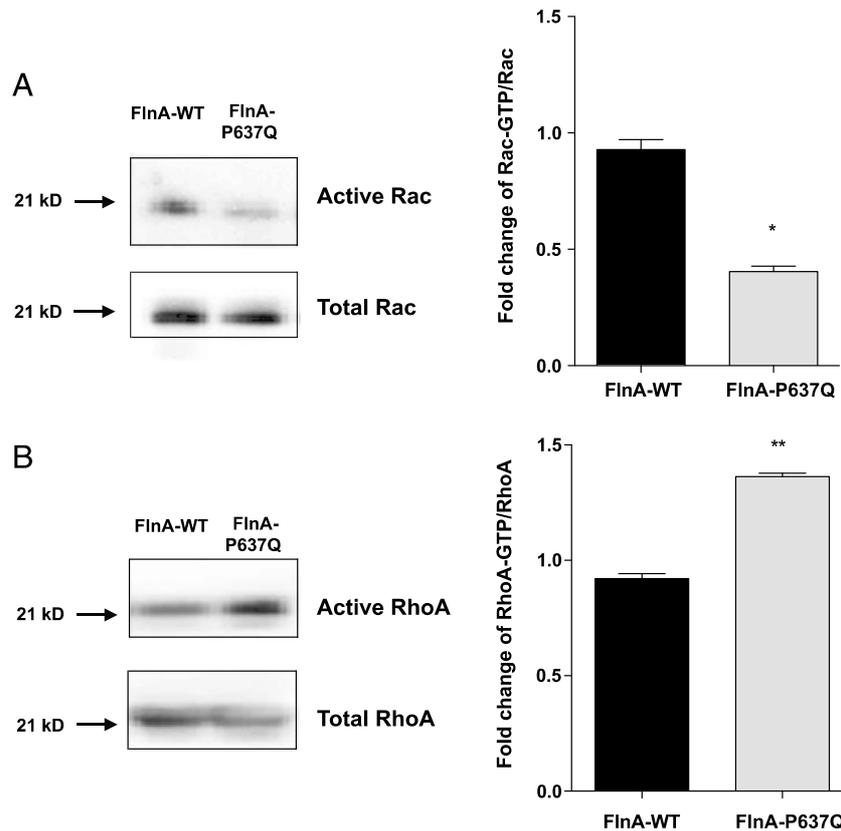
using the constitutively active Rac1-Q61L mutant fused to GST [24]. As shown in Fig. 7C, the amount of “active” FilGAP pulled down from mutant FlnA cell lines more than doubled with respect to that isolated from FlnA-WT cells.

#### 4. Discussion

In the present study, we investigated the effects of FlnA-G288R and P637Q mutations on the actin cytoskeleton organizing properties of FlnA and showed that these point mutations deregulate the balance between RhoA and Rac1 GTPase activities. Our data pointed to an unexpected and new role of the first repeats of FlnA in cell morphology, adhesion and migration capacities.

Since its discovery more than 30 years ago FlnA was identified as an actin binding protein and many studies established its crucial role in actin cytoskeleton remodeling. However, its almost ubiquitous expression and its ability to homo- and hetero-multimerize with FlnB complicated the functional analysis of mutant FlnAs in conventional *in vitro*

expression model. In the absence of valvular cellular model easily accessible to experimentation, we chose to use a FlnA-deficient melanoma cell line. Indeed, in their pioneering work Cunningham and colleagues demonstrated that the FlnA deficient cells (M2) used here, exhibit impaired locomotion and develop cell surface blebbing when they attach to and spread on a substratum [8,25]. In M2 cells, intracellular solvent flow drives blebs formation and (re)-expression of exogenous FlnA facilitates actin cortical gelation thereby leading to decreased size and occurrence of the blebs [8]. These observations were consistent with the many studies which, thereafter, highlighted the role of filamin A in cortical actin network organization and stabilization [1–3]. Because, in their original work, Cunningham and colleagues revealed the critical role of the molar FlnA to actin ratio to fully suppress bleb formation and restore M2 cell locomotion, in the present study we a) selected clones with FlnA/actin molar ratios similar to that of the original FlnA-WT expressing cell line (A7) (Fig. 1B) and b) established new FlnA-WT to evaluate possible bias linked to the expression vector and the transfection protocol used. Our data showed that FlnA-WT clones established



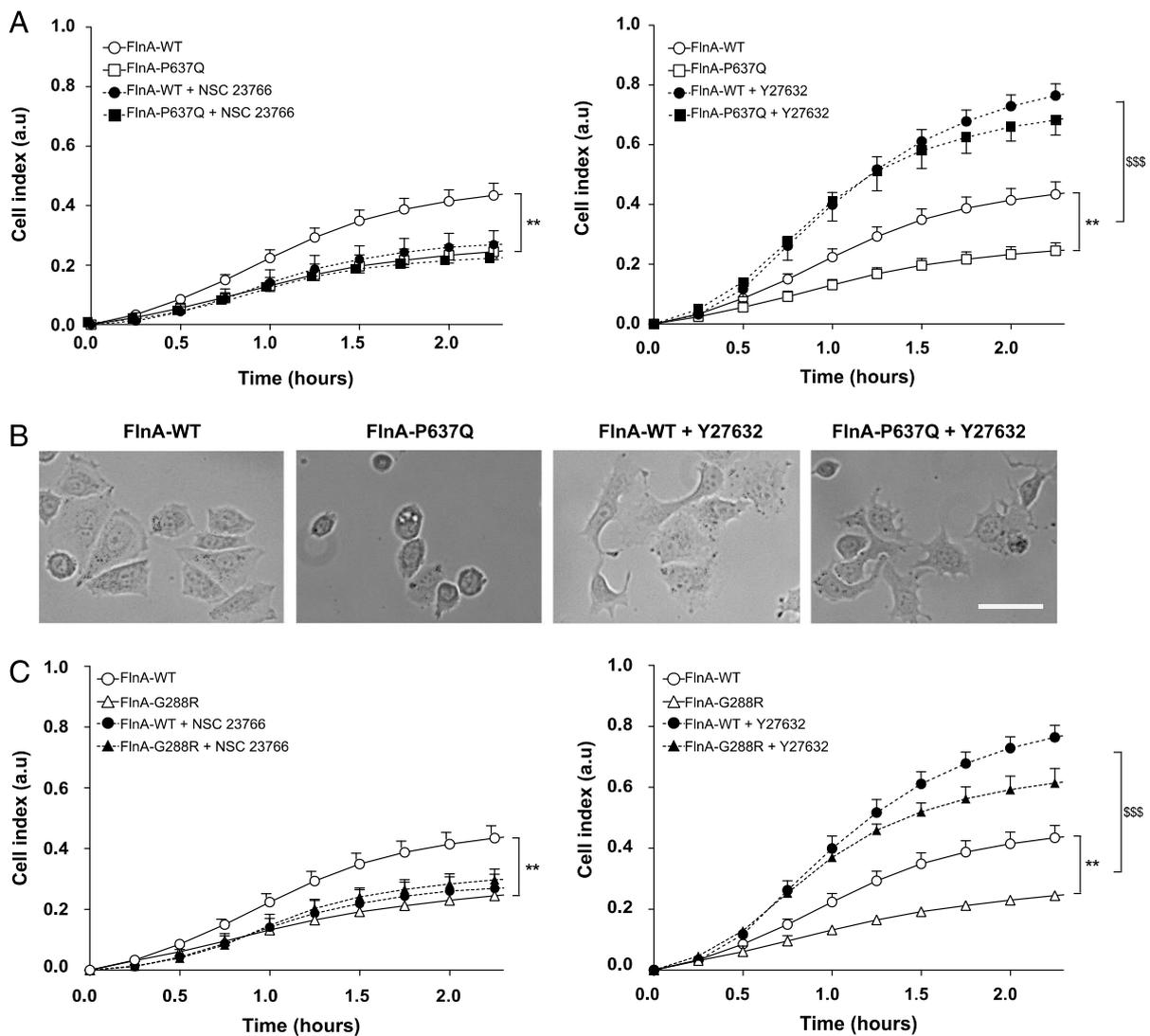
**Fig. 5.** Rac1 and RhoA GTPases activities are modified in FlnA-P637Q cells. A. Representative experiment of active Rac1 pull down using GST-Crib (left-hand images). Lower Rac1 activity in FlnA-P637Q cells was quantified in five experiments. The mean data are shown on the graph,  $n = 4$ , Error bars show SEM,  $*P < 0.05$ . B. Increased RhoA activity was detected in FlnA-P637Q cells (left-hand images). Mean data from five experiments is shown on the graph, Error bars show SEM,  $**P < 0.01$  versus FlnA-WT cells.

here were indistinguishable from the original FlnA-WT cell line (A7). Interestingly, FlnA-G288R and P637Q expression also suppressed bleb formation. Together with the absence of any sign of increased protein degradation (not shown) or changes in subcellular localization of mutant FlnAs (Fig. 2) our data indicate that the two mutations do not grossly affect FlnA structure and FlnA-actin interaction. This idea is consistent with the location of the mutations in Igl repeats 1 and 4 of FlnA (for G288R and P637Q, respectively) which are structurally separated from the N-terminal actin binding domain by a hinge and the Igl repeat 9–15 region that constitutes a secondary interaction domain necessary for high avidity binding to F-actin [2,28].

Although physical FlnA-actin interactions are not drastically altered by the mutations, the latter impacted cell spreading and locomotion. Cell migration is known to critically rely on actin cytoskeleton remodeling and many previous studies established the key role of small GTPases Rac1 and RhoA in this process [29,30]. According to a simplistic model, Rac1 is activated at the leading edge of the cells and participates in the formation of lamellipodia and adhesion complexes and thus to forward protrusion. On the other hand, RhoA is inhibited at the leading edge but its activity is then required to stabilize focal adhesion complexes and to activate contractile events like retraction of trailing cell processes that are required for migration. Consistent with this model, we showed the migration-deficient FlnA-P637Q cells exhibited lower Rac1 activity than FlnA-WT cells. Lower Rac1 activities also fit with the observation that the FlnA-G288R and P637Q cells are devoid of lamellipodia-like processes and forward protrusion and they are smaller than FlnA-WT cells. Functional adhesion assays using xCELLigence system further corroborated this notion as Rac1 inhibition using NSC23766 (10  $\mu$ M) reduced FlnA-WT cells adhesion capacities down to those of FlnA-P637Q and G288R cells. Importantly, similar adhesion defects were also made

in another cell model, the HT1080 cells. Because FlnA is known to interact with RhoA and Rac1, one could speculate that the mutations affect their interactions and thus alter their spatial distribution and regulation. Although we did not specifically test mutant-FlnA/GTPases interactions, we suspect this is unlikely because RhoA and Rac1 interaction domains on FlnA are located in C-terminal repeats (Igl 21–23) that are remote from those targeted by the mutations (Igl 1, 4) [30]. Consistent with RhoA activation being required to release the trailing (caudal) regions of the cell from substrates we showed the Rho associated kinase (ROCK) inhibitor (Y27632 10  $\mu$ M) rescued/stabilized adhesion which correlated with the induction of large lamellipodia like structures in FlnA-P637Q cells. Collectively these data are consistent with a mechanism by which the activated RhoA-ROCK signaling cascade suppresses Rac1 activity resulting in reduced migratory potential.

Mutual antagonism between RhoA and Rac1 GTPases is a well established mechanism that participates to the spatio-temporal regulation of their activities and the Rac1 specific GTPase activating protein FilGAP appeared as an interesting candidate to test. FilGAP is known to bind FlnA and its phosphorylation by ROCK to increase its Rac1-GAP activity [22,26]. Indeed, the Rac-GAP activity assays we performed indicated that “active” FilGAP was significantly increased in mutant FlnA cells compared to FlnA-WT cells ( $> \times 2$ ). Together with the rescue of the adhesion of FlnA-P637Q and G288R cells when FilGAP was silenced our data strongly implicate FilGAP in Rac1 down regulation. Preliminary co-immunoprecipitation assays indicate that, although the interactions appeared weaker, mutant FlnAs still bind FilGAP indicating that the mutations do not drastically impair their physical interactions (Supplementary data Fig. S2). Preservation of their interaction is actually consistent with the remote locations of the mutations and FlnA-FilGAP interaction region on FlnA (Igl repeat 1–4 and 23–24, respectively). On



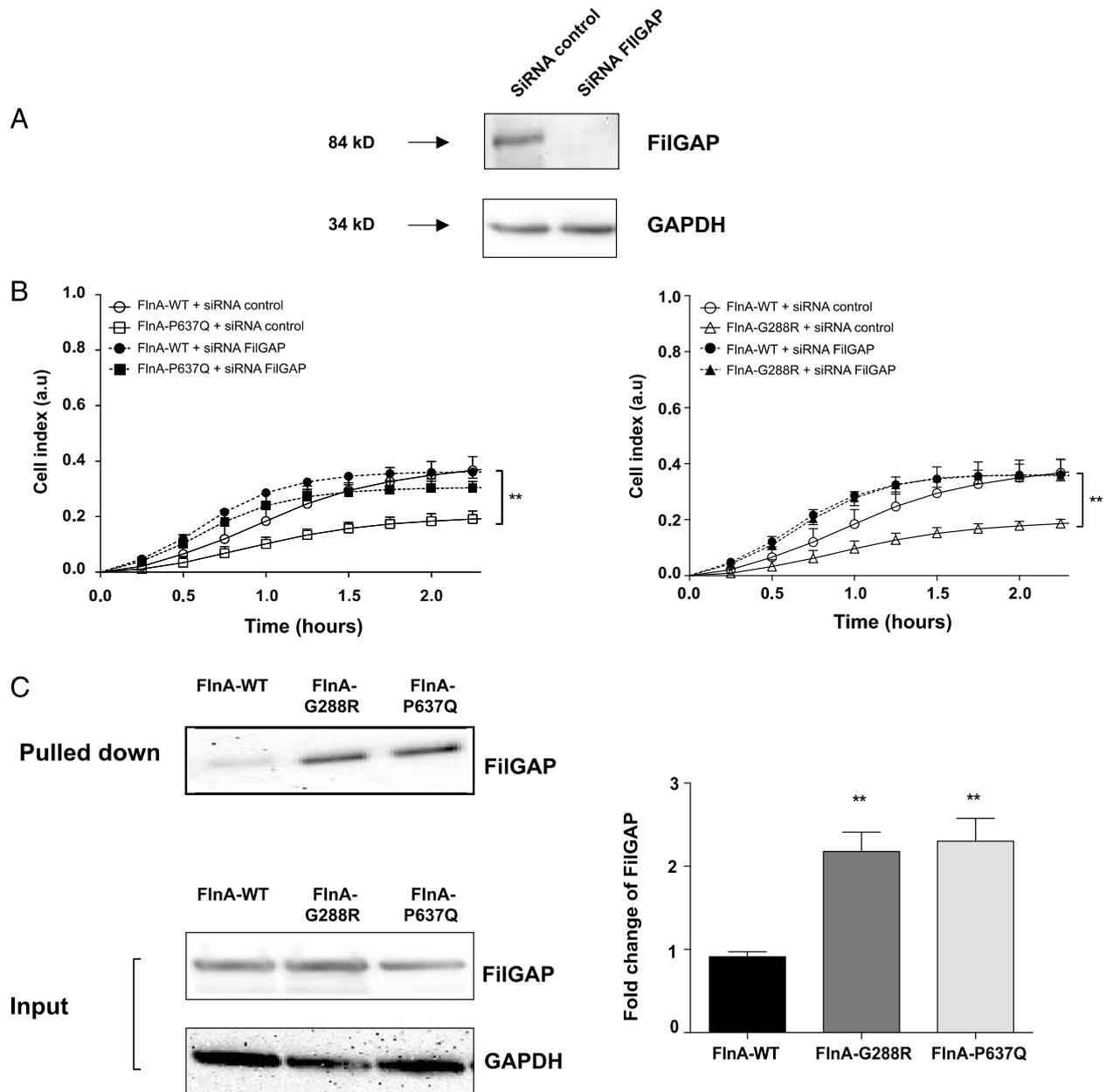
**Fig. 6.** Rac1 and RhoA activities determine FlnA–P637Q and G288R cells spreading. **A.** FlnA–WT and P637Q cell indexes (CI) measured using xCELLigence system in the presence and absence of the Rac1 inhibitor NSC23766 (10 μM) in FlnA–P637Q (left panel) and the ROCK inhibitor Y27632 (10 μM). (right panel). FlnA–WT data are included in both panels for comparison. Results are means ± SEM of four independent experiments. \*\* indicates significant difference between FlnA–WT with and without inhibitors calculated by two-way analysis of variance, Bonferroni corrected testing ( $n = 4$ , \$\$\$ $P < 0.001$  and \*\* $P < 0.01$ ). **B.** Phase contrast images of FlnA–WT and FlnA–P637Q cells seeded on fibronectin coverslip (10 μg/ml) for 2 hours with or without Y27632 (10 μM). The inhibitor restores lamellipodia like structure in the mutant cells. Scale bar: 20 μm. **C.** FlnA–WT and G288R cell indexes (CI) measured using xCELLigence system in the presence and absence of the Rac1 inhibitor NSC23766 (10 μM) in FlnA–P637Q (left panel) and the ROCK inhibitor Y27632 (10 μM) (right panel). FlnA–WT data are included in both panels for comparison. Results are means ± SEM of four independent experiments. \*\* indicates significant difference between FlnA–WT with and without inhibitor calculated by two-way analysis of variance, Bonferroni corrected testing ( $n = 4$ , \$\$\$ $P < 0.001$  and \*\* $P < 0.01$ ).

the other hand, our co-immunoprecipitation realized in the absence of mechanical stress may underestimate a potential effect of the mutations on their interaction. In line with the critical role of mechanical strain on FlnA–FilGAP interaction and the prevalence of shear stress and pressure during cardiac contraction, increased FilGAP availability resulting from reduced FlnA–FilGAP interaction might contribute to the pathological process [31]. Future studies will be required to ascertain this issue.

In an effort to elucidate the mechanisms linking FlnA–G288R and P637Q mutations to RhoA activation, we investigated FlnA interaction with R-Ras that was recently shown to bind to the Ig1 1–8 repeats region of FlnA [3,9,12]. In addition, Ras effector proteins include guanine nucleotide exchange factors and GTPase-activating proteins such as the Rac1 exchange factor Tiam1, and p12ORasGAP/p19ORhoGAP complex that couple Ras to RhoA and Rac1 GTPases signaling [32–34]. It was thus tantalizing to speculate that the mutations located in the proximity of

R-Ras binding site could alter its binding and Rho–GTPases regulation. However, our preliminary results showed that FlnA–G288R and P637Q mutations do not modify R-Ras binding suggesting FlnA–Ras interaction is not critical to the adhesion and migration deficiencies we observed (Supplementary Fig. S3).

Our data support a mechanism by which specific (N-terminal) FlnA mutations modify actin remodeling pathways. These pathways are critical for cellular responses to mechanical stress, cell–extracellular matrix interactions and epithelial–mesenchymal transformation, three key processes involved in valve development and homeostasis [35]. Interestingly, we recently defined co-operative functional interactions between serotonin, transglutaminase-2 (TG2) and FlnA in the remodeling of cardiac valves during valvulogenesis and “TG2/serotonylation” events participate to actin-remodeling processes and increase RhoA activity [36,37]. Whether small GTPase imbalance and increased RhoA



**Fig. 7.** FilGAP is “activated” and involved in the reduced spreading of FlnA-P637Q and G288R cells. A. Example of FilGAP extinction in FlnA-P637Q cells treated with FilGAP siRNA. The blot was probed with anti FilGAP and GAPDH (to control loading, 25  $\mu$ g). B. Cell index of FlnA-P637Q and G288R cells treated with control and FilGAP siRNA (left and right panels respectively). FlnA-WT data are included in both panels for comparison. Results are means  $\pm$  SEM of four independent experiments ( $n = 4$  Error bars show SEM,  $^{**}P < 0.01$ .) C. Rac1-GAP activity pull down assay. FlnA-WT, G288R and P637Q melanoma cells were transfected with FilGAP-HA (input lower blot) and “active” FilGAP pulled down using GST-Rac1-Q61L fusion protein (upper blot). “Active” FilGAP pulled down in mutant FlnA cells more than doubled with respect to FlnA-WT cells.  $^{**}P < 0.01$  versus FlnA-WT cells ( $n = 4$ ).

serotonylation contribute to valve development and valvular dystrophy remains to be determined [38] but points to candidate therapeutic mechanisms for human heart valve diseases.

#### Acknowledgments

This work was funded by The Foundation Leducq, Transatlantic Mitral Network of xCELLigence grant 07CVD04 (Paris, France) and the Fédération Française de Cardiologie, Grant R11065NN/RAK1190NNA (TL, JM) (FFC, Paris, France). The work at MUSC was performed in a facility constructed with support from the National Institutes of Health, Grant Number C06 RR018823 from the Extramural Research Facilities Program of the National Center for Research Resources. Other funding sources: National Heart Lung and Blood Institute: R01-HL33756 (RRM), COBRE 1P30 GM103342 (RRM, RAN), 8P20 GM103444 (RRM

and RAN); American Heart Association: 11SDG5270006 (RAN); National Science Foundation: EPS-0903795 (RRM); NHLBI K24 HL67434 and HL109506 (RAL).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.022>.

#### References

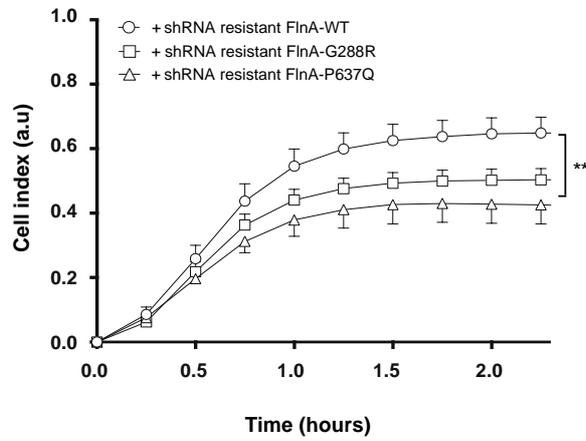
- [1] Y. Feng, C.A. Walsh, The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling, *Nat. Cell Biol.* 6 (2004) 1034–1038.
- [2] F. Nakamura, T.M. Osborn, C.A. Hartemink, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, Structural basis of filamin A functions, *J. Cell Biol.* 179 (2007) 1011–1025.

- [3] F. Nakamura, T.P. Stossel, J.H. Hartwig, The filamins: organizers of cell structure and function, *Cell Adh. Migr.* 5 (2011) 160–169.
- [4] J.H. Hartwig, J. Tyler, T.P. Stossel, Actin-binding protein promotes the bipolar and perpendicular branching of actin filaments, *J. Cell Biol.* 87 (1980) 841–848.
- [5] T.P. Stossel, J. Condeelis, L. Cooley, J.H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher, S.S. Shapiro, Filamins as integrators of cell mechanics and signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 138–145.
- [6] A.X. Zhou, J.H. Hartwig, L.M. Akyurek, Filamins in cell signaling, transcription and organ development, *Trends Cell Biol.* 20 (2010) 113–123.
- [7] X. Zhou, J. Boren, L.M. Akyurek, Filamins in cardiovascular development, *Trends Cardiovasc. Med.* 17 (2007) 222–229.
- [8] C.C. Cunningham, Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing, *J. Cell Biol.* 129 (1995) 1589–1599.
- [9] A. Lardeux, F. Kyndt, S. Lecoite, H.L. Marec, J. Merot, J.J. Schott, T. Le Tourneau, V. Probst, Filamin-a-related myxomatous mitral valve dystrophy: genetic, echocardiographic and functional aspects, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 4 (2011) 748–756.
- [10] S.S. Ithychanda, D. Hsu, H. Li, L. Yan, D.D. Liu, M. Das, E.F. Plow, J. Qin, Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 35113–35121.
- [11] H. Kim, F. Nakamura, W. Lee, C. Hong, D. Perez-Sala, C.A. McCulloch, 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.* 316 (2010) 1829–1844.
- [12] J.E. Gaweckka, G.S. Griffiths, B. Ek-Rylander, J.W. Ramos, M.L. Matter, R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells, *PLoS One* 5 (2010) e11269.
- [13] G.S. Griffiths, M. Grundl, J.S. Allen III, M.L. Matter, R-Ras interacts with filamin A to maintain endothelial barrier function, *J. Cell. Physiol.* 226 (2011) 2287–2296.
- [14] H. Falet, A.Y. Pollitt, A.J. Begonja, S.E. Weber, D. Duerschmied, D.D. Wagner, S.P. Watson, J.H. Hartwig, A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 1967–1979.
- [15] H. Kim, F. Nakamura, W. Lee, Y. Shifrin, P. Arora, C.A. McCulloch, Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 (2010) C221–C236.
- [16] S.P. Robertson, Z.A. Jenkins, T. Morgan, L. Ades, S. Aftimos, O. Boute, T. Fiskerstrand, S. Garcia-Minaur, A. Grix, A. Green, V. Der Kaloustian, R. Lewkonja, B. McInnes, M.M. van Haelst, G. Mancini, T. Illes, G. Mortier, R. Newbury-Ecob, L. Nicholson, C.I. Scott, K. Ochman, I. Brozek, D.J. Shears, A. Superti-Furga, M. Suri, M. Whiteford, A.O. Wilkie, D. Krakow, Frontometaphyseal dysplasia: mutations in FLNA and phenotypic diversity, *Am. J. Med. Genet. A* 140 (2006) 1726–1736.
- [17] V.L. Sheen, P.H. Dixon, J.W. Fox, S.E. Hong, L. Kinton, S.M. Sisodiya, J.S. Duncan, F. Dubeau, I.E. Scheffer, S.C. Schachter, A. Wilner, R. Henchy, P. Crino, K. Kamuro, F. DiMario, M. Berg, R. Kuzniecky, A.J. Cole, E. Bromfield, M. Biber, D. Schomer, J. Wheless, K. Silver, G.H. Mochida, S.F. Berkovic, F. Andermann, E. Andermann, W.B. Dobyns, N.W. Wood, C.A. Walsh, Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 1775–1783.
- [18] V.L. Sheen, A. Jansen, M.H. Chen, E. Parrini, T. Morgan, R. Ravenscroft, V. Ganesh, T. Underwood, J. Wiley, R. Leventer, R.R. Vaid, D.E. Ruiz, G.M. Hutchins, J. Menasha, J. Willner, Y. Geng, K.W. Gripp, L. Nicholson, E. Berry-Kravis, A. Bodell, K. Apse, R.S. Hill, F. Dubeau, F. Andermann, J. Barkovich, E. Andermann, Y.Y. Shugart, P. Thomas, M. Viri, P. Veggiotti, S. Robertson, R. Guerrini, C.A. Walsh, Filamin A mutations cause periventricular heterotopia with Ehlers-Danlos syndrome, *Neurology* 64 (2005) 254–262.
- [19] J.A. Bernstein, D. Bernstein, U. Hehr, L. Hudgins, Familial cardiac valvulopathy due to filamin A mutation, *Am. J. Med. Genet. A* 155A (2011) 2236–2241.
- [20] F. Kyndt, J.P. Gueffet, V. Probst, P. Jaafar, A. Legendre, F. Le Bouffant, C. Toquet, E. Roy, L. McGregor, S.A. Lynch, R. Newbury-Ecob, V. Tran, I. Young, J.N. Trochu, H. Le Marec, J.J. Schott, Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy, *Circulation* 115 (2007) 40–49.
- [21] M. Baldassarre, Z. Razinia, C.F. Burande, I. Lamsoul, P.G. Lutz, D.A. Calderwood, Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration, *PLoS One* 4 (2009) e7830.
- [22] K. Saito, Y. Ozawa, K. Hibino, Y. Ohta, FilGAP, a Rho/Rho-associated protein kinase-regulated GTPase-activating protein for Rac, controls tumor cell migration, *Mol. Biol. Cell* 23 (2012) 4739–4750.
- [23] R.J. Keogh, New technology for investigating trophoblast function, *Placenta* 31 (2010) 347–350.
- [24] C. Guilluy, A.D. Dubash, R. Garcia-Mata, Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus, *Nat. Protoc.* 6 (2011) 2050–2060.
- [25] C.C. Cunningham, J.B. Gorlin, D.J. Kwiatkowski, J.H. Hartwig, P.A. Janmey, H.R. Byers, T.P. Stossel, Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion, *Science* 255 (1992) 325–327.
- [26] Y. Ohta, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 803–814.
- [27] F. Nakamura, FilGAP and its close relatives: a mediator of Rho-Rac antagonism that regulates cell morphology and migration, *Biochem. J.* 453 (2013) 17–25.
- [28] G.M. Sawyer, A.J. Sutherland-Smith, Crystal structure of the filamin N-terminal region reveals a hinge between the actin binding and first repeat domains, *J. Mol. Biol.* 424 (2012) 240–247.
- [29] V. Sanz-Moreno, G. Gadea, J. Ahn, H. Paterson, P. Marra, S. Pinner, E. Sahai, C.J. Marshall, Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement, *Cell* 135 (2008) 510–523.
- [30] Y. Ohta, N. Suzuki, S. Nakamura, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 2122–2128.
- [31] A.J. Ehrlicher, F. Nakamura, J.H. Hartwig, D.A. Weitz, T.P. Stossel, Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A, *Nature* 478 (2011) 260–263.
- [32] J.M. Lambert, Q.T. Lambert, G.W. Reuther, A. Malliri, D.P. Siderovski, J. Sondke, J.G. Collard, C.J. Der, Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 621–625.
- [33] A.S. Nimmual, B.A. Yatsula, D. Bar-Sagi, Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos, *Science* 279 (1998) 560–563.
- [34] S. Schubbert, K. Shannon, G. Bollag, Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 295–308.
- [35] R.B. Hinton, K.E. Yutzey, Heart valve structure and function in development and disease, *Annu. Rev. Physiol.* 73 (2011) 29–46.
- [36] K. Sauls, A. de Vlaming, B.S. Harris, K. Williams, A. Wessels, R.A. Levine, S.A. Slaugenhaupt, R.L. Goodwin, L.M. Pavone, J. Merot, J.J. Schott, T. Le Tourneau, T. Dix, S. Jesinkey, Y. Feng, C. Walsh, B. Zhou, S. Baldwin, R.R. Markwald, R.A. Norris, Developmental basis for filamin-A-associated myxomatous mitral valve disease, *Cardiovasc. Res.* 96 (2012) 109–119.
- [37] C. Guilluy, M. Rolli-Derkinderen, P.L. Tharaux, G. Melino, P. Pacaud, G. Loirand, Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 2918–2928.
- [38] R.A. Norris, R. Moreno-Rodriguez, A. Wessels, J. Merot, P. Bruneval, A.H. Chester, M.H. Yacoub, A. Hagege, S.A. Slaugenhaupt, E. Aikawa, J.J. Schott, A. Lardeux, B.S. Harris, L.K. Williams, A. Richards, R.A. Levine, R.R. Markwald, Expression of the familial cardiac valvular dystrophy gene, filamin-A, during heart morphogenesis, *Dev. Dyn.* 239 (2010) 2118–2127.

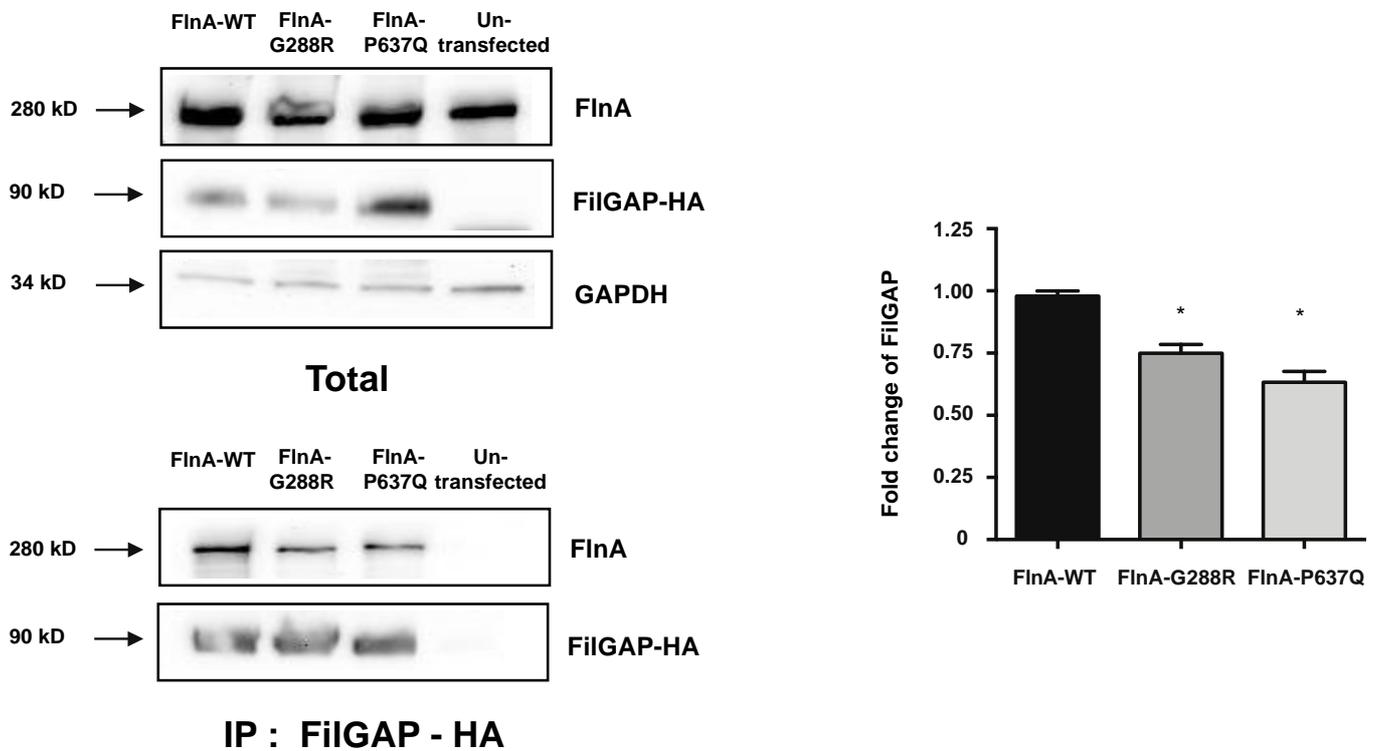
# Supplement data

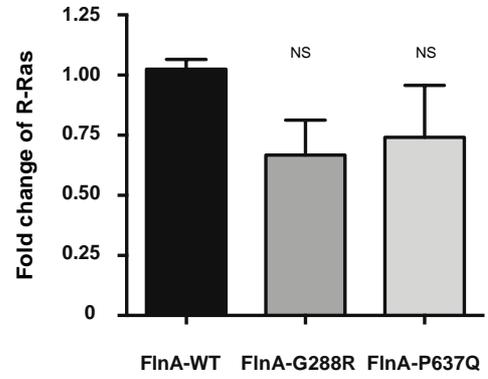
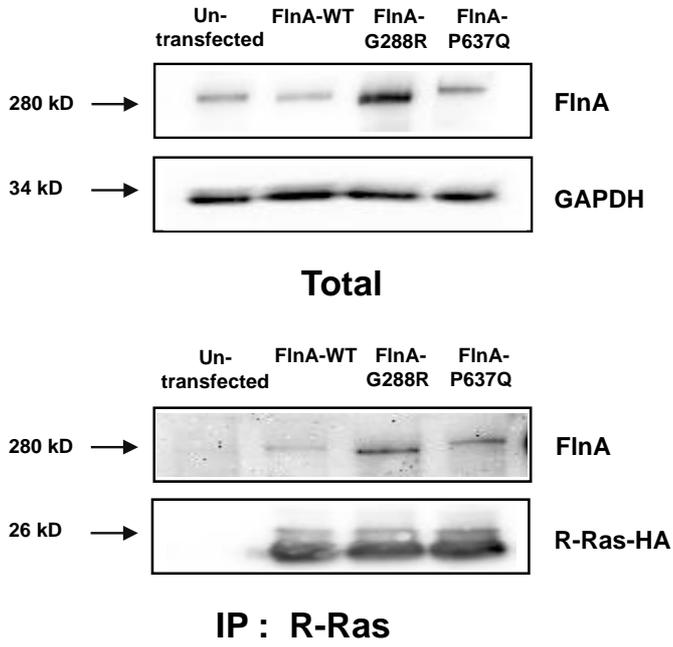
## S1

shRNA FlnA-knockdown HT1080 cells



## S2





### **3. Mises en évidence d'un autre mécanisme physiopathologique**

Les mutations de la FLNa altèrent la balance RhoA/Rac et mettent en évidence le rôle de FilGAP dans cette dérégulation. Cependant, certaines questions restent en suspend notamment « Comment les mutations de la FLNa modifient-elles l'activité de RhoA ? » ou « Quel est le lien entre une augmentation de l'activité de RhoA et la physiopathologie des valves ? ».

Des études précédentes ont montré qu'une suractivité de RhoA ou une diminution de l'activité de Rac conduisent à des atteintes valvulaires mais aucun lien n'a été établi avec la FLNa (Sanematsu et coll., 2010; Tan et coll., 2013; Bouchareb et coll., 2014). Pour tenter de répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés aux protéines interagissant dans la partie N-terminale de la FLNa afin d'identifier un ou des partenaires potentiellement responsables de l'augmentation de l'activité de RhoA.

Les protéines qui interagissent avec la FLNa le font majoritairement dans la partie C-terminale. Or les mutations identifiées dans la dystrophie valvulaire liée aux mutations de la FLNa sont localisées dans les 8 premiers domaines (domaines 1, 4, 5 et 6-8 ; Figure n°9C - Introduction -) (Kyndt et coll., 2007). Parmi les quelques protéines déjà identifiées, on trouve la protéine R-ras, une protéine G monomérique décrite comme interagissant avec le 3<sup>e</sup> domaine répété (Gawecka et coll., 2010). Son interaction avec la FLNa permet de maintenir R-ras active et d'améliorer les processus d'adhésion et de migration en maintenant les intégrines à la membrane. Cette interaction, FLNa-R-ras, est également impliquée dans le maintien de la barrière endothéliale en empêchant la phosphorylation de VE-Cadhérine (Griffiths et coll., 2011). Néanmoins, nos travaux ont démontré les mutations de la FLNa n'affectent pas l'interaction avec la protéine R-ras (Duval et coll., 2013). Les premiers domaines répétés de la FLNa également interagissent avec la protéines PKC ou la vimentine pour réguler la formation des filaments intermédiaires. Ces filaments participent au maintien de la structure de la cellule. Cependant, parmi ces quelques protéines, aucune n'est impliquée directement ou indirectement dans le maintien de l'activité de RhoA.

De précédents travaux initiés au laboratoire avaient pour but d'identifier de nouveaux partenaires interagissant avec les 8 premiers domaines répétés de la FLNa. L'hypothèse sous-jacente étant que les mutations de la FLNa modifieraient l'interaction avec l'un de ses partenaires.

#### **3.1. Identification d'une nouvelle protéine : La tyrosine phosphatase PTP-PEST**

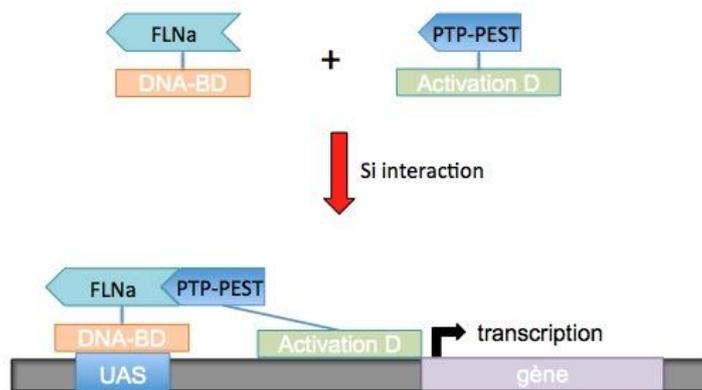
Les premiers tests d'interaction ont été effectués par la société « Hybrigenic » avec une approche de double hybride contre une banque de cDNA humain. La technique permet d'identifier des interactions protéiques grâce à la reconstruction d'un facteur de transcription fonctionnel. Dans un premier temps, cette société a réalisé un screening des protéines interagissant avec une construction contenant uniquement les 8 premiers domaines répétés ainsi que le 24<sup>e</sup> domaine répété de la FLNa.

Elle a établi une liste de protéines interagissant avec cette construction. Parmi ces partenaires, nous nous sommes intéressés à la protéine PTP-PEST (décrite dans le paragraphe 3.3 - Introduction -). Ce partenaire est intéressant puisqu'il est impliqué dans la régulation de la phosphorylation de nombreuses protéines participant au contrôle des adhésions focales. De plus, PTP-PEST régule l'activité d'une GAP de RhoA qui pourrait être responsable de l'augmentation de son activité.

J'ai entrepris de tester si les mutations de la FLNa modifient l'interaction avec cette protéine. Pour ce faire, différentes approches expérimentales ont été utilisées.

### 3.1.1. Technique de Double Hybride

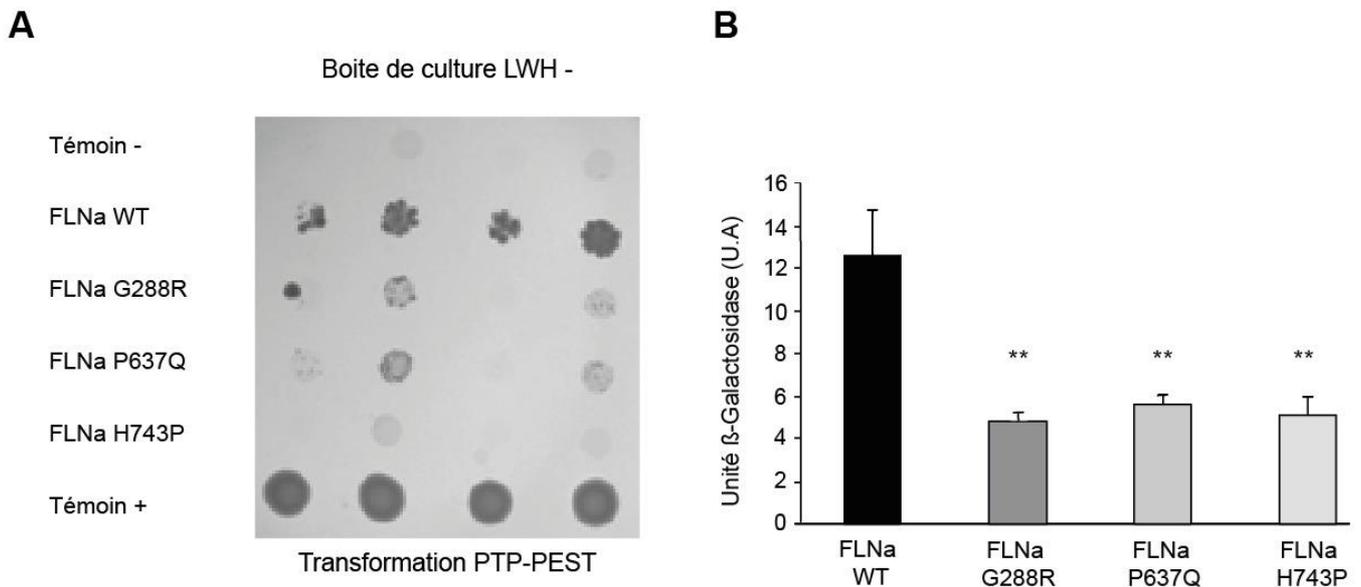
Le principe de la technique de double hybride en levure repose sur la reconstitution d'un facteur transcriptionnel fonctionnel. Pour cela, on utilise une protéine de fusion contenant un domaine de liaison à l'ADN et une autre protéine de fusion contenant un domaine d'activation. Lorsque ces 2 protéines interagissent, elles reconstituent le facteur de transcription et permettent la transcription d'un gène rapporteur. La protéine FLNa-WT ou mutée est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4. La sélection des levures synthétisant ces protéines de fusion s'effectue sur un milieu de culture dépourvu en leucine car elles expriment une enzyme nécessaire à la synthèse de cet acide aminé. La protéine de fusion PTP-PEST est fusionnée avec le domaine d'activation et la sélection des levures s'effectue quant à elle sur un milieu de culture dépourvu en tryptophane. L'interaction entre ces 2 protéines permet le rapprochement des 2 domaines (domaine de liaison à l'ADN et domaine d'activation) ce qui active la transcription du gène  $\beta$ -Gal4 (figure n°28). Ces 2 constructions sont co-transfectées dans une souche de levure : *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A. Un test d'auxotrophie (qualitative) et un test colorimétrique (quantitative) sont réalisés avec ces levures transformées pour estimer l'interaction entre les FLNa et la protéine PTP-PEST.



**Figure 28 :** Représentation schématique du mécanisme du double hybride en levure. La protéine FLNa est associée au domaine de liaison à l'ADN (DNA-BD) et la protéine PTP-PEST est associée au domaine (activation D). Si les 2 protéines interagissent, elles forment un facteur de transcription fonctionnelle qui va permettre la synthèse d'une enzyme (ici la  $\beta$ -Gal4).

- **Test d'auxotrophie** : Les levures transformées avec les 2 constructions poussent sur un milieu minimum de culture (Yeast Nitrogen Base) dépourvu en leucine et en tryptophane. Une fois les levures sélectionnées et amplifiées, elles sont ensemencées sur une boîte de gélose ne contenant ni leucine, ni tryptophane, ni histidine. En effet, l'interaction entre les 2 protéines (FLNa/PTP-PEST) permet de reconstituer le facteur de transcription Gal4. Ce facteur Gal4 permet la synthèse de l'enzyme nécessaire à la production d'histidine. Si l'interaction existe bien entre les 2 protéines alors les levures sont capables de pousser sur un milieu appauvri en histidine. A noter que cette technique est qualitative.

Ce test a montré que sur un milieu sans histidine, les levures exprimant la FLNa-WT et PTP-PEST sont capables de pousser alors que peu de clones exprimant les FLNa mutées sont présentes (figure 29-A). Ce résultat suggère que les FLNa mutées n'interagissent pas ou peu avec la protéine PTP-PEST.



**Figure 29 : Modification de l'interaction entre la FLNa et PTP-PEST.** **A.** test d'auxotrophie vis-à-vis de l'histidine. Les levures transformées ou non avec les différents plasmides (FLNa et PTP-PEST) sont déposées sous formes de patch sur des boîtes de culture sans Leucine, tryptophane et histidine (LWH-). Seules les levures témoin + et FLNa-WT/PTP-PEST poussent sur le milieu de culture. **B.** Test colorimétrique de la dégradation de ONPG en ONP par la  $\beta$ -galactosidase. Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes en unité de  $\beta$ -galactosidase (unité arbitraire). N=4, p<0.01.

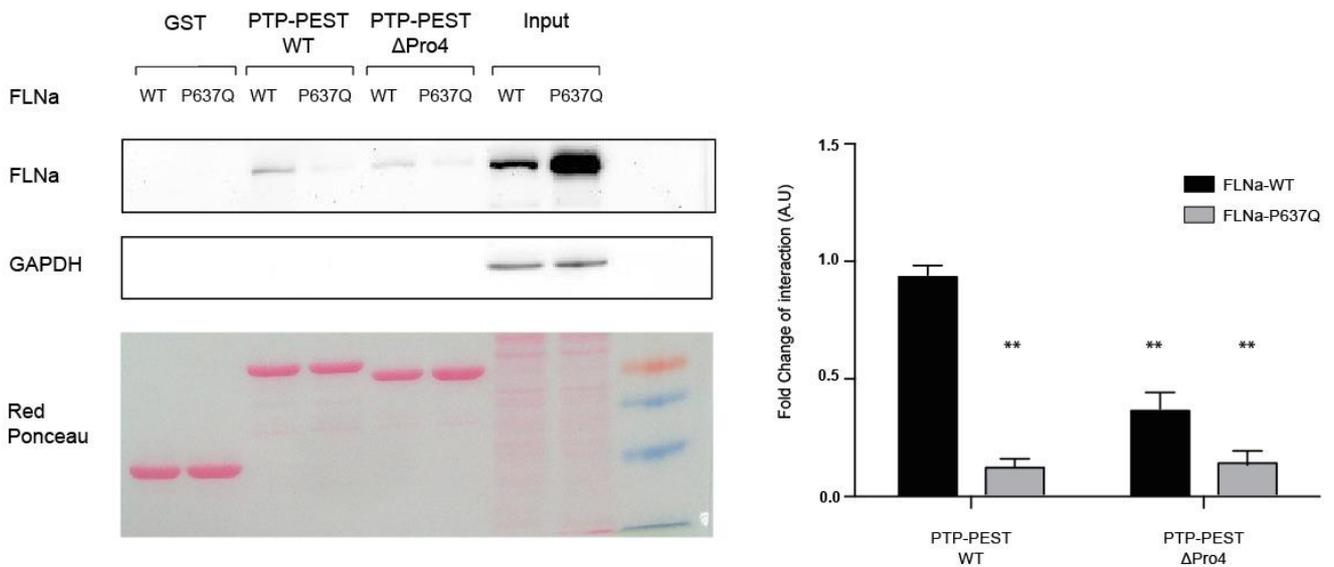
- **Test Colorimétrique** : Ce test repose sur la capacité de dégradation de l'Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside (ONPG) en Ortho-Nitro-Phényl (ONP) grâce à l'enzyme  $\beta$ -Galactosidase. La quantité d'ONP est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente. Comme dans le test d'auxotrophie, l'expression de la  $\beta$ -galactosidase est sous la dépendance du promoteur Gal4. La quantité de

$\beta$ -Galactosidase exprimée est proportionnelle à l'interaction réalisée entre les 2 protéines. L'avantage de cette technique est qu'elle est quantitative comparée au test d'auxotrophie.

Ces tests montrent une diminution de l'interaction de l'ordre de 60% entre les FLNa mutées et PTP-PEST (figure 29-B).

### 3.1.2. Technique de Pull down

Ces résultats de double hybride ont été confirmés par la technique de Pull Down (décrite dans la partie Matériel et Méthodes - 4.2) en utilisant des cellules de mélanomes exprimant les FLNa WT ou P637Q et des constructions de GST PTP-PEST. Ces constructions sont constituées de la GST et des acides aminés 600 à 709 de la protéine PTP-PEST qui forment le site d'interaction de la FLNa (Playford et coll., 2006). La seconde construction est semblable à la première à l'exception de 5 prolines qui sont délétées (construction PTP-PEST  $\Delta$ Pro4). Elle sert de contrôle négatif puisque ces prolines correspondent au site d'interaction entre PTP-PEST et la FLNa (Playford et coll., 2006).



**Figure 30 : Perte de l'interaction entre la FLNa-P637Q et PTP-PEST.** La technique de pull down a été utilisée avec des constructions de GST seul (contrôle -), GST-PTP-PEST WT et GST-PTP-PEST  $\Delta$ Proline 4 (sans zone d'interaction avec la FLNa). Un dépôt de 25  $\mu$ g d'échantillon total est déposé pour normaliser la quantité de FLNa présente. N=3, \*\* p<0.01.

Les signaux observés sur le western blot sont spécifiques puisqu'il n'y a pas d'interaction avec la protéine GST ou les billes d'agaroses. La FLNa-WT interagit avec la construction PTP-PEST alors qu'il n'y a peu d'interaction avec la FLNa-P637Q (diminution de 80%). Lors de l'utilisation de la

construction PTP-PEST  $\Delta$ Pro4, l'interaction avec la FLNa-WT ou P637Q est diminuée de 60% et de 80%, respectivement (figure n°30).

Ces résultats confirment une diminution de l'interaction entre la FLNa-P637Q et la protéine PTP-PEST obtenues en double hybride.

### 3.1.3. Technique d'Immunoprécipitation

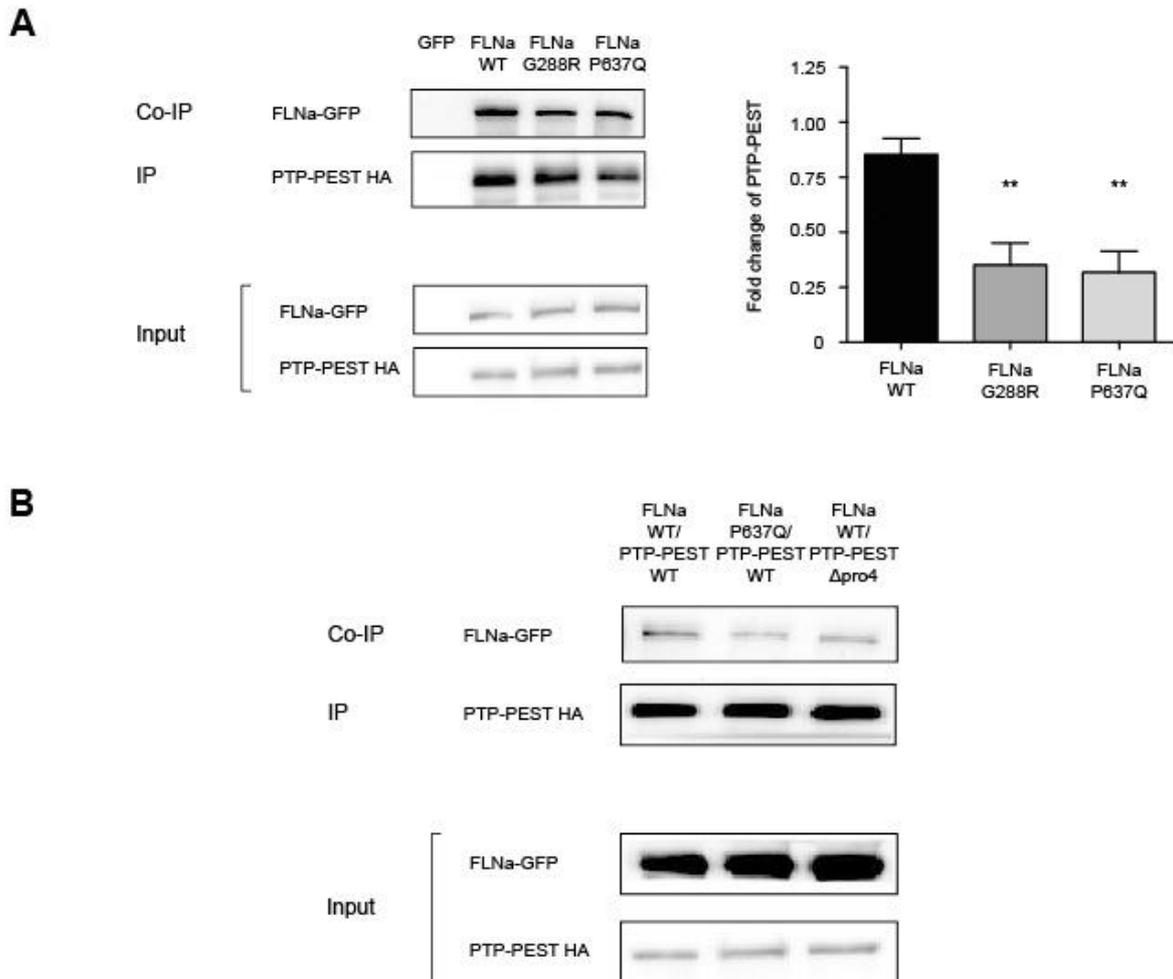
Les 2 techniques précédentes sont des approches où l'on utilise des constructions protéiques pour observer des interactions dites « *in vitro* ». Pour s'assurer de la validité de nos résultats « *in vitro* » j'ai réalisé des Co-IP.

Pour cela, les cellules de mélanome M2 ont été co-transfectées avec des constructions codant pour la FLNa marquée à l'aide de la GFP et la protéine PTP-PEST marquée à l'aide du tag HA. La protéine PTP-PEST a été immunoprécipitée grâce à l'anticorps HA et la présence de la FLNa a été révélée grâce à l'anticorps GFP.

Les Co-IP illustrées ci-dessous montrent que l'interaction entre la protéine PTP-PEST et les FLNa-G288R/P637Q est diminuée d'environ 60 % comparée à l'interaction entre la protéine PTP-PEST et la FLNa-WT (figure n°31 A).

La encore, la spécificité d'interaction a été testée entre ces 2 protéines à l'aide de la construction PTP-PEST  $\Delta$ Pro4. Les résultats obtenus avec cette construction montrent que l'interaction avec la FLNa-WT est diminuée d'environ 50% ce qui correspond au niveau à celui observé entre la protéine PTP-PEST et les FLNa mutées (figure n°31 B).

Ces différentes expériences ont permis l'identification d'un nouveau partenaire de la FLNa qui interagit dans les 8 premiers domaines répétés. Cette interaction est diminuée par la présence les mutations de la FLNa (G288R et P637Q) d'environ 60%. Ces résultats doivent être confirmés avec les protéines endogènes mais également dans un autre modèle cellulaire.



**Figure 31** : Co-Immunoprecipitation de PTP-PEST et de la FLNa. A. Co immunoprecipitation de la FLNa-WT ou mutée (GFP) et de la protéine PTP-PEST (HA) dans les cellules de M2. La variation d'interaction est représentée sous forme d'histogramme. N=4, \*\* p<0.01. B. Co immunoprecipitation de la FLNa-WT et mutée (GFP) et de la protéine PTP-PEST WT ou  $\Delta$ Proline 4 (HA) dans les cellules de M2.

### 3.2. Impact de la perte d'interaction de PTP-PEST

Les résultats précédents ont permis 1) d'identifier la protéine PTP-PEST comme un partenaire de la FLNa interagissant au niveau des 8 premiers domaines répétés de la FLNa et 2) de montrer que cette interaction est diminuée d'environ 60 % par les mutations de la FLNa. Maintenant, le but est d'identifier un lien potentiel entre la perte d'interaction avec la protéine PTP-PEST et l'augmentation de l'activité de RhoA dans les cellules exprimant la FLNa mutée et potentiellement le rôle de PTP-PEST dans le développement du processus pathologique.

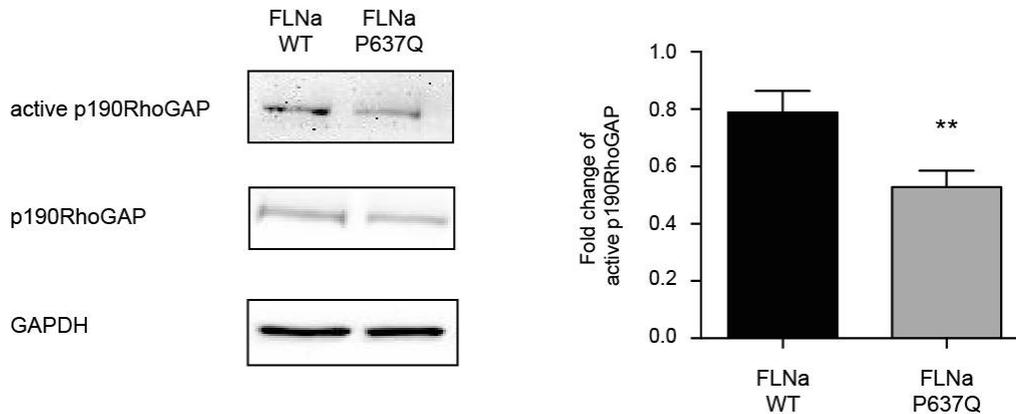
### 3.2.1. Modification de l'activité de p190RhoGAP

Parmi les protéines régulées par PTP-PEST, la protéine p190RhoGAP nous est apparue comme une cible intéressante. En effet, p190RhoGAP a été décrite comme diminuant l'activité de la protéine RhoA. Cette diminution est due à une activité plus importante de p190RhoGAP lorsqu'il est phosphorylé. Ce contrôle de l'état de phosphorylation de p190RhoGAP est effectué par la protéine PTP-PEST qui la déphosphoryle pour la rendre inactive (Sastry et coll., 2006).

Le rôle des mutations de la FLNa sur l'activité de p190RhoGAP a donc été évalué. L'activité de la protéine p190RhoGAP a été mesurée par une approche de pull down en utilisant une construction de RhoA active (RhoQ63L). Cette construction dominante active permet de fixer les protéines GAP et les effecteurs de RhoA. Le niveau d'interaction de la protéine avec cette construction permet d'évaluer son activité et indirectement d'en déduire son niveau de phosphorylation.

Les résultats montrent que la protéine p190RhoGAP se fixe moins sur la construction de RhoA active lorsque la FLNa-P637Q est exprimée. La fixation de la protéine p190RhoGAP est diminuée d'environ 40% dans les cellules exprimant la FLNa-P637Q comparée aux cellules exprimant la FLNa-WT (figure n°32).

Ce résultat suggère que la diminution de l'activité de p190RhoGAP pourrait expliquer le maintien de l'activité de RhoA. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer que la perte d'interaction entre les FLNa mutées et PTP-PEST est bien responsable de la diminution de l'activité de p190RhoGAP et par conséquent, de l'augmentation de celle de RhoA.



**Figure 32 :** Mesure de l'activité de p190RhoGAP. Le pull down de RhoA-Q63L permet de mesurer l'activité des GAP interagissant avec RhoA. L'activité de p190RhoGAP est diminuée dans les cellules FLNa-P637Q comparé au FLNa-WT. N=4, \*\* p<0.01.

Cela étant, ce résultat est intéressant puisqu'il permet de mettre en évidence un lien entre la perte d'interaction entre les FLNa mutées et PTP-PEST, et une hausse de l'activité de RhoA. La perte d'interaction pourrait déphosphoryler de façon plus importante p190RhoGAP et maintenir une activité

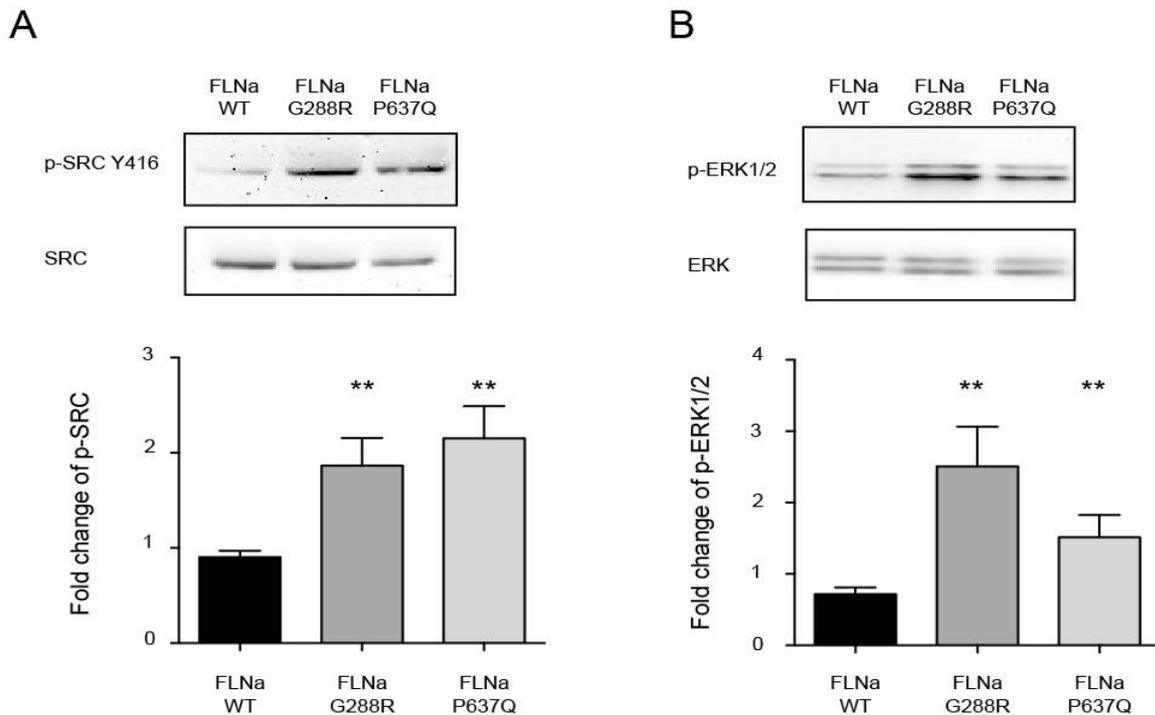
de RhoA élevée. Il reste cependant à comprendre l'impact de cette dérégulation dans la physiopathologie malgré les quelques évidences indiquant qu'une dérégulation de ces protéines est impliquée dans des valvulopathies (Tan et coll., 2013).

### 3.2.2. Modification de l'activité des protéines associées à la voie Ras

En plus de p190RhoGAP, la protéine PTP-PEST est impliquée dans la déphosphorylation de nombreuses protéines notamment celles associées à la voie Ras dont les protéines SRC et ERK.

La protéine SRC participe à la maturation des points focaux d'adhésion en activant de nombreux effecteurs. Elle est phosphorylée par la protéine FAK lors de l'engagement des intégrines. La protéine PTP-PEST intervient en déphosphorylant la tyrosine 416 de SRC ce qui la rend moins active (figure n°22) (Zheng et coll., 2009). De façon intéressante, j'ai montré que la phosphorylation de SRC sur la tyrosine 416 est plus élevée (environ 2x) dans les cellules exprimant la FLNa-P637Q comparée aux cellules exprimant la FLNa-WT (figure n°33 A).

La protéine ERK est régulée par la voie Ras via l'activation de la protéine SRC et elle est également décrite comme activant les gènes de la matrice extracellulaire. La protéine PTP-PEST peut influencer son niveau de phosphorylation via SRC. Là encore, j'ai montré que le niveau de phosphorylation de ERK1-2 dans les cellules exprimant les FLNa mutées est supérieur à celui des cellules exprimant la FLNa-WT (figure n°33 B).



**Figure 33:** Niveau de phosphorylation de ERK et de SRC. Western blot montrant le niveau de phosphorylation de SRC et ERK. Représentations graphiques des variations de la phosphorylation entre les FLNa-WT et les FLNa mutées. N=5, \*\*p<0.01

Ces résultats suggèrent que l'activité de la voie Ras est augmentée dans les cellules exprimant la FLNa mutée. L'augmentation de la phosphorylation de SRC sur la tyrosine Y416 renforce la phosphorylation de FAK ce qui conduit à une maturation plus importante des points focaux. La maturation des points focaux diminue la migration cellulaire. Ce qui est cohérent avec les défauts de migration identifiés dans les modèles cellulaires exprimant les FLNa mutées.

L'activité de la protéine ERK est plus importante dans les cellules exprimant la FLNa mutée ce qui est en corrélation avec une activité de SRC augmentée. Il a été démontré qu'une activité élevée de la protéine ERK 1-2 conduit à une augmentation de la sécrétion des constituants de la MEC. En effet, chez des souris traitées avec du TGF- $\beta$  ou avec de la 5-HT, la voie ERK 1-2 est suractivée ce qui a pour conséquence un remodelage excessif de la matrice extracellulaire (Jian et coll., 2002; Habashi et coll., 2011). Ce remodelage chez ces souris est très similaire à celui observé chez les patients porteurs des mutations de la FLNa suggérant ainsi le rôle potentiel de ERK 1-2 dans le processus physiopathologique.

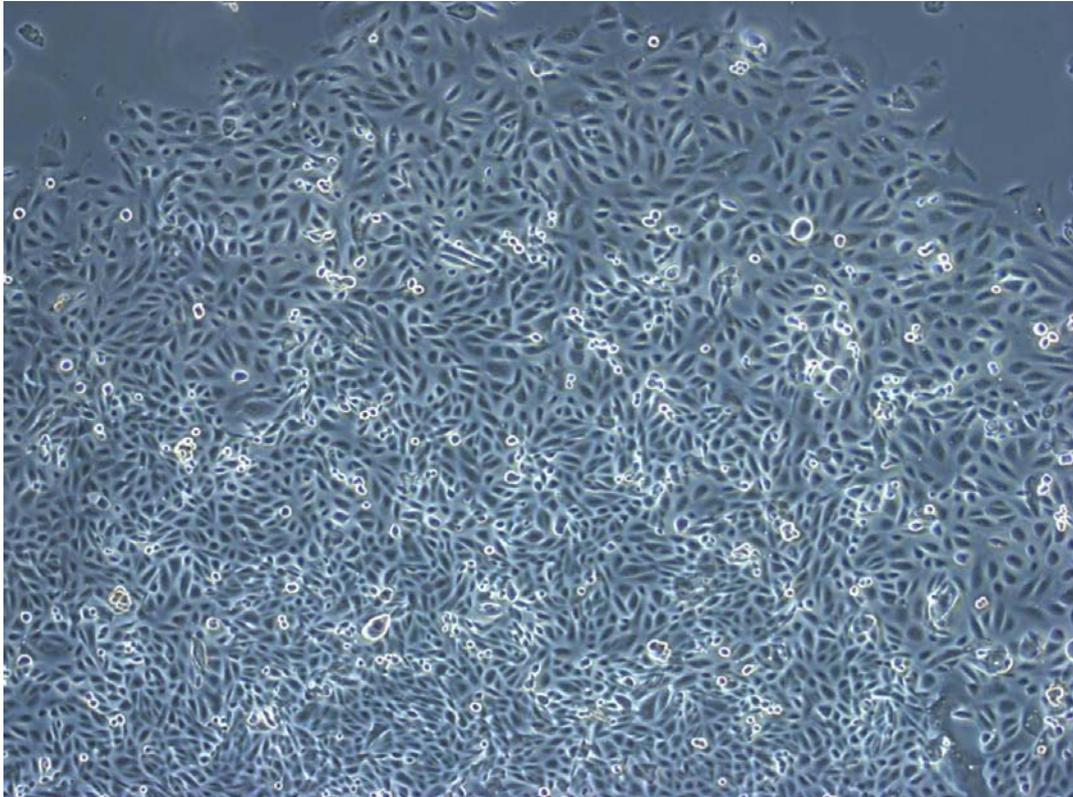
#### **4. Développement d'un nouveau modèle cellulaire.**

Pour mettre en évidence des mécanismes physiopathologiques, il est nécessaire d'utiliser un modèle cellulaire adapté. Or, l'une des limites de notre travail est l'utilisation de modèles cellulaires très éloignés des CIV et dont la pertinence peut-être discutée pour identifier ces mécanismes pathologiques. La 1<sup>ère</sup> alternative est l'utilisation de CIV provenant de modèles animaux mais ces cellules devront être transfectées pour exprimer les mutations de la FLNa. On se retrouve alors à nouveau dans un modèle de surexpression de. Une autre alternative est l'utilisation de cellules provenant de patient qui expriment de façon endogène les mutations. Les cellules IPS constituent alors un modèle particulièrement intéressant.

En collaboration avec l'équipe de Karim Si-Tayeb (UMR 1087- *l'institut du thorax*), nous développons un modèle d'IPS à partir de cellules souches urinaires de patients. Les urines sont récupérées auprès des patients par l'équipe clinique du CHU. L'intérêt majeur de cette approche est le caractère non invasif d'un prélèvement d'urine comparé à une biopsie. Les cellules qu'elles contiennent sont isolées et mises en culture dans un milieu adéquat pour permettre l'obtention de clones de cellules souches urinaires (USC). Ces cellules seront ensuite transformées en IPS par la transfection de facteurs de transcription spécifiques. Les IPS sont des cellules souches pluripotentes induites fabriquées en laboratoire à partir de cellules adultes. Ces cellules peuvent théoriquement se différencier en n'importe quelles autres cellules de l'organisme. Les IPS obtenues seront ensuite différenciées en cellules endocardiques à l'origine des CIV (Collaboration avec Michel Pucéat, Marseille). Cependant, il est relativement difficile d'obtenir des cellules IPS malgré les avancées dans le domaine. Nous avons donc décidé d'utiliser directement les USC pour déterminer si elles pouvaient être un modèle pertinent permettant de mettre en évidence des mécanismes physiopathologiques.

Grâce à l'équipe clinique du CHU, nous avons obtenu plusieurs échantillons d'urine porteurs des mutations de la FLNa. A ce jour, les USC de 5 patients FLNa-P637Q et 2 patients FLNa-H743P ont été isolées puis congelées dès les premiers passages de culture (passage 2 et 3). Les USC contrôles proviennent soit de donneurs sains soit de patients atteints de pathologie ne présentant aucune caractéristique communes avec la pathologie étudiée (patients atteints d'arythmies ou de problèmes endocrinologiques). La caractérisation de ces cellules est réalisée par l'équipe de Karim Si-Tayeb selon différents critères. Tout d'abord, il y a leur morphologie en forme de « grain de riz » assez caractéristique lorsqu'elles sont en culture. Elles ont également une capacité de prolifération rapide lors des premiers passages de culture. Une analyse par cytométrie en flux a montré l'absence de marqueurs de cellules souches hématopoïétiques tels que CD14, CD45 et CD184, et de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que CD49a, CD73, CD90 et CD105. De plus, contrairement aux cellules souches mésenchymateuses, les USC expriment fortement le CD146 qui est un marqueur de péricytes. Enfin, les USC ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires tels que des cellules musculaires lisses, squelettiques, cellules endothéliales, neuronales, urothéliales, voir en

ostéocytes et chondrocytes lorsqu'elles sont stimulées avec des cytokines et des facteurs de croissances spécifiques.



**Figure 34 : Morphologie des USC en culture.** Image en contraste de phase des USC après 5 jours de culture au fond d'une boîte de culture de 10 cm de diamètre recouvert de 0,1% de gélatine. Les USC présente un aspect en forme de « grain de riz ».

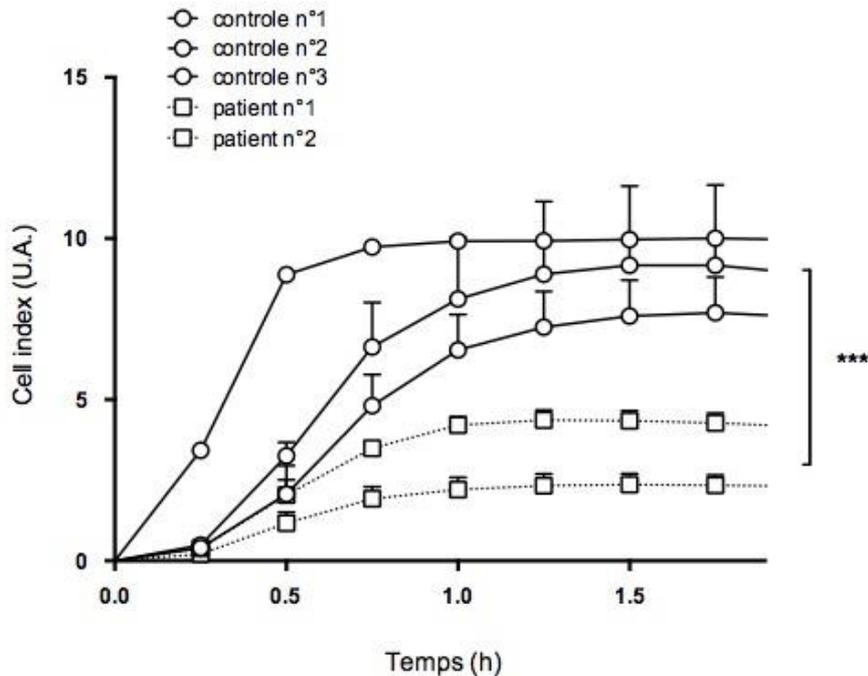
#### 4.1.1. Les USC : un modèle pertinent pour les valvulopathies ?

Dans cette démarche d'obtenir un nouveau modèle cellulaire, j'ai tenté de prouver que 1) les USC présentaient les mêmes défauts observés dans les 2 modèles que nous avons utilisé (mélanomes et HT1080) et 2) de définir des tests plus physiologiques pour mettre évidence des mécanismes pathologiques.

- Défaut d'adhésion et d'étalement : L'un des tests mis en place pour caractériser les modèles précédents était l'approche xCELLigence pour analyser les processus d'adhésion et d'étalement en n'utilisant qu'un faible nombre de cellules. j'ai donc comparé les USC provenant de 3 patients contrôles et de 2 patients FLNa-P637Q. Ces cellules primaires ont été utilisées entre le passage 3 et le passage 6 de culture.

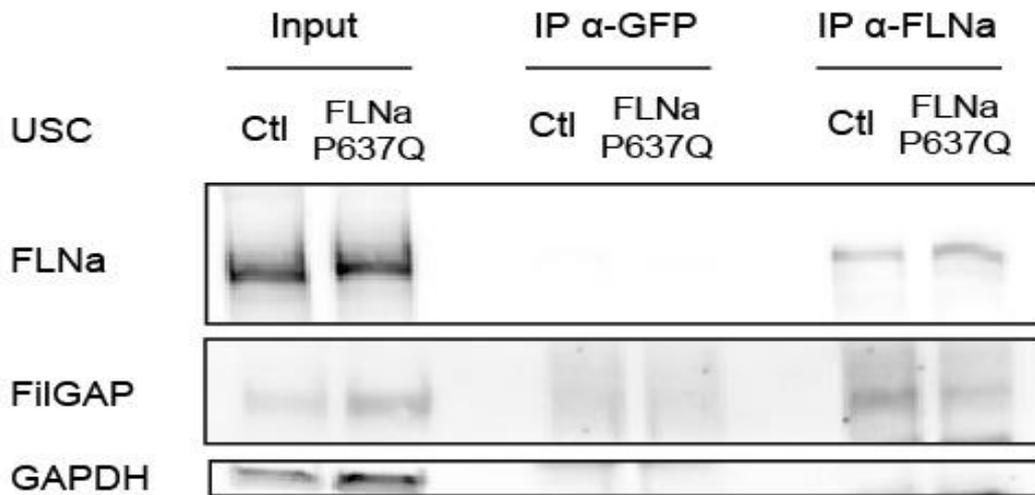
Comme cela est représenté sur le graphique ci-dessous (figure n°34), les courbes des *cell index* des USC FLNa-P637Q (carrés) sont moins élevées que celles des USC contrôles (ronds) traduisant des défauts d'adhésion et d'étalement.

Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus sur le modèle de mélanomes ou de fibrosarcomes (figure n°6 et S1 du papier FLNa).



**Figure 35 : Processus d'adhésion et d'étalement des USC.** Les USC contrôles et FLNa-P637Q sont déposées en triplicata sur une plaque xCELLigence. Les USC contrôle (rond) présentent un *Cell index* plus important au cours du temps en comparaison aux USC FLNa-P637Q (carré). N=3, \*\* p<0.01

- Perte d'interaction FLNa-FilGAP : Dans un second temps, j'ai testé la perte d'interaction entre la FLNa-P637Q et la protéine FilGAP. Comme cela est illustré sur le western blot ci-dessous dans les USC de patients, l'interaction FLNa-P637Q et FilGAP est diminuée d'environ 65% par rapport à celle de la FLNa-WT (figure n°35). Ce premier résultat confirme ceux obtenus précédemment avec les cellules de mélanomes.



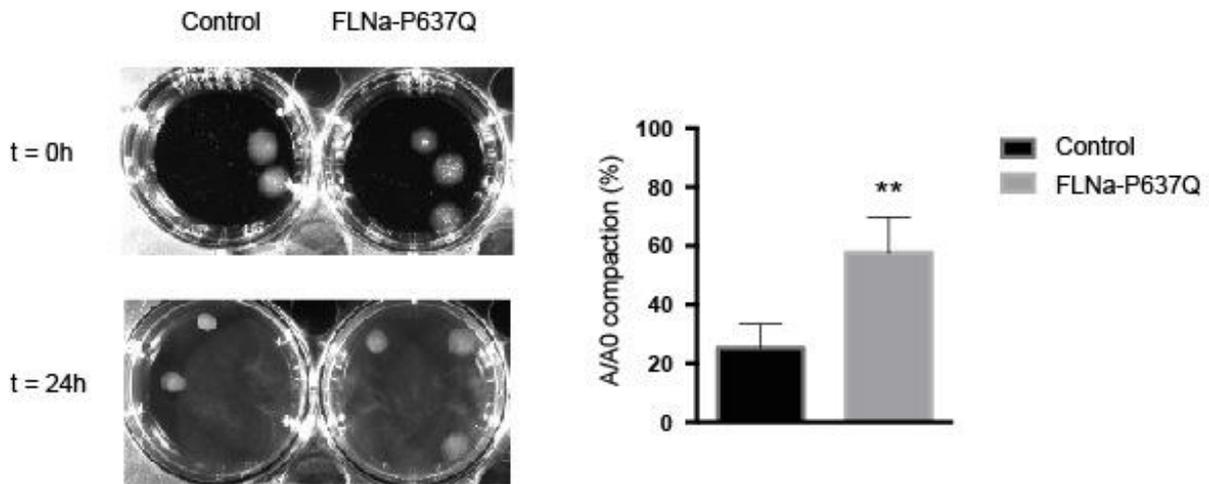
**Figure 36 :** Co-immunoprecipitation FLNa-FilGAP. Immunoprecipitation des FLNa et révélation de la protéine FilGAP dans des USC contrôles et FLNa-P637Q. L’immunoprecipitation avec l’anticorps GFP sert de contrôle négatif et le dépôt total (input) permet de s’assurer de la quantité de protéine total présente.

#### 4.1.2. Remodelage de la matrice du collagène

L’un des tests couramment utilisé pour analyser le rôle des CIV dans l’homéostasie de la MEC valvulaire est la compaction d’un gel de collagène I (Butcher et coll., 2007). Dans ce test, les cellules sont entourées d’une matrice de collagène qui polymérise pendant 24h puis les gels sont détachés du fond de la boîte de culture. La diminution de la taille des gels traduit la capacité des cellules à se contracter et à réorganiser la matrice qui les entoure.

Comme cela est représenté sur la figure ci-dessous (figure n°36), la taille des gels contenant les USC contrôle est réduite d’environ 80% en 24h alors que celle des dômes USC FLNa-P637Q ne l’est que de 40%.

Ce résultat suggère que les USC FLNa-P637Q ne peuvent compacter la matrice de collagène. Cela peut être contradictoire avec les résultats précédents montrant que la voie RhoA est suractivée dans les cellules FLNa-P637Q et que cela devrait entraîner une augmentation de la contractilité cellulaire et donc une compaction plus importante des gels. Cependant, ces résultats contradictoires peuvent être dus au fait que dans ces 2 expériences que les cellules étaient soit cultivées en 2D soit en 3D. Or, il a été démontré que les voies de signalisations et le phénotype des cellules cultivées en 2D ou en 3D pouvait être très différent voir opposé (Wozniak et coll., 2004; Shi et Tarbell, 2011; Ingesson-Carlsson et Nilsson, 2013)



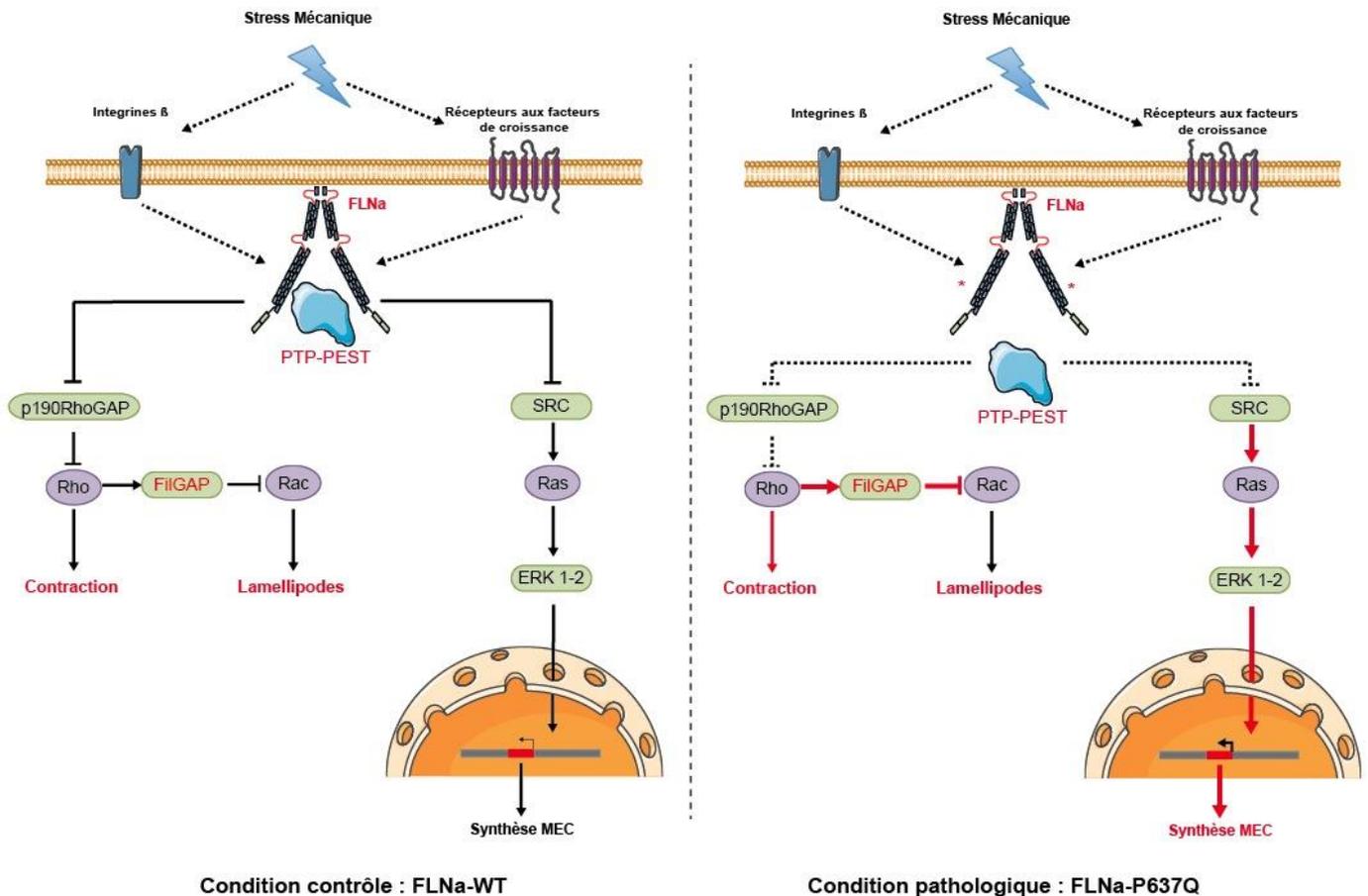
**Figure 37 :** **Compaction des gels de collagène avec les USC.** Les USC sontensemencées dans un dôme de collagène I pendant 24h. Une fois libérées, les photos sont prises toutes les heures pour déterminer le diamètre des dômes. La compaction des dômes est quantifiée et représentée sur l’histogramme à droite. N=3, \*\* p<0.01.

L’ensemble de ces premiers tests sur les USC tend à indiquer que les USC sont un modèle cellulaire pertinent pour étudier les mécanismes physiopathologiques. L’un des avantages de ces cellules est l’expression endogène de la mutation de la FLNa ainsi que leur facilité d’obtention. Maintenant, nous devons approfondir la caractérisation de ces cellules tant au niveau fonctionnel qu’au niveau biochimique. A l’avenir, on peut espérer que ces cellules permettront d’étudier les mécanismes physiopathologiques dû aux mutations de la FLNa lors de leur réponse à un stress mécanique ou lors du processus d’EMT.

La suite de ce projet est la création de cellules IPS à partir des USC dans le but de les différencier en CIV. L’obtention de ces CIV de patients dérivés d’IPS nous permettra d’étudier plus précisément le développement de la pathologie et notamment l’impact que peut avoir le stress mécanique. A ce jour, nous avons réussi à obtenir d’2 clones de cellules IPS d’un patient mutée FLNa-P637Q.

## 5. Discussion

Dans ce projet, j'ai étudié les effets des mutations de la FLNa identifiées dans une dystrophie valvulaire non syndromique. Dans un modèle de mélanome humain, j'ai montré que les mutations de la FLNa modifient l'activité des protéines G monomériques en faveur d'une augmentation de l'activité de RhoA et d'une diminution de l'activité de Rac1 liée à la protéine FilGAP. Les répercussions phénotypiques sont des défauts d'adhésion, d'étalement et de migration. Cela nous a permis d'identifier un nouveau rôle de la partie N-terminale de la FLNa et d'appréhender un mécanisme physiopathologique potentiel. L'une des explications possible à l'augmentation de la voie RhoA serait la perte d'interaction entre la FLNa et la protéine PTP-PEST qui engendrerait une mauvaise localisation de la phosphatase. Cela modifierait l'activité de p190RhoGAP, SRC et ERK1-2 (figure n°38). Néanmoins, ces résultats soulèvent quelques points de discussion.



**Figure 38 :** Schéma récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans la dystrophie valvulaire liée aux mutations de la FLNa. Dans des conditions normales, la FLNa interagit avec la protéine PTP-PEST ce qui limite son effet sur p190RhoGAP et SRC. La conséquence est un maintien du niveau basal des voies sous-jacentes (Rho, Rac, ERK). Dans des conditions pathologiques, la diminution de l'interaction entre la FLNa et PTP-PEST ne régule plus les protéines p190RhoGAP et SRC ce qui entraîne l'augmentation de la voie Rho et de la voie ERK qui activent la synthèse de gènes de la matrice possiblement impliquée dans la pathologie.

## 5.1. La pertinence du modèle cellulaire

L'une des difficultés rencontrée dans ce projet réside dans le choix d'un modèle cellulaire pertinent pour mettre en évidence un mécanisme physiopathologique. L'ensemble de ces expériences a été réalisé avec différentes lignées cellulaires : une lignée de mélanome humain (M2) et une lignée de fibrosarcomes (HT1080) (Cunningham et coll., 1992; Baldassarre et coll., 2009). En effet, l'expression ubiquitaire de la FLNa ainsi que son hétérodimérisation avec la FLNb compliquent l'étude de ces mutations dans n'importe quel modèle cellulaire. Ce sont les raisons pour lesquelles, au commencement de ce projet, le modèle de mélanome nous est apparu comme un modèle d'étude « adapté » pour essayer de comprendre les effets des mutations de la FLNa.

Les cellules M2 ont la particularité d'être dépourvues « naturellement » en FLNa (Jeon et coll., 2008). Ce modèle nous est apparu « adapté » pour exprimer de façon stable les FLNa mutées. Lors de la création des lignées stables exprimant la FLNa-WT ou mutée, nous avons respecté certaines données de la littérature concernant l'expression de la FLNa pour sélectionner les clones pour avoir un ratio entre la quantité de FLNa et d'actine pour que la cellule est une activité normale (Cunningham et coll., 1992). De plus, il faut noter que ce modèle est une lignée cancéreuse présentant des modifications de certaines voies de signalisation ainsi que du génome pouvant fausser les mécanismes physiopathologiques observés. Quoiqu'il en soit, même si les cellules de mélanomes sont éloignées des CIV, elles nous ont permis d'identifier des voies de signalisation potentiellement impliquées dans la pathologie et de mieux comprendre l'effet des mutations de la FLNa.

De plus, les résultats ont été confirmés dans un modèle de fibrosarcomes HT1080 où l'expression de la FLNa est diminuée par un shRNA contre la FLNa. Néanmoins, il s'agit toujours d'un modèle dérivé de cellules cancéreuses dans lequel les FLNa sont surexprimées de façon transitoire. L'un des inconvénients de ce modèle est le niveau d'expression de la FLNb qui peut compenser les effets de la diminution de la FLNa. En effet, l'équipe de M. Lutz a montré que seuls les HT1080 KO pour les 2 FLN présentent des défauts de migration alors qu'ils ne sont pas présents quand la FLNa ou la FLNb sont absentes suggérant une compensation de l'une par l'autre (Baldassarre et coll., 2009). Cependant, les défauts que j'ai mis en évidence dans ce modèle exprimant les mutations de la FLNa peuvent être atténués par la présence de la FLNb et ce, malgré la surexpression de la FLNa. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet des mutations de la FLNa sur l'hétérodimérisation avec la FLNb. En effet, comme les CIV expriment la FLNb, il se peut que l'effet des mutations de la FLNa soit atténué par son hétérodimérisation et explique ainsi potentiellement les divers degrés de sévérité présents chez les patients porteurs de la mutation (Sousa et coll., 2010)

L'utilisation de cellule IPS issues de patient pourrait être une alternative à l'utilisation de lignée cellulaire et nous avons initié cette démarche. Cependant, ces cellules IPS sont en cours d'obtention auprès de Michel Pucéat à Marseille mais la tâche n'est pas facile. En parallèle des

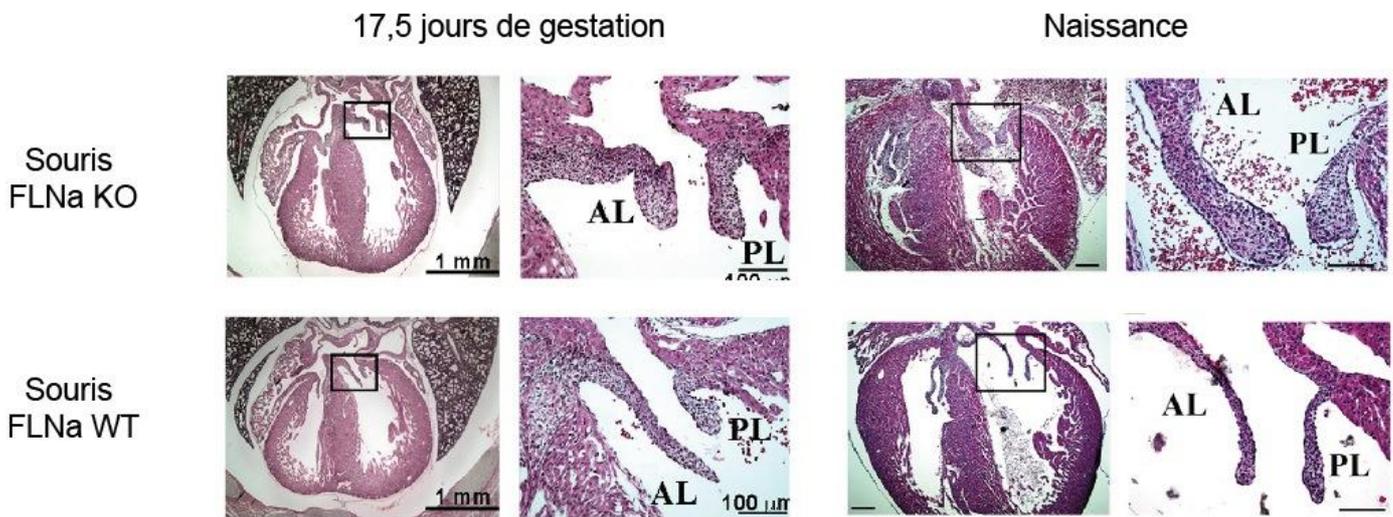
travaux de Michel Pucéat, nous collaborons avec l'équipe de Karim Si-Tayeb pour utiliser les cellules souches urinaires de patients (USC) pour les différencier en IPS pour ensuite obtenir des CIV. Cependant, les USC peuvent être un modèle cellulaire pertinent pour étudier les mécanismes physiopathologiques puisqu'elles expriment de façon endogène la mutation. Comme évoqué précédemment, les premiers résultats sur les USC sont prometteurs et concordants avec ceux obtenus avec les mélanomes ou avec les fibrosarcomes. Ce modèle est intéressant puisque les prélèvements d'urine sont non invasifs et peuvent être obtenus de façon régulière auprès des patients. Il reste cependant à déterminer si les USC sont pertinentes d'un point de vue physiopathologique car elles restent assez éloignées des CIV.

Toujours avec l'objectif est de trouver un modèle cellulaire différent des lignées cancéreuses utilisées précédemment pour nous permettre d'étudier les mécanismes physiopathologiques liés aux mutations de la FLNa, nous avons obtenue des biopsies de patient pour essayer d'en extraire les t les CIV. Cependant, il est très difficile d'en obtenir puisque les valves ne sont remplacées que dans des cas très graves. Cela sous-entend que la valve est très endommagée et donc qu'il est impossible d'en extraire les cellules. Nous avons donc décidé de mettre au point l'extraction des CIV présentes dans les valves de souris qui est un modèle couramment utilisé en laboratoire. Cependant, les premiers essais que j'ai effectués n'ont pas été concluants du fait de la difficulté d'isoler les valves. En effet, les valves de souris sont très fragiles, translucides et de petite taille ce qui limite la quantité de cellules obtenue. Pour avoir un nombre suffisant de cellules pour étudier les mécanismes physiopathologiques, il faudrait un nombre conséquent de souris. L'alternative serait l'utilisation de plus gros animaux tels que le porc ou le lapin pour isoler les CIV. Cependant, les cellules isolées se différencient très vite en CIV actives (présence d' $\alpha$ -SMA) en culture ce qui n'est peut-être pas le reflet de la réalité. Elles sont également difficilement transfectables ce qui compliquent la tâche pour étudier les mutations de la FLNa.

Pour s'affranchir de la transfection de ces cellules, il a été envisagé l'utilisation d'un modèle de souris exprimant les mutations de la FLNa. Il est vrai que les modèles cellulaires décrits précédemment ne sont peut-être pas le reflet de la physiopathologie et donc le modèle animal apparaît comme le plus pertinent et notamment le modèle de souris. Il permettrait de comprendre les mécanismes physiopathologiques liés au remodelage de la MEC au cours du temps en prenant en compte différents paramètres physiologiques (stress mécanique, système hormonal) et de pouvoir tester différentes approches thérapeutiques sur les voies de signalisation que nous avons identifiées. A ce jour, Il existe différents modèles de souris KO pour la FLNa. La première souris KO pour la FLNa a été créée en 2006 par Hart et collaborateurs (Hart, 2006). La mutation de la FLNa en position 2388, induite chimiquement, conduit à l'absence d'expression chez ces souris. Il en résulte des défauts de formation du squelette chez les femelles et une létalité *in utero* accrue chez les mâles. En effet, les mâles présentent des défauts de développement cardiaque accompagnés de multiples malformations squelettiques. Un second modèle de souris conditionnelle pour la FLNa a été développé par Feng et

son équipe (Feng et coll., 2006). Les souris femelles hétérozygotes sont viables mais les mâles meurent *in utero* avec la présence de nombreuses malformations cardiaques. Ces résultats montrent que la FLNa est indispensable pour le développement cardiaque.

Nos collaborateurs du réseau Leducq ont développé un modèle de souris KO conditionnelle pour la FLNa au niveau des cellules endothéliales. Ces souris présentent un épaissement des valves cardiaques du cœur gauche ainsi que des régurgitations mitrales (figure n°39) (Sauls et coll., 2012). Ces travaux ont montré que la FLNa est nécessaire durant l'embryogenèse pour la formation des valves. En effet, au 17.5<sup>e</sup> jour de gestation, les souris KO pour la FLNa présentent des valves déjà épaissies ressemblant au phénotype présent chez les patients. A la vue de ces résultats, on peut extrapoler que les mutations de la FLNa affecteraient l'embryogenèse des valves conduisant à un phénotype pathologique. En accord avec cette idée, un enfant porteur de la mutation de la FLNa-P637Q présente un léger prolapsus mitral depuis l'âge de 1 an.



**Figure 39 :** Coupe histologique de valves des souris KO pour la FLNa. Comparaison des coupes histologiques de cœurs de souris KO pour la FLNa et de souris contrôle au 17,5<sup>e</sup> jours de gestation et à la naissance. Les feuillets valvulaires mitraux sont plus épais chez les souris KO pour la FLNa comparé à ceux de la souris contrôle. D'après (Sauls et coll., 2012).

La suite de ce projet est 1) d'identifier les voies de l'embryogenèse et notamment celles de l'EMT modifiées par les mutations de la FLNa et donc potentiellement impliquées dans ce processus pathologique. Parmi ces voies, celles de la sérotonine (5-HT) et du TGF- $\beta$  (décrites ci-dessous) ont été décrites comme étant impliquées dans des valvulopathies seront étudiées. 2) l'impact du stress mécanique dans le développement de la pathologie car la FLNa est un mécanosenseur et que les valves subissent les plus fortes contraintes mécaniques de l'organisme.

## 5.2. Implication de la voie sérotoninergique

La 5-HT est un neurotransmetteur sécrété à 95% par les cellules entérochromaffines de l'intestin et à 5% par les neurones. Elle est stockée majoritairement dans les plaquettes (Ni et Watts, 2006). L'effet de la 5-HT est médié par 7 types de récepteurs à 7 domaines transmembranaires (5-HT<sub>R1-7</sub>). Tous ces récepteurs sont couplés à la protéine Gq à l'exception du 5-HT<sub>R3</sub> qui est un récepteur canal à perméabilité cationique. La voie des MAP-kinases impliquant notamment la protéine ERK1-2 est activée par la fixation de la 5-HT sur le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> agissant ainsi sur la prolifération cellulaire et le remodelage de la MEC (Launay et coll., 1996). La synthèse de la 5-HT est sous la dépendance d'une enzyme, la Tryptophane hydroxylase 1 (TPH1) qui hydrolyse le tryptophane en 5-HT. Par exemple, chez le chien, un stress mécanique cyclique augmente la synthèse de cette enzyme ce qui conduit à la production excessive de 5-HT (Lacerda et coll., 2012). L'effet de la 5-HT est aboli par le transporteur SERT qui permet de l'internaliser et de la métaboliser (Ni et Watts, 2006).

La voie de la 5-HT participe au processus de valvulogénèse et a été identifiée comme étant un facteur contribuant au développement de valvulopathies (Jian et coll., 2002). En effet, il est bien connu aujourd'hui, qu'une forte concentration de 5-HT circulante induit des valvulopathies (Ayme-Dietrich et coll., 2012). C'est le cas, par exemple, des patients atteints de tumeurs carcinoïdes dont la sécrétion de 5-HT est anormalement élevée conduit à un remodelage excessif de la valve mitrale (Gustafsson et coll., 2008). Les caractéristiques de ces valvulopathies sont 1) une prolifération importante de CIV activées, 2) une fibrose et 3) des dépôts myxoïdes sous forme de plaque sur la valve. Ce phénotype est semblable à celui observé chez les patients porteurs de la mutation FLNa. Cela a également été confirmé lorsque des rats traités avec une dose chronique de 5-HT qui présentaient les mêmes atteintes valvulaires. En effet, les CIV de ces souris augmentent l'expression du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> à la membrane et diminuent l'expression du transporteur SERT favorisant l'augmentation de 5-HT extracellulaire (Elangbam et coll., 2008). Il a également été observé chez des chiens atteints de dégénérescence canine de la valve mitrale qui est l'équivalent chez le chien de la pathologie humaine du PVM, une augmentation de la 5-HT circulante associée à un remodelage excessif de la MEC (Oyama et Levy, 2010).

De même, les valvulopathies médicamenteuses utilisant des dérivés des Fenfluramines (Meditor®) ou des dérivés des pergolides (Lisuride) qui sont des médicaments agonistes de la 5-HT induisent des valvulopathies avec une atteinte mitrale très importante via la stimulation du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> (Hofmann et coll., 2006; Rothman et Baumann, 2009). Des travaux de Roland Lawson sur l'effet des dérivés des Fenfluramines dans le développement de valvulopathies chez des souris ont montré l'importance du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> ainsi que la contribution du 5-HT<sub>2A</sub> dans ce processus dégénératif. En effet, lorsqu'il utilise des inhibiteurs pharmacologiques de ces récepteurs, il arrive à limiter le développement de valvulopathie. De plus, il a mis en évidence le rôle des CEV dans ce

processus en bloquant l'activité de la eNOS ce qui a pour conséquence de limiter le développement de la pathologie (Données non publiées, communication orale GRRC 2014).

L'ensemble de ces études montre que la 5-HT est une cible intéressante dans le développement de la pathologie et surtout que les phénotypes présents sont assez proches de ceux observés chez les patients porteurs de la mutation de la FLNa. Cependant, quel est le lien entre la FLNa, la 5-HT et les mécanismes physiopathologiques mis en jeu ?

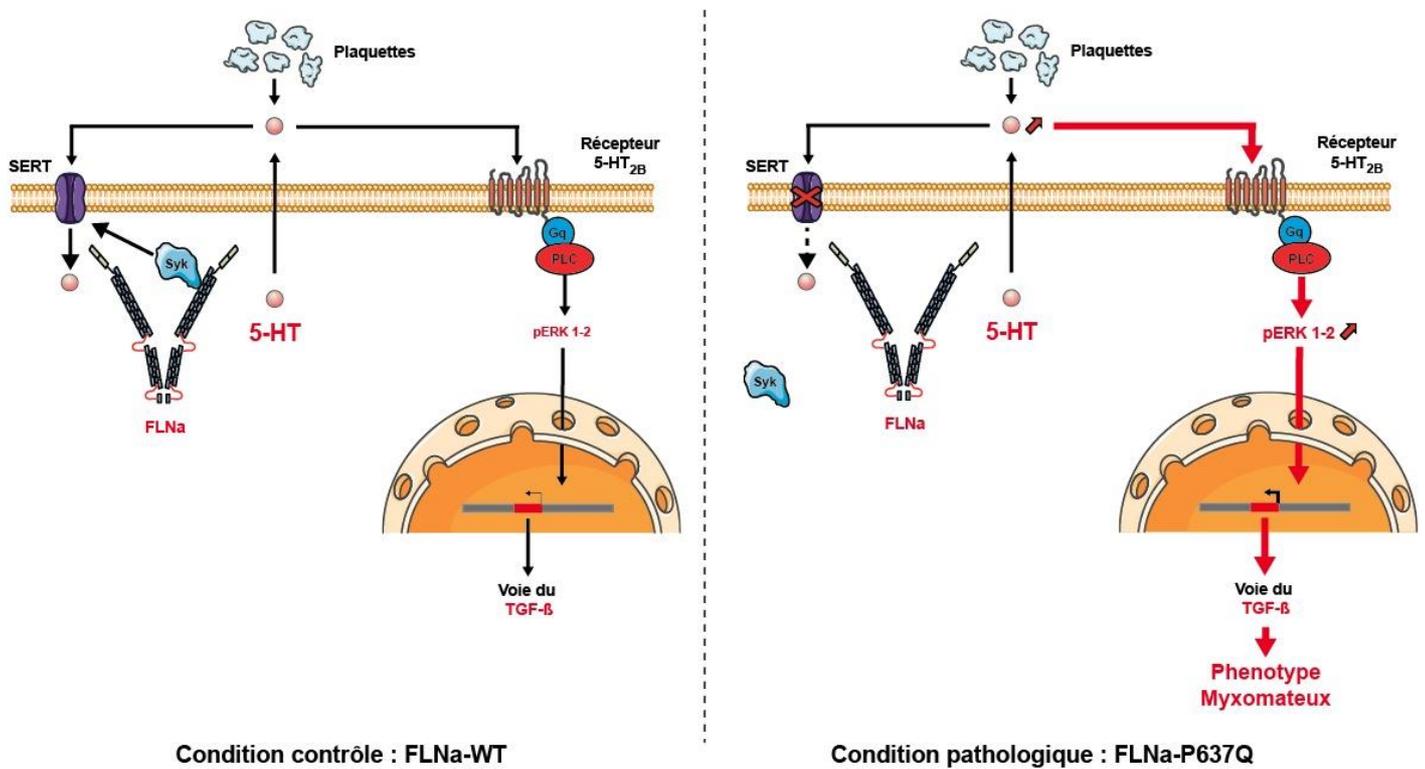
Tout d'abord, la FLNa est sérotonylée par la transglutaminase 2 (TG2) ce qui a pour conséquence de modifier son activité régulatrice du cytosquelette (Watts et coll., 2009). L'interaction entre la TG2 et la FLNa n'a pas été démontrée à proprement parler. Cependant, des études 3D in silico ont montré que la séquence reconnue pour interagir avec TG2 est très proche de la région où est située la mutation P637Q (Sauls et coll., 2012). L'hypothèse émise par l'équipe de Norris (Charleston) est que l'interaction entre la FLNa, la TG2 et la 5-HT peut être impliquée dans le remodelage de la valve en stimulant l'activité contractile des CIV pour compacter la matrice. Ils ont démontré que la 5-HT intracellulaire et la TG2 sont nécessaires pour sérotonyler la FLNa et induire la formation des fibres de stress. De plus, la 5-HT intracellulaire est nécessaire pour la compaction de gel de collagène via une augmentation de la contractilité cellulaire (Sauls et coll., 2012). De nouvelles données ont montré que les mutations de la FLNa diminueraient sa capacité à être sérotonylée par la perte d'interaction avec la TG2 et ne seraient plus capable de compacter un gel de collagène (donnée non publiée – Norris – Réseau Leducq). Le fait que les gels de collagène ne se compactent plus est cohérent avec les résultats que j'ai obtenus avec les USC de patients porteurs de la mutation FLNa (figure n°37).

La protéine « Spleen Tyrosine kinase » (Syk) a été décrite pour interagir avec les domaines 1-3 et 5 de la FLNa dans la zone où sont localisées nos mutations (Falet et coll., 2010). La FLNa permet de localiser spatialement la protéine Syk à la membrane des plaquettes pour qu'elle soit phosphorylée et activée. La protéine Syk permet d'activer le transport SERT pour internaliser la 5-HT (Pavanetto et coll., 2011). De plus, des souris KO pour le transporteur SERT présentent un taux élevé de 5-HT circulante ce qui induit des valvulopathies de type myxoïde (Mekontso-Dessap et coll., 2006). L'action de 5-HT sur les récepteurs ainsi que la diminution de SERT conduit à une augmentation de la synthèse de la MEC et à une activation de la voie du TGF- $\beta$  (Jian et coll., 2002). L'idée sous jacente est que les mutations de la FLNa empêchent l'interaction avec la protéine Syk ce qui bloque l'activité du transporteur SERT. La conséquence directe est une augmentation de la concentration en 5-HT circulante qui active les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> pour induire le remodelage de la valve (figure n°40). Xu et collaborateurs ont montré que la 5-HT active la phosphorylation de la protéine ERK1-2 via le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> dans des cultures de CIV d'aorte pathologique (Xu et coll., 2002). Ce qui est intéressant, c'est que les mutations de la FLNa augmentent également la phosphorylation de la protéine ERK1-2 et que cela peut être dû à l'activation de la voie de la 5-HT

De plus, les mutations de la FLNa peuvent modifier la réponse au stress mécanique de ces cellules ce qui peut avoir comme conséquence, une synthèse excessive de 5-HT via la TPH1. Le taux de 5-HT circulant est augmenté ce qui active le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> des CEV et de CIV entraînant une synthèse excessive des composants de la MEC.

Le seul inconvénient à ces hypothèses est que les analyses sanguines des patients ne présentent aucune augmentation de la concentration en 5-HT circulante. Cependant, il est possible que cette augmentation soit un phénomène local et pas systémique.

Il reste de nombreuses expériences complémentaires à réaliser pour mettre en évidence un lien de cause à effet entre les mutations de la FLNa et la 5-HT dans les dystrophies valvulaires et surtout de déterminer si la 5-HT est le mécanisme principale ou simplement une voie amplificatrice de la pathologie.



**Figure 40 : Hypothèse de la voie de la sérotonine dans le développement pathologique.** Dans des conditions physiologiques, la 5-HT active le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> conduisant à la synthèse de gène de la voie du TGF-β via la protéine ERK1-2. Elle est internalisée par le transporteur SERT pour être dégradée ou fixée sur des protéines. L'activité de SERT est dépendante de la présence de la protéine Syk qui est co-localisée près du transporteur via son interaction avec la FLNa. Dans des conditions pathologiques, les mutations FLNa-P637Q modifient l'interaction avec Syk. La conséquence est l'inhibition de l'internalisation de la 5-HT ce qui suractive les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et la voie du TGF-β impliquée dans le phénotype myxomateux. D'après (Orton et coll., 2012).

### 5.3. Implication de la voie du TGF- $\beta$

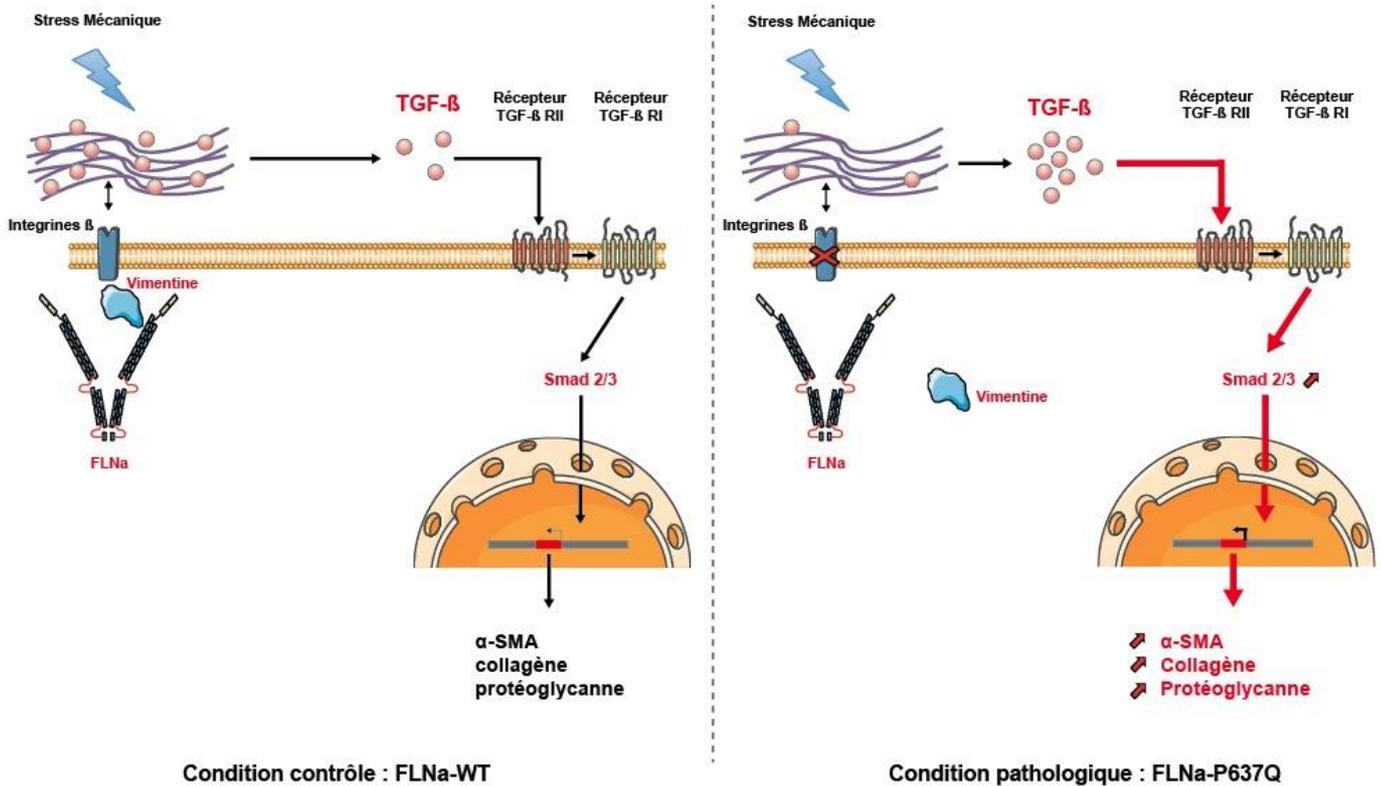
Tout comme la voie de la 5-HT, la voie du TGF- $\beta$  est impliquée dans le développement de valvulopathies.

A l'origine, la voie de signalisation du TGF- $\beta$  fut la première identifiée comme étant responsable de valvulopathies notamment les syndromiques comme le syndrome de Marfan ou de Loeys-Dietz (Dietz et coll., 1991; Loeys et coll., 2006). Le TGF- $\beta$  fait parti de la superfamille des facteurs de croissance décrit comme participant au processus d'EMT et de différenciation des CIV. Le TGF- $\beta$  est sécrété sous forme une inactive et est retenu dans la MEC. Une fois libéré et clivé par les MMP, il se fixe sur le récepteur TGF- $\beta$  RII qui s'associe avec le récepteur TGF- $\beta$  RI pour phosphoryler les protéines smad 2/3. Ces smads vont activer la synthèse de gènes de remodelage de la MEC (Wipff et Hinz, 2008).

Une forte sécrétion du TGF- $\beta$  conduit à l'augmentation de l'apparition de valvulopathies notamment dans les tumeurs carcinoïdes, la sténose aortique ou les maladies rhumatiques (Hyytiäinen et coll., 2004; Khan et Sheppard, 2006). Le lien avec la voie de la 5-HT est intéressant puisque l'activation du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> permet l'augmentation des ARN messagers du TGF- $\beta$ 1 via la voie ERK1-2 (Jian et coll., 2002). Des travaux de Walker et collaborateurs ont montré que l'activation des CIV est dépendante de la concentration en TGF- $\beta$  sécrétée et que l'effet est grandement augmenté lors que les CIV sont sous un stress mécanique (Walker et coll., 2004). Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Merryman qui a montré une augmentation de la  $\alpha$ -SMA, de la synthèse de collagène et de protéoglycanes dans les CIV de porc soumises à un stress mécanique et en présence de TGF- $\beta$ 1 (Merryman et coll., 2006). Les modèles animaux développés pour étudier la voie du TGF- $\beta$  ont montré son implication dans la valvulogénèse et notamment durant le processus d'EMT (Conway et coll., 2011). En effet, la génération de souris invalidées pour le gène du TGF- $\beta$ 2 présente des défauts d'EMT associés à un épaissement des valves (Sanford et coll., 1997). L'idée étant que les mutations de la FLNa pourraient influencer la synthèse du TGF- $\beta$  via la voie de le 5-HT et de la réponse au stress mécanique. Mais il existe un autre acteur décrit comme interagissant avec la FLNa et pouvant réguler la voie du TGF- $\beta$  et être impliqué dans cette réponse au stress mécanique : Les intégrines.

En effet, les intégrines font le lien entre la MEC et la cellule pour permettre une réponse adaptée lors différents processus cellulaire tels que l'adhésion ou la réponse au stress mécanique. Tout comme la FLNa, les intégrines sont des mécanosenseurs qui vont transduire un signal spécifique. Le TGF- $\beta$  favorise la transcription des intégrines et en retour elles agissent sur la disponibilité du TGF- $\beta$  dans le milieu (Pechkovsky et coll., 2008). Les intégrines fixent les complexes latents de TGF- $\beta$  et permettent sa libération soit par clivage via les MMP soit via le stress mécanique qui étire les intégrines (Wipff et Hinz, 2008).

L'hypothèse sous jacente est que les intégrines ne répondent plus de façon adéquate au stress mécanique à cause des mutations de la FLNa qui ne les maintiennent plus à la membrane. Cela a pour conséquence d'augmenter la concentration en TGF- $\beta$  en ne le retenant plus dans les complexes latents. La question est donc « quel pourrait être le lien entre les mutations de la FLNa, le TGF- $\beta$ , les intégrines et les mécanismes physiopathologiques ? »



**Figure 41 : Hypothèse de la voie du TGF- $\beta$  dans le développement pathologique.** . Dans des conditions physiologiques, le TGF- $\beta$  est retenu dans la MEC dans des complexes protéiques. La FLNa permet de co-localiser la vimentine pour activer et maintenir les intégrines à la membrane. Lors d'un stress mécanique, les intégrines et la MEC sont étirer ce qui libère le TGF- $\beta$ . Il active la voie des smad via les récepteurs TGF- $\beta$  RI et RII. Les smads activent les gènes du collagène, des protéoglycanes et de l'  $\alpha$ -SMA. Dans des conditions pathologiques, la perte d'interaction FLNa-vimentine déstabilise les intégrines à la membrane. La diminution des intégrines limite la capture du TGF- $\beta$  qui est libre dans le milieu. Cela suractive la voie conduisant à la surexpression de ces gènes impliquée dans la valvulopathie.

Les intégrines sont capable d'interagir avec la FLNa au niveau de la partie C-terminale (Calderwood et coll., 2001). Elles créent un mécanisme de senseur et de transducteur des forces mécaniques que subit la cellule. Un partenaire essentiel à la régulation des intégrines interagit avec la zone où sont situées les mutations de la FLNa. Il s'agit de la protéine vimentine décrite comme participant à la régulation des filaments intermédiaires et exprimée dans les CIV quiescentes ou actives (Rabkin et coll., 2001; Kim et coll., 2010b). Des travaux de Ivaska et collaborateurs ont montré

que la perte d'interaction entre la FLNa et la vimentine limite la phosphorylation de cette dernière par la PKC- $\epsilon$ . La conséquence de cette perte d'interaction est une augmentation de l'endocytose et de la dégradation des intégrines  $\beta 1$  (Ivaska et coll., 2005). On peut extrapoler que les mutations de la FLNa modifient l'interaction avec la vimentine diminuant ainsi l'expression des intégrines  $\beta 1$  à la membrane. Le TGF- $\beta 1$  se retrouve alors moins séquestré dans la matrice par les intégrines ce qui conduit à un remodelage de la MEC (figure n°40).

**Projet n°2**

**Identification d'un nouveau gène dans le**  
**Prolapsus Mitral Valvulaire :**  
**Etudes des mécanismes moléculaires liées aux**  
**mutations de la protéine FilGAP**

## 1. Introduction

Le prolapse mitral affecte 2% de la population et reste une des indications les plus communes pour la chirurgie valvulaire. Bien que les bases génétiques aient évolué depuis que notre équipe a identifié le gène *FLNA* comme le premier gène responsable d'une maladie, les gènes impliqués et identifiés restent rares. Dans cette pathologie, nous avons démontré que les mutations de la *FLNa* modifient la balance de protéines G monomériques et que cette modification est due à la protéine FilGAP. De façon intéressante, la protéine FilGAP est décrite comme une protéine de régulation de l'activité de Rac1 mais surtout, l'interaction *FLNa*/FilGAP en fait une protéine impliquée dans la réponse au stress mécanique (Duval et coll., 2013).

Considérant les résultats expérimentaux précédents et l'importance des forces hémodynamiques durant le développement cardiaque, FilGAP apparaît comme un gène candidat potentiel dans le développement du PVM.

Un séquençage du gène FilGAP dans une cohorte de 95 patients atteints de PVM a mis en évidence 3 mutations : FilGAP-R95Q; P417H; T481M. Ces variants ne sont pas retrouvés dans des bases de données génétiques suggérant de la rareté de ces variants. Les mutations sont situées dans 2 régions différentes de la protéine ; la mutation R95Q est située dans le domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) qui permet la localisation de FilGAP à la membrane et les mutations P417H et T481M sont situées entre les sites de phosphorylations à proximité du site d'interaction de la *FLNa*. Les premiers résultats montrent que les mutations de FilGAP diminuent son activité ce qui a pour conséquence de ne plus réguler l'activité de Rac. Cette augmentation de l'activité de Rac est corroborée par une augmentation des processus d'adhésion et d'étalement comparé à la protéine FilGAP-WT. L'impact des mutations de FilGAP sur l'activité de Rac s'effectue selon 2 mécanismes distincts. La mutation R95Q modifie le domaine PH ce qui l'empêche d'être localisée à la membrane. Alors que les mutations P417H et T481M diminuent l'interaction avec la *FLNa* ce qui conduit à un mauvais adressage.

## 2. L'article

**A new gene of the mechanotransduction pathway is associated with familial mitral valve prolapse: *ARHGAP24* (FilGAP).**

D Duval<sup>a,\*</sup>, A Rimbert<sup>a,\*</sup>, T Le Tourneau<sup>a</sup>, RA Norris<sup>b</sup>, RR Markwald<sup>b</sup>, H Le Marec<sup>a</sup>, R Levine<sup>c</sup>, DJ Milan, JJ Schott<sup>a</sup>, J Merot<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Institut du Thorax. INSERM UMR1087, CNRS UMR 6291, 8 Quai Moncousu 44007 Nantes Cedex. France.

<sup>b</sup> Department of Regenerative Medicine and Cell Biology, Cardiovascular Developmental Biology Center, Children's Research Institute, Medical University of South Carolina, 171 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425, USA

<sup>c</sup> Noninvasive Cardiac Laboratory, Department of Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114, USA

\* D. D, and A. R equally contributed to this work.

### Authors' emails:

D.D: [damien.duval@etu.univ-nantes.fr](mailto:damien.duval@etu.univ-nantes.fr); A.R: [antoine.rimbert@etu.univ-nantes.fr](mailto:antoine.rimbert@etu.univ-nantes.fr);  
T.L : [thletourneau@yahoo.fr](mailto:thletourneau@yahoo.fr); R. N: [norrisra@musc.edu](mailto:norrisra@musc.edu); RR. M : [markwald@musc.edu](mailto:markwald@musc.edu); H, LM: [herve.lemarec@univ-nantes.fr](mailto:herve.lemarec@univ-nantes.fr); R. L: [RLEVINE@PARTNERS.ORG](mailto:RLEVINE@PARTNERS.ORG); JJ. S: [jjschott@univ-nantes.fr](mailto:jjschott@univ-nantes.fr); J. M: [jean.merot@univ-nantes.fr](mailto:jean.merot@univ-nantes.fr);

**Key words:** Mitral valve prolapse, FilGAP, Filamin A, mechanotransduction.

### Corresponding author:

Dr Merot Jean  
Institut du Thorax. INSERM UMR1087,CNRS UMR 6291  
8 Quai Moncousu  
44007 Nantes Cedex.  
France  
Phone: +33 (0)2.28.08.01.64; Email: [jean.merot@univ-nantes.fr](mailto:jean.merot@univ-nantes.fr)

## **Introduction.**

The proper function of cardiac valves is mandatory for an efficient blood pumping by the heart. Cardiac valve insufficiency is in turn a major source of morbidity and mortality worldwide and a growing cause of heart failure. As far as the left atrio-ventricular (mitral) valve is concerned, valve dysfunction mainly results from an inappropriate apposition of valve leaflets which contributes to mitral regurgitation (MR) and cardiac insufficiency. In Mitral Valve Prolapse (MVP), a common disease that affects 2.4% of the population, one or both leaflets are excessively long, protrude into the atrium, eventually exhibit myxomatous transformation and the mitral annulus is usually enlarged [1-2]. Surgical intervention remains, up to now, the major MVP treatment used to repair the functional defects attributed to structural changes of the leaflets and to avoid secondary myocardial dysfunction and pulmonary hypertension that would ultimately lead to cardiac failure and sudden death. Fortunately, surgical advances have made mitral valve repair increasingly successful. However, abnormal valve biology persists, the possibility of tissue failure remains and percutaneous MVP repair remains challenging. It is thus urgent to identify new potential therapeutical targets and alternatives.

Despite the deleterious role of leaflet size in valve diseases and the important prognostic impact of MR on survival, little is known about the molecular and cellular determinants of leaflet length and structure. This highlights the need to explore the development, the dynamic nature of valves and their plasticity, deriving clues from diseases like MVP in which leaflet size figures prominently.

MVP has long been considered as an ageing/degenerative disease with little genetic background. However, recent genomic analyses of large families have demonstrated that MVP also affects childhood and newborn children that pointed to embryological origins. Indeed, developmental defects leading to abnormal valve structure and function occur in several syndromic connective tissue diseases with identified genetic basis (e.g Noonan, Ehlers-Danlos, Loeys-Dietz and Marfan syndromes) [3-5]. More recently, we identified *FLNA* (Filamin A, FlnA) as the first gene responsible for non-syndromic familial MVP in a large family suffering X-linked myxomatous mitral dystrophy [6-7]. Since its discovery as an actin binding protein, FlnA turned out as a functional hub with

essential scaffolding properties in many signaling pathways which integrates multiple cellular functions during embryonic development and participates to cellular homeostasis [8-9]. Nevertheless, the hallmark function of FlnA remains its ability to stabilize cortical F-actin networks and link them to cellular membranes thereby conferring membranes integrity and protecting cells against mechanical stress [10-13]. Consistent with these properties, we showed that FlnA is crucial for proper valvulogenesis and that the MVP associated mutations affect the balance of two master regulators of the actin cytoskeleton; RhoA and Rac1 GTPases [14-18]. Furthermore, we showed that the GTPases deregulation by these FlnA mutations involved another key actor of mechanical stress transduction pathway; the *ARHGAP24* gene product FilGAP [14, 19]. Indeed, FilGAP is a GTPase activating protein specific for Rac1 that mediates dynamic and spatial regulation of Rac1 activity. Very interestingly, FilGAP binds to unstressed FlnA and dissociates from the latter when the FlnA-actin network is submitted to mechanical strains [11-12, 20-21].

Considering the previous experimental and clinical studies that defined the critical role of hemodynamic forces in cardiac valves development and their pathological remodeling, FilGAP emerged as a potential candidate gene involved in MVP [22-25]. To test this hypothesis we entirely sequenced *ARHGAP24* gene exons in a cohort of 95 patients that underwent mitral valve surgical repair. We identified three rare mutations encoding three amino acids substitutions in FilGAP protein (R95Q, P417H and T481M). Genetic and echocardiographic exploration of the relatives of these probandus demonstrated the strong penetrance of the FilGAP-T481M mutation among the affected individuals of the family. Using biochemical, functional and *in vivo* Zebrafish animal model we showed that these three mutations are loss of function mutations through different molecular mechanisms.

## **Results.**

### **ARHGAP24 mutations are associated to MVP.**

Based on our previous studies showing FilGAP participates in the molecular mechanisms involved in the MVP associated to FlnA mutations, previous studies demonstrating FilGAP implication in cellular mechanical stress response and the recognized role of hemodynamic forces in valvular development as well as diseases, the FilGAP encoding gene *ARHGAP24* emerged as a good candidate gene potentially involved in MVP. Thus, in a first step, we determined whether FilGAP is expressed in human mitral valves. *ARHGAP24* gene contains 8 exons that can be alternatively spliced and give rise to 4 FilGAP proteins isoforms which essentially differ in the presence of the N-terminal Pleckstrin Homology (PH) domain in Isoform1 (Fig1A and S1). RT-PCR experiments using isoforms specific primers showed that FilGAP is indeed expressed in human mitral valves and that, compared to brain, kidney and total heart, the mitral valves expressed the highest proportion of the PH domain containing isoform, FilGAP Isoform1. We then performed a complete exon sequencing of *ARHGAP24* in a cohort of 95 MVP patients. The patients enrolled in the cohort exhibited a typical form of MVP in echocardiography with a displacement of any part of at least one mitral leaflet  $\geq 2$  mm above the mitral annulus line in the parasternal long axis view. This screen identified in three patients three rare variants encoding three amino acids substitutions: R95Q, P417H and T481M (aa numbers correspond to FilGAP Isoform 1 NP\_001020787.2). Importantly, a) according to the Exome Variant server these mutations were rare in both European and American populations (table 1), b) the three amino acids targeted by the mutations were highly conserved between species (table 1) and c) the amino acids are localized in two important functional regions of FilGAP R95 in the PH domain and P417 and T481 in the spacer region containing the regulatory ROCK phosphorylation sites (Fig1B). Together these molecular data and bio-informatic analysis positioned these three variants as potential MVP causing mutations.

FilGAP-R95Q patient was a 71 year-old man who was referred to surgery for severe mitral regurgitation (MR) with a flail related to multiple chordal rupture in the middle part of the posterior leaflet. This posterior leaflet scallop was thickened and elongated and resected during surgery.

Histologic examination demonstrated a typical aspect of myxoïd degeneration with elastic network dissociation and focal collagen fibrosis. His relatives refused to participate to a familial study.

The patient bearing FilGAP-P417H mutation was a 31 year-old woman. The MVP was detected upon routine medical examination. Her posterior mitral leaflet exhibited billowing and thickening with mild MR. The anterior leaflet was also thickened but was not billowing into the left atrium. To date only her mother agreed enters the study. Her echocardiographic evaluation was normal and she was not carrying the mutation.

On the other hand, a familial recruitment could be made for the FilGAP-T481M mutation. In this family, the proband (II:3; 57 year-old man) was referred to surgery for severe MR secondary to a posterior flail leaflet with chordal ruptures in the middle part of the leaflet. The prolapsing scallop was severely thickened (> 5mm) and elongated but both medial and lateral scallops of the posterior leaflet and the overall anterior leaflet were of near normal appearance. Histologic examination demonstrated a typical aspect of myxoïd degeneration with focal collagen bands. Two sisters (II:1, 67 year-old and II:2, 63 year-old) had a typical posterior leaflet billowing and elongation of the middle scallop (14 and 16 mm, respectively) (Fig2A and 2B). The posterior leaflet was only moderately thickened. The rest of the mitral valve looked like normal. Mild MR was present for both sisters. Finally, the father (I:1, 84 year-old) was also diagnosed with a posterior leaflet prolapse and asymptomatic moderate MR.

All patients carrying FilGAP mutation examined by echocardiography (n=6) had an isolated posterior leaflet billowing, prolapse or flail, whereas the anterior leaflet was apparently normal (Fig 2). Direct visual macroscopic examination during surgery in 2 patients confirmed the normal appearance of the anterior leaflet while the posterior leaflet was prolapsing in its medial part due to chordal ruptures. This medial segment was also clearly thickened and elongated. Overall, the appearance of FilGAP associated MVP was relatively uniform and corresponded to a “forme fruste” or minor form of Barlow disease [26].

**MVP associated FilGAP mutations are « loss of function » mutations.**

FilGAP was previously described as a GTPase activating protein (GAP) specifically regulating Rac1 GTPase activity but not that of RhoA and CDC42 GTPases. Furthermore, we demonstrated RhoGTPase deregulation to be involved in MVP [14, 19, 27]. We thus analyzed the effects of R95Q, P417H and T481M mutations on the GAP activity of FilGAP. WT and mutant FilGAPs were transfected in Hek293 cells and the levels of activated GTP bound Rac1 determined in pull down experiments using GST-PAK1 fusion protein [14]. As shown in figure 3A, FilGAP-WT significantly decreased the cellular GTP bound Rac1 compared to control pcDNA3-transfected cells. Conversely, FilGAP-R95Q, P417H and T481M did not affect Rac1 GTPase activity and even slightly increased, although not significantly, Rac1-GTP levels. This suggested that the three mutations are loss of function mutations of FilGAP's GAP activity. This hypothesis was directly tested in another set of pull down experiments using the GST fused to activated Rac1 as a bait (GST-Rac1-Q61L) to specifically isolate active Rac1-GAP regulators including FilGAP [28]. These experiments showed the mutant FilGAPs indeed exhibited a 45 to 55% decrease in their ability to interact with active Rac1 (Fig 3B). Together these data indicate that the three mutations affect the GAP activity of FilGAP and its ability to decrease Rac1 GTPase activity.

According to previous studies including ours, FilGAP was shown to participate to Rac1 regulation during cells spreading and adhesion phases [14, 19, 21]. Here, we have used the impedance measurement technology of the xCELLigence system to test the effects of the FilGAP mutations on these cellular properties. As illustrated in figure 4A, after seeding the cells on the E-plate and, consistent with decreased Rac1 activity and lower spreading capacities, the “cell index” (CI) of cells transfected with wild-type FilGAP raised more slowly and reached a lower steady state ( $CI_{st}$ ) level than control pcDNA3-transfected cells ( $dCI/dt = 0.105 \pm 0.016$  vs  $dCI/dt = 0.095 \pm 0.009$  and  $CI_{st} = 0.230 \pm 0.008$  vs  $CI_{st} = 0.186 \pm 0.005$   $n=5$ , for pcDNA3 and FilGAP-WT transfected cells, respectively). Conversely, siRNA mediated silencing of endogenous FilGAP significantly increased the kinetics and steady state adhesion of the cells ( $dCI/dt = 0.188 \pm 0.021$  vs  $dCI/dt = 0.105 \pm 0.010$  and  $CI_{st} = 0.302 \pm 0.017$  vs  $CI_{st} = 0.229 \pm 0.013$ ,  $n=5$  for FilGAP and control siRNA transfected cells, respectively). Consistent with a loss of function effect of the mutations, the CIs of the cells expressing the three

FilGAP mutations raised faster and to higher steady state levels than FilGAP-WT transfected cells (Fig 4B). Interestingly, the kinetics ( $dCI/dt$ ) and  $CI_{st}$  of cells transfected with mutant FilGAPs were higher than that of “control” pcdna3 transfected cells, although the differences measured did not reach significance (Table 2). Also, it is worth noting that despite the CIs measured for the mutants did not reach those observed in siRNA extinction experiments suggesting the transfected mutant FilGAPs are able to associate with and exert a negative effect on endogenous FilGAP. In fact, co-immunoprecipitation experiments using Myc-tagged FilGAP-WT and Ha-tagged mutant FilGAPs showed the mutations do not affect their capacity to interact with FilGAP-WT and form dimers (Fig 4C).

Together these data show that the three MVP associated FilGAP mutations 1) are loss of function mutations, 2) lead to increased Rac1 activity 3) affect cell adhesion and spreading properties and 4) exert a dominant negative effect on wild-type FilGAP. We then analyzed the potential molecular mechanisms involved.

#### **MVP associated FilGAP mutations affect its function through different molecular mechanisms.**

Based on homology sequence analysis and previous structural and functional studies, different domains were defined in FilGAP protein [19, 21, 29]. As illustrated in figure 1B, R95Q mutation is located in the pleckstrin homology domain of FilGAP (amino acid (aa) 19-125), whereas P417H and T481M mutations target the “spacer” region which separates the GAP activity region (aa 135-329) from the coiled-coil domain (aa 649-725) which mediates FilGAP protein dimerization. The spacer domain harbors the serine and threonine residues that are phosphorylated by activated ROCK kinase downstream of RhoA signaling that most probably regulate FilGAP localization and interaction with binding partners including filamin A (FlnA). Based on these molecular cues, we analyzed the potential effects of the mutations on FilGAP interaction with membrane phosphoinositides via the PH domain and with the actin binding cytoskeletal protein FlnA.

R95Q mutation suppresses FilGAP-phosphatidylinositides interactions.

The binding affinities of PH domains for phosphatidylinositol phosphates depend on the number of specific glycine (Gly) residues they contain. Because FilGAP PH-domain contains only two of these Gly residues it is expected to bind phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (3,4,5)PIP<sub>3</sub> with higher affinity than phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (4,5)PIP<sub>2</sub> [30]. Indeed, using a PIP strip binding assay we showed FilGAP-WT strongly binds (3,4,5)PIP<sub>3</sub> and, to a lesser extent, (3,4)PIP<sub>2</sub> but not (4,5)PIP<sub>2</sub>, (3,5)PIP<sub>2</sub> (Fig 5A). On the other, when the PIPs strips were incubated with the same amounts of mutant FilGAPs (Fig 5B), FilGAP-PIPs interactions were totally knocked-out by R95Q mutation whereas P417H and T481M mutations remained without significant effect (Fig 5A). Together these data suggest that the loss of interaction with (3,4,5)PIP<sub>3</sub> we observe *in vitro* for R95Q mutation might affect FilGAP/membrane interaction *in vivo*.

WT or R95Q PH domain modelization is in progress by Nadège Germain in CEA (fig 5B)

P417H and T481M mutations affect FilGAP/FlnA interactions.

FlnA/FilGAP interactions are critical for the GAP activity of FilGAP toward Rac1 *in vivo* and previous studies identified the very C-terminal region of FilGAP (aa stretch encompassing 726F-V734) as the interface between FilGAP and FlnA immunoglobulin like repeat 23 (Ig23) [19, 27, 29, 31]. However, other regions of FilGAP, including the coiled-coil domain, also determine the affinity and the avidity of FlnA/FilGAP complex [31]. We have thus analyzed the impact of the mutations on FlnA/FilGAP interactions in co-immunoprecipitation experiments. As shown in figure 6A, endogenous FlnA of Hek293 cells were efficiently co-immunoprecipitated with both WT and FilGAP-R95Q. On the other hand, P417H and T481M mutations significantly reduced by more than half the amount of immunoprecipitated FlnA, indicating they affect FlnA/FilGAP interaction.

Previous studies indicate that FilGAP fulfills its Rac1GAP activity thanks to its interactions with FlnA which sequester FilGAP to specific cellular domains. Loosening of their interaction could thus increase FilGAP motility and participate to the altered Rac1 regulation we observed. We tested this hypothesis in FRAP experiments using a functional (Fig S2) chimeric FilGAP fused to mcherry fluorescent protein expressed in HT1080 cells as well as shRNA-FlnA knockout HT1080 cells [10]. A

typical experiment performed using FilGAP-WT and HT1080 cells is illustrated on figure 6B (left panel). After bleaching 70-80% of mcherry-FilGAP fluorescence, the fluorescence recovered within 25-30 sec ( $t_{1/2} = 11.2 \pm 1.0$  sec,  $n = 16$ ) and reached a new steady state level. Accordingly, the non recovered fraction represents the immobile fraction of FilGAP and typically averaged  $24.7 \pm 3.0\%$  ( $n=14$ ) of initial fluorescence in our set of experiments. Consistent with the data described above, FRAP kinetics and the percentage of recovery of FilGAP-R95Q were indistinguishable from those of FilGAP-WT (Fig 6B right panel, Table 3). On the other hand, FilGAP-P417H and T481M mutants recovered significantly faster and in a larger proportion than FilGAP-WT (see histograms on Fig 6B). Together, these data are consistent with an increased mobility of P417H and T481M mutants resulting from the loosening of their interactions with FlnA. This idea was further supported by the following: first, FRAP data of P417H and T481M mutants were similar to those obtained when the key valine residue (V734) of FilGAP, involved in the FlnA/FilGAP interface and interaction, was mutated to a tyrosine (FilGAP-V734Y) to abrogate FlnA/FilGAP binding (Table 3) [31]. Second, FlnA extinction leveled down both the kinetics and steady state recoveries of FilGAP-WT and all the mutants tested (R95Q, P417H, T481M and V734Y) to faster and higher values, respectively (Fig 7 and Table.3).

Together, our data indicate that R95Q mutation and P417H, T481M mutations affect FilGAP function through inappropriate membrane sequestration or targeting by two different mechanisms, improper interaction with membrane PIPs and the cytoskeleton organizer FlnA.

### **FilGAP knock-out affects Zebrafish valvular development.**

In Progress in boston by David Milan

## **Discussion**

Cardiac valves experience harsh and repetitive mechanical loading including shear stress, pressure and stretching during cardiac contraction cycle from early embryological stage and along the lifetime of individuals. In fact, many clues indicate that the sculpting of saddle shaped mitral annulus, posterior and anterior scallops length and shape as well as the positioning of chordae tendineae anchorage are orchestrated by these particular hemodynamic forces which participate to the proper developmental maturation and the homeostasis of the mitral valve [32-33]. Our present study pointing to new mutations targeting a key component of the cellular mechanical transduction pathway in inheritable mitral valvulopathy further supports this notion.

Here, the screening of a cohort of sporadic, non syndromic MVP patients identified three rare mutations in the FlnA-interacting Rac1 specific regulator FilGAP. Strikingly, although the functional and clinical traits of the FlnA and FilGAP associated valvulopathies were different, both FlnA and FilGAP are well recognized actors of cellular mechanical stress response signaling pathway. Indeed, FlnA patients exhibited polyvalvular defects associated with developmental and degenerative myxoid alterations of both anterior and posterior mitral leaflets as well as the sub-valvular apparatus but no chordal rupture [6] and (TLT *unpublished observations*). On the other hand, the two FilGAP probands (FilGAP-R95Q and T481M) were referred to surgery for severe mitral regurgitation following chordal ruptures and the myxomatous degeneration associated to scallops thickening concerned only the posterior leaflet. In fact, the echocardiographic features of FilGAP patients was relatively homogeneous and corresponded to a “forme fruste” or minor form of Barlow disease [26]. This restricted clinical picture of FilGAP-associated MVP compared to that of FlnA patients mirrors the restricted functional implication of FilGAP in mechano-transduction compared to FlnA which is involved in a large spectrum of signaling pathways through its interaction with more than 100 binding partners. Ref).

As far as FilGAP is concerned, previous studies by Akilesh and colleagues associated FilGAP loss of function mutation to familial focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and, interestingly enough, a strong link was previously established between kidney diseases and MVP (ref). In fact, in the screening of FSGS cohorts for FilGAP mutations, Akilesh and collaborators specifically identified and

associated the FilGAP-Q158R mutation to FSGS. Interestingly, they also identified FilGAP-T481M mutation in addition to P417A in which the proline is substituted by an alanine. The latter mutation (FilGAP-P417A) is most probably a fully functional frequent variant that we also detected in both MVP and control cohorts (our preliminary data indicate this mutation does not have any functional impact on FilGAP properties ,not shown). Intriguingly, neither FilGAP-T481M nor R95Q and P417H MVP patients examined in the present study exhibited any sign of renal dysfunction. However, it is worth noting that Q158R mutation is located close to the catalytic site of the GAP domain and might thus have more drastic functional effects on FilGAP activity compared to MVP associated mutations that may require harsh mechanical stress conditions experienced by the cardiac valves to express their functional deficiency. Unfortunately the valvular status of the FSGS patients harboring FilGAP-Q158R mutation remained undetermined and further studies will be required to clarify the potential link between FSGS and MVP.

## **Materials and Methods.**

### **Reagents.**

Polyclonal antibodies for GAPDH (1:10,000); and HRP-conjugated antibodies (1:10 000) were purchased from Santa Cruz. Monoclonal antibodies were purchased from Chemicon (anti-filamin A, 1:1000), BD Transduction Laboratories (anti-Rac1, 1:500), Sigma – Aldrich (FilGAP, 1:250), Roche (anti-HA, 1:1000). Total human mitral valve RNAs from a healthy 41 years old man were obtained from AMS Biotechnology. Brain and kidney total RNAs were from Clontech (Human Multiple Tissue cDNA Panels).

### **RT-PCR**

mRNA were reverse transcribed and amplified using the High Capacity cDNA Reverse transcription kits (Applied Biosystems) and amplified by PCR following the manufacturers recommendations. The following forward (F) and reverse (R) isoforms specific *ARHGAP24* primers were used: iso1\_F: 5'-caatgactccacggagaacc-3'; iso1\_R: 5'-tccttgggtctcttcattg-3'; iso2\_F: 5'-aaaccgggttcagaactca-3'; iso2\_R: 5'-cccacagtcaaagcatctt-3'; iso3\_F: 5'-tgggatgggaggatactgac-3'; iso3\_R: 5'-atatgactcggcggattgac-3'; iso4\_F: 5'-ctgaagtgtatgtttgtgcaag-3'; For *GAPDH* and *FLNA* we used GAPDH\_F: 5'-ttcattgacctcaactacatggt-3'; GAPDH\_R: 5'-ctcagtgtagcccaggatgccctt-3'; FLNA\_F: 5'-caggcttggtgtctgcttacg-3'; Primer FLNA\_R: 5'-tcccgcattgctctgtt-3'.

### **Patients' consents, clinical studies.**

The study was conducted in compliance with current Good Clinical Practice standards and in accordance with principles set forth under the Declaration of Helsinki (1989). Institutional review board approvals of the study were obtained before the initiation of patient enrollment. Each patient entering the study agreed to and signed an institutional review board-approved statement of informed consent. The present study was conducted according to French guidelines for genetic research and approved by the ethics committee of Nantes University Hospital. Written informed consent was obtained from all participants. Clinical investigation included a review of medical history and a physical examination, with particular attention given to the cardiovascular system and any connective tissue diseases. The phenotypic assignment of family members was based on echocardiographic

examination. Transthoracic echocardiograms were recorded according to the criteria of the American Society of Echocardiography with a Sequoia C256 (Acuson Inc., Mountain View, Calif) equipped with a multifrequency probe (3.5 to 2.0 MHz). Measurements of mitral valves were performed on parasternal, long-axis, 2-dimensional images without second harmonic. The length of each leaflet was determined immediately before valve closure. The thickness of the free edge of the mitral leaflets was measured on a selected diastolic frame that clearly separated the mitral leaflets and chordae. Mitral valve prolapse was considered to exist when 2-dimensional recordings in the parasternal long-axis view showed protrusion of mitral leaflets into the left atrium, crossing the line between the annular hinge points, and when the coaptation point of the leaflets remained at or above the mitral annular plane during systole. Mitral regurgitation was estimated by using standard methods, which include the proximal isovelocity surface area (PISA) analysis.

#### **DNA extraction and sequencing.**

Patients' DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes with standard methods. After amplification by PCR, excess primers were removed from the amplified fragments using exoSAP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and sequenced with a dye-terminator cycle-sequencing system (ABI PRISM 3730, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif). Sequences analyses were performed with Seqscape v2.5.

#### **Cell culture and transfection.**

Hek293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and L-glutamine. HT1080 cells and shRNA mediated FlnA knocked down HT1080 cells were obtained from Dr D Calderwood (Yale Univ, New Have CT, USA) and grown in DMEM supplemented with 10% FCS, L-glutamine and the same medium supplemented with 2 $\mu$ g/ml puromycin, respectively. The cells were transfected with FilGAP constructs plasmids using Lipofectamine (Invitrogen) or Genecellin (BiocellChallenge) according to the manufacturers' specifications.

### **Plasmids and SiRNA.**

The pCMV5 N-terminally HA-tagged FilGAP (HA-FilGAP-WT) was a gift of Dr Yasutaka Ohta (Division of Cell Biology, Kitasato University, Kitasato, Japan). Myc-tag and R95Q, P417H, T481M and V734F mutations were introduced in the wild-type FilGAP using PCR based mutagenesis kits (Quickchange and Q5 site directed mutagenesis kits from Agilent Tech and New England Biolabs, respectively). The mcherry-C1 expression vector (Clontech) was used to construct red fluorescent protein (mcherry) N-terminally tagged FilGAPs. All the constructs were verified by sequencing. To deplete endogenous FilGAP, siRNA oligonucleotide duplexes targeting the sequence 5'-AAGATAGAGTATGAGTCCAGGATAA-3' (nt 1975–1999 of FilGAP) were used [27]. Control siRNA duplexes targeting GFP were used (sens 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3', antisens 5'-GAACUUCAGGGU CAGCUUGCCG-3'). The cells were transfected according to the suppliers' guidelines (Eurogentec) and used 48 hours post transfection.

### **Adhesion and spreading assays.**

The impedance measurement technology of the xCELLigence system was used to monitor cell adhesion and spreading as previously described [14, 34].  $1 \times 10^4$  cells per well were plated into 96-wells E-Plates (Roche Diagnostics, GmbH), placed on the Real Time Cell Analyzer and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cell adhesion and spreading were measured as the changes in the electrical impedance between the microelectrodes lining the bottom of the wells and expressed as a *Cell Index* (CI) according to the manufacturer's guidelines. Impedance measurements were taken every 1 min for 3 hours. The slope of CI changes (dCI/dt) were calculated between  $t_{30\text{min}}$  and  $t_{1\text{h}30\text{min}}$ .

### **Co-immunoprecipitation and immunoblotting.**

Cells transfected with FilGAP-HA were lysed in NETF buffer containing: 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaF, 1 % NP-40, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1X protease inhibitor cocktail (Roche) and lysates clarified by centrifugation ( $15,000 \times g$  for 15 min at 4°C). The cell lysates (500 µg) were incubated with 6 µg of anti-HA for 2 h at 4°C and then with 30 µl of protein A conjugated beads (Dynabeads, Invitrogen) for 1h at 4°C. The immunoprecipitates were washed four

times with NETF buffer and separated by SDS-PAGE transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad Transblot). Immunoblots probed with appropriate antibodies and revealed using enhanced chemiluminescence (ECL) kit (GE Healthcare). Chemiluminescence signals were quantified using an Imager system (Roche Diagnostic) and the data normalized with respect to GAPDH.

### **Glutathione-S-transferase (GST) protein purification and GST pull-down assays.**

GST-PAK1 containing the Cdc42/Rac1 Interactive Binding (Crib) region of p21 activated kinase were produced in BI21 E.Coli treated overnight with 1 mM IPTG at 25°C. The GST-Rac1-Q61L fusion protein used to analyze FilGAP activity in a Rac1-GAP activity pull down assay, was a kind gift of Dr C. Guilluy and K Burrige (Institut du Thorax, Nantes, France) [28]. The GST-fusion proteins were purified using Glutathione Agarose 4B beads (Macherey-Nagel). Transfected Hek293 cells grown for 2-4 hrs after seeding were lysed in XXXX buffer. The cell lysates were centrifuged at 15,000 ×g for 15 min at 4°C. 500 µg of cleared cell lysates were incubated with GST-tagged proteins (30µg) and rotated (18 rpm) for 1h at 4°C. The beads were washed four times with cell lysis buffer and bound proteins separated by SDS-PAGE. Bound Rac1 was detected by immunoblotting as describe above. In Rac1-GAP activity assay, cells were transfected with WT and mutant HA-FilGAPs and pulled down FilGAPs quantified by western blotting using anti-HA antibody.

### **Phosphoinositides binding assay.**

PIP strips (Echelon) were used according to the manufacturer's instruction to test FilGAP binding to phosphatidylinositols. Strips were incubated overnight at 4°C with cleared cell lysates (20µg) and anti-HA antibody and then revealed by ECL.

### **FRAP experiments.**

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments were performed on mCherry-FilGAP transfected HT1080 cells (WT and FlnA Ko cells) seeded on 8µm slide chambers (Ibidi) 24 hours after transfection using a Nikon confocal Eclipse C1 inverted microscope equipped with a temperature (37°C) and atmosphere controlled (5% CO<sub>2</sub>) chamber. Briefly, steady state control images were

captured for 30 sec and a region of interest ( $1 \mu\text{m}^2$ ) was bleached for 500 msec using 488 and 564 laser wavelengths to obtain  $\approx 70$ -80% decrease of fluorescence. Images were then captured every 5 sec for 1 min after bleaching. Kinetics of recovery were fitted to a mono-exponential,  $t_{1/2}$  and % of recovery calculated.

### **Zebrafish studies.**

In progress by D. Milan

### **Statistical analysis**

Each assay presented here was performed at least three times. Graphs depict mean values  $\pm$  SEM of sample size n. Data were analyzed using Prism (GraphPad Software) and p-values were generated using a Mann-Whitney test or two-ways ANOVA test: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

**Acknowledgements.**

FRAP experiments were performed at the core microscopic facility MicroPICell SFR Bonamy Nantes with the technical assistance of Steven Nedellec and Philippe Hulin. This work was funded by The Foundation Leducq, Transatlantic Mitral Network of xCELLigence grant 07CVD04 (Paris, France) and the Fédération Française de Cardiologie , Grant R11065NN/RAK1190NNA (TL, JM) (FFC, Paris, France). The work at MUSC was performed in a facility constructed with support from the National Institutes of Health, Grant Number C06 RR018823 from the Extramural Research Facilities Program of the National Center for Research Resources. Other funding sources: National Heart Lung and Blood Institute: R01-HL33756 (RRM), COBRE 1P30 GM103342 (RRM, RAN), 8P20 GM103444 (RRM and RAN); American Heart Association: 11SDG5270006 (RAN); National Science Foundation: EPS-0903795 (RRM); NHLBI K24 HL67434 and HL109506 (RAL).

### **Figure legends**

**Figure 1: Discovery of 3 new rare variant in FilGAP protein.** **A)** Tissue expression of FilGAP is determined by RT-PCR assay on brain, kidney and mitral valve RNA. The 3 isoforms of FilGAP are expressed in Mitral Valve whereas FilGAP isoform 1 is missing in kidney and isoform 3 in brain. The mutations that we found are present in FilGAP isoform-1. **B)** Pedigree tree of 3 MVP families that lead to the identification of FilGAP mutations. Female member are identified by circles and males by squares. Clinical status is indicated by filled symbols, affected (Dark), probably affected (grey) and healthy (white). + or – signs indicate the presence of FilGAP mutation and the ? sign, patients not examined by clinicians. Schematic diagram representing the FilGAP structure. In N-terminal, the pleckstrine domain (PH) participates to membrane anchorage with PIP2 and PIP3. Next, the GAP domain that regulates Rac activity. This GAP domain is under control of phosphorylation sites phosphorylated in Spacer domain. In C-terminal part, the coiled-coil domain determines FilGAP dimerization and the sequence of 10 amino acid is necessary for FLNa interaction (FLNa domain). The 3 mutations are localized in PH domain (R95Q) for the 1st one and the 2 others (P417H and T481M) between phosphorylation sites.

**Figure 2: FilGAP valve dystrophy.** **A)** Echocardiography of II:1 FilGAP-T481M patient. Posterior leaflet prolapse (thick arrow) with leaflet elongation and anterior displacement of the coaptation point (thin arrow) **B)** Echocardiography of II:2 FilGAP-T481M patient. Posterior leaflet prolapse (3 mm above the annulus line, into the left atrium) with moderate anterior displacement of the coaptation point

**Figure 3: MVP-associated FilGAP mutations are loss of function mutations.** **A)** Typical western blot of a Rac1-GTP pull down assay experiment. Hek293 cells were transfected with pcDNA3 (control), HA-FilGAP-WT, R95Q, P417H or T481M and active Rac1 isolated using GST-PAK1. Although all HA-FilGAP constructs were expressed to similar levels (input FilGAPs-HA), only FilGAP-WT (second lane) significantly decreased the active Rac1 pulled down compared to control. The histogram on the right gives the mean data from seven experiments. Error bars show SEM, \*\* P<0.01 versus

pcdna3 condition. **B)** Active Rac1-GAP pull down assay. Equal amount of HA-FilGAPs (input HA-FilGAPs) were loaded on GST-Rac1-Q61L fusion protein (red ponceau staining shown in the bottom image) and “active” FilGAPs pulled down were revealed using anti-HA (upper blot). Only FilGAP-WT significantly interacted with “active”-Rac1. The histogram on the right gives the mean of five experiments. \*\* indicates significant difference ( $P < 0.01$ ) versus FilGAP-WT cells.

**Figure 4: Loss of function of FilGAP mutants revealed in cell spreading assays.**

**A)** Cell indexes (CI) values measured using xCELLigence system. FilGAP-WT transfected cells exhibited slower CI increases and lower steady states CI ( $CI_{st}$ ) compared to pcdna3 or siRNA control treated cells. On the other hand, cells treated with siRNA targeting FilGAP exhibited faster increase and higher  $CI_{st}$  compared to controls (lower panel). The blot image illustrates the  $\approx 80\%$  extinction of endogenous FilGAP obtained using FilGAP specific siRNA (upper panel). **B)** CI recordings obtained from R95Q, P417H and T481M transfected cells. The pcdna3 and FilGAP-WT data shown in **A)** are reproduced to facilitate comparison. None of the mutant FilGAPs altered cell spreading and adhesion compared to pcdna3 transfected cells. Values represent the mean of six experiments and SEM are indicated by the bars. \*\* significant difference ( $p < 0.01$ ) vs FilGAP-WT. **C)** FilGAP mutations do not affect its dimerization. Hek293 cells were co-transfected Myc-tagged FilGAP-WT and HA-tagged FilGAP mutants. The blots on the right show immunoprecipitated mutant FilGAPs using anti-HA antibody (lower image) and the co-immunoprecipitated myc-tagged FilGAP-WT (upper image). Myc-FilGAP-WT was co-IPed with WT and all the HA-tagged mutant FilGAPs. Control experiment shows Myc-FilGAP was not immunoprecipitated by anti-HA antibody in the absence of co-transfected HA-FilGAPs. The blots on the left show the constructs were expressed at similar levels in the different conditions. GAPDH was used as “gel loading” control. These experiments were reproduced at least twice.

**Figure 5 FilGAP-R95Q mutation affects PIPs binding.** **A)** PIP strips carrying (3,4)PIP<sub>2</sub>, (3,5)PIP<sub>2</sub>, (4,5)PIP<sub>2</sub>, (3,4,5)PIP<sub>3</sub> dots were incubated with equal amounts of HA-FilGAP-WT, R95Q, P417H or T481M (as shown by the western blot below) and their binding revealed by ECL using anti-HA-and

peroxidase coupled antibodies. Only R95Q mutation suppresses both (3,4)PIP<sub>2</sub> and (3,4,5)PIP<sub>3</sub> FilGAP binding. GAPDH was used as a “gel loading” control. These experiments and data were reproduced three times. **B)** Modelization of PH domain of FilGAP WT and R95Q. In progress .

**Figure 6. FilGAP-P417H and T481M mutations impede FlnA/FilGAP interactions and cellular motility of FilGAP.** **A)** The two upper blots on the left show immunoprecipitated (IP) HA-FilGAP-WT, R95Q, P417H and T481M transfected in Hek293 cells and the co-immunoprecipitated (Co-IP) FlnA. Note that P417H and T481M mutations significantly reduced Co-IPed FlnA. The lower blots show the similar expression levels of FlnA and HA-FilGAP in the different conditions and GAPDH was used as a “gel loading” control. The histogram on the left shows the quantification of three experiments. \*\* indicates significant ( $p < 0.01$ ) difference vs FilGAP-WT. **B)** A typical recording of a FRAP experiment performed on a HT1080 cell expressing mcherry-FilGAP-WT is shown on the left. The mobile and immobile fractions of FilGAP are indicated. The averaged data from FilGAP-WT (n=16), R95Q (n=13), P417H (n=12) and T481M (n=15) transfected cells from 3-4 experiments are shown on the right. The histograms shows the averaged data of  $t_{1/2}$  and recovered fluorescence at  $t = 1$ min. P417H and T481M mutations but not R95Q significantly increase the rates of recovery and reduce the immobilized fraction. \*\* indicates significant ( $p < 0.01$ ) difference vs FilGAP-WT. Numerical data are given in supplemental Table 3

**Figure 7. FilGAP-P417H and T481M mutations impede FlnA/FilGAP interactions and cellular motility of FilGAP.** Averaged recovered fractions (immobile/mobile) and  $t_{1/2}$  of FilGAP-WT (n=6), R95Q (n=6), P417H (n=9), T481M (n=11) and V734Y (n=7) from three experiments performed in shRNA FlnA-KO HT1080 cells. The FilGAP-WT data obtained in HT1080 cells from A) are added to facilitate comparison. All the constructs tested exhibited similar motilities in the absence of filamin A. \*\* and \*\*\* indicates significant difference ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively) vs FilGAP-WT in HT1080 cells. Numerical data are given in supplemental Table 3.

**S1: Schematic diagram representing all 4 FilGAP isoform structure.** The sequences of 3 isoforms of FilGAP differ from ARHGAP-1 isoform by the lacking of PH domain in N-terminal part.

**S2: Comparison of FilGAP-HA and FilGAP-mCherry construct.** Cell indexes (CI) values measured using xCELLigence system. FilGAP-WT-mCherry transfected cells exhibited same CI and same steady states CI ( $CI_{st}$ ) compared to FilGAP-WT-HA. The same result was obtained with both FilGAP-T481M-HA and FilGAP-T481M-mCherry. On the other hand, the cells transfected with FilGAP-T481M-HA and FilGAP-T481M-mCherry exhibited higher CI increases and higher steady states CI compare to both FilGAP-WT-HA and FilGAP-WT-mCherry. \*\* indicates significant ( $p < 0.01$ ) difference vs FilGAP-WT-HA

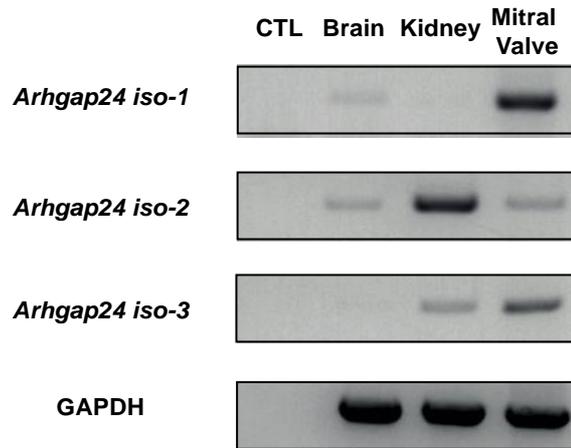
**S3: Expression of FilGAP-mCherry and FLNa in HT1080 cells.** Western blot analysis of total extract (25  $\mu$ g) from HT1080 and FLNa-KO HT1080 cells transfected with FilGAP-mCherry constructs. The blot probed with anti-FLNa shows only HT1080 cells expressed FLNa compare to FLNa-KO HT1080. Nevertheless, FilGAP-mCherry constructs expression is the same in both cells lines. The blot probed with anti GAPDH to normalized the amount of protein.

- [1] J.M. Flack, J.H. Kvasnicka, J.M. Gardin, S.S. Gidding, T.A. Manolio, D.R. Jacobs, Jr., Anthropometric and physiologic correlates of mitral valve prolapse in a biethnic cohort of young adults: the CARDIA study, *Am Heart J*, 138 (1999) 486-492.
- [2] L.A. Freed, D. Levy, R.A. Levine, M.G. Larson, J.C. Evans, D.L. Fuller, B. Lehman, E.J. Benjamin, Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse, *N Engl J Med*, 341 (1999) 1-7.
- [3] B. Lee, M. Godfrey, E. Vitale, H. Hori, M.G. Mattei, M. Sarfarazi, P. Tsipouras, F. Ramirez, D.W. Hollister, Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes, *Nature*, 352 (1991) 330-334.
- [4] F. Malfait, P. Coucke, S. Symoens, B. Loeys, L. Nuytinck, A. De Paepe, The molecular basis of classic Ehlers-Danlos syndrome: a comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients, *Hum Mutat*, 25 (2005) 28-37.
- [5] K.K. Singh, K. Rommel, A. Mishra, M. Karck, A. Haverich, J. Schmidtke, M. Arslan-Kirchner, TGFBR1 and TGFBR2 mutations in patients with features of Marfan syndrome and Loeys-Dietz syndrome, *Hum Mutat*, 27 (2006) 770-777.
- [6] F. Kyndt, J.P. Gueffet, V. Probst, P. Jaafar, A. Legendre, F. Le Bouffant, C. Toquet, E. Roy, L. McGregor, S.A. Lynch, R. Newbury-Ecob, V. Tran, I. Young, J.N. Trochu, H. Le Marec, J.J. Schott, Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy, *Circulation*, 115 (2007) 40-49.
- [7] F. Kyndt, J.J. Schott, J.N. Trochu, F. Baranger, O. Herbert, V. Scott, E. Fressinaud, A. David, J.P. Moisan, J.B. Bouhour, H. Le Marec, B. Benichou, Mapping of X-linked myxomatous valvular dystrophy to chromosome Xq28, *Am J Hum Genet*, 62 (1998) 627-632.
- [8] F. Nakamura, T.P. Stossel, J.H. Hartwig, The filamins: organizers of cell structure and function, *Cell Adh Migr*, 5 (2011) 160-169.
- [9] A.X. Zhou, J.H. Hartwig, L.M. Akyurek, Filamins in cell signaling, transcription and organ development, *Trends Cell Biol*, 20 (2010) 113-123.
- [10] M. Baldassarre, Z. Razinia, C.F. Burande, I. Lamsoul, P.G. Lutz, D.A. Calderwood, Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration, *PLoS One*, 4 (2009) e7830.
- [11] Z. Razinia, T. Makela, J. Ylanne, D.A. Calderwood, Filamins in mechanosensing and signaling, *Annu Rev Biophys*, 41 (2012) 227-246.
- [12] Y. Shifrin, P.D. Arora, Y. Ohta, D.A. Calderwood, C.A. McCulloch, The role of FilGAP-filamin A interactions in mechanoprotection, *Mol Biol Cell*, 20 (2009) 1269-1279.
- [13] T.P. Stossel, J. Condeelis, L. Cooley, J.H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher, S.S. Shapiro, Filamins as integrators of cell mechanics and signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (2001) 138-145.
- [14] D. Duval, A. Lardeux, T. Le Tourneau, R.A. Norris, R.R. Markwald, V. Sauzeau, V. Probst, H. Le Marec, R. Levine, J.J. Schott, J. Merot, Valvular dystrophy associated filamin A mutations reveal a new role of its first repeats in small-GTPase regulation, *Biochim Biophys Acta*, 1843 (2014) 234-244.

- [15] G. Loirand, V. Sauzeau, P. Pacaud, Small G proteins in the cardiovascular system: physiological and pathological aspects, *Physiol Rev*, 93 (2013) 1659-1720.
- [16] A. Lardeux, F. Kyndt, S. Lecointe, H.L. Marec, J. Merot, J.J. Schott, T. Le Tourneau, V. Probst, Filamin-a-related myxomatous mitral valve dystrophy: genetic, echocardiographic and functional aspects, *J Cardiovasc Transl Res*, 4 (2011) 748-756.
- [17] R.A. Norris, R. Moreno-Rodriguez, A. Wessels, J. Merot, P. Bruneval, A.H. Chester, M.H. Yacoub, A. Hagege, S.A. Slaugenhaupt, E. Aikawa, J.J. Schott, A. Lardeux, B.S. Harris, L.K. Williams, A. Richards, R.A. Levine, R.R. Markwald, Expression of the familial cardiac valvular dystrophy gene, filamin-A, during heart morphogenesis, *Dev Dyn*, 239 (2010) 2118-2127.
- [18] K. Sauls, A. de Vlaming, B.S. Harris, K. Williams, A. Wessels, R.A. Levine, S.A. Slaugenhaupt, R.L. Goodwin, L.M. Pavone, J. Merot, J.J. Schott, T. Le Tourneau, T. Dix, S. Jesinkey, Y. Feng, C. Walsh, B. Zhou, S. Baldwin, R.R. Markwald, R.A. Norris, Developmental basis for filamin-A-associated myxomatous mitral valve disease, *Cardiovasc Res*, 96 (2012) 109-119.
- [19] Y. Ohta, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling, *Nat Cell Biol*, 8 (2006) 803-814.
- [20] A.J. Ehrlicher, F. Nakamura, J.H. Hartwig, D.A. Weitz, T.P. Stossel, Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A, *Nature*, 478 (2011) 260-263.
- [21] F. Nakamura, FilGAP and its close relatives: a mediator of Rho-Rac antagonism that regulates cell morphology and migration, *Biochem J*, 453 (2013) 17-25.
- [22] J.R. Hove, R.W. Koster, A.S. Forouhar, G. Acevedo-Bolton, S.E. Fraser, M. Gharib, Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis, *Nature*, 421 (2003) 172-177.
- [23] M.S. Sacks, W. David Merryman, D.E. Schmidt, On the biomechanics of heart valve function, *J Biomech*, 42 (2009) 1804-1824.
- [24] H. Tan, S. Biechler, L. Junor, M.J. Yost, D. Dean, J. Li, J.D. Potts, R.L. Goodwin, Fluid flow forces and rhoA regulate fibrous development of the atrioventricular valves, *Dev Biol*, 374 (2013) 345-356.
- [25] J. Vermot, A.S. Forouhar, M. Liebling, D. Wu, D. Plummer, M. Gharib, S.E. Fraser, Reversing blood flows act through klf2a to ensure normal valvulogenesis in the developing heart, *PLoS Biol*, 7 (2009) e1000246.
- [26] D.H. Adams, R. Rosenhek, V. Falk, Degenerative mitral valve regurgitation: best practice revolution, *Eur Heart J*, 31 (2010) 1958-1966.
- [27] K. Saito, Y. Ozawa, K. Hibino, Y. Ohta, FilGAP, a Rho/Rho-associated protein kinase-regulated GTPase-activating protein for Rac, controls tumor cell migration, *Mol Biol Cell*, 23 (2012) 4739-4750.
- [28] C. Guilluy, A.D. Dubash, R. Garcia-Mata, Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus, *Nat Protoc*, 6 (2011) 2050-2060.

- [29] F. Nakamura, T.M. Osborn, C.A. Hartemink, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, Structural basis of filamin A functions, *J Cell Biol*, 179 (2007) 1011-1025.
- [30] J.K. Klarlund, W. Tsiaras, J.J. Holik, A. Chawla, M.P. Czech, Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRP1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs, *J Biol Chem*, 275 (2000) 32816-32821.
- [31] F. Nakamura, O. Heikkinen, O.T. Pentikainen, T.M. Osborn, K.E. Kasza, D.A. Weitz, O. Kupiainen, P. Permi, I. Kilpelainen, J. Ylanne, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, Molecular basis of filamin A-FilGAP interaction and its impairment in congenital disorders associated with filamin A mutations, *PLoS One*, 4 (2009) e4928.
- [32] P.J. Kilner, G.Z. Yang, A.J. Wilkes, R.H. Mohiaddin, D.N. Firmin, M.H. Yacoub, Asymmetric redirection of flow through the heart, *Nature*, 404 (2000) 759-761.
- [33] M. Padala, R.A. Hutchison, L.R. Croft, J.H. Jimenez, R.C. Gorman, J.H. Gorman, 3rd, M.S. Sacks, A.P. Yoganathan, Saddle shape of the mitral annulus reduces systolic strains on the P2 segment of the posterior mitral leaflet, *Ann Thorac Surg*, 88 (2009) 1499-1504.
- [34] R.J. Keogh, New technology for investigating trophoblast function, *Placenta*, 31 (2010) 347-350.

A



B

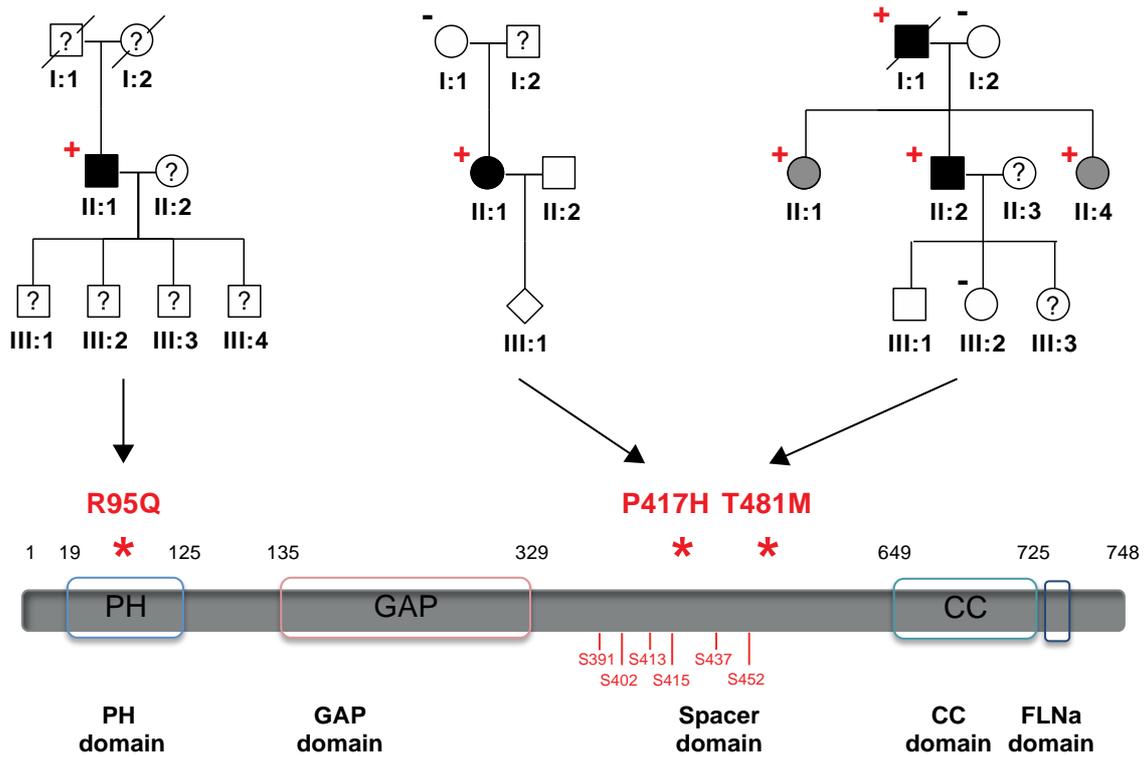
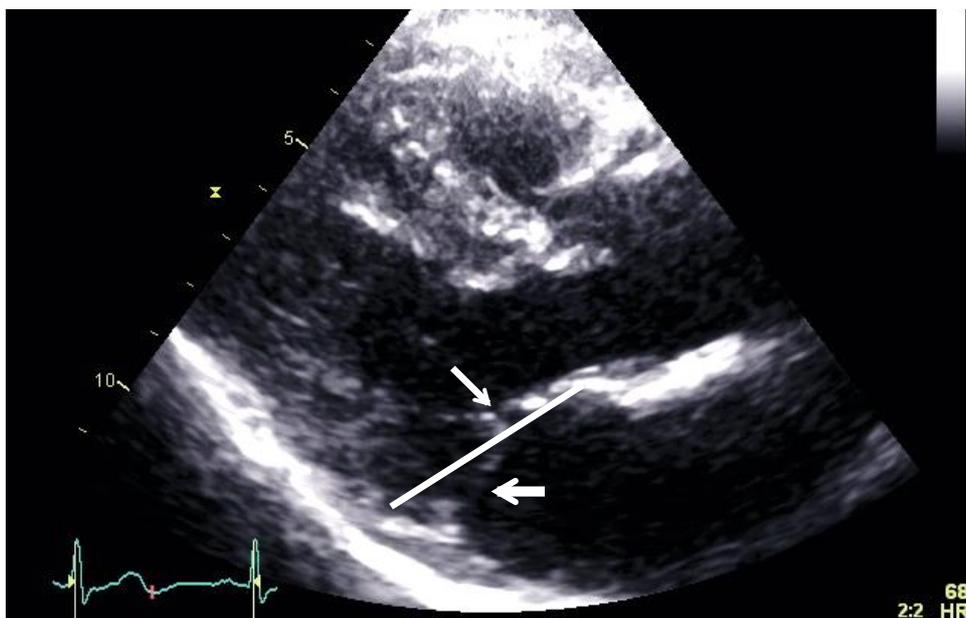


Figure n°1

A



B

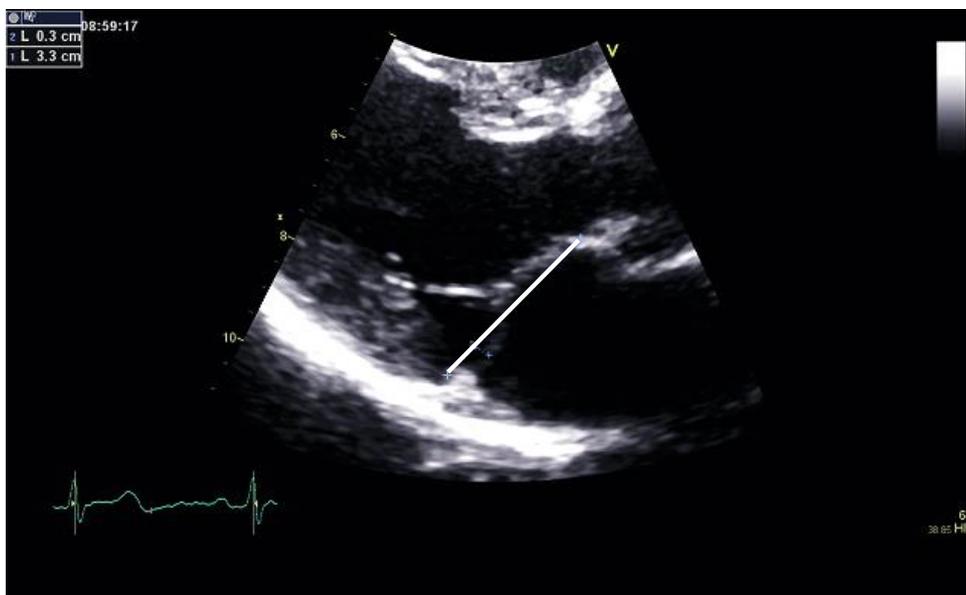
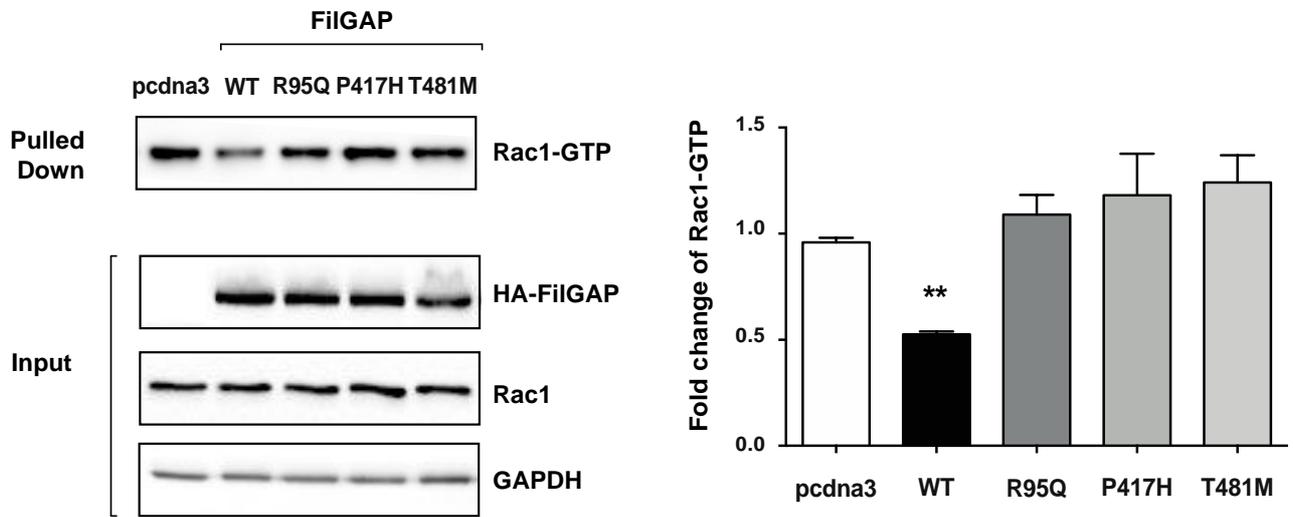


Figure n°2

A



B

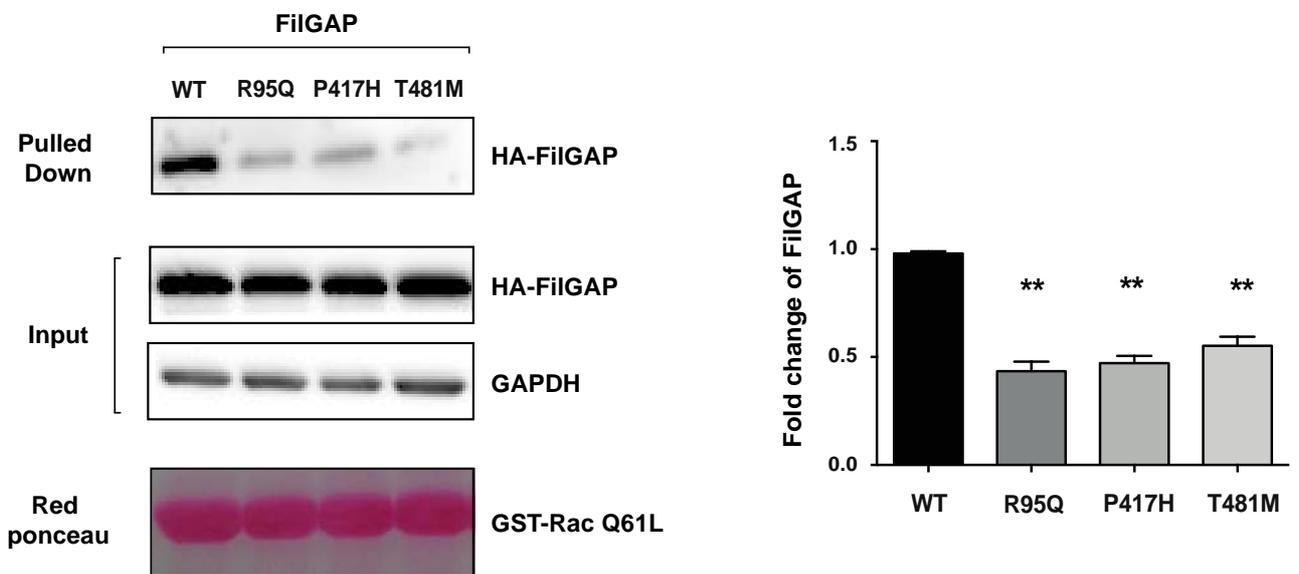


Figure n°3

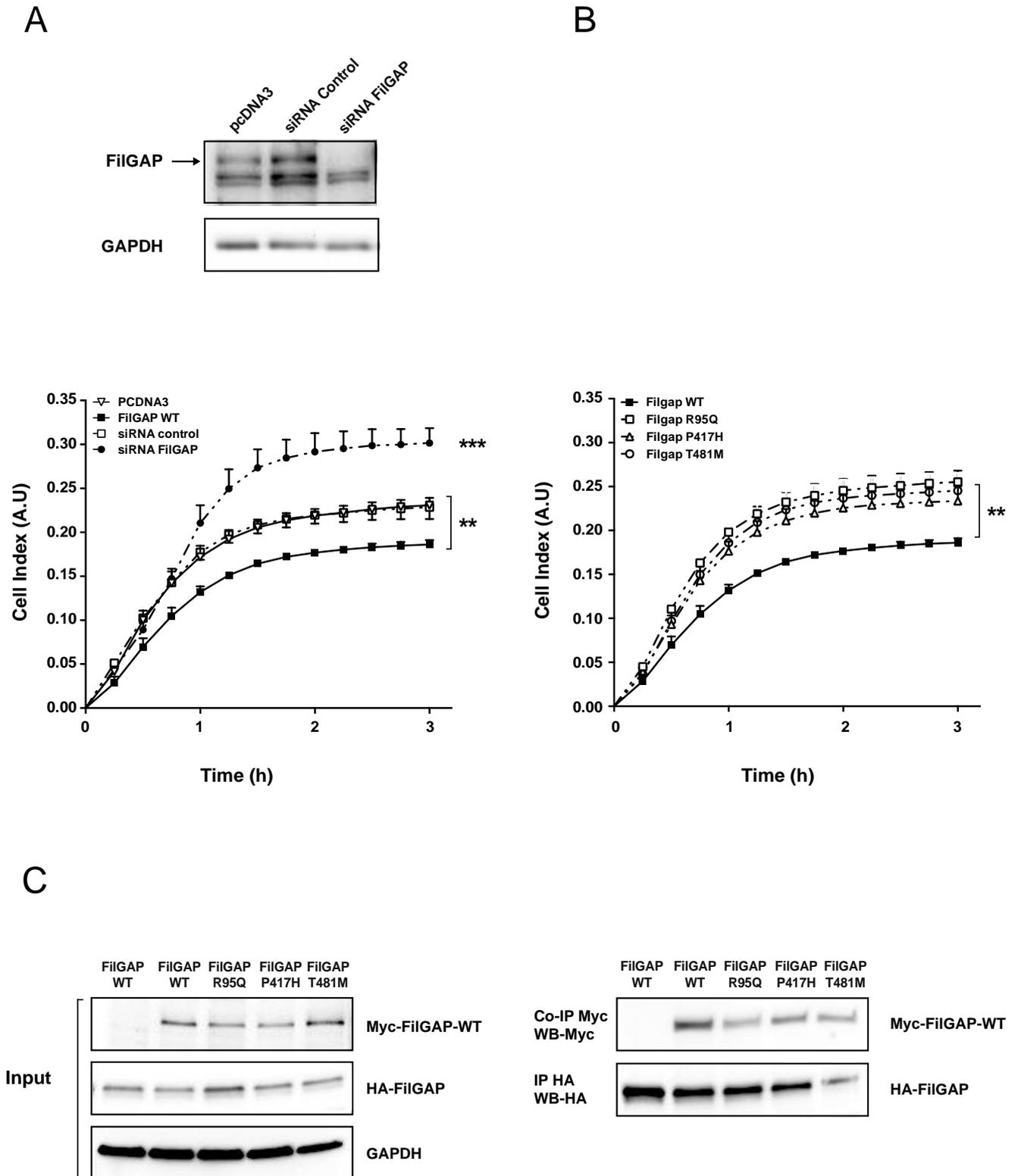
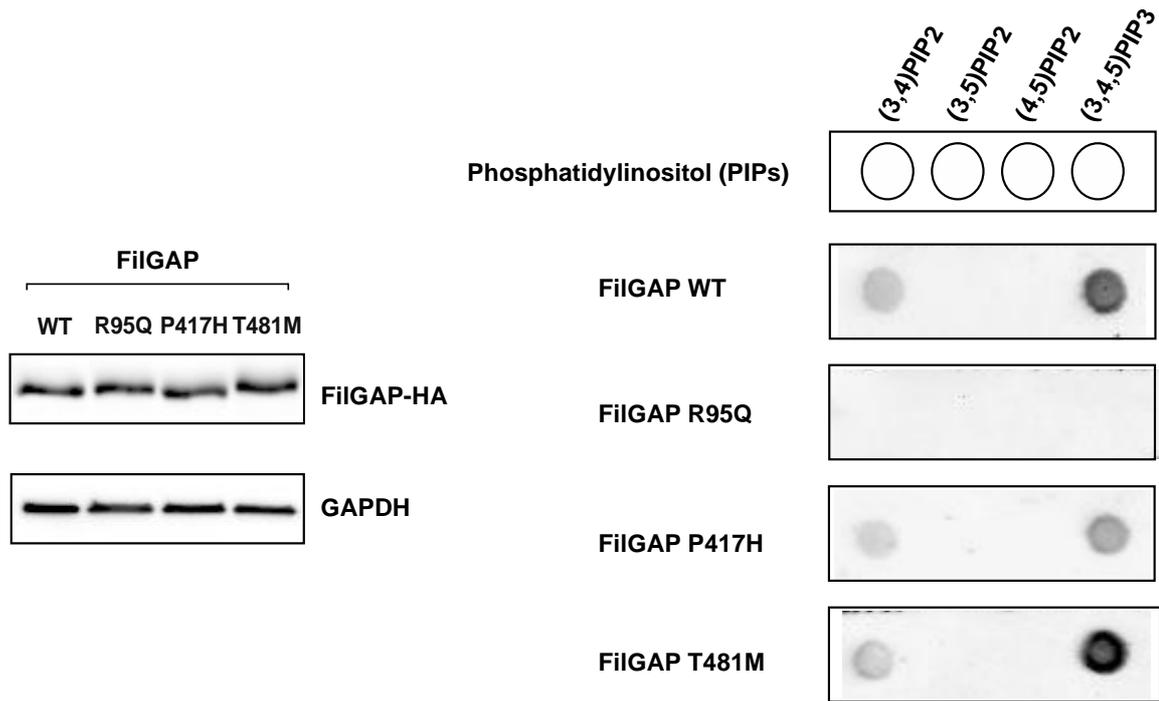


Figure n°4

A



B

Modelization of PH domain is in progress

Figure n°5

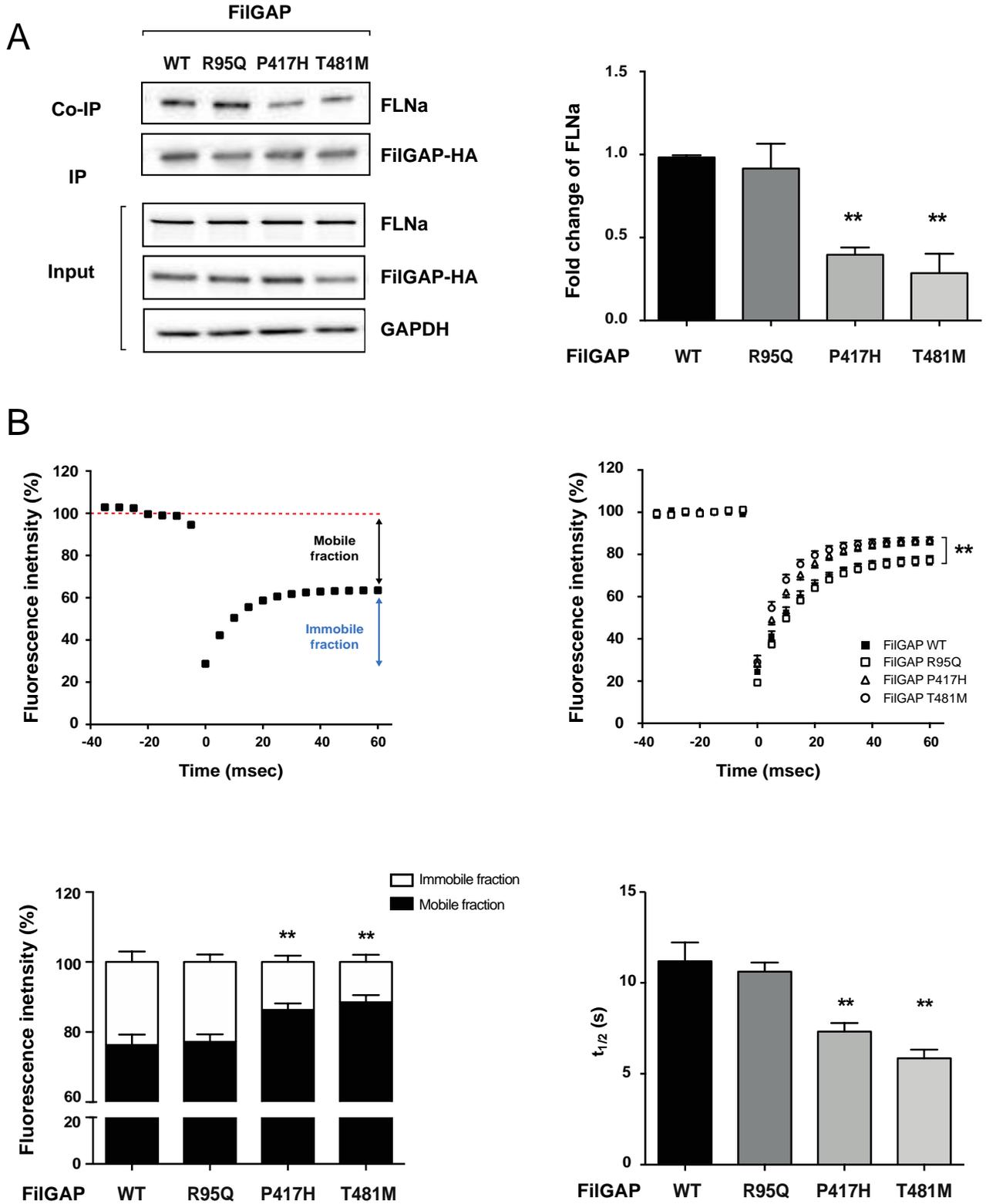


Figure n°6

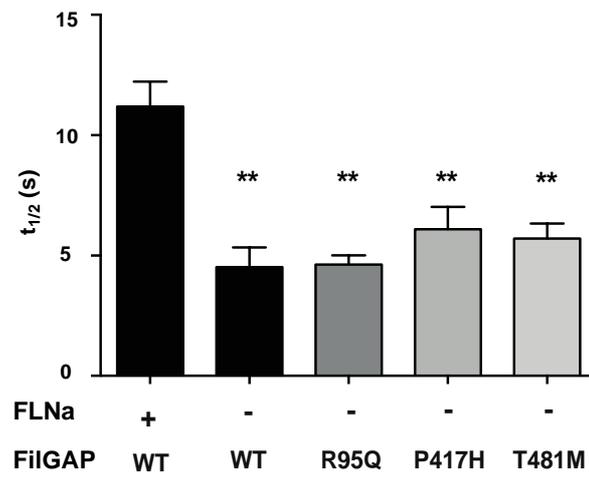
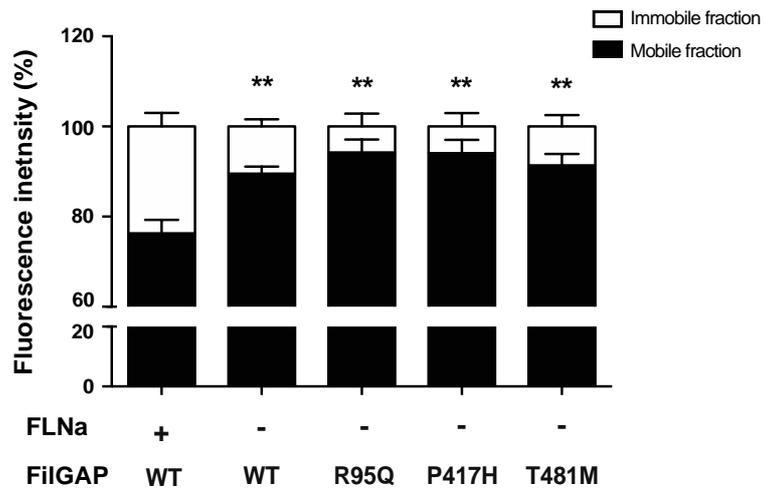


Figure n°7

Refseq transcrit	mRNA position	Protein position	EA MAF	EUR MAF	Protein domain	GERP
NM_001025616.2	c.284G>A	p.Arg95Gln	0.00105	0.0013	PH Domain	5.02
NM_001025616.2	c.1249C>G	p.Pro417Ala	0.01918	0.01	Spacer Domain	4.72
NM_001025616.2	c.1250C>A	p.Pro417His	-	-	Spacer Domain	5.60
NM_001025616.2	c.1442C>T	p.Thr481Met	0.00105	0.0026	Spacer Domain	4.86

**Table 1**

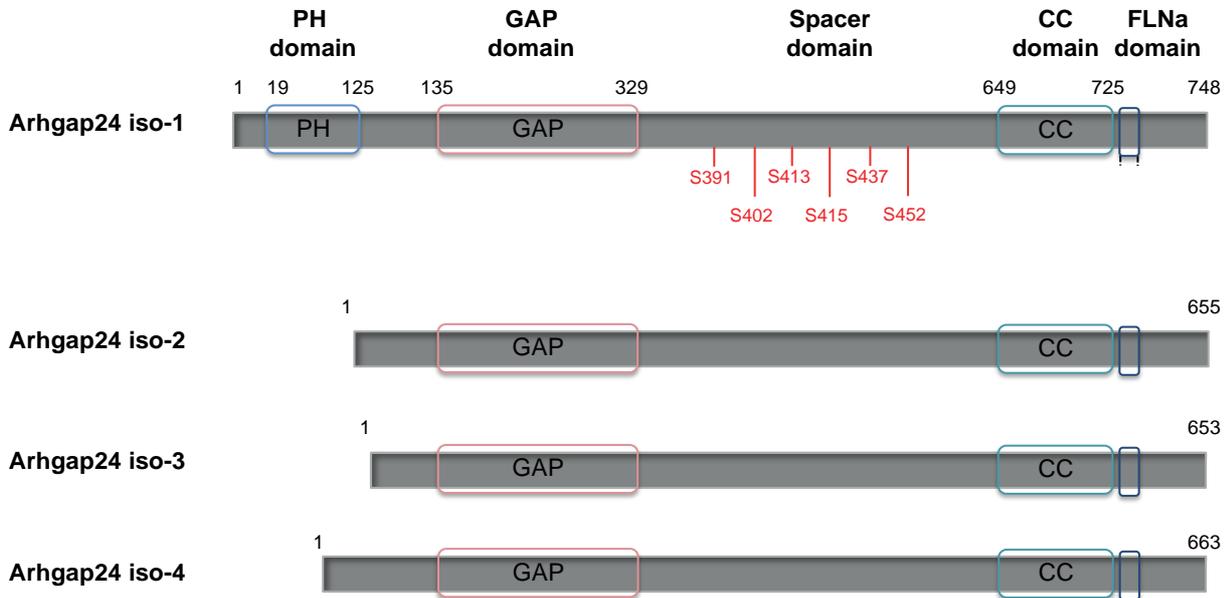
	Plasmide					siRNA	
	pcdna3	FilGAP				Ctl	FilGAP
		WT	R95Q	P417H	T481M		
dCl/dt	0.105 +/- 0.016	0.095 +/- 0.009	0.119 +/- 0.016	0.116 +/- 0.015	0.125 +/- 0.02	0.105 +/- 0.01	0.188 +/- 0.021
Cl <sub>st</sub>	0.230 +/- 0.008	0.186 +/- 0.005	0.255 +/- 0.01	0.233 +/- 0.016	0.245 +/- 0.02	0.228 +/- 0.013	0.301 +/- 0.016

**Table 2**

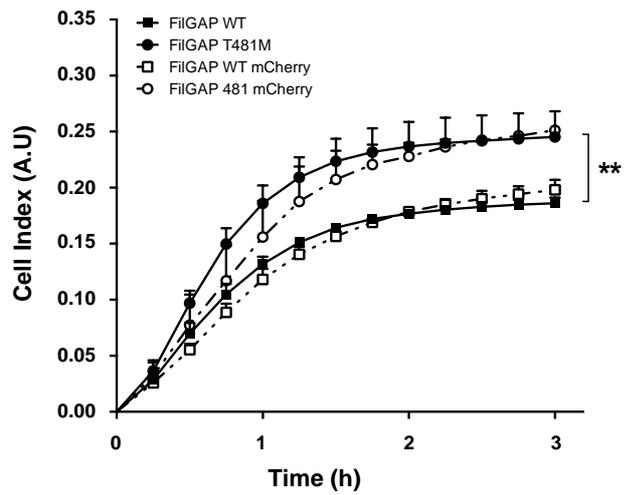
FilGAP	HT1080					FLNa-KO HT1080			
	WT	R95Q	P417H	T481M	V734Y	WT	R95Q	P417H	T481M
Recovery (%)	76.29 +/- 3.02 n=16	77.19 +/- 2.13 n=13	86.57 +/- 1.90 n=12	86.27 +/- 2.04 n=15	91.36 +/- 2.55 n=7	89.55 +/- 1.58 n=10	94.24 +/- 2.87 n=6	94.10 +/- 2.95 n=9	91.36 +/- 2.55 n=11
t1/2 (s)	11.19 +/- 1.02 n=16	10.62 +/- 0.49 n=13	7.32 +/- 0.47 n=12	5.84 +/- 0.47 n=15	5.50 +/- 0.55 n=7	4.52 +/- 0.81 n=10	4.62 +/- 0.35 n=6	6.08 +/- 0.93 n=9	5.70 +/- 0.61 n=11

**Table 3**

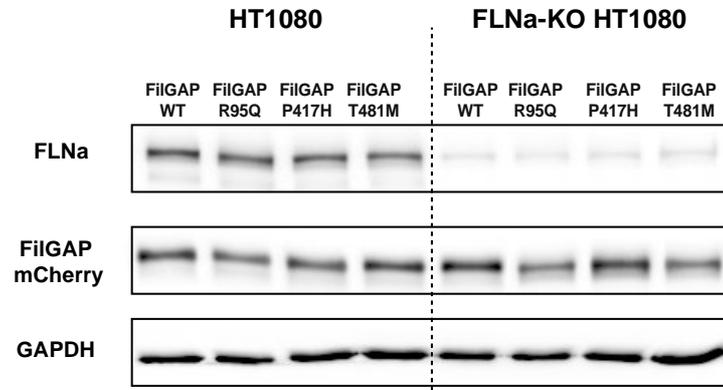
## S1



## S2



S3



**- Discussion Générale -**

Les maladies cardiovasculaires sont actuellement la première cause de mortalité dans les pays développés. Parmi celle-ci, le prolapsus de la valve mitrale (PVM) devient de plus en plus commun en affectant 2 à 3% de la population (Freed et coll., 1999; Devereux et coll., 2001). Cependant, ce chiffre peut-être sous-estimé du fait du caractère silencieux de la pathologie notamment parce que la majorité des cas de PVM se présente sous une forme sporadique donc difficile à déceler. Le manque de connaissance de cette pathologie fait que l'unique traitement à ce jour est la chirurgie valvulaire. Malgré que le PVM soit connu depuis plus d'un siècle, aucun mécanisme impliqué dans la pathologie n'a été caractérisé. Les premières analyses génétiques réalisées chez des patients atteints de PVM ont permis de mettre en évidence 3 différents loci mais aucun gène n'a pu y être associé (Disse et coll., 1999; Freed et coll., 2003; Nesta et coll., 2005). Cependant, l'identification de ces loci a mis en évidence l'importance de la génétique dans le développement de la pathologie. Cela a été renforcé par la découverte de cas familiaux atteints de PVM notamment dans la région nantaise (Kyndt et coll., 1998; Trochu et coll., 2000). L'avancée des technologies a permis d'accélérer l'identification de nouveaux mécanismes. Ces avancées incluent par exemple : 1) l'amélioration de l'imagerie médicale pour diagnostiquer et ainsi recruter les patients dans les études cliniques, 2) la découverte du premier gène (gène *FLNA*) impliqué dans une atteinte valvulaire non syndromique par une analyse de liaison dans des formes familiales (Kyndt et coll., 2007), 3) l'utilisation de nouvelles approches technologiques telles que l'approche génome entier (Whole-Exom), l'approche gène-candidat, les études d'associations (GWAS) ou l'approche « Haloplex » pour l'identification de nouveaux gènes chez des formes familiales et sporadiques et 4) le développement de nouveaux modèles cellulaires pour étudier les effets de ces mutations tel que les IPS pour permettre d'obtenir des CIV porteuses de la mutation incriminée de façon endogène et ainsi se rapprocher au plus près de la physiopathologie (Bharadwaj et coll., 2011).

Mon travail de recherche se situe dans cette période où les avancées technologiques ont permis de mettre en évidence des gènes potentiellement impliqués dans le PVM dont notamment le premier, le gène *FLNA*. Néanmoins aucun mécanisme physiopathologique n'a encore pu être clairement identifié. Les modèles de réexpression et les outils actuels d'analyse montrent leurs limites et suggèrent que de nouvelles hypothèses doivent être reformulées afin d'améliorer la compréhension de la pathologie. L'objectif de ma thèse a été à la fois de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires associés au PVM mais aussi de développer de nouvelles hypothèses de travail notamment sur le développement de nouveaux modèles cellulaires plus pertinents ou sur l'impact que peut avoir le stress mécanique dans le processus pathologique.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai identifié un mécanisme potentiellement lié aux mutations de la FLNa dans le processus pathologique du PVM.

Mes résultats ont montré, dans un modèle de mélanome humain, que les mutations de la FLNa modifient la balance de l'activité des protéines G monomériques en faveur d'une augmentation de l'activité de RhoA et d'une diminution de l'activité de Rac. Les répercussions au niveau phénotypique sont des défauts d'adhésion, d'étalement et de migration cellulaire ; ce qui est cohérent avec la modification de la balance Rho/Rac. Cette dérégulation est liée à la perte d'interaction avec la protéine FilGAP qui diminue l'activité de la protéine Rac (Duval et coll., 2013). Cela étant, cette perte d'interaction n'explique pas l'augmentation de l'activité de RhoA. Nous avons identifié que la protéine PTP-PEST interagit avec les premiers domaines répétés de la FLNa et que ses mutations modifient cette interaction. PTP-PEST régule la phosphorylation de nombreuses protéines notamment, celle de p190RhoGAP contrôle l'activité de RhoA et explique ainsi l'augmentation de son activité (Sastry et coll., 2006). La perte d'interaction augmente également l'activité de la protéine ERK 1-2 décrite comme participant à la synthèse des composants de la MEC.

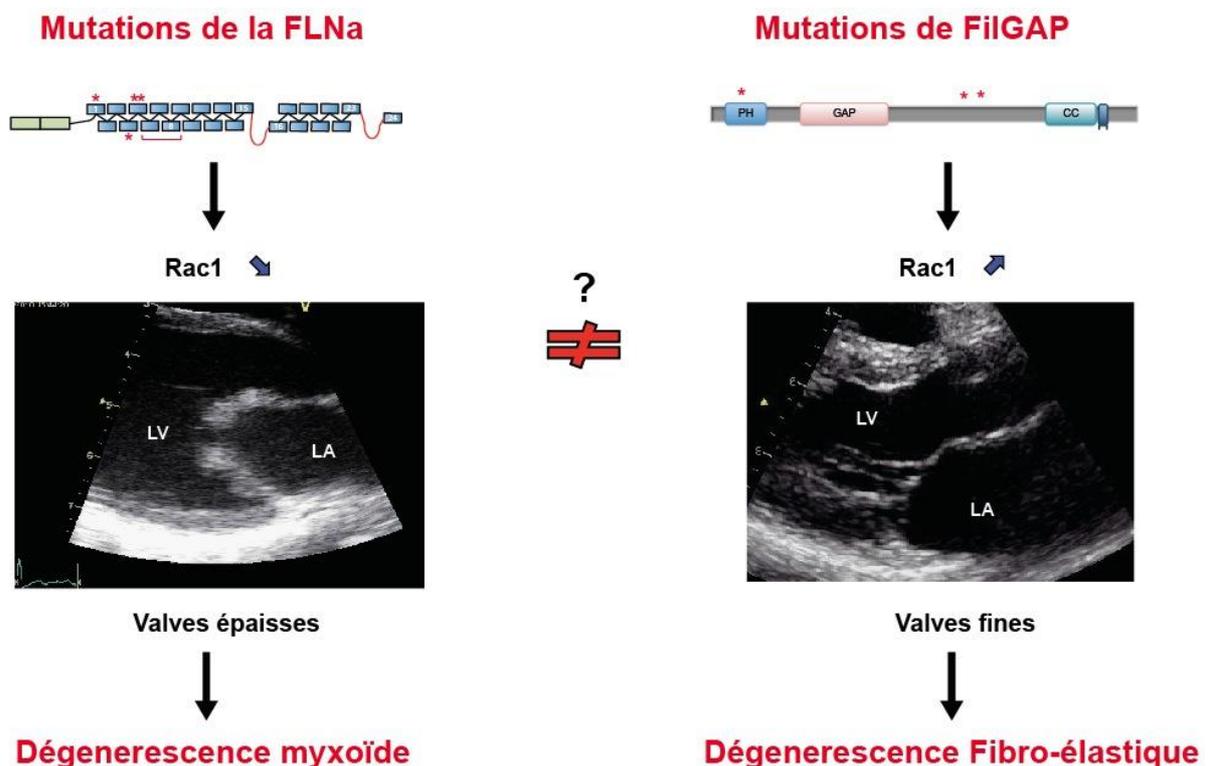
Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai identifié les effets des mutations de la protéine FilGAP dans le processus pathologique du PVM.

La protéine FilGAP identifiée dans le PVM lié aux mutations de la FLNa ainsi que son rôle fonctionnel dans la réponse au stress mécanique en font un candidat intéressant pour être potentiellement impliqué dans le processus pathologique. Par une approche de séquençage d'exome du gène *ARHGAP24* codant pour FilGAP, nous avons identifié 3 variants rares dans une cohorte de 95 patients atteints de PVM. Les mutations de la protéine FilGAP modifient son activité GTPasique ce qui a pour conséquence de ne plus inhiber l'activité de Rac. Cette perte d'inhibition passe par 2 mécanismes différents : 1) la modification du domaine PH par la mutation R95Q empêche sa localisation membranaire et 2) les mutations P417H et T481M diminuent l'interaction avec la FLNa ce qui a pour conséquence de ne plus le localiser à proximité de la membrane.

L'identification de mutations situées sur ces 2 protéines, décrites comme interagissant l'une avec l'autre, nous laisse suggérer que cette voie de signalisation est importante dans le processus pathologique. Or, les effets de ces mutations sont opposés alors qu'ils contribuent tous les 2 à des PVM. En effet, les mutations de la FLNa diminuent l'activité de Rac1 alors que celles de FilGAP ont tendance à l'augmenter.

La première explication possible concerne la caractérisation phénotypique des patients. Il est difficile de déterminer le type de PVM présent chez les patients malgré les avancées techniques en imagerie médicale et notamment en matière d'échographie cardiaque. Cependant, la caractérisation phénotypique des patients mutés pour la FLNa est de mieux en mieux définie grâce à un suivi régulier des patients. Ils présentent un épaissement des feuillets valvulaires de la valve mitrale dû à un

remodelage excessif de la MEC, une augmentation de la taille de l'anneau mitral associé à une diminution de la longueur des cordages. On trouve également des atteintes au niveau de la valve aortique (Barlow et Pocock, 1963). L'ensemble de ces caractéristiques est typique de la maladie de Barlow ou de la dégénérescence myxoïde. La caractérisation phénotypique est complexifiée par le fait que peu de patients sont porteurs des mutations de FilGAP. Cependant, les premiers résultats montrent tout de même une ballonnisation de la valve postérieure avec un excès de longueur et un aspect plutôt fin. Ce phénotype ressemble à une dégénérescence fibro-élastique bien que cela reste à confirmer auprès d'autres patients porteurs de la mutation (figure n°42) (Carpentier et coll., 1980). Ces 2 phénotypes différents peuvent être cohérents avec une variation de l'activité de Rac puisqu'une diminution de l'activité de Rac induit un remodelage de la MEC de la valve (Sanematsu et coll., 2010). On peut supposer qu'une suractivation de Rac conduit à une prolifération plus importante des CIV et par conséquent forme une valve plus allongée.



**Figure 42 :** Comparaison des phénotypes de PVM liés aux mutations de la FLNa ou de FilGAP. Les mutations de la FLNa diminuent l'activité de Rac1. Le phénotype associé est un remodelage excessif de la valve comme illustré sur l'échographie (gauche). A l'inverse, les mutations de FilGAP ont tendance à augmenter l'activité de Rac1. Sur le plan clinique, les patients ont une valve fine et allongée surtout la valve postérieure (droite).

L'origine des valvulopathies peut être différente en fonction des mutations de la FLNa ou de FilGAP. Le rôle différent de ces protéines laisse à penser que celles associées aux mutations de la FLNa seraient d'ordre développemental alors que celles associées aux mutations de FilGAP seraient à caractère progressif. De nombreux travaux montrent l'importance de la FLNa dans la régulation de voies de signalisation et notamment lors de l'embryogenèse. En effet, lorsque la FLNa est délétée chez des souris, il en résulte une mort « *in utero* » avec de nombreuses malformations cardiaques (Sauls et coll., 2012). Cela peut s'expliquer par le rôle que joue la FLNa dans la régulation de la voie du TGF- $\beta$ , de la 5-HT ou lors de la réponse au stress mécanique (Sasaki et coll., 2001; Sauls et coll., 2012; Razinia et coll., 2012). Cette hypothèse s'est vue renforcée par la présence d'un léger reflux mitral diagnostiqué à l'âge d'1 an chez un enfant porteur de la mutation de la FLNa-P637Q.

A l'inverse, la valvulopathie associée aux mutations de FilGAP s'apparente à une maladie à caractère progressif et non développementale. La protéine FilGAP régule très spécifiquement l'activité de Rac1 et participe à la réponse au stress mécanique notamment via son interaction avec la FLNa (Ohta et coll., 2006; Shifrin et coll., 2009). Il en résulterait une mauvaise adaptation des cellules au stress mécanique qui à long terme conduirait à leur activation en CIV activée. Il n'existe actuellement aucun modèle animal KO pour FilGAP pour répondre à cette question. C'est pourquoi nous avons répondu à l'appel d'offre « Phenomin ». Cette souris KO conditionnelle pour ce gène sera bientôt disponible. Ce modèle de souris couplé aux tests effectués avec les USC de patients nous permettra d'appréhender les mécanismes physiopathologiques du PVM lié aux mutations de FilGAP.

Les effets contradictoires entre les mutations de la FLNa et de FilGAP peuvent être également dus aux conditions expérimentales. En effet, les facteurs environnementaux peuvent influencer le comportement cellulaire. La majorité des expériences a été réalisée dans un environnement 2D sur une matrice rigide ( $\approx 20$  gPa) alors que les CIV dans les valves sont dans un environnement 3D et dans une matrice souple ( $\approx 1$  kPa) (Birukova et coll., 2013). Cette différence d'environnement et de rigidité de la matrice peut modifier la réponse cellulaire et par conséquent, ne pas être représentative du mécanisme physiopathologique. De précédents travaux ont montré que la voie RhoA était suractivée et conduisait à la formation de fibres de stress lorsque la matrice était rigide, ce qui ne se retrouve pas sur des matrices souples (Keely, 2011; Birukova et coll., 2013). De plus, des travaux de Birukova et collaborateurs ont montré que la voie Rac1 était impliquée dans le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale en augmentant la localisation de l'actine à la périphérie de la cellule, en redistribuant les adhésions focales à la périphérie via les protéines PAK1 et cortactine (Birukova et coll., 2006; 2007). Ce phénomène est dépendant de la rigidité de la matrice sous jacente qui peut activer soit la voie Rho soit la voie Rac1 (Birukova et coll., 2013). Ces travaux peuvent expliquer la différence de phénotype entre les 2 pathologies. Pour celle liées aux mutations de la FLNa, la diminution de Rac1 peut induire une rupture de la barrière des CEV et entraîner une différenciation des CIV via la 5-HT libérée par les

plaquettes. La conséquence directe serait une augmentation de la synthèse de MEC. Alors que pour les mutations de FilGAP, la barrière des CEV n'est pas rompue et par conséquent cela limiterait le remodelage excessif de la MEC de la valve suggérant qu'un autre mécanisme impliqué dans le processus pathologique.

L'environnement 3D permet de moduler la réponse cellulaire. En effet, des cellules cultivées dans une matrice 3D diminuent l'activité de RhoA et activent la voie Ras-ERK1-2 pour synthétiser des composants de la MEC tels que l'élastine (Sahai et coll., 2007; Lin et Mequanint, 2012).

Le stress mécanique est un facteur important dans la physiologie des valves. En effet, les valves subissent les contraintes mécaniques les plus fortes et les plus variées de l'organisme comme les forces de tension, de pression et d'étirement (Balachandran et coll., 2006). La FLNa et la protéine FilGAP sont toutes les 2 des mécanosenseurs adaptant la réponse cellulaire aux contraintes mécaniques subies (Shifrin et coll., 2009; Razinia et coll., 2012). Cela suggère l'importance du stress mécanique dans le développement de la pathologie. En effet, de nombreux travaux ont montré l'impact du stress lors de l'embryogenèse et notamment dans l'activation des CIV impliquées dans le remodelage de la MEC (Butcher et Markwald, 2007; Buskohl et coll., 2012a). Les CEV participent également à la transmission du stress mécanique conduisant le cas échéant à une activation des CIV via une infiltration plaquettaire libérant de la 5-HT ou bien une libération excessive du TGF- $\beta$  via les intégrines mais également impliquée dans l'EMT lorsque la barrière endothéliale est fragilisée (Balachandran et coll., 2011; Tao et coll., 2012). L'étude de l'impact des mutations sur la réponse au stress mécanique de FilGAP et de la FLNa est maintenant obligée pour appréhender les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les formes familiales de PVM.

Les avancées technologiques et le recrutement de patients atteint de valvulopathies ont permis l'identification de nouveaux variants potentiellement impliqués. L'ensemble de ces variants identifiés met en évidence 2 voies de signalisation importantes. En effet, certains variants comme la FLNa, FilGAP font partie des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine et sont importante dans la réponse cellulaire du stress mécanique (Ohta et coll., 1999; 2006). Des variants rares dans des protéines impliquées dans cette voie de signalisation ont été depuis identifiés comme par exemple Dock180 (Sanematsu et coll., 2010). D'autres variants comme Lrrfip1 ou APC semblent plutôt cibler la voie Wnt/ $\beta$ -caténine impliquée dans la valvulogenèse (Gubern et coll., 2014). Là encore, une modulation de la voie par Wnt par le stress mécanique pourrait être un lien important à considérer (De Calisto et coll., 2005; Gessert et Kühl, 2010; Sinha et coll., 2012)

- Discussion générale -

La découverte de nouveaux gènes et le développement de nouveaux modèles permettront d'améliorer les connaissances dans le développement du PVM. L'objectif est d'essayer de comprendre les mécanismes sous-jacents à la pathologie afin de développer les traitements thérapeutiques appropriés et d'améliorer la prise en charge des patients.

**- Bibliographie -**

- Ahearn, I. M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., et Philips, M. R. (2012). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 39–51. doi:10.1038/nrm3255.
- Akilesh, S., Suleiman, H., Yu, H., Stander, M. C., Lavin, P., Gbadegesin, R., Antignac, C., Pollak, M., Kopp, J. B., Winn, M. P., et al. (2011). Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, et a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 121, 4127–4137. doi:10.1172/JCI46458DS1.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., et Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699–711. doi:10.1016/j.cell.2004.05.018.
- Anyanwu, A. C., et Adams, D. H. (2007). Etiologic classification of degenerative mitral valve disease: Barlow's disease et fibroelastic deficiency. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 19, 90–96. doi:10.1053/j.semtcvs.2007.04.002.
- Armstrong, E. J., et Bischoff, J. (2004). Heart valve development: endothelial cell signaling et differentiation. *Circ Res* 95, 459–470. doi:10.1161/01.RES.0000141146.95728.da.
- Arthur, W. T., et Burrige, K. (2001). RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading et migration by promoting membrane protrusion et polarity. *Mol Biol Cell* 12, 2711–2720.
- Aupperle, H., Thielebein, J., Kiefer, B., März, I., Dinges, G., et Schoon, H. A. (2009). An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases et their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. *Vet J* 180, 88–94. doi:10.1016/j.tvjl.2007.11.011.
- Avierinos, J.-F., Gersh, B. J., Melton, L. J., Bailey, K. R., Shub, C., Nishimura, R. A., Tajik, A. J., et Enriquez-Sarano, M. (2002). Natural history of asymptomatic mitral valve prolapse in the community. *Circulation* 106, 1355–1361. doi:10.1161/01.CIR.0000028933.34260.09.
- Ayme-Dietrich, Lawson, Gasser, gas, Dallemand, Bischoff, N., et Monassier, L. (2012). Mitral bioprosthesis hypertrophic scaring et native aortic valve fibrosis during benfluorex therapy. 26, 215–218. doi:10.1111/j.1472-8206.2012.01027.x.
- Balachandran, K., Alford, P. W., Wylie-Sears, J., Goss, J. A., Grosberg, A., Bischoff, J., Aikawa, E., Levine, R. A., et Parker, K. K. (2011). Cyclic strain induces dual-mode endothelial-mesenchymal transformation of the cardiac valve. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 19943–19948. doi:10.1073/pnas.1106954108.
- Balachandran, K., Konduri, S., Sucusky, P., Jo, H., et Yoganathan, A. P. (2006). An ex vivo study of the biological properties of porcine aortic valves in response to circumferential cyclic stretch. *Ann Biomed Eng* 34, 1655–1665. doi:10.1007/s10439-006-9167-8.
- Baldassarre, M., Razinia, Z., Burande, C. F., Lamsoul, I., Lutz, P. G., et Calderwood, D. A. (2009). Filamins regulate cell spreading et initiation of cell migration. *PLoS ONE* 4, e7830. doi:10.1371/journal.pone.0007830.
- Barlow, J. B., et Pocock, W. A. (1963). The significance of late systolic murmurs et mid-late systolic clicks. *Md State Med J* 12, 76–77.
- Bartman, T., Walsh, E. C., Wen, K.-K., McKane, M., Ren, J., Alexander, J., Rubenstein, P. A., et Stainier, D. Y. R. (2004). Early myocardial function affects endocardial cushion development in zebrafish. *Plos Biol* 2, E129. doi:10.1371/journal.pbio.0020129.

- Bellanger, J. M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T. P., et Debant, A. (2000). The Rac1- et RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* 2, 888–892. doi:10.1038/35046533.
- Bernards, A., et Settleman, J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* 14, 377–385. doi:10.1016/j.tcb.2004.05.003.
- Berry, F. B., O'Neill, M. A., Coca-Prados, M., et Walter, M. A. (2005). FOXC1 transcriptional regulatory activity is impaired by PBX1 in a filamin A-mediated manner. *Mol Cell Biol* 25, 1415–1424. doi:10.1128/MCB.25.4.1415-1424.2005.
- Bharadwaj, S., Liu, G., Shi, Y., Markert, C., Andersson, K.-E., Atala, A., et Zhang, Y. (2011). Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 17, 2123–2132. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0637.
- Birukova, A. A., Chatchavalvanich, S., Rios, A., Kawkitinarong, K., Garcia, J. G. N., et Birukov, K. G. (2006). Differential regulation of pulmonary endothelial monolayer integrity by varying degrees of cyclic stretch. *Am J Pathol* 168, 1749–1761. doi:10.2353/ajpath.2006.050431.
- Birukova, A. A., Malyukova, I., Poroyko, V., et Birukov, K. G. (2007). Paxillin-beta-catenin interactions are involved in Rac/Cdc42-mediated endothelial barrier-protective response to oxidized phospholipids. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L199–211. doi:10.1152/ajplung.00020.2007.
- Birukova, A. A., Tian, X., Cokic, I., Beckham, Y., Gardel, M. L., et Birukov, K. G. (2013). Endothelial barrier disruption et recovery is controlled by substrate stiffness. *Microvascular Research* 87, 50–57. doi:10.1016/j.mvr.2012.12.006.
- Bouchareb, R., Boulanger, M.-C., Fournier, D., Pibarot, P., Messaddeq, Y., et Mathieu, P. (2014). Mechanical strain induces the production of spheroid mineralized microparticles in the aortic valve through a RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Journal of molecular et cellular cardiology* 67, 49–59. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.12.009.
- Brotschi, E. A., Hartwig, J. H., et Stossel, T. P. (1978). The Gelation of Actin by Actin-binding Protein. 1–7.
- Bruneau, B. G. (2008). The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 451, 943–948. doi:10.1038/nature06801.
- Buskohl, P. R., Gould, R. A., et Butcher, J. T. (2012a). Quantification of embryonic atrioventricular valve biomechanics during morphogenesis. *Journal of Biomechanics* 45, 895–902. doi:10.1016/j.jbiomech.2011.11.032.
- Buskohl, P. R., Jenkins, J. T., et Butcher, J. T. (2012b). Computational simulation of hemodynamic-driven growth et remodeling of embryonic atrioventricular valves. *Biomech Model Mechanobiol* 11, 1205–1217. doi:10.1007/s10237-012-0424-5.
- Butcher, J. T., et Markwald, R. R. (2007). Valvulogenesis: the moving target. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 362, 1489–1503. doi:10.1098/rstb.2007.2130.
- Butcher, J. T., et Nerem, R. M. (2006). Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress. *Tissue Eng.* 12, 905–915. doi:10.1089/ten.2006.12.905.

- Butcher, J. T., Norris, R. A., Hoffman, S., Mjaatvedt, C. H., et Markwald, R. R. (2007). Periostin promotes atrioventricular mesenchyme matrix invasion et remodeling mediated by integrin signaling through Rho/PI 3-kinase. *Dev Biol* 302, 256–266. doi:10.1016/j.ydbio.2006.09.048.
- Butcher, J. T., Penrod, A. M., García, A. J., et Nerem, R. M. (2004). Unique morphology et focal adhesion development of valvular endothelial cells in static et fluid flow environments. *Arteriosclerosis, Thrombosis, et Vascular Biology* 24, 1429–1434. doi:10.1161/01.ATV.0000130462.50769.5a.
- Butcher, J. T., Tressel, S., Johnson, T., Turner, D., Sorescu, G., Jo, H., et Nerem, R. M. (2006). Transcriptional profiles of valvular et vascular endothelial cells reveal phenotypic differences: influence of shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, et Vascular Biology* 26, 69–77. doi:10.1161/01.ATV.0000196624.70507.0d.
- Calderwood, D. A., Huttenlocher, A., Kiosses, W. B., Rose, D. M., Woodside, D. G., Schwartz, M. A., et Ginsberg, M. H. (2001). Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol* 3, 1060–1068. doi:10.1038/ncb1201-1060.
- Carpentier, A., Chauvaud, S., Fabiani, J. N., Deloche, A., Relland, J., Lessana, A., D'Allaines, C., Blondeau, P., Piwnica, A., et Dubost, C. (1980). Reconstructive surgery of mitral valve incompetence: ten-year appraisal. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 79, 338–348.
- Chalajour, F., Treede, H., Ebrahimnejad, A., Lauke, H., Reichenspurner, H., et Ergun, S. (2004). Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res* 298, 455–464. doi:10.1016/j.yexcr.2004.04.034.
- Charest, A., Pepin, A., Shetty, R., Cote, C., Voisine, P., Dagenais, F., Pibarot, P., et Mathieu, P. (2006). Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis. *Heart* 92, 1844–1849. doi:10.1136/hrt.2005.086595.
- Chen, H. S., Kolahi, K. S., et Mofrad, M. R. K. (2009). Phosphorylation facilitates the integrin binding of filamin under force. *Biophys J* 97, 3095–3104. doi:10.1016/j.bpj.2009.08.059.
- Cherfils, J., et Zeghouf, M. (2013). Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, et GDIs. *Physiol Rev* 93, 269–309. doi:10.1152/physrev.00003.2012.
- Combs, M. D., et Yutzey, K. E. (2009). Heart valve development: regulatory networks in development et disease. *Circ Res* 105, 408–421. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201566.
- Conway, S. J., Doetschman, T., et Azhar, M. (2011). The Inter-Relationship of Periostin, TGF beta, et BMP in Heart Valve Development et Valvular Heart Diseases. *TheScientificWorldJOURNAL* 11, 1509–1524. doi:10.1100/tsw.2011.132.
- Cunningham, C. C. (1995). Actin polymerization et 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., et Stossel, T. P. (1992). Actin-binding protein requirement for cortical stability et efficient locomotion. *Science* 255, 325–327.
- Davidson, D. (2001). PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates. *EMBO J* 20, 3414–3426. doi:10.1093/emboj/20.13.3414.

- De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C. F., et Mayor, R. (2005). Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* 132, 2587–2597. doi:10.1242/dev.01857.
- Derynck, R., et Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent et Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584. doi:10.1038/nature02006.
- Devereux, R. B., Jones, E. C., Roman, M. J., Howard, B. V., Fabsitz, R. R., Liu, J. E., Palmieri, V., Welty, T. K., et Lee, E. T. (2001). Prevalence et correlates of mitral valve prolapse in a population-based sample of American Indians: the Strong Heart Study. *Am. J. Med.* 111, 679–685.
- Dietz, H. C., Cutting, G. R., Pyeritz, R. E., Maslen, C. L., Sakai, L. Y., Corson, G. M., Puffenberger, E. G., Hamosh, A., Nanthakumar, E. J., et Curristin, S. M. (1991). Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 352, 337–339. doi:10.1038/352337a0.
- Dijke, ten, P., et Hill, C. S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 29, 265–273. doi:10.1016/j.tibs.2004.03.008.
- Disse, S., Abergel, E., Berrebi, A., Houot, A. M., Le Heuzey, J. Y., Diebold, B., Guize, L., Carpentier, A., Corvol, P., et 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. doi:10.1086/302624.
- Durbin, A. D., et Gotlieb, A. I. (2002). Advances towards understanding heart valve response to injury. *Cardiovasc Pathol* 11, 69–77.
- Duval, D., Lardeux, A., Le Tourneau, T., Norris, R. A., Markwald, R. R., Sauzeau, V., Probst, V., Le Marec, H., Levine, R., Schott, J. J., et al. (2013). Valvular dystrophy associated filamin A mutations reveal a new role of its first repeats in small-GTPase regulation. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.022.
- Ehrlicher, A. J., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Weitz, D. A., et Stossel, T. P. (2011a). Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP et integrin binding to filamin A supplementary data. *Nature*. doi:10.1038/nature10430.
- Ehrlicher, A. J., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Weitz, D. A., et Stossel, T. P. (2011b). Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP et integrin binding to filamin A. *Nature* 478, 260–263. doi:10.1038/nature10430.
- Elangbam, C. S., Job, L. E., Zadrozny, L. M., Barton, J. C., Yoon, L. W., Gates, L. D., et Slocum, N. (2008). 5-hydroxytryptamine (5HT)-induced valvulopathy: compositional valvular alterations are associated with 5HT2B receptor et 5HT transporter transcript changes in Sprague-Dawley rats. *Exp Toxicol Pathol* 60, 253–262. doi:10.1016/j.etp.2008.03.005.
- Enriquez-Sarano, M., Avierinos, J.-F., Messika-Zeitoun, D., Detaint, D., Capps, M., Nkomo, V., Scott, C., Schaff, H. V., et Tajik, A. J. (2005). Quantitative determinants of the outcome of asymptomatic mitral regurgitation. *N. Engl. J. Med.* 352, 875–883. doi:10.1056/NEJMoa041451.
- Etienne-Manneville, S., et Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635. doi:10.1038/nature01148.

- Falet, H., Pollitt, A. Y., Begonja, A. J., Weber, S. E., Duerschmied, D., Wagner, D. D., Watson, S. P., et Hartwig, J. H. (2010). A novel interaction between FlnA et Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling et function. *J. Exp. Med.* 207, 1967–1979. doi:10.1084/jem.20100222.
- Feng, Y., et Walsh, C. A. (2004). The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility et signalling. *Nat Cell Biol* 6, 1034–1038. doi:10.1038/ncb1104-1034.
- Feng, Y., Chen, M. H., Moskowitz, I. P., Mendonza, A. M., Vidali, L., Nakamura, F., Kwiatkowski, D. J., et Walsh, C. A. (2006). Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development et cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 19836–19841. doi:10.1073/pnas.0609628104.
- Filip, D. A., Radu, A., et Simionescu, M. (1986). Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells. *Circ Res* 59, 310–320. doi:10.1161/01.RES.59.3.310.
- Fornes, P., Heudes, D., Fuzellier, J. F., Tixier, D., Bruneval, P., et Carpentier, A. (1999). Correlation between clinical et histologic patterns of degenerative mitral valve insufficiency: a histomorphometric study of 130 excised segments. *Cardiovasc Pathol* 8, 81–92.
- Fox, J. W., Lamperti, E. D., Ekşioğlu, Y. Z., Hong, S. E., Feng, Y., Graham, D. A., Scheffer, I. E., Dobyens, W. B., Hirsch, B. A., Radtke, R. A., et al. (1998). Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21, 1315–1325.
- Freed, L. A., Acierno, J. S., Dai, D., Leyne, M., Marshall, J. E., Nesta, F., Levine, R. A., et Slaugenhaupt, S. A. (2003). A locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 11p15.4. *Am J Hum Genet* 72, 1551–1559. doi:10.1086/375452.
- Freed, L. A., Levy, D., Levine, R. A., Larson, M. G., Evans, J. C., Fuller, D. L., Lehman, B., et Benjamin, E. J. (1999). Prevalence et clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N. Engl. J. Med.* 341, 1–7. doi:10.1056/NEJM199907013410101.
- Gardel, M. L., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Crocker, J. C., Stossel, T. P., et Weitz, D. A. (2006). Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1762–1767. doi:10.1073/pnas.0504777103.
- Garg, V. (2006). Molecular genetics of aortic valve disease. *current opinion in cardiology* 21, 180–184. doi:10.1097/01.hco.0000221578.18254.70.
- Garg, V., Muth, A. N., Ransom, J. F., Schluterman, M. K., Barnes, R., King, I. N., Grossfeld, P. D., et Srivastava, D. (2005). Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437, 270–274. doi:10.1038/nature03940.
- Garton, A. J., et Tonks, N. K. (1994). PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation. *EMBO J* 13, 3763–3771.
- Garton, A. J., Flint, A. J., et Tonks, N. K. (1996). Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol* 16, 6408–6418.
- Gawecka, J. E., Griffiths, G. S., Ek-Rylander, B., Ramos, J. W., et Matter, M. L. (2010). R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS ONE* 5, e11269. doi:10.1371/journal.pone.0011269.

- Gay, O., Gilquin, B., Nakamura, F., Jenkins, Z. A., McCartney, R., Krakow, D., Deshiere, A., Assard, N., Hartwig, J. H., Robertson, S. P., et al. (2011). RefilinB (FAM101B) targets filamin A to organize perinuclear actin networks et regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 11464–11469. doi:10.1073/pnas.1104211108.
- Gessert, S., et Köhl, M. (2010). The multiple phases et faces of wnt signaling during cardiac differentiation et development. *Circ Res* 107, 186–199. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.221531.
- Glogauer, M., Arora, P., Chou, D., Janmey, P. A., Downey, G. P., et McCulloch, C. A. (1998). The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J Biol Chem* 273, 1689–1698.
- Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Blaha, M. J., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Franco, S., et al. (2014). Heart disease et stroke statistics--2014 update: a report from the american heart association. *Circulation* 129, e28–e292. doi:10.1161/01.cir.0000441139.02102.80.
- Gorlin, J. B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J., et Hartwig, J. H. (1990a). Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol* 111, 1089–1105.
- Gorlin, J. B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J., et Hartwig, J. H. (1990b). 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., et Vesely, I. (2003). Glycosaminoglycan profiles of myxomatous mitral leaflets et chordae parallel the severity of mechanical alterations. *J Am Coll Cardiol* 42, 271–277. doi:10.1016/S0735-1097(03)00626-0.
- Grau, J. B., Pirelli, L., Yu, P.-J., Galloway, A. C., et Ostrer, H. (2007). The genetics of mitral valve prolapse. *Clinical Genetics* 72, 288–295. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00865.x.
- Griffiths, G. S., Grundl, M., Allen, J. S., et Matter, M. L. (2011). R-Ras interacts with filamin a to maintain endothelial barrier function. *J. Cell. Physiol.* 226, 2287–2296. doi:10.1002/jcp.22565.
- Gubern, C., Camós, S., Hurtado, O., Rodríguez, R., Romera, V. G., Sobrado, M., Cañadas, R., Moro, M. A., Lizasoain, I., Serena, J., et al. (2014). Characterization of Gcf2/Lrrfip1 in experimental cerebral ischemia et its role as a modulator of Akt, mTOR et  $\beta$ -catenin signaling pathways. *Neuroscience* 268, 48–65. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.02.051.
- Guerrini, R., et Parrini, E. (2010). Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity et correlation with Filamin A mutations  
. *Neurobiol. Dis.* 38, 154–166. doi:10.1016/j.nbd.2009.02.008.
- Guilluy, C., Dubash, A. D., et a-Mata, R. G. I. (2011). Analysis of RhoA et Rho GEF activity in whole cells et the cell nucleus. *Nature Protocols* 6, 2050–2060. doi:10.1038/nprot.2011.411.
- Gustafsson, B. I., Hauso, O., Drozdov, I., Kidd, M., et Modlin, I. M. (2008). Carcinoid heart disease. *Int. J. Cardiol.* 129, 318–324. doi:10.1016/j.ijcard.2008.02.019.
- Habashi, J. P., Doyle, J. J., Holm, T. M., Aziz, H., Schoenhoff, F., Bedja, D., Chen, Y., Modiri, A. N., Judge, D. P., et Dietz, H. C. (2011). Angiotensin II Type 2 Receptor Signaling Attenuates Aortic Aneurysm in Mice Through ERK Antagonism. *Science* 332, 361–365. doi:10.1126/science.1192152.

- Halle, M., Liu, Y. C., Hardy, S., Theberge, J. F., Blanchetot, C., Bourdeau, A., Meng, T. C., et Tremblay, M. L. (2007). Caspase-3 Regulates Catalytic Activity et Scaffolding Functions of the Protein Tyrosine Phosphatase PEST, a Novel Modulator of the Apoptotic Response. *Mol Cell Biol* 27, 1172–1190. doi:10.1128/MCB.02462-05.
- Hart, A. W. (2006). Cardiac malformations et midline skeletal defects in mice lacking filamin A. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2457–2467. doi:10.1093/hmg/ddl168.
- Hartwig, J. H., et Stossel, T. P. (1981). Structure of macrophage actin-binding protein molecules in solution et interacting with actin filaments. *J. Mol. Biol.* 145, 563–581.
- Hayek, E., Gring, C. N., et Griffin, B. P. (2005). Mitral valve prolapse. *Lancet* 365, 507–518. doi:10.1016/S0140-6736(05)17869-6.
- Himmel, M., van der Ven, P. F. M., Stöcklein, W., et Fürst, D. O. (2003). The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins. *Biochemistry* 42, 430–439. doi:10.1021/bi026501.
- Hofmann, C., Penner, U., Dorow, R., Pertz, H. H., Jähnichen, S., Horowski, R., Latté, K. P., Palla, D., et Schurad, B. (2006). Lisuride, a dopamine receptor agonist with 5-HT<sub>2B</sub> receptor antagonist properties: absence of cardiac valvulopathy adverse drug reaction reports supports the concept of a crucial role for 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonism in cardiac valvular fibrosis. *Clin Neuropharmacol* 29, 80–86.
- Hunter, T. (2009). Tyrosine phosphorylation: thirty years et counting. *Curr Opin Cell Biol* 21, 140–146. doi:10.1016/j.ceb.2009.01.028.
- Hyytiäinen, M., Penttinen, C., et Keski-Oja, J. (2004). Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association et roles in TGF-beta activation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41, 233–264. doi:10.1080/10408360490460933.
- Ingeson-Carlsson, C., et Nilsson, M. (2013). Switching from MAPK-dependent to MAPK-independent repression of the sodium-iodide symporter in 2D et 3D cultured normal thyroid cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 381, 241–254. doi:10.1016/j.mce.2013.08.006.
- Ithychanda, S. S., Hsu, D., Li, H., Yan, L., Liu, D. D., Liu, D., Das, M., Plow, E. F., et Qin, J. (2009). Identification et characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering et cross-talk. *Journal of Biological Chemistry* 284, 35113–35121. doi:10.1074/jbc.M109.060954.
- Ito, T., Suzuki, A., et Stossel, T. P. (1992). Regulation of water flow by actin-binding protein-induced actin gelatin. *Biophys J* 61, 1301–1305. doi:10.1016/S0006-3495(92)81938-0.
- Ivaska, J., Vuoriluoto, K., Huovinen, T., Izawa, I., Inagaki, M., et Parker, P. J. (2005). PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling et motility. *EMBO J* 24, 3834–3845. doi:10.1038/sj.emboj.7600847.
- 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 NH<sub>2</sub>-terminal kinase signaling pathway. *Mol Biol Cell* 19, 5116–5130. doi:10.1091/mbc.E08-06-0576.
- Jian, B., Narula, N., Li, Q.-Y., Mohler, E. R., et Levy, R. J. (2003). Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps et promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann. Thorac. Surg.* 75, 457–65– discussion 465–6.

- Jian, B., Xu, J., Connolly, J., Savani, R. C., Narula, N., Liang, B., et 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.
- Kainulainen, T., Pender, A., D'Addario, M., Feng, Y., Lekic, P., et McCulloch, C. A. (2002). Cell death et mechanoprotection by filamin a in connective tissues after challenge by applied tensile forces. *J Biol Chem* 277, 21998–22009. doi:10.1074/jbc.M200715200.
- Katoh, M., et Katoh, M. (2004). Identification et characterization of ARHGAP24 et ARHGAP25 genes in silico. *Int. J. Mol. Med.* 14, 333–338.
- Kawaguchi, K., Saito, K., Asami, H., et Ohta, Y. (2014a). ADP Ribosylation Factor 6 (Arf6) Acts through FilGAP Protein to Down-regulate Rac Protein et Regulates Plasma Membrane Blebbing. *Journal of Biological Chemistry* 289, 9675–9682. doi:10.1074/jbc.M113.546051.
- Kawaguchi, K., Saito, K., Asami, H., et Ohta, Y. (2014b). Arf6 Acts through FilGAP to Down-regulate Rac et Regulates Plasma Membrane Blebbing. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M113.546051.
- Keely, P. J. (2011). Mechanisms by Which the Extracellular Matrix et Integrin Signaling Act to Regulate the Switch Between Tumor Suppression et Tumor Promotion. *J Mammary Glet Biol Neoplasia* 16, 205–219. doi:10.1007/s10911-011-9226-0.
- Keogh, R. J. (2010). New technology for investigating trophoblast function. *Placenta* 31, 347–350. doi:10.1016/j.placenta.2010.02.008.
- Khan, R., et Sheppard, R. (2006). Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease et arrhythmia. *Immunology* 118, 10–24. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02336.x.
- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C., et Baldassarre, M. (2006). The molecular basis of filamin binding to integrins et competition with talin. *Mol Cell*.
- Kim, H., Nakamura, F., Lee, W., Hong, C., Pérez-Sala, D., et McCulloch, C. A. (2010a). Regulation of cell adhesion to collagen via beta1 integrins is dependent on interactions of filamin A with vimentin et protein kinase C epsilon. *Exp Cell Res* 316, 1829–1844. doi:10.1016/j.yexcr.2010.02.007.
- Kim, H., Nakamura, F., Lee, W., Shifrin, Y., Arora, P. D., et McCulloch, C. A. (2010b). Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion et spreading. *AJP: Cell Physiology* 298, C221–36. doi:10.1152/ajpcell.00323.2009.
- Kim, L., Kim, D. K., Yang, W. I., Shin, D. H., Jung, I. M., Park, H. K., et 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. doi:10.3346/jkms.2008.23.1.41.
- Kruithof, B. P. T., Krawitz, S. A., et Gaussin, V. (2007). Atrioventricular valve development during late embryonic et postnatal stages involves condensation et extracellular matrix remodeling. *Dev Biol* 302, 208–217. doi:10.1016/j.ydbio.2006.09.024.
- 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. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.622621.

- 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. doi:10.1086/301747.
- La Flanagan, Chou, J., et Falet, H. (2001). Filamin A, the Arp2/3 complex, et the morphology et function of cortical actin filaments in human melanoma cells. *The Journal of cell ...*
- Lacerda, C. M. R., MacLea, H. B., Kisiday, J. D., et Orton, E. C. (2012). Static et cyclic tensile strain induce myxomatous effector proteins et serotonin in canine mitral valves. *J Vet Cardiol* 14, 223–230. doi:10.1016/j.jvc.2011.12.002.
- Latif, N., Sarathchandra, P., Taylor, P. M., Antoniw, J., Brand, N., et Yacoub, M. H. (2006). Characterization of molecules mediating cell-cell communication in human cardiac valve interstitial cells. *Cell Biochem. Biophys.* 45, 255–264. doi:10.1385/CBB:45:3:255.
- Launay, J. M., Birraux, G., Bondoux, D., Callebert, J., Choi, D. S., Loric, S., et Maroteaux, L. (1996). Ras involvement in signal transduction by the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor. *J Biol Chem* 271, 3141–3147.
- Lebart, M. C., Méjean, C., Casanova, D., Audemard, E., Derancourt, J., Roustan, C., et Benyamin, Y. (1994). Characterization of the actin binding site on smooth muscle filamin. *J Biol Chem* 269, 4279–4284.
- Lester, W. M., Damji, A. A., Gedeon, I., et Tanaka, M. (1993). Interstitial cells from the atrial et ventricular sides of the bovine mitral valve respond differently to denuding endocardial injury. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29A, 41–50.
- Li, S., Chen, B. P., Azuma, N., Hu, Y. L., Wu, S. Z., Sumpio, B. E., Shyy, J. Y., et Chien, S. (1999). Distinct roles for the small GTPases Cdc42 et Rho in endothelial responses to shear stress. *J Clin Invest* 103, 1141–1150. doi:10.1172/JCI5367.
- Lin, C. J., Lin, C. Y., Chen, C. H., Zhou, B., et Chang, C. P. (2012). Partitioning the heart: mechanisms of cardiac septation et valve development. *Development* 139, 3277–3299. doi:10.1242/dev.063495.
- Lin, S., et Mequanint, K. (2012). The role of Ras-ERK-IL-1 $\beta$  signaling pathway in upregulation of elastin expression by human coronary artery smooth muscle cells cultured in 3D scaffolds. *Biomaterials* 33, 7047–7056. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.044.
- Lincoln, J., Lange, A. W., et Yutzey, K. E. (2006). Hearts et bones: shared regulatory mechanisms in heart valve, cartilage, tendon, et bone development. *Dev Biol* 294, 292–302. doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.027.
- Liu, A. C., Joag, V. R., et Gotlieb, A. I. (2007). The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* 171, 1407–1418. doi:10.2353/ajpath.2007.070251.
- Loeys, B. L., Schwarze, U., Holm, T., Callewaert, B. L., Thomas, G. H., Pannu, H., De Backer, J. F., Oswald, G. L., Symoens, S., Manouvrier, S., et al. (2006). Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N. Engl. J. Med.* 355, 788–798. doi:10.1056/NEJMoa055695.
- Loirand, G., Sauzeau, V., et Pacaud, P. (2013). Small G proteins in the cardiovascular system: physiological et pathological aspects. *Physiol Rev* 93, 1659–1720. doi:10.1152/physrev.00021.2012.

- Loo, D. T., Kanner, S. B., et 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.
- Luxton, G. W. G., Gomes, E. R., Folker, E. S., Vintinner, E., et Gundersen, G. G. (2010). Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science* 329, 956–959. doi:10.1126/science.1189072.
- Lynch, C. D., Gauthier, N. C., Biaias, N., Lazar, A. M., Roca-Cusachs, P., Yu, C.-H., et Sheetz, M. P. (2011). Filamin depletion blocks endoplasmic spreading et destabilizes force-bearing adhesions. *Mol Biol Cell* 22, 1263–1273. doi:10.1091/mbc.E10-08-0661.
- Madaule, P., et Axel, R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell* 41, 31–40.
- Marron, K., Yacoub, M. H., Polak, J. M., Sheppard, M. N., Fagan, D., Whitehead, B. F., de Leval, M. R., Anderson, R. H., et Wharton, J. (1996). Innervation of human atrioventricular et arterial valves. *Circulation* 94, 368–375.
- Marti, A., Luo, Z., Cunningham, C., Ohta, Y., Hartwig, J., Stossel, T. P., Kyriakis, J. M., et Avruch, J. (1997). Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 et is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. *J Biol Chem* 272, 2620–2628.
- Mebazaa, A., Mayoux, E., Maeda, K., Martin, L. D., Lakatta, E. G., Robotham, J. L., et Shah, A. M. (1993). Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. *Am. J. Physiol.* 265, H1841–6.
- Mekontso-Dessap, A., Brouri, F., Pascal, O., Lechat, P., Hanoun, N., Lanfumey, L., Seif, I., Benhaim-Sigaux, N., Kirsch, M., Hamon, M., et al. (2006). Deficiency of the 5-hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis et valvulopathy in mice. *Circulation* 113, 81–89. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.554667.
- Merryman, W. D., Youn, I., Lukoff, H. D., Krueger, P. M., Guilak, F., Hopkins, R. A., et Sacks, M. S. (2006). Correlation between heart valve interstitial cell stiffness et transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H224–31. doi:10.1152/ajpheart.00521.2005.
- Misfeld, M., et Sievers, H.-H. (2007). Heart valve macro- et microstructure. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 362, 1421–1436. doi:10.1098/rstb.2007.2125.
- Mohler, E. R., Gannon, F., Reynolds, C., Zimmerman, R., Keane, M. G., et Kaplan, F. S. (2001). Bone formation et inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103, 1522–1528. doi:10.1161/01.CIR.103.11.1522.
- Nakamura, F. (2013). FilGAP et its close relatives: a mediator of Rho-Rac antagonism that regulates cell morphology et migration. *Biochem. J.* 453, 17–25. doi:10.1042/BJ20130290.
- Nakamura, F., Hartwig, J. H., Stossel, T. P., et Szymanski, P. T. (2005). Ca<sup>2+</sup> et calmodulin regulate the binding of filamin A to actin filaments. *J Biol Chem* 280, 32426–32433. doi:10.1074/jbc.M502203200.
- 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 et its impairment in congenital disorders associated with filamin A mutations. *PLoS ONE* 4, e4928. doi:10.1371/journal.pone.0004928.

- Nakamura, F., Osborn, T., et Hartemink, C. (2007). Structural basis of filamin A functions. *Journal of Cell ...*
- Nakamura, F., Stossel, T. P., et Hartwig, J. H. (2011). The filamins: Organizers of cell structure et function. *Cell Adhesion & Migration* 5, 160–169.
- Nesta, F., Leyne, M., Yosefy, C., Simpson, C., Dai, D., Marshall, J. E., Hung, J., Slaugenhaupt, S. A., et Levine, R. A. (2005). New locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 13: clinical insights from genetic studies. *Circulation* 112, 2022–2030. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.516930.
- Ni, W., et Watts, S. W. (2006). 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 575–583. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04410.x.
- Norris, R. A., Moreno-Rodriguez, R., Wessels, A., Merot, J., Bruneval, P., Chester, A. H., Yacoub, M. H., Hagège, A., Slaugenhaupt, 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. doi:10.1002/dvdy.22346.
- Nosedá, M., McLean, G., Niessen, K., Chang, L., Pollet, I., Montpetit, R., Shahidi, R., Dorovini-Zis, K., Li, L., Beckstead, B., et al. (2004). Notch activation results in phenotypic et functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ Res* 94, 910–917. doi:10.1161/01.RES.0000124300.76171.C9.
- Ohta, Y., Hartwig, J. H., et Stossel, T. P. (2006). FilGAP, a Rho- et ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol* 8, 803–814. doi:10.1038/ncb1437.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. H., et Stossel, T. P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2122–2128.
- Orton, E. C., Lacerda, C. M. R., et MacLea, H. B. (2012). Signaling pathways in mitral valve degeneration. *J Vet Cardiol* 14, 7–17. doi:10.1016/j.jvc.2011.12.001.
- Oyama, M. A., et Levy, R. J. (2010). Insights into serotonin signaling mechanisms associated with canine degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 24, 27–36. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0411.x.
- Östman, A., Hellberg, C., et Böhmer, F. D. (2006). Protein-tyrosine phosphatases et cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, 307–320. doi:10.1038/nrc1837.
- Paranya, G., Vineberg, S., Dvorin, E., Kaushal, S., Roth, S. J., Rabkin, E., Schoen, F. J., et Bischoff, J. (2001). Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor-beta-mediated et non-transforming growth factor-beta-mediated transdifferentiation in vitro. *Am J Pathol* 159, 1335–1343. doi:10.1016/S0002-9440(10)62520-5.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R., et Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics et cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 633–643. doi:10.1038/nrm2957.
- Pavanetto, M., Zarpellon, A., Borgo, C., Donella-Deana, A., et Deana, R. (2011). Regulation of serotonin transport in human platelets by tyrosine kinase Syk. *Cell. Physiol. Biochem.* 27, 139–148. doi:10.1159/000325216.

- Pechkovsky, D. V., Scaffidi, A. K., Hackett, T. L., Ballard, J., Shaheen, F., Thompson, P. J., Thannickal, V. J., et Knight, D. A. (2008). Transforming growth factor beta1 induces alphavbeta3 integrin expression in human lung fibroblasts via a beta3 integrin-, c-Src-, et p38 MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 283, 12898–12908. doi:10.1074/jbc.M708226200.
- Pentikäinen, U., Jiang, P., Takala, H., Ruskamo, S., Campbell, I. D., et Yläne, J. (2011). Assembly of a filamin four domain fragment et the influence of splicing variant-1 on the structure. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M110.195958.
- Person, A. D., Klewer, S. E., et Runyan, R. B. (2005). Cell biology of cardiac cushion development. *Int. Rev. Cytol.* 243, 287–335. doi:10.1016/S0074-7696(05)43005-3.
- Pinto, V. I., Senini, V. W., Wang, Y., Kazembe, M. P., et McCulloch, C. A. (2014). Filamin A protects cells against force-induced apoptosis by stabilizing talin- et vinculin-containing cell adhesions. *FASEB J.* 28, 453–463. doi:10.1096/fj.13-233759.
- Playford, M. P., Lyons, P. D., Sastry, S. K., et Schaller, M. D. (2006). Identification of a Filamin Docking Site on PTP-PEST. *Journal of Biological Chemistry* 281, 34104–34112. doi:10.1074/jbc.M606277200.
- Pudas, R., Kiema, T.-R., Butler, P. J. G., Stewart, M., et Yläne, J. (2005). Structural basis for vertebrate filamin dimerization. *Structure* 13, 111–119. doi:10.1016/j.str.2004.10.014.
- Rabkin, E., Aikawa, M., Stone, J. R., Fukumoto, Y., Libby, P., et Schoen, F. J. (2001). Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes et mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation* 104, 2525–2532.
- Rahim, S., et Üren, A. (2011). A real-time electrical impedance based technique to measure invasion of endothelial cell monolayer by cancer cells. *J Vis Exp*. doi:10.3791/2792.
- Razinia, Z., Mäkelä, T., Yläne, J., et Calderwood, D. A. (2012). Filamins in Mechanosensing et Signaling. *Annu Rev Biophys.* doi:10.1146/annurev-biophys-050511-102252.
- Reits, E. A., et Neefjes, J. J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility et activity in living cells. *Nat Cell Biol* 3, E145–7. doi:10.1038/35078615.
- 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. doi:10.1038/ng1119.
- Rothman, R. B., et Baumann, M. H. (2009). Serotonergic drugs et valvular heart disease. *Expert Opin Drug Saf* 8, 317–329. doi:10.1517/14740330902931524.
- Sacks, M. S., David Merryman, W., et Schmidt, D. E. (2009). On the biomechanics of heart valve function. *Journal of Biomechanics* 42, 1804–1824. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.05.015.
- Sahai, E., Garcia-Medina, R., Pouysségur, J., et Vial, E. (2007). Smurf1 regulates tumor cell plasticity et motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J Cell Biol* 176, 35–42. doi:10.1083/jcb.200605135.
- Saito, K., Ozawa, Y., Hibino, K., et Ohta, Y. (2012). FilGAP, a Rho/Rho-associated protein kinase-regulated GTPase-activating protein for Rac, controls tumor cell migration. *Mol Biol Cell* 23, 4739–4750. doi:10.1091/mbc.E12-04-0310.

- Sanematsu, F., Hirashima, M., Laurin, M., Takii, R., Nishikimi, A., Kitajima, K., Ding, G., Noda, M., Murata, Y., Tanaka, Y., et al. (2010). DOCK180 Is a Rac Activator That Regulates Cardiovascular Development by Acting Downstream of CXCR4. *Circ Res* 107, 1102–1105. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223388.
- Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L., et Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124, 2659–2670.
- Santhanakrishnan, A., et Miller, L. A. (2011). Fluid dynamics of heart development. *Cell Biochem Biophys*. 61, 1–22. doi:10.1007/s12013-011-9158-8.
- Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., et Marshall, C. J. (2008). Rac Activation et Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement. *Cell* 135, 510–523. doi:10.1016/j.cell.2008.09.043.
- Sarkisian, M. R., Bartley, C. M., Chi, H., Nakamura, F., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Flavell, R. A., et Rakic, P. (2006). MEKK4 signaling regulates filamin expression et neuronal migration. *Neuron* 52, 789–801. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.024.
- Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K., et Watanabe, K. (2001). Filamin associates with Smads et regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 276, 17871–17877. doi:10.1074/jbc.M008422200.
- Sastry, S. K., Rajfur, Z., Liu, B. P., Cote, J.-F., Tremblay, M. L., et Burridge, K. (2006). PTP-PEST couples membrane protrusion et tail retraction via VAV2 et p190RhoGAP. *J Biol Chem* 281, 11627–11636. doi:10.1074/jbc.M600897200.
- Sauls, K., de Vlaming, A., Harris, B. S., Williams, K., Wessels, A., Levine, R. A., Slaughaupt, S. A., Goodwin, R. L., Pavone, L., Merot, J., et al. (2012). Developmental Basis for Filamin-A Associated Myxomatous Mitral Valve Disease. *Cardiovasc Res*. doi:10.1093/cvr/cvs238.
- Schmidt, A., et Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*. 16, 1587–1609. doi:10.1101/gad.1003302.
- Seabra, M. C., et Wasmeier, C. (2004). Controlling the location et activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 16, 451–457. doi:10.1016/j.ceb.2004.06.014.
- Sheen, V. L., Feng, Y., Graham, D., Takafuta, T., Shapiro, S. S., et Walsh, C. A. (2002). Filamin A et Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration et can physically interact. *Hum. Mol. Genet*. 11, 2845–2854.
- Shen, Y., Lyons, P., Cooley, M., Davidson, D., Veillette, A., Salgia, R., Griffin, J. D., et Schaller, M. D. (2000). The noncatalytic domain of protein-tyrosine phosphatase-PEST targets paxillin for dephosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 275, 1405–1413. doi:10.1074/jbc.275.2.1405.
- Shi, Z.-D., et Tarbell, J. M. (2011). Fluid flow mechanotransduction in vascular smooth muscle cells et fibroblasts. *Ann Biomed Eng* 39, 1608–1619. doi:10.1007/s10439-011-0309-2.
- Shifrin, Y., Arora, P. D., Ohta, Y., Calderwood, D. A., et McCulloch, C. A. (2009). The role of FilGAP-filamin A interactions in mechanoprotection. *Mol Biol Cell* 20, 1269–1279. doi:10.1091/mbc.E08-08-0872.

- Shifrin, Y., Pinto, V., Hassanali, A., Arora, P., et McCulloch, C. (2012). Force-induced apoptosis mediated by the Rac/PAK/p38 signaling pathway is regulated by filamin A. *Biochem. J.* doi:10.1042/BJ20112119.
- Shih, T. Y., Papageorge, A. G., Stokes, P. E., Weeks, M. O., et Scolnick, E. M. (1980). Guanine nucleotide-binding et autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 287, 686–691.
- Singh, N. N., et Ramji, D. P. (2006). The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 487–499. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.09.002.
- Sinha, T., Wang, B., Evans, S., Wynshaw-Boris, A., et Wang, J. (2012). Disheveled mediated planar cell polarity signaling is required in the second heart field lineage for outflow tract morphogenesis. *Dev Biol* 370, 135–144. doi:10.1016/j.ydbio.2012.07.023.
- Sirois, J., Cote, J.-F., Charest, A., Uetani, N., Bourdeau, A., Duncan, S. A., Daniels, E., et Tremblay, M. L. (2006). Essential function of PTP-PEST during mouse embryonic vascularization, mesenchyme formation, neurogenesis et early liver development. *Mechanisms of Development* 123, 869–880. doi:10.1016/j.mod.2006.08.011.
- Skowasch, D., Schrempf, S., Wernert, N., Steinmetz, M., Jabs, A., Tuleta, I., Welsch, U., Preusse, C. J., Likungu, J. A., Welz, A., et al. (2005). Cells of primarily extra-valvular origin in degenerative aortic valves et bioprostheses. *Eur. Heart J.* 26, 2576–2580. doi:10.1093/eurheartj/ehi458.
- Soini, Y., Salo, T., et Satta, J. (2003). Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum. Pathol.* 34, 756–763. doi:10.1016/S0046-8177(03)00245-4.
- Sousa, S., Baujat, G., Abadie, V., Bonnet, D., Sidi, D., Munnich, A., Krakow, D., et Cormier-Daire, V. (2010). Postnatal growth retardation, facial dysmorphism, spondylocarpal synostosis, cardiac defect, et inner ear malformation (cardiospondylocarpofacial syndrome?)—a distinct syndrome? *152A*, 539–546. doi:10.1002/ajmg.a.33277.
- Stossel, T. P., et Hartwig, J. H. (1975). Interactions between actin, myosin, et an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages. Alveolar macrophage myosin Mg-2+-adenosine triphosphatase requires a cofactor for activation by actin. *J Biol Chem* 250, 5706–5712.
- Stossel, T., Condeelis, J., et Cooley, L. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics et signalling. ... *Molecular Cell Biology*.
- Su, Z.-J., Hahn, C. N., Goodall, G. J., Reck, N. M., Leske, A. F., Davy, A., Kremmidiotis, G., Vadas, M. A., et Gamble, J. R. (2004). A vascular cell-restricted RhoGAP, p73RhoGAP, is a key regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 12212–12217. doi:10.1073/pnas.0404631101.
- Superti-Furga, A., Gugler, E., Gitzelmann, R., et Steinmann, B. (1988). Ehlers-Danlos syndrome type IV: a multi-exon deletion in one of the two COL3A1 alleles affecting structure, stability, et processing of type III procollagen. *J Biol Chem* 263, 6226–6232.
- Takai, Y., Sasaki, T., et Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153–208.
- Takekawa, M., Itoh, F., Hinoda, Y., Arimura, Y., Toyota, M., Sekiya, M., Adachi, M., Imai, K., et Yachi, A. (1992). Cloning et characterization of a human cDNA encoding a novel putative cytoplasmic protein-tyrosine-phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 1223–1230.
- Tamura, K., Jones, M., Yamada, I., et Ferrans, V. J. (2000). Wound healing in the mitral valve. *J. Heart Valve Dis.* 9, 53–63.

- Tan, H., Biechler, S., Junor, L., Yost, M. J., Dean, D., Li, J., Potts, J. D., et Goodwin, R. L. (2013). Fluid flow forces et rhoA regulate fibrous development of the atrioventricular valves. *Dev Biol* 374, 345–356. doi:10.1016/j.ydbio.2012.11.023.
- Tao, G., Kotick, J. D., et Lincoln, J. (2012). Heart valve development, maintenance, et disease: the role of endothelial cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 100, 203–232. doi:10.1016/B978-0-12-387786-4.00006-3.
- Taylor, P. M., Batten, P., Brand, N. J., Thomas, P. S., et Yacoub, M. H. (2003). The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 113–118.
- Tcherkezian, J., et Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol. Cell* 99, 67–86. doi:10.1042/BC20060086.
- Tonks, N. K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 833–846. doi:10.1038/nrm2039.
- Tonks, N. K. (2005). Redox redux: revisiting PTPs et the control of cell signaling. *Cell* 121, 667–670. doi:10.1016/j.cell.2005.05.016.
- Toshiyuki Arakia, B., Gordon Chana, B., Newbiggingc, S., Morikawac, L., Bronsond, R. T., et Benjamin G Neela, B. (2009). Noonan syndrome cardiac defects are caused by PTPN11 acting in endocardium to enhance endocardial-mesenchymal transformation. 1–6.
- Towbin, J. A. (1999). Toward an understanding of the cause of mitral valve prolapse. *Am J Hum Genet* 65, 1238–1241. doi:10.1086/302635.
- Trochu, J. N., Kyndt, F., Schott, J. J., Gueffet, J. P., Probst, V., Bénichou, B., et 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., et Hosoya, H. (2003). The carboxy-terminal pleckstrin homology domain of ROCK interacts with filamin-A. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 886–890. doi:10.1016/S0006-291X(03)00048-2.
- Vadlamudi, R. K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T. P., et Kumar, R. (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* 4, 681–690. doi:10.1038/ncb838.
- Van der Flier, A., et Sonnenberg, A. (2001). Structural et functional aspects of filamins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1538, 99–117.
- Van der Flier, A., Kuikman, I., Kramer, D., Geerts, D., Kreft, M., Takafuta, T., Shapiro, S. S., et Sonnenberg, A. (2002). Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, et determine binding to integrin [beta] subunits. *J Cell Biol* 156, 361–376. doi:10.1083/jcb.200103037.
- Van der Ven, P. F., Obermann, W. M., Lemke, B., Gautel, M., Weber, K., et Fürst, D. O. (2000). Characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of gamma-filamin/ABP-L in sarcomeric Z-disc formation. *Cell Motil. Cytoskeleton* 45, 149–162. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(200002)45:2<149::AID-CM6>3.0.CO;2-G.
- Veillette, A., Rhee, I., Souza, C. M., et Davidson, D. (2009). PEST family phosphatases in immunity, autoimmunity, et autoinflammatory disorders. *Immunol. Rev.* 228, 312–324. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00747.x.

- Vermot, J., Forouhar, A. S., Liebling, M., Wu, D., Plummer, D., Gharib, M., et Fraser, S. E. (2009). Reversing blood flows act through *klf2a* to ensure normal valvulogenesis in the developing heart. *Plos Biol* 7, e1000246. doi:10.1371/journal.pbio.1000246.
- Vetter, I. R., et Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299–1304. doi:10.1126/science.1062023.
- Walker, G. A., Masters, K. S., Shah, D. N., Anseth, K. S., et 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. doi:10.1161/01.RES.0000136520.07995.aa.
- Wang, N., Tytell, J. D., et Ingber, D. E. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 75–82. doi:10.1038/nrm2594.
- Watts, S. W., Priestley, J. R. C., et Thompson, J. M. (2009). Serotonylation of vascular proteins important to contraction. *PLoS ONE* 4, e5682. doi:10.1371/journal.pone.0005682.
- Wee, H.-J., Voon, D. C.-C., Bae, S.-C., et Ito, Y. (2008). PEBP2-beta/CBF-beta-dependent phosphorylation of RUNX1 et p300 by HIPK2: implications for leukemogenesis. *Blood* 112, 3777–3787. doi:10.1182/blood-2008-01-134122.
- Willems, I. E., Havenith, M. G., Smits, J. F., et Daemen, M. J. (1994). Structural alterations in heart valves during left ventricular pressure overload in the rat. *Lab. Invest.* 71, 127–133.
- Wipff, P.-J., et Hinz, B. (2008). Integrins et the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *Eur J Cell Biol* 87, 601–615. doi:10.1016/j.ejcb.2008.01.012.
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L., et Keely, P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 1692, 103–119. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.04.007.
- Xu, J., Jian, B., Chu, R., Lu, Z., Li, Q., Dunlop, J., Rosenzweig-Lipson, S., McGonigle, P., Levy, R. J., et Liang, B. (2002). Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT2 receptor et its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol* 161, 2209–2218. doi:10.1016/S0002-9440(10)64497-5.
- Yamazaki, M., Furuike, S., et Ito, T. (2002). Mechanical response of single filamin A (ABP-280) molecules et its role in the actin cytoskeleton. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 23, 525–534.
- Yang, Q., Co, D., Sommercorn, J., et Tonks, N. K. (1993). Cloning et expression of PTP-PEST. A novel, human, nontransmembrane protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 268, 17650.
- Yoder, M. C., Mead, L. E., Prater, D., Krier, T. R., Mroueh, K. N., Li, F., Krasich, R., Temm, C. J., Prchal, J. T., et Ingram, D. A. (2007). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis et hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109, 1801–1809. doi:10.1182/blood-2006-08-043471.
- Yoshida, N., Ogata, T., Tanabe, K., Li, S., Nakazato, M., Kohu, K., Takafuta, T., Shapiro, S., Ohta, Y., Satake, M., et al. (2005). Filamin A-bound PEBP2beta/CBFbeta is retained in the cytoplasm et prevented from functioning as a partner of the Runx1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 25, 1003–1012. doi:10.1128/MCB.25.3.1003-1012.2005.
- Yoshioka, M., Yuasa, S., Matsumura, K., Kimura, K., Shiomi, T., Kimura, N., Shukunami, C., Okada, Y., Mukai, M., Shin, H., et al. (2006). Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nat Med* 12, 1151–1159. doi:10.1038/nm1476.

- Bibliographie -

- Yuan, Y., et Shen, Z. (2001). Interaction with BRCA2 suggests a role for filamin-1 (hsFLNa) in DNA damage response. *J Biol Chem* 276, 48318–48324. doi:10.1074/jbc.M102557200.
- Zhang, Y., McNeill, E., Tian, H., Soker, S., Andersson, K.-E., Yoo, J. J., et Atala, A. (2008). Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J. Urol.* 180, 2226–2233. doi:10.1016/j.juro.2008.07.023.
- Zheng, Y., Xia, Y., Hawke, D., Halle, M., Tremblay, M. L., Gao, X., Zhou, X. Z., Aldape, K., Cobb, M. H., Xie, K., et al. (2009). FAK Phosphorylation by ERK Primes Ras-Induced Tyrosine Dephosphorylation of FAK Mediated by PIN1 et PTP-PEST. *Mol Cell* 35, 11–25. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.013.
- Zhou, A.-X., Hartwig, J. H., et Akyürek, L. M. (2010). Filamins in cell signaling, transcription et organ development. *Trends Cell Biol* 20, 113–123. doi:10.1016/j.tcb.2009.12.001.
- Zhou, T., Benda, C., Dunzinger, S., Huang, Y., Ho, J. C., Yang, J., Wang, Y., Zhang, Y., Zhuang, Q., Li, Y., et al. (2012). Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nature Protocols* 7, 2080–2089. doi:10.1038/nprot.2012.115.

**- Annexe -**

### Prix et Bourses

- Prix poster au congrès de la SFC/ GRRC en Avril 2014 à Strasbourg: «*ARHGAP 24/(FilGAP); a new gene responsible for Mitral Valve Prolapse* »
- 1<sup>er</sup> prix C. Walton Lillehei Award au 7<sup>th</sup> biennial congress of the society for heart valve disease et the heart valve society of America à Venise pour la présentation: «*FlnA mutations associated with valvular dystrophy alter the Rho/Rac balance in a melanoma cell model* »
- Obtention d'une bourse de voyage pour le congrès de Venise par l'université de Nantes
- Obtention d'une bourse de thèse par la Société Française de Cardiologie en collaboration avec le Dr Thierry Le Tourneau (200 000 euros pour salaire et fonctionnement)

### Publication

- Publication en 1<sup>er</sup> auteur: «*Valvular dystrophy associated FlnA mutations reveal a new role of the first repeats of FlnA in small-GTPase regulation* » dans *Biochimica & Biophysica Acta* 1843 (2014) 234–244 (Impact Factor: 4,947).

### Communications orales

- Communication orale au congrès de la SFC/ GRRC en Avril 2014 à Strasbourg : «*ARHGAP 24/(FilGAP); a new gene responsible for Mitral Valve Prolapse* »
- Communication orale au 7<sup>th</sup> biennial congress of the society for heart valve disease et the heart valve society of America à Venise pour la présentation: «*FlnA mutations associated with valvular dystrophy alter the Rho/Rac balance in a melanoma cell model* »

### Communications écrites

- Poster au congrès de la SFC/GRRC en Avril 2014 à Strasbourg : «*ARHGAP24/(FilGAP); a new gene responsible for Mitral Valve Prolapse* »
- Poster au congrès de la SFC/GRRC en Avril 2013 à Marseille : «*FlnA mutations associated to valvular dystrophy: Role of PTP-N12 signaling pathways* »
- Poster au congrès de la SFC/GRRC de Bordeaux en Avril 2012 : «*FlnA mutations associated to valvular dystrophy: Role of integrin and/or Rac signaling pathways* »
- Poster au congrès des « petites protéines G » à Poitiers en Novembre 2011 : «*FlnA mutations associated with valvular dystrophy alter the Rho/Rac balance in a melanoma cell model* »

## **Études des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans des dystrophies valvulaires non syndromiques.**

Les valvulopathies touchent 2% de la population et le premier gène identifié est le gène *FLNA* chez des patients présentant un prolapse mitral (PVM). Ce gène code pour la Filamine A (FLNa) qui organise le réseau cytosquelette d'actine et participe à la régulation de voies de signalisation notamment de réponse cellulaire au stress mécanique. Le but de mon travail a été de comprendre le rôle des mutations de la FLNa (G288R et P637Q) identifiées chez des patients dans le processus pathologique du PVM. Dans un modèle de ré-expression de mélanome humain, j'ai montré que les mutations de la FLNa induisent des défauts d'adhésion, d'étalement et de migration cellulaire. Ces défauts sont dus à une dérégulation de la balance des GTPases RhoA et Rac1. J'ai montré que la protéine FilGAP décrite pour interagir avec la FLNa intervient dans cette dérégulation. Les mutations de la FlnA déstabilisent aussi son interaction avec la tyrosine phosphatase PTPN12. PTPN12 étant connue pour réguler l'activité de RhoA, il est possible que la perte d'interaction FlnA/PTPN12 participe aussi à la pathologie.

De plus, trois mutations sur le gène codant pour FilGAP (*ARHGAP24*) ont été identifiées dans 3 formes familiales de PVM. Ces mutations sont des « pertes de fonctions » car elles ne régulent plus l'activité de Rac via 2 mécanismes : 1) l'une n'est plus adressée correctement à la membrane, 2) les 2 autres n'interagissent plus avec la FLNa.

Mes travaux ont mis en évidence les mécanismes moléculaires des mutations touchant des protéines (FlnA et FilGAP) impliquées dans les voies de signalisation de réponse cellulaire au stress mécanique qui sont très sollicitées dans les valves cardiaques.

**Mots clés** : Valvulopathies, Filamine A, FilGAP, matrice extracellulaire, protéines G monomériques.

## **Study of molecular et cellular mechanisms involved in non-syndromic heart valve disease**

The prevalence of heart valve disease is 2% of population et the first gene identified is the *FLNA* gene on patients with Mitral Valve Prolapse (MVP). This gene encodes for Filamin A which organizes the actin cytoskeleton network et participates in many signaling pathways particularly in mechanical stress response. The aim of my work is to identify the role of FLNa mutations identified in patient with pathological MVP. In the re-expression of a human melanoma cell model, I showed that FLNa mutations lead to an adhesion, spreading et migration impairment. These impairments are due to a deregulation of the small GTPases activities – Rho et Rac. I have shown that FilGAP, known to interact with FLNa, participates to this deregulation. FlnA mutations destabilize its interaction with PTP-PEST.

Higher RhoA activity is due to the loss of FLNa-PTP-PEST interaction. PTP-PEST is known to regulate RhoA activity et there is a possibility that the loss of interaction participates to the pathological processes.

Moreover, 3 mutations on the *ARHGAP24* gene, which encodes for FilGAP, were identified on 3 familial forms. These mutations are “loss of function” because they can regulate Rac activity through 2 mechanisms: 1) One of them is not correctly addressed in the membrane et 2) The two others are not able to interact with FLNa.

My work showed 2 molecular mechanisms of mutation that affected 2 proteins (FLNa-FilGAP) involved in mechanical stress signaling pathways which are very important in heart valves.

**Key word**: Heart valve disease, Filamin A, FilGAP, Extracellular matrix, small protein G.