

## Thèse de Doctorat

Pauline LABBÉ

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions*

Spécialité : *Biologie des organismes*

Unité de recherche : *Institut du Thorax – INSERM UMR\_U1087*

Soutenue le : *08 Novembre 2016*

Thèse N° :

# Mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le Prolapsus Valvulaire Mitral.

Rôles des gènes *LRRFIP1* et *PTPRF*

## JURY

Rapporteurs :	<b>M. Michel PUCEAT</b> , Directeur de Recherche, UMR_S910, Marseille <b>M. Robert KELLY</b> , Directeur de Recherche, IBDM, Marseille
Examineurs :	<b>M. Fabien LE GRAND</b> , Directeur de Recherche, UMR S-974, Paris <b>M. Thierry LE TOURNEAU</b> , Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Directeur de Thèse :	<b>M. Jean MÉROT</b> Chargé de Recherche, Institut du thorax-UMR_U1087, Nantes
Co-directeur de Thèse :	<b>M. Jean-Jacques SCHOTT</b> Directeur de Recherche, Institut du thorax-UMR_U1087, Nantes
Président du jury :	<b>M. Thierry LE TOURNEAU</b> , Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Nantes



## ***Remerciements***

Je tiens à remercier Mr Michel Pucéat et Mr Robert Kelly ainsi que Mr Fabien Le Grand et Mr Thierry Le Tourneau d'avoir accepté d'être respectivement rapporteurs et examinateurs de ce travail. Je remercie également Stéphane Zaffran et Karim Si-Tayeb pour leur aide, leurs conseils et suggestions lors de mes comités de suivi de thèse.

Je remercie Hervé Le Marec de m'avoir permis de réaliser mes stages et ma thèse au sein de l'institut du thorax.

Je remercie Jean Mérot, pour m'avoir accueillie en stage dès ma Licence 3, et m'avoir permis de réaliser ma thèse sur ce sujet que j'ai commencé à aborder dès mon Master 1. Un **immense merci** pour votre encadrement de très grande qualité, vos conseils, votre disponibilité, votre soutien. Cela a été pour moi trois années passionnantes, enrichissantes et épanouissantes.

Merci à l'équipe de génétique, et en particulier à Jean-Jacques Schott pour ses conseils, ses suggestions et son aide dans le développement du projet, Solena Le Scouarnec et Thierry Le Tourneau pour leur aide autour de la génétique et la clinique du projet. Un très grand merci à Simon et Stéphanie, ainsi qu'à Audrey, Françoise, Estelle et Elodie (merci pour les conseils en statistiques !) pour avoir répondu à mes questions, pour les manips sur mon projet, pour votre soutien et votre aide.

Merci à Dr (et futur médecin) Damien de m'avoir formée et d'avoir eu la patience de répondre à mes (nombreuses et pas toujours pertinentes) questions. Merci à Dr Antoine de m'avoir aidée à y voir un peu plus clair sur la génétique (ô combien difficile) du prolapsus valvulaire mitral. Merci à Dr Lucile pour son humour et sa bonne humeur, les discussions métaphysiques avec François (*cf.* L'ère des grenouilles géantes) et notre passion commune pour les hamburgers.

Un merci particulier à Sophie pour ses qualités vocales dithyrambiques, François pour sa rigueur exceptionnelle, Nadjat pour son amitié indéfectible et Clara pour son imitation parfaite de *Gugus*, un certain pigeon domestique. Merci pour les fous rires à toute heure de la journée (mais bien souvent après 18h), pour les chansons qui restent longtemps dans la tête, pour les « cafés soleil dehors » le midi, pour les discussions plus ou moins philosophiques autour d'un mojito (en dehors du labo, je précise), pour les blagues scientifiques (*le MYC est mouse*, *le Sirius Black*, *the Lapinou's method* et autres *Belbécher N* et *Burette S*, sans oublier la *protéine* « *qui nage* ») et les blagues tout court, pour

les hamburgers (encore), les pizzas, les sushis et tout le reste. *You're sexy and you know it*. Ah et merci aussi pour tous les surnoms que vous m'avez donnés, j'allais oublier.

Merci à tous ceux qui m'ont apporté leur aide : Céline pour son fabuleux protocole de cross-linking, Angélique pour son incroyable protocole d'extraction d'ARN et ses réponses à toutes mes questions H&S, Agnès C pour sa contribution à l'ambiance folle de la salle 206 et pour ses encouragements à déposer mon Western Blot avant 17h, Aurore pour ses dépannages en milieux de culture et anticorps secondaires (et plein d'autres choses), Nathalie G pour ses conseils en qPCR, Thibault pour ses transfectants et ses C2C12, Nathalie V pour les lamelles de verre (diamètre 12 mm !), Béatrice pour les séquençages, Nathalie C pour les milieux LB, Ophélie pour toutes les démarches administratives, Salam for allowing me to improve my english, Vimla pour son super stage par comparaison que je n'oublierai pas, et pour finir Néjma, Marc et Christophe mes fournisseurs officiels de ProLong Gold (avec ou sans DAPI).

Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé des rires, des questions (scientifiques ou non), des repas, de bons moments, de près ou de loin durant ces trois années : Audrey A, Valentine, Marine F, Marine C, Joanna, Lindzy, Maxime, Laure, Martine, Marie-France, Agnès H, Flavien, Isabelle, Gilliane, Maud, Pierre-Joseph, Xavier, Laurence, Sandrine, Eva, Christian, Benjamin, Aurélie, Virginie, Françoise, Marie-Pierre, Corinne, Zeineb. Pardon à ceux que j'ai oublié.

Merci à Damien, Antoine, Alice, Arnaud, Manon, Solène et Aude pour leur travail sur ce projet, leur aide ou simplement leur sympathique présence au cours de ces trois années. Et Laurabelle, merci pour ton soutien moral lors de la douloureuse mise en page sur Word de ce manuscrit (au diable les sauts de section et la numérotation automatique).

Merci à tous les coureurs de l'institut : Sophie, Thibault, Flavien, Julien, Ophélie, Agnès, Marine, Maxime, Solène, Corinne, et merci en particulier aux coachs Jade et Thomas. Ces petits footings après le travail ont toujours été des moments très agréables (oui, même les dix tours de stade en plein soleil).

Merci à toutes ces HEK 293 que j'ai si souvent balancé dans la DASRI sans plus de culpabilité.

Merci Hélène, Elodie, Morgan, Céline et Awen pour votre amitié sincère et vos encouragements.

Merci à mes parents. Votre soutien (psychologique, affectif et financier) est tout pour moi. Vous êtes les meilleurs parents du monde.



# Sommaire

<b>Table des illustrations</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>11</b>
<b>Liste des Annexes</b> .....	<b>11</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>13</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION –</b> .....	<b>17</b>
I. Les valves cardiaques.....	1
1. Embryogénèse des valves cardiaques .....	1
2. Structure et fonctionnement de la valve mitrale .....	3
a. Composition cellulaire et matricielle de la valve mitrale .....	4
b. Physiopathologie des valves et activation des VICs/VECs .....	7
3. Voies de signalisation impliquées dans le développement des valves .....	8
4. Les cross-talk/régulations entre ces voies de signalisation.....	14
II. La voie Wnt canonique .....	18
1. Bref historique de la découverte de la voie Wnt .....	18
2. La voie Wnt.....	19
a. Wnt et ses récepteurs .....	19
b. Les mécanismes de stabilisation de la $\beta$ -caténine.....	20
c. Du noyau cellulaire à la transcription de gènes.....	22
d. Auto-régulation de la voie Wnt : les activateurs et inhibiteurs naturels.....	26
3. Implication de la voie <i>Wnt</i> dans le développement des valves .....	28
a. Implication dans l'établissement des progéniteurs cardiaques .....	28
b. Implication dans l'EMT .....	28
c. Implication dans la maturation des valves .....	29
4. Wnt et pathologies valvulaires.....	31
III. Le prolapsus valvulaire mitral (PVM) .....	32
1. Symptômes et dépistage du PVM .....	32
2. Anatomie et histologie du PVM .....	33
3. Traitement du PVM .....	34
4. Génétique du PVM .....	35
a. Génétique des formes syndromiques du PVM.....	35
b. Génétique des formes non syndromiques du PVM.....	37

<b>PROJET 1 - .....</b>	<b>40</b>
-------------------------	-----------

## **Introduction Projet 1 – Étude de l'implication du gène LRRFIP1 dans le développement**

<b>valvulaire.....</b>	<b>42</b>
------------------------	-----------

I. LRRFip1 : structure et rôles de la protéine .....	42
1. Structure du gène/protéine LRRFip1.....	42
2. Expression tissulaire et cellulaire de LRRFip1 .....	43
3. Rôles de la protéine LRRFip1 .....	44
a. Rôle dans la répression de la transcription de gènes .....	44
b. Rôle dans les réponses du système immunitaire .....	45
c. Rôle dans la voie Wnt .....	46
d. Rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine .....	46
e. Rôle dans la différenciation musculaire.....	47

## **Résultats Projet 1 – Étude de l'implication du gène LRRFIP1 dans le développement**

<b>valvulaire.....</b>	<b>50</b>
------------------------	-----------

I. Caractérisation de LRRFip1-iso1 (Article).....	50
II. Production d'un anticorps anti-LRRFip1-iso1 .....	51
III. Identification du variant p.R94G dans le gène <i>LRRFIP1</i> .....	54
IV. Effets physiopathologiques de la mutation p.R94G .....	57
1. Expression et localisation de LRRFip1-iso1-R94G.....	57
2. Activation de la voie Wnt .....	57
3. Interaction avec les protéines partenaires de LRRFip1-iso1 .....	59
V. Identification des protéines partenaires de LRRFip1.....	59
1. Identification des protéines cytoplasmiques .....	59
a. Identification de Dishevelled et Flightless-1 par co-immunoprécipitation .....	59
b. Identification de USP9X par Spectrométrie de Masse .....	60
c. Étude de l'effet de LRRFip1-iso1 sur les niveaux de phosphorylation/ubiquitination de la $\beta$ -caténine .....	65
d. Activation de la voie du TGF- $\beta$ par LRRFip1.....	69
e. Etude des modifications post-traductionnelles de LRRFip1-iso1 .....	71
2. Identification des protéines nucléaires .....	73
a. Étude de l'interaction entre LRRFip1 et TCF-4 par co-immunoprécipitation .....	73
b. Tentative d'identification des protéines nucléaires par Spectrométrie de Masse.....	75
c. Autres approches pour identifier le complexe nucléaire : 2D et ChIP.....	78
VI. Modèle animal : le <i>Zebrafish</i> .....	79

<b>Discussion Projet 1 – Étude de l’implication du gène LRRFIP1 dans le développement</b>	
<b>valvulaire.....</b>	<b>81</b>
I.    Pertinence du modèle cellulaire .....	81
II.   Hypothèses physiopathologiques du rôle de <i>LRRFIP1</i> dans la voie Wnt et le	
développement des valves .....	83
III. <i>LRRFIP1</i> : un rôle physiologique dans les valves et/ou dans le myocarde ? .....	86
IV.   Effets du stress mécanique .....	90
V.    Effets de la mutation p.R94G .....	91
<b>PROJET 2 - .....</b>	<b>93</b>
<b>Introduction Projet 2 - Étude de l’implication du gène PTPRF dans le PVM.....</b>	<b>95</b>
I.    Identification du variant p.I328M dans le gène <i>PTPRF</i> .....	95
1.    Description de la famille .....	95
2.    Structure des gène/protéine <i>PTPRF</i> .....	96
3.    Rôles du récepteur LAR .....	99
a.    Rôle dans le développement du système nerveux.....	99
b.    Rôle dans la régulation des adhésions cellulaires et du cytosquelette d’actine .....	101
c.    Rôle dans la signalisation cellulaire .....	102
<b>Résultats Projet 2 - Étude de l’implication du gène PTPRF dans le PVM.....</b>	<b>105</b>
I.    Expression et localisation de short-PTPRF (sPTPRF) .....	105
1.    Expression tissulaire et cellulaire de sPTPRF .....	105
2.    Expression et localisation cellulaire de sPTPRF .....	107
II.   Fonctions cellulaires de sPTPRF .....	111
1.    Interaction de sPTPRF avec les Héparane Sulfate Protéoglycans (HSPGs).....	111
2.    Expression protéique de sPTPRF dans les VICs de rat .....	113
3.    Résultat préliminaire : effet de sPTPRF sur la signalisation de l'EGF .....	114
4.    Résultat préliminaire : effet de sPTPRF sur la signalisation de Wnt.....	115
5.    Effet de la mutation p.I328M sur la stabilité de la protéine .....	115
<b>Discussion Projet 2 – Étude de l’implication du gène PTPRF dans le PVM .....</b>	<b>117</b>
I.    Problèmes liés au développement des outils moléculaires.....	117
II.   Hypothèses physiopathologiques du rôle de <i>PTPRF</i> dans la signalisation du développement	
des valves.....	119
III.  Modèles d'étude .....	121
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE - .....</b>	<b>123</b>

<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES - .....</b>	<b>127</b>
I. Culture Cellulaire .....	128
1. Les cellules HEK 293 .....	128
2. Les cultures primaires de VICs de rat .....	128
II. Transfection et traitements cellulaires .....	129
1. Transfection des lignées .....	129
2. Transfection des cultures primaires (VICs) .....	129
3. Traitements chimiques utilisés .....	130
4. Anticorps utilisés .....	131
III. Techniques de Biologie Moléculaire .....	132
1. Obtention des plasmides .....	132
2. Mutagenèse dirigée .....	132
3. PCR .....	132
4. PCR quantitative .....	133
IV. Techniques de Biologie Cellulaire .....	135
1. Immunofluorescence .....	135
2. Test d'activité de la Luciférase (TOP Flash) .....	135
V. Techniques de Biochimie .....	136
1. Western Blot .....	136
2. Isolement des fractions nucléaires .....	136
3. Isolement des fractions membranaires .....	137
4. Immunoprécipitation .....	137
5. Immunoprécipitation de LRRFip1-iso1-HA pour la Spectrométrie de Masse .....	138
6. Séparation par affinité - Pull-down .....	138
a. Pull-down de LRRFip1-iso1-6XHis (billes de nickel) .....	138
b. Pull-down de sPTPRF (billes d'héparine-agarose) .....	139
7. CHIP-Seq .....	139
VI. Statistiques .....	140
<b>ANNEXES - .....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE - .....</b>	<b>167</b>

## *Table des illustrations*

Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe de cœur en vue frontale. ....	1
Figure 2 : Représentation de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). ....	2
Figure 3 : Anatomie de la valve mitrale .....	3
Figure 4 : Structure des valves en conditions physiologiques .....	4
Figure 5 : Les cinq phénotypes/fonctions des cellules interstitielles de valve (VICs). ....	6
Figure 6 : Voies de signalisation BMP, TGF- $\beta$ et Notch. ....	12
Figure 7 : Récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans la valvulogénèse. ....	16
Figure 8 : Deux modèles pour l'activation de la voie Wnt. ....	22
Figure 9 : Modèle d'activation de la transcription de gènes. ....	23
Figure 10 : Les protéines du complexe de transcription de la voie Wnt. ....	25
Figure 11 : Les activateurs et inhibiteurs de la voie Wnt. ....	27
Figure 12 : Echocardiographie d'un prolapsus valvulaire mitral .....	32
Figure 13 : Différences anatomiques et histologiques entre FED et Barlow's. ....	33
Figure 14 : Différents types de prothèse pour la chirurgie des valves. ....	35
Figure 15 : Épissage alternatif de <i>LRRFIP1</i> humain. ....	43
Figure 16 : Récapitulatif des rôles cellulaires de LRRFip1-iso5 dans la voie Wnt et la régulation du cytosquelette. ....	48
Figure 17 : Alignement des séquences en acides aminés des cinq isoformes de LRRFip1 humain. ....	52
Figure 18 : Test par Western Blot des anticorps anti-LRRFip1-iso1 (Eurogentec). ....	53
Figure 19 : Arbre généalogique de la famille MOR et représentation du phénotype PVM. ....	54
Figure 20 : Localisation de LRRFip1-iso1 WT et R94G. ....	57
Figure 21 : Effet du mutant R94G sur la voie Wnt canonique. ....	58
Figure 22 : Effet du mutant R94G sur l'expression de TCF-7. ....	58
Figure 23 : Interaction de LRRFip1-iso1 avec Fli-1 et Dvl-1. ....	60
Figure 24 : Image d'un gel coloré au Nitrate d'Argent sur lequel a été séparé par électrophorèse l'immunoprécipitat de LRRFip1-iso1 WT et R94G. ....	61
Figure 25 : Interaction de LRRFip1 avec USP9X. ....	62
Figure 26 : Interaction de LRRFip1-iso1 avec USP9X et la $\beta$ -caténine. ....	63

Figure 27 : Effet de l'extinction de l'expression d'USP9X sur l'activation de la voie Wnt par LRRFip1.....	64
Figure 28 : Effet de LRRFip1 sur l'expression de la $\beta$ -caténine active et totale. ....	66
Figure 29 : Effets de LRRFIP1 sur les localisations cytoplasmique et nucléaire de la $\beta$ -caténine.....	67
Figure 30 : Effet de LRRFip1 sur la localisation de la $\beta$ -caténine.....	68
Figure 31 : Effet de LRRFip1 sur l'ubiquitination de la $\beta$ -caténine. ....	69
Figure 32 : Etude de l'activation de la voie du TGF- $\beta$ par LRRFip1.....	70
Figure 33 : Séquence en acides aminés de LRRFip1-iso1 de I62 à S98.....	71
Figure 34 : Phosphorylation de LRRFip1.....	72
Figure 35 : Ubiquitination de LRRFip1-iso1. ....	73
Figure 36 : Interaction de TCF-4 avec LRRFip1-iso1. ....	74
Figure 37 : Image de gels colorés au Nitrate d'Argent sur lesquels a été séparé par électrophorèse l'immunoprécipitat de LRRFip1-iso1 WT et mutant W76;82-AA.....	77
Figure 38 : Image de gels d'électrophorèse en 2D colorés au Nitrate d'Argent. ....	78
Figure 39 : Effet du KO de LRRFip1-iso1 chez le <i>Zebrafish</i> .....	80
Figure 40 : Alignement des séquences de LRRFip1-iso1 et LRRFip2-iso1.....	85
Figure 41 : Expression de LRRFip1-iso1 dans les valves humaines et murines.....	87
Figure 42 : Rôle de la voie Wnt dans le développement des valves et du muscle.....	88
Figure 43 : Effet de LRRFip1-iso1 sur l'expression de <i>SFRP2</i> et <i>NOV</i> . ....	89
Figure 45 : Représentation schématique de la protéine PTPRF (isoformes courte et longue). ....	97
Figure 46 : Maturation du récepteur LAR .....	98
Figure 47 : Implication de LAR et ses partenaires dans la morphogénèse de la zone active synaptique. ....	101
Figure 48 : Récapitulatif des principaux rôles cellulaires de LAR.....	103
Figure 49 : Expression de <i>PTPRF</i> dans la valve mitrale. ....	105
Figure 50 : Expression de <i>PTPRF</i> dans les tissus humains. ....	106
Figure 51 : Séquence protéique de sPTPRF. ....	109
Figure 52 : Expression et localisation cellulaire de sPTPRF par Western Blot. ....	110
Figure 53 : Localisation cellulaire de sPTPRF par immunomarquage.....	111
Figure 54 : Interaction de sPTPRF avec les HSPGs. ....	112

Figure 55 : <b>Expression de sPTPRF et interaction avec les HSPGs dans les VICs de rat.</b>	113
Figure 56 : <b>Effet de sPTPRF sur l'expression de ERK et phospho-ERK.</b>	114
Figure 57 : <b>Effet de sPTPRF sur des cibles de la voie Wnt.</b>	115
Figure 58 : <b>Effet de la mutation I328M sur la stabilité de sPTPRF.</b>	116
Figure 59 : <b>Hypothèse pour la maturation de sPTPRF.</b>	118

### *Liste des Tableaux*

Tableau 1 : <b>Récapitulatif des gènes impliqués dans les formes syndromiques de PVM...</b>	36
Tableau 2 : <b>Données phénotypiques des patients atteints de PVM de la famille MOR. ...</b>	55
Tableau 3 : <b>Liste des variants partagés par au moins 9 patients atteints de PVM de la famille MOR.</b>	56
Tableau 4 : <b>Données phénotypiques des patients atteints de PVM de la famille LAP.....</b>	96
Tableau 5 : <b>Liste des traitements chimiques utilisés.</b>	130
Tableau 6 : <b>Liste des anticorps utilisés.</b>	131
Tableau 7 : <b>Séquences des primers utilisés pour les PCR d'expression de LRRFIP1 et PTPRF.</b>	133
Tableau 8 : <b>Conditions utilisées pour les PCR d'expression de LRRFIP1 et PTPRF. ...</b>	133
Tableau 9 : <b>Conditions utilisées pour les qPCR sur les VICs.....</b>	134
Tableau 10 : <b>Séquences des primers utilisés pour les qPCR sur les VICs.</b>	134

### *Liste des Annexes*

Annexe 1 : <b>Interactants de LRRFip1-iso1 détectés par Spectrométrie de Masse.....</b>	142
Annexe 2 : <b>Article : MVP-Associated Filamin A Mutations Affect FlnA-PTPN12 (PTP-PEST) Interactions.....</b>	150





## *Liste des abréviations*

- 5-HT** : Sérotonine
- ADN**: Acide Désoxyribonucléique
- ALK** : « Anaplastic Lymphoma Kinase »
- ARHGAP** : « Aplysia Ras-Related Homologue GAP »
- ARNm**: Acide RiboNucléique messenger
- BMP** : « Bone Morphogenetic Protein »
- BSA**: « Bovine Serum Albumin »
- CAV** : Canal Atrio-Ventriculaire
- CC** : Domaine Coiled-Coil
- DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylindole
- DCHS1** : Dachsous
- DMEM** : « Dulbecco's Modified Eagle Medium »
- dNTP** : Deoxynucleotide
- DTT** : Dithiothréitol
- EGF** : « Epidermal Growth Factor »
- EGTA** : « Ethylen Glycol Tetraacetic Acid »
- EMT** : « Epithelial-to-Mesenchymal Transition »
- EPDC** : « Epicardium-Derived Cells »
- ERK 1-2** : « Extracellular signal Regulated Kinases »
- FGF** : « Fibroblast Growth Factor »
- FLNA**: Filamine A
- GAG** : GlycosAminoGlycane
- GAP** : « GTPase-Activating Protein »
- GEF** : « Guanine Exchange Factor »
- GFP**: « Green Fluorescent Protein »
- GTPases** : Enzymes d'hydrolyse du GTP en GDP
- HRP** : « HorseRadish Peroxydase »
- HSPG** : Héparane Sulfate ProtéoGlycans
- IPS**: « Induced Pluripotent Stem-Cell »
- KO** : « Knock-Out »

**LAR** : « Leukocyte common Antigen-Related »

**LB** : « Lysogeny Broth »

**LRRFIP1** : « Leucine-Rich Repeat in Flightless-Interacting Protein 1 »

**MAPK** : « Mitogen-Activated Protein Kinases »

**MEC** : Matrice Extra-Cellulaire

**MMP** : « Matrix MetalloProteinase »

**NO** : « Nitric Oxyde » ou Monoxyde d'Azote

**PBS** : « Phosphate Buffered Saline »

**PCR** : « Polymerase Chain Reaction »

**PDGF** : « Platelet-Derived Growth Factor »

**PECAM** : « Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule »

**PFA** : ParaFormAldéhyde

**PMSF** : PhenylMethylSulfonyl Fluoride

**PTPN12** : « Protein Tyrosine-Phosphatase, Non-Receptor type 12 »

**PTPRF** : Protéine Tyrosine Phosphatase Récepteur de type F

**PVM** : Prolapsus Valvulaire Mitral

**RAC** : Rétrécissement Aortique Calcifié

**RT-qPCR** : Réverse Transcription –PCR quantitative

**SDS** : Sodium Dodécyl Sulfate

**SVF** : Sérum de Veau Fétal

**TBS** : « Tris Buffer Saline »

**TE** : Tractus d'Éjection

**TGF** : « Transforming Growth Factor »

**VEC** : « Valve Endothelial Cells »

**VEGF** : « Vascular Endothelial Growth Factor »

**VIC** : « Valve Interstitial Cells »

**WT** : « Wild Type » (Type sauvage)

**$\alpha$ -SMA** : «  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin »

## *Avant-propos*

Ma thèse a été réalisée à l'institut du thorax dans l'équipe *Génétique des maladies héréditaires* dirigée par Jean-Jacques Schott et qui a pour but d'identifier les gènes et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de deux maladies dégénératives des valves cardiaques, le Rétrécissement Aortique Calcifié et le Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM). Cette équipe est pluridisciplinaire et composée de cliniciens, généticiens, bioinformaticiens, statisticiens et physiologistes dans le but de recruter les patients puis réaliser les analyses génétiques sur des familles ou des cas isolés et les études fonctionnelles sur les gènes et mutations identifiés.

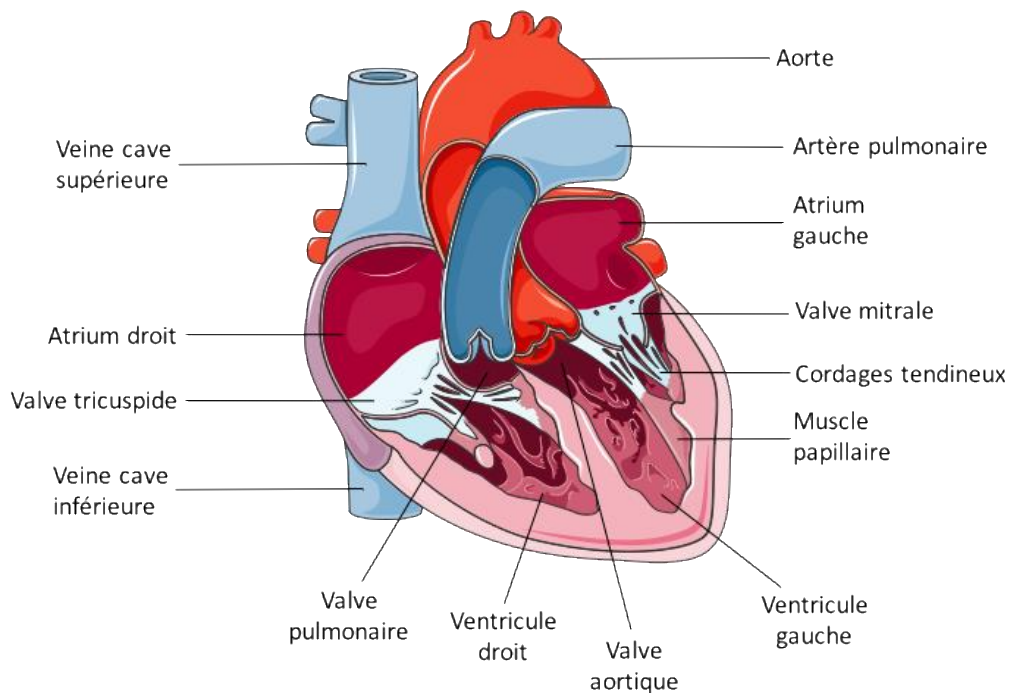
Les mécanismes du développement du PVM sont méconnus et les traitements médicamenteux qui pourraient retarder la chirurgie sont inexistantes. En effet, le PVM, qui a longtemps été considéré comme une pathologie dégénérative liée au vieillissement des patients, apparaît maintenant comme la conjonction de facteurs environnementaux (alimentation trop riche en lipides/glucides, sédentarité, tabagisme, *etc.*) et de facteurs génétiques. Le but est ici de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du PVM mais également de faciliter son dépistage et améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

Jusqu'à maintenant, seulement deux gènes ont été associés à une forme familiale non syndromique de PVM : les gènes *FLNA* en 2007 et *DCHS1* en 2015, qui participent tous les deux aux réponses cellulaires induites par le stress mécanique via le remodelage du cytosquelette d'actine. Depuis, plusieurs mutations retrouvées dans des familles atteintes de PVM ont permis d'identifier des gènes potentiellement causaux pour la pathologie, et mon travail de thèse s'est focalisé sur deux d'entre eux : *LRRFIP1* et *PTPRF*, qui sont impliqués dans les processus de prolifération, migration et adhésion cellulaire respectivement via la régulation de la voie Wnt canonique et le remodelage du cytosquelette d'actine. Ces mécanismes qui participent au développement et/ou au maintien de l'homéostasie des valves, font de *LRRFIP1* et *PTPRF* des gènes potentiellement intéressants dans la compréhension du développement du PVM.



# INTRODUCTION –

Les valves cardiaques sont des structures qui séparent les quatre cavités du cœur : la valve mitrale est située entre les oreillette et ventricule gauches, la valve tricuspide entre les oreillette et ventricule droits, la valve aortique entre le ventricule gauche et l'aorte et la valve pulmonaire entre le ventricule droit et l'artère pulmonaire (Figure 1). Ces valves élastiques s'ouvrent et se ferment passivement en fonction du flux sanguin, et assurent un écoulement du sang dans une seule direction dans des conditions physiologiques, des oreillettes aux ventricules et des ventricules aux artères aorte ou pulmonaire. Un défaut de structure et/ou de fonctionnement de ces valves peut provoquer l'apparition d'une insuffisance mitrale pouvant dans les cas les plus graves entraîner le décès du patient.



**Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe de cœur en vue frontale.**

(Image tirée de *Servier Medical Art*)

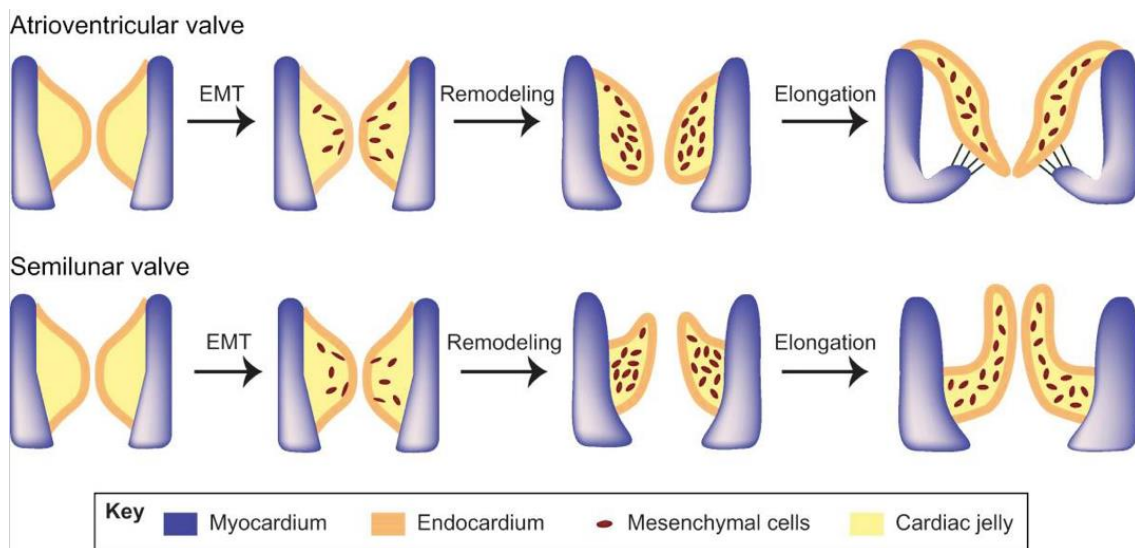
## I. Les valves cardiaques

### 1. Embryogénèse des valves cardiaques

Le cœur est le premier organe à se former et fonctionner au cours de l'embryogénèse. Chez l'homme, il se constitue le 22<sup>ème</sup> jour du développement par fusion des tubes endocardiques (qui sont dérivés des ébauches vasculaires de la région cardiogène) pour former le tube cardiaque primitif. Il est composé de deux couches de cellules, le myocarde/épicarde et

l'endocarde séparées par de la Matrice Extra-Cellulaire (MEC) appelée gelée cardiaque composée de glycosaminoglycans et de protéines.

Le développement des valves commence chez la souris de E9.5 à E10.5 par la formation de coussins endocardiques à la jonction entre le canal atrio-ventriculaire (CAV) et le tractus d'éjection (TE). Sous l'action de facteurs sécrétés par le myocarde, les cellules endothéliales adjacentes à ces coussins vont adopter un profil mésenchymateux et migratoire et venir envahir la gelée cardiaque : c'est la transition épithélio-mésenchymateuse (Runyan et Markwald, 1983) (Figure 2). Les cellules envahissant les coussins endocardiques ne proviennent pas seulement du tube cardiaque primitif mais sont également dérivées de la crête neurale dans le cas des valves semi-lunaires (SL), et ces cellules rejoignent les coussins vers E10.5 (Epstein et al., 2000). Les valves sont également constituées par des cellules myocardiques (étape qu'on appelle la myocardisation) qui vont envahir les bords des coussins endocardiques (van den Hoff et al., 1999), et il a été montré plus récemment que des cellules dérivées de l'épicarde (EPDCs) contribuent également à peupler les coussins endocardiques à partir de E12.0, mais ce mécanisme est encore peu décrit pour les valves AV (Wessels et al., 2012).



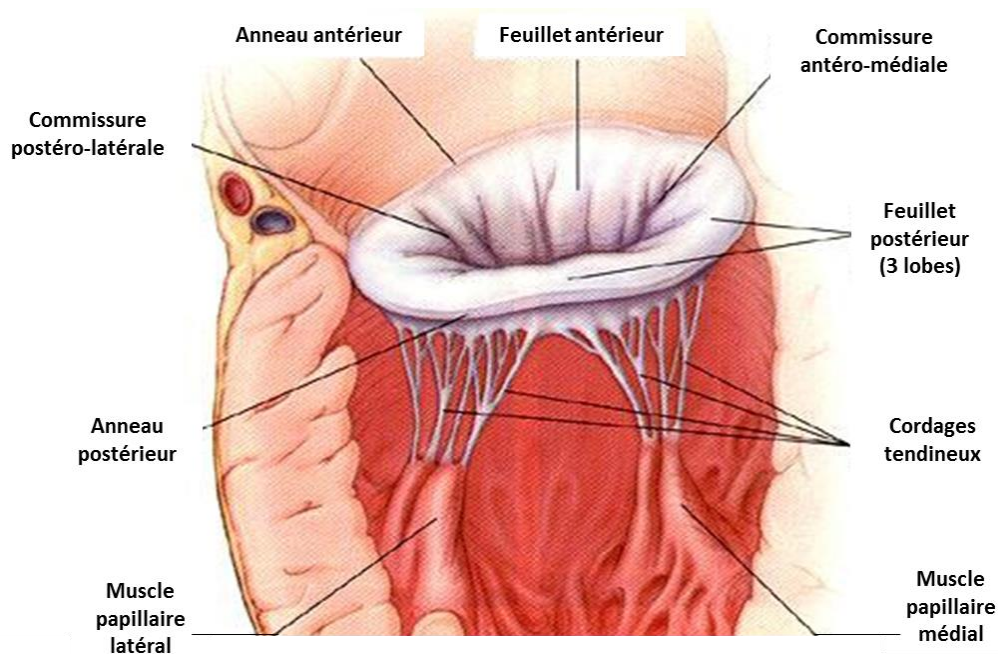
**Figure 2 : Représentation de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).**

Les cellules endothéliales du tube primitif vont adopter un profil mésenchymateux et envahir les coussins endocardiques qui seront à l'origine de la formation des valves matures. L'EMT commence à E9.5 chez la souris. (d'après Lin et al., 2012).

Des étapes complexes de prolifération (environ de E11.5 à E13.5 chez la souris), de maturation et d'élongation de ces cellules donneront naissance aux feuillets des valves constitués de cellules interstitielles englobées dans de la MEC qu'elles continueront de sécréter. Sous l'effet du flux sanguin, la MEC va se remodeler pour ainsi constituer trois couches qui confèrent aux valves des caractéristiques bien distinctes : l'*atrialis* pour l'élasticité, la *fibrosa* pour la rigidité et la *spongiosa* pour l'adaptation des valves au flux sanguin (Lin et al., 2012).

## 2. Structure et fonctionnement de la valve mitrale

L'anatomie des valves est complexe. Les valves AV sont constituées de feuillets asymétriques (deux pour la valve mitrale et trois pour la valve tricuspide) insérés sur un anneau à la jonction entre l'oreillette et le ventricule et reliés au muscle ventriculaire (également appelé muscle papillaire) par des cordages tendineux (Figure 3). Ces cordages sont constitués d'un cœur de collagène entouré d'une gaine de fibres élastiques permettant leur extensibilité. La valve mitrale possède un feuillet antérieur (le plus large), et un feuillet postérieur qui représente la plus grande partie de l'insertion sur l'anneau. Ils s'insèrent sur deux muscles papillaires, le médial et le latéral, qui sont dans la continuité du myocarde ventriculaire.



**Figure 3 : Anatomie de la valve mitrale**

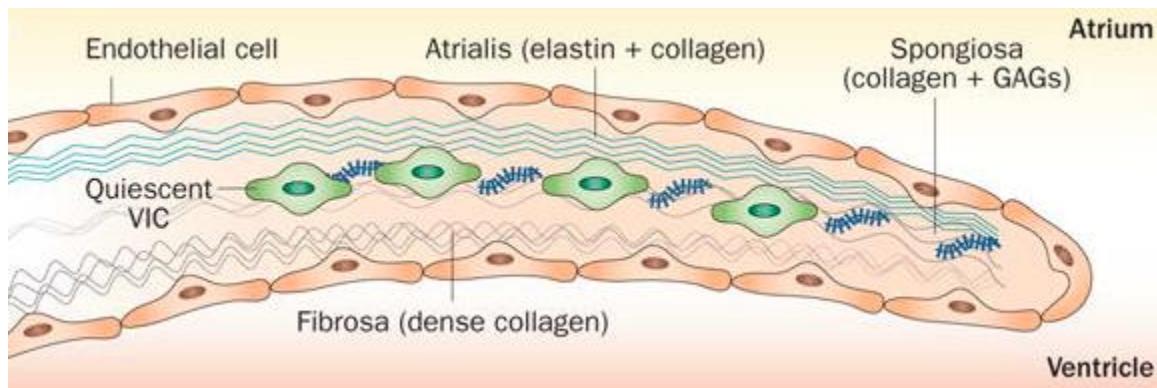
La valve mitrale est composée de deux feuillets (antérieur et postérieur) insérés sur un anneau mitral et reliés par des cordages tendineux aux muscles ventriculaires (papillaires). (Modifié d'après <http://mvpresource.com>).



### a. Composition cellulaire et matricielle de la valve mitrale

La valve mature est composée d'une MEC très organisée en trois couches (Figure 4) :

- La *fibrosa* est soumise à la forte pression du flux sanguin résidant dans le ventricule gauche. Elle est principalement composée de collagène de type I et III et donne sa rigidité à la valve.
- L'*atrialis* est constituée de fibres élastiques qui donnent à la valve sa souplesse et sa flexibilité permettant ses mouvements durant le passage du sang et sa déformation lors de la systole.
- La *spongiosa* est la couche médiane composée de protéoglycans. Elle joue un rôle d'interface entre la fibrosa et l'*atrialis* et permet d'absorber (notamment par la rétention d'eau) les chocs de compression et d'étirement dus à la pression du flux sanguin.



**Figure 4 : Structure des valves en conditions physiologiques**

Les valves atrio-ventriculaires (mitrale et tricuspide) sont composées d'une MEC organisée en trois couches distinctes : l'*atrialis*, la *spongiosa* et la *fibrosa*. Les feuillets sont recouverts d'une couche de cellules endothéliales (VECs) et les couches plus profondes contiennent les cellules interstitielles de la valve (VICs) (d'après Levine et al., 2015).

Les feuillets de la valve mitrale sont recouverts d'une couche continue de cellules endothéliales (VECs). Hormis leurs origines embryonnaires distinctes, ces VECs ont les mêmes fonctions que les cellules endothéliales vasculaires mais possèdent deux caractéristiques propres : elles s'alignent perpendiculairement au flux sanguin et expriment des gènes associés à la chondrogénèse (Butcher et al., 2006). L'intérieur de la valve est composé principalement de cellules quiescentes, les cellules interstitielles de valve (VICs) ayant comme origine pour la plupart les progéniteurs endothéliaux des coussins endocardiques (De Lange et al., 2004). Les VICs sont des cellules de type fibroblastique qui sont positives pour la vimentine et la chondromoduline 1. Elles ont été classées selon cinq

phénotypes (Figure 5) et assurent l'homéostasie des valves mais sont également impliquées dans les processus pathologiques (Liu et al., 2007) :

1) Les progéniteurs embryonniques qui seront à l'origine des qVICs matures après l'EMT. Ce sont les cellules présentes dans les coussins endocardiques embryonnaires, qui vont subir l'EMT, des étapes de différenciation, prolifération et remodelage sous l'influence de nombreux facteurs (Wnt, VEGF, TGF- $\beta$ /BMP, Notch, voir partie I.3).

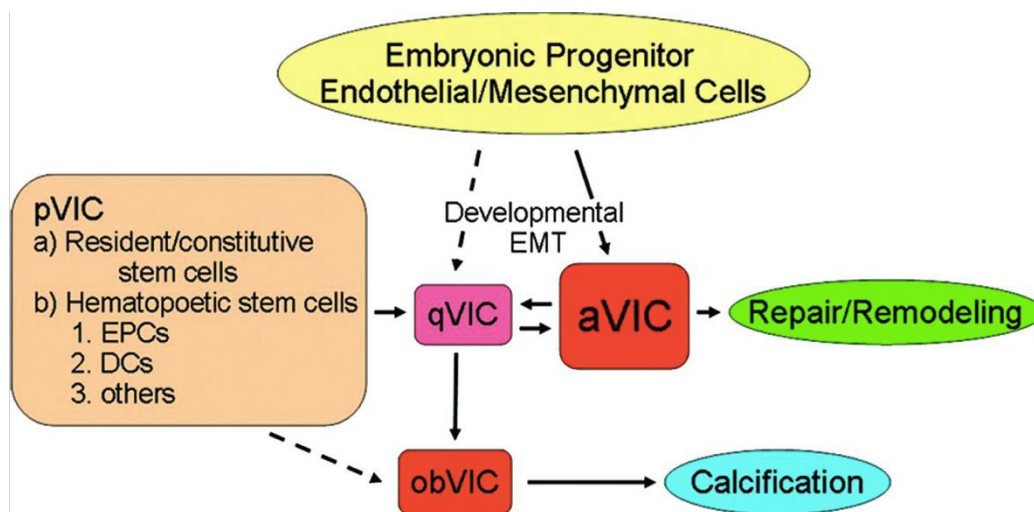
2) Les VICs quiescentes (qVICs) : Elles contribuent à maintenir la structure et la physiologie de la valve mature notamment grâce à leurs jonctions adhérentes (N-Cadhérine et desmogléine) et leurs jonctions gap (connexines 26 et 45) (Filip et al., 1986) qui permettent respectivement de maintenir les VICs jointives et d'assurer la communication avec les VICs adjacentes (Latif et al., 2006). Les qVICs maintiendraient également la sécrétion et la dégradation de la MEC à un niveau bas et inhiberaient l'angiogénèse dans des conditions physiologiques. En effet, les valves saines ne sont pas vascularisées contrairement aux valves pathologiques qui présentent une augmentation de l'activité du VEGF et une diminution de l'activité de la chondromoduline 1, un facteur anti-angiogénique (Yoshioka et al., 2006).

3) Les VICs progénitrices (pVICs) : Ce sont des cellules d'origine diverse (moelle osseuse, cellules circulantes ou résidant dans la valve), qui s'activent et prolifèrent sous l'effet d'un stress cellulaire. Deux types de ces cellules ont été identifiés à partir de valves aortiques sténosées et de bioprothèses (Skowasch et al., 2005) 1) **Les progéniteurs endothéliaux** qui expriment des marqueurs de cellules souches dont CD133 et CD34 2) **Les cellules dendritiques** qui expriment S100, une protéine de liaison au calcium. Une étude a montré que ces cellules progénitrices, sous l'influence du TGF- $\beta$  et VEGF, vont respectivement adopter un phénotype mésenchymateux (marqueurs retrouvés dans les cellules subissant l'EMT comme l' $\alpha$ -SMA) ou un phénotype endothélial (Paruchuri et al., 2010). Ce phénotype est partiellement réversible dans les deux cas, ce qui révèle la plasticité importante de ces cellules. Cependant, les facteurs à l'origine du recrutement, de la différenciation en aVICs et du mode d'action des pVICs sont encore méconnus.

4) Les VICs activées (aVICs) : Dans des conditions pathologiques ("blessure" cellulaire et/ou stress mécanique ou hémodynamique anormal) et pour des raisons encore méconnues, ces

cellules s'activent pour devenir des myofibroblastes exprimant de l' $\alpha$ -SMA, des métalloprotéinases (MMP), des inhibiteurs des MMP (TIMPs) ainsi que des cytokines inflammatoires (TGF- $\beta$ ) qui vont rapidement mener à une sécrétion accrue de la MEC et son remodelage (Blevins et al., 2006) dans le but de "réparer" la valve. Ces VICs ont également des capacités de migration et de prolifération accrues (Liu et Gotlieb, 2007). A terme, ces VICs peuvent induire une fibrose ou une calcification de la valve *in vivo*.

5) Les VICs ostéoblastiques (obVICs) : Ce sont des VICs qui en conditions pathologiques vont subir une différenciation en ostéoblastes et promouvoir la calcification des valves. Les VICs expriment alors des protéines en lien avec la synthèse du cartilage ou de l'os telles que l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, l'alkaline phosphatase ou encore les BMP2 et 4 (Rajamannan et al., 2003). Plusieurs ligands de la famille du TGF- $\beta$  et BMP pourraient réguler les processus de calcification des valves *in vivo* puisqu'ils induisent la différenciation ostéoblastique des VICs en culture (Osman et al., 2006).



**Figure 5 : Les cinq phénotypes/fonctions des cellules interstitielles de valve (VICs)**

Les VICs assurent l'intégrité et la physiologie des valves matures. Il a été décrit dans la littérature cinq phénotypes différents 1) Les progéniteurs embryonniques qui subiront l'EMT 2) Les qVICs qui maintiennent l'intégrité des valves en conditions physiologiques 3) Les pVICs qui suite à un stress cellulaire vont être recrutées et se différencier en aVICs 4) Les aVICs qui deviennent des myofibroblastes et sécrètent des MMP/TIMP qui remodelent la MEC 5) Les obVICs qui subissent une différenciation ostéoblastique et peuvent induire la calcification des valves. (d'après Liu et al., 2007).

b. **Physiopathologie des valves et activation des VICs/VECs**

Les mécanismes cellulaires à l'origine de l'activation pathologique des VICs sont encore peu décrits mais étant donné que la dégénération des valves est liée principalement à une dérégulation des composants de la MEC, les VICs qui contrôlent la synthèse/dégradation de cette matrice sont probablement les médiateurs de ces mécanismes. Plus récemment, le rôle des VECs a également été mis en cause puisque leur expression d' $\alpha$ -SMA augmente en cas de régurgitation mitrale suggérant une potentielle réactivation de l'EMT en cas de pathologie valvulaire (Dal-Bianco et al., 2009). Leurs synthèse et relargage accrus d'Oxyde Nitrique (NO) ont également été reliés à un remodelage des valves mitrales (Moesgaard et al., 2007). Plusieurs hypothèses ont été émises sur les causes de la dégénérescence des valves :

1) Le stress mécanique : Les valves sont soumises à des forces mécaniques d'étirement, de compression, de torsion et de cisaillement générées par le flux sanguin. Plusieurs études montrent un lien entre l'application de ces forces et une modification du phénotype des valves *in vivo* et *in vitro* avec en particulier une surexpression de l' $\alpha$ -SMA, des MMP et de protéines impliquées dans la synthèse des collagènes comme la décorine, un protéoglycan de la MEC (Lacerda et al., 2012; Stephens et al., 2008).

2) La sérotonine : La libération dans la circulation de ce neurotransmetteur en grande quantité par les tumeurs carcinoïdes (tumeurs neuroendocrines le plus souvent digestives) a été liée au développement d'atteintes des valves cardiaques. Ces atteintes ressemblent fortement à des dégénérescences myxoïdes avec une accumulation des protéoglycans/GAG dans la MEC (Gustafsson et al., 2008). Le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> a été fortement associé à ces valvulopathies (Rothman et Baumann, 2009).

3) La réactivation des voies de signalisation : Il est probable que, sous l'influence de facteurs génétiques prédisposant, la moindre dérégulation des voies de signalisation impliquées dans la valvulogénèse peut mener au développement de valvulopathies congénitales. De plus, de nombreuses études ont montré la forte similarité entre les mécanismes de régulation impliqués dans la synthèse des os/cartilage et la dégénérescence des valves. Il est intéressant de constater que ces mécanismes partagent plusieurs voies de signalisation telles que la voie du TGF- $\beta$ , des BMP, Notch et Wnt décrites juste après dans ce manuscrit (voir parties I.3 et II). En effet, l'expression du TGF- $\beta$ 1 augmente dans les valves calcifiées et fibrosées (Jian et al.,

2003; Kim et al., 2008) de même que certaines protéines de la voie Wnt (voir partie II.4) tandis que des mutations de Notch1 ont été directement associées à la progression de la calcification aortique (Garg et al., 2005). L'axe BMP2-Sox9 (impliqué dans le développement du cartilage) pourrait avoir un rôle dans la dégénérescence myxoïde notamment via la synthèse d'aggrécane et de collagène de type II spécifiques du cartilage (Orton et al., 2012).

### 3. Voies de signalisation impliquées dans le développement des valves

Les mécanismes des voies de signalisation impliqués dans l'initiation de l'EMT et la prolifération des cellules mésenchymateuses ont été largement étudiés et décrits. Ils mettent en jeu des facteurs de transcription et facteurs de croissance présents à la fois dans l'endocarde et le myocarde. En revanche, l'intégration de ces signaux provenant de différentes voies de signalisation (TGF- $\beta$ , Wnt, Notch...) pour mener à la formation de valves matures est encore mal documentée. En effet, de nombreuses publications ont montré l'importance de plusieurs voies de signalisation intervenant au cours du développement des valves de façon parfaitement synergique :

1) La voie des Bones Morphogenetic Proteins (BMP) (Figure 6) : Le rôle critique des BMP a été établi en particulier dans la création d'un environnement propice à l'activation de l'endocarde avant l'EMT, dans l'induction de l'EMT ainsi que l'invasion des coussins endocardiques. En effet, de nombreux ligands BMP (2, 4, 5, 6 et 7) sont exprimés dans le myocarde au cours du développement des valves. Il a été montré que le BMP2 est essentiel pour le déclenchement de l'EMT et la formation des valves atrio-ventriculaires. En effet, le rôle du BMP2 a été investigué dans des embryons de poulet qui montraient que des oligonucléotides anti-sens de BMP2 empêchaient la formation du mésenchyme (Yamagishi et al., 1999). Une délétion spécifique dans le myocarde AV de BMP2 (le KO complet est létal) chez la souris a montré qu'il est indispensable pour la sécrétion de la gelée cardiaque et la formation des coussins endocardiques (Ma et al., 2005). De façon intéressante, ce KO de BMP2 n'affecte pas la formation des coussins endocardiques du TE, suggérant un rôle spécifique dans le développement des valves AV. A l'inverse, le BMP4 est exprimé dans le myocarde du TE et est impliqué dans la prolifération cellulaire suivant l'EMT des coussins endocardiques ainsi que dans le remodelage des valves (McCulley et al., 2008). Les BMP5, 6 et 7 quant à eux semble jouer un rôle mineur.

Les récepteurs des BMP, en particulier ALK2, ALK3 et BMPRII ont également été impliqués dans la valvulogénèse. Ainsi, un KO endothélial de ALK2 et ALK3 chez la souris induit un échec des cellules de l'endocarde à adopter un profil migratoire (Song et al., 2007; Wang et al., 2005). De même, un KO endothélial de BMPRII et du récepteur aux chémokines CXCR7 (impliqué dans la signalisation des Smad 1, 5 et 8) provoquent un épaississement des feuillets de la valve, tandis qu'un KO de BMPRII dans le myocarde n'a pas d'effet (Beppu et al., 2005; Yu et al., 2011). Enfin, un KO de TBX20 dans le myocarde du CAV chez la souris diminue l'expression de BMP2 et perturbe l'EMT (Cai et al., 2011).

Toutes ces données suggèrent l'importance de la voie des BMP dans l'initiation de l'EMT et l'acquisition du profil migratoire, la prolifération et la survie des cellules endocardiques, ainsi que dans le remodelage des valves (Garside et al., 2013).

2) La voie du Transforming Growth Factor Bêta (TGF- $\beta$ ) (Figure 6) : chez la souris, le TGF- $\beta$ 1 est exprimé dans l'endocarde de façon précoce à E8 (Akhurst et al., 1990). Le TGF- $\beta$ 2 est exprimé dans l'endocarde à E10 tandis que le TGF- $\beta$ 3 est exprimé après l'EMT et n'est pas exprimé dans l'endocarde (Camenisch et al., 2002). Ceci suggère que les TGF- $\beta$ 1 et 2 pourraient avoir un rôle critique dans l'initiation de l'EMT et le TGF- $\beta$ 3 dans le remodelage des valves. Or le rôle précis des TGF- $\beta$  dans la valvulogénèse est difficile à étudier du fait de la mortalité précoce de nombreux modèles de souris KO pour ces protéines, et les études portant sur des modèles d'embryons de poulet et de souris ont rapporté certains résultats contradictoires.

En effet, tandis que les TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3 sont exprimés dans l'endocarde des embryons de poulet avant et pendant l'EMT, chez la souris seulement le TGF- $\beta$ 2 est exprimé dans l'endocarde du CAV entre E9.0 et E10.0 (Camenisch et al., 2002). De même, une souris KO pour le TGF- $\beta$ 2 a montré de très sévères dysfonctionnements dans beaucoup d'organes dont des malformations cardiaques, notamment au niveau du TE, du CAV, du septum et de l'arche aortique (Sanford et al., 1997). Le TGF- $\beta$ 2 aurait également un rôle dans la fin de l'EMT puisqu'une souris TGF- $\beta$ 2<sup>-/-</sup> développe des coussins AV hypercellularisés, tandis qu'aucune différence n'est observée avec la souris TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> et TGF- $\beta$ 3<sup>-/-</sup> (Azhar et al., 2009). Une souris KO pour le TGF- $\beta$ 1 n'a pas montré de défauts valvulaires (Letterio et Roberts, 1996), tout comme la souris KO pour le TGF- $\beta$ 3 qui montre des malformations pulmonaires

et une anomalie de formation du palais (Kaartinen et al., 1995). L'isoforme longue de la protéine Latent TGF- $\beta$  Binding Protein 1 (LTBP1L) pouvant se lier à toutes les isoformes des TGF- $\beta$ , a quant à elle été impliquée dans la régulation de la voie du TGF- $\beta$  lors de la formation des valves (Todorovic et al., 2011).

A contrario chez le poulet, les rôles du TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3 sont importants dans l'EMT puisque leur ciblage par des anticorps neutralisants inhibe respectivement la transformation des cellules endocardiques et leur migration dans les coussins (Boyer et al., 1999).

Le rôle du TGF- $\beta$ 3 a été confirmé plus récemment chez le poulet puisqu'il pourrait avoir un rôle dans l'initiation de l'EMT en synergie avec le BMP2 exprimé par le myocarde (Nakajima et al., 2000). Le rôle des récepteurs aux TGF- $\beta$  a été mis en évidence dans le développement des valves puisqu'une déplétion endothéliale de ALK5 altère la migration des cellules mésenchymateuses au niveau des coussins endocardiques (Sridurongrit et al., 2008) et qu'un KO endothélial de T $\beta$ RII chez la souris provoque la mort des embryons après E12.5 qui ne montrent pas de défaut de l'EMT mais plutôt un défaut de prolifération des cellules (Jiao et al., 2006).

Enfin, plusieurs effecteurs Smad dont certains sont communs avec la voie des BMPs et du TGF- $\beta$  sont impliqués dans le développement des valves. En effet, un KO complet de Smad6 cause de sévères dysfonctionnements cardiaques avec entre autre une hyperplasie des valves, suggérant son rôle inhibiteur de la voie des BMP/TGF- $\beta$  (Galvin et al., 2000). Un KO de Smad7 provoque également de nombreux défauts cardiaques tels que des problèmes de septation, de développement du TE et de non compaction du myocarde (Hayashi et al., 1997). Notamment, le KO de Smad7 induit une augmentation de la phosphorylation des Smad2/3 et de l'apoptose cellulaire au niveau des coussins AV, suggérant également le rôle inhibiteur de Smad7 dans la formation des valves. Enfin, un KO endothélial de Smad4, qui est un effecteur commun de la voie du TGF- $\beta$  et du BMP, montre des coussins endocardiques AV acellulaires, suggérant le rôle fondamental de Smad4 dans l'EMT notamment via sa coactivation avec le facteur de transcription Gata4 du promoteur Id2 (Moskowitz et al., 2011). Ces données suggèrent un rôle de la voie du TGF- $\beta$  dans l'initiation et la terminaison de l'EMT, mais également dans le remodelage/maturation des valves.

3) La voie Notch (Figure 6) : Cette voie de signalisation est cruciale pour le développement des valves du fait de l'expression complémentaire et synergique de *Notch 1, 2, 3* et *4*, des ligands *Jag1* et *Jag2* et des cibles *Hey1* et *Hey2* dans l'endocarde et le myocarde de E9.5 à E15.5 (Garside et al., 2013). Les explants de souris *Notch1<sup>-/-</sup>* (qui meurent à E10.5) et *RBPJ<sup>-/-</sup>* subissent une EMT très réduite, avec une réduction de l'expression de *Snail* et *TGF- $\beta$*  et une persistance de l'expression de la *VE-cadhérine* (Timmerman et al., 2004). De même, l'activation constitutive de la voie Notch dans l'endocarde induite par la surexpression du fragment NICD (provenant du clivage de Notch) provoque l'augmentation de l'expression à E9.5 de nombreux gènes impliqués dans l'initiation de l'EMT tels que *Snail2*, *Twist2*, *Bmp6*, *Alk3* et *Alk6* (Luna-Zurita et al., 2010).

Curieusement, la souris *Notch2<sup>-/-</sup>* ne montre pas de défauts valvulaires (McCright et al., 2001). *Notch 3* et *4* ne semblent pas jouer un rôle indispensable dans la formation des valves puisque les souris *Notch3* et *Notch4<sup>-/-</sup>* sont viables (Krebs et al., 2000, 2003). Des souris KO pour des ligands de la voie Notch tels que *Jag1*, *Jag2* et *Dll4* montrent de nombreux défauts mais pas dans la formation des valves, ce qui suggère un rôle redondant des différents éléments de cette voie de signalisation. Enfin, tandis qu'un double mutant pour les cibles de Notch *Hey1/Hey2* meurt de sévères problèmes vasculaires à E9.5 (Fischer et al., 2004), un double mutant pour les cibles *Hey1/HeyL* survit et montre également une diminution de l'expression de *Snail* et de la MMP2 (protéase sous le contrôle de *Snail* requise pour la dégradation des cadhérines et la perte des jonctions endothéliales qui sont nécessaires pour l'EMT) dans le CAV ainsi qu'une diminution de l'invasion des coussins endocardiques par les cellules mésenchymateuses, confirmant le rôle de Notch dans l'EMT (Fischer et al., 2007). Enfin, des mutants pour les effecteurs intracellulaires de la voie Notch tels que les facteurs de transcription RBPJ et MAML ont également montré des défauts de l'EMT (High et al., 2008; Timmerman et al., 2004).



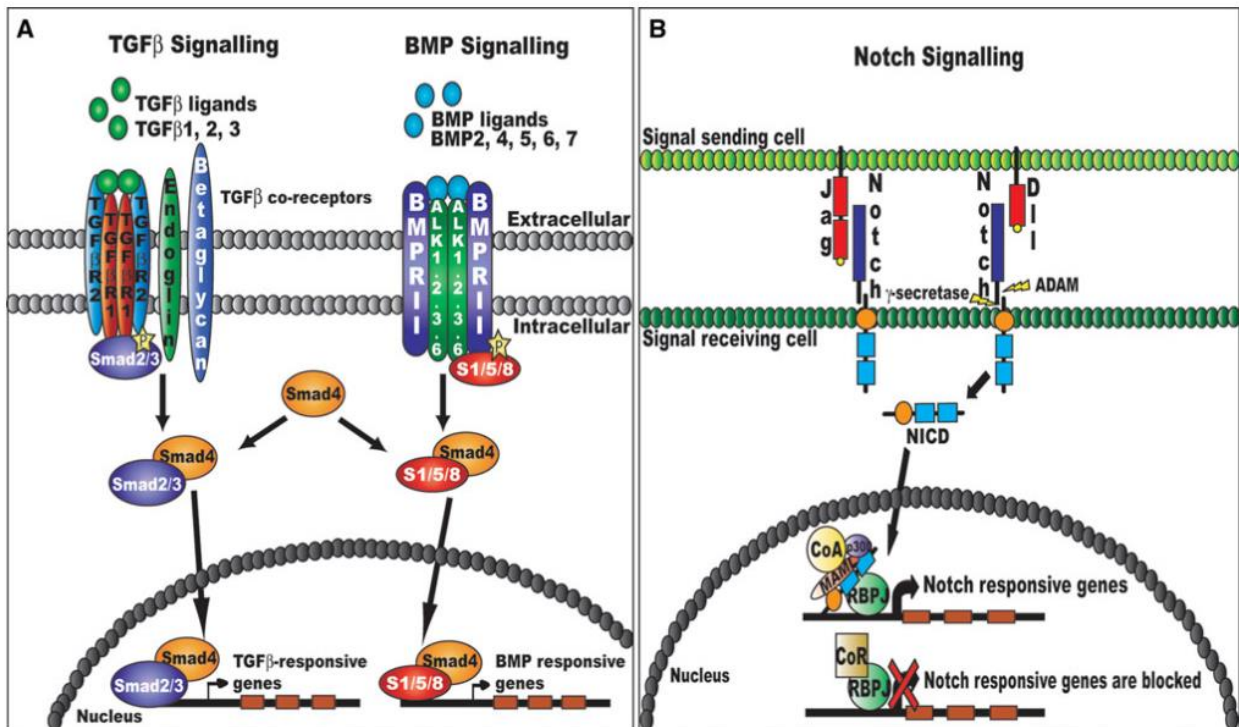


Figure 6 : Voies de signalisation BMP, TGF- $\beta$  et Notch

A. Les ligands TGF- $\beta$  et BMP se fixent sur leurs complexes de récepteurs respectifs qui vont provoquer la phosphorylation de Smad2/3 ou Smad1/5/8 (R-Smad), qui va se lier à un co-facteur Smad4 et migrer dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles.

B. Les ligands Jagged ou Delta-like (DII) d'une cellule peuvent interagir avec le récepteur Notch d'une autre cellule et provoquer un changement de conformation du récepteur et un démasquage des sites de clivage S2 et S3. La métalloprotéinase ADAM et le complexe  $\gamma$ -sécrétase vont cliver Notch respectivement sur les sites S2 et S3. Ce dernier clivage libère le fragment intra-cellulaire de Notch, NICD, qui est transloqué dans le noyau où il se lie à des co-facteurs de transcription dont RBPJ, MAML, p300. En cas d'absence de signal Notch, RBPJ est lié au co-répresseur CoR (d'après Garside et al., 2013).

#### 4) Les récepteurs tyrosines kinases et leurs chémokines :

De nombreux récepteurs tyrosines kinases associés à leurs facteurs de croissance participent au développement des valves, aussi bien dans l'initiation de l'EMT que dans son inhibition, notamment le VEGF, le FGF et l'EGF.

La voie du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est composée des ligands VEGFA, VEGFB, PlGF, VEGFC et VEGFD qui peuvent se lier aux récepteurs tyrosine-kinase VEGFR1 et VEGFR2 (Ferrara et al., 2003). Plusieurs études suggèrent que le VEGF régule négativement le développement des valves. En effet, le VEGFA est exprimé à E10.5 chez un cœur de souris spécifiquement dans le myocarde délimitant les coussins

endocardiques en formation et sa surexpression prématurée à E9.5 inhibe l'EMT, prévenant alors un excès d'EMT et par conséquent une hyperplasie des valves (Dor et al., 2001). La calcineurine (une phosphatase activée par le calcium qui peut induire la déphosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de transcription Nuclear Factor of Activated T cells (NF-AT) (Beals et al., 1997)) participe à l'initiation de l'EMT à E9.0 en réprimant l'expression du VEGFA dans le myocarde (Chang et al., 2004). Mais plus récemment, le rôle biphasique du VEGF au cours du développement des valves a été suggéré puisque le VEGFR1 est fortement exprimé dans l'endocarde juste avant l'EMT à E9.0 et est nécessaire pour la formation des coussins endocardiques du TE (mais pas du CAV) tandis que le VEGFR2 est requis après l'EMT vers E11.5 pour l'élongation des valves (Stankunas et al., 2010).

La signalisation du Fibroblast Growth Factor (FGF) comprend 18 ligands pouvant interagir avec 4 récepteurs tyrosine-kinase. Certains de ces ligands ont été impliqués dans le développement des valves puisque le FGF8 est indispensable à la formation du TE (Park et al., 2006), tandis que le FGF4 peut induire la prolifération de cellules mésenchymateuses explantées d'embryons de poulet (Sugi et al., 2003). De façon intéressante, des souris KO dans le myocarde du TE pour *FRS2 $\alpha$* , un effecteur intracellulaire requis pour l'activation des voies Ras/MAPK et PI3K/Akt (Ornitz et Itoh, 2015), présentent des défauts de l'invasion des cellules mésenchymateuses dus à une augmentation de l'expression du VEGFA (Zhang et al., 2008). Le FGF a également été décrit comme nécessaire à la différenciation des cellules de la crête neurale en cellules musculaires lisses (étape de myocardisation importante lors de la septation du TE) lors du remodelage des valves SL *via* l'augmentation de l'expression du *bmp4* (Zhang et al., 2010).

Les protéines de la famille ErbB sont des récepteurs tyrosine kinase au nombre de 4 : EGFR/HER1 (ErbB-1), Neu/HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) et HER4 (ErbB-4). Ils interagissent avec des ligands tels que l'Epidermal Growth Factor (EGF), l'Heparin-Binding EGF (HB-EGF), la famille des héréguine/neuréguline (HRG) et le Transforming Growth Factor de type  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) avec des affinités différentes. Comme pour le VEGF, le rôle inhibiteur de l'EGF dans le développement des valves a également été mis en évidence dans plusieurs études. En effet, une souris EGFR<sup>-/-</sup> et HB-EGF<sup>-/-</sup> montre des valves SL et AV plus larges dues à un défaut de régulation de la voie des BMP et une suractivation des Smad1/5/8 (Chen et al., 2000; Jackson et al., 2003). Le HB-EGF peut se lier aux Héparanes Sulfates

Protéoglycans (HSPGs), des protéoglycans particuliers présents dans la MEC qui jouent le rôle de plateforme de signalisation pour les voies Wnt, TGF- $\beta$  et FGF (Lin et al., 2004). De façon intéressante, une souris exprimant des HB-EGF tronqués pour le site de liaison aux HSPGs présente des valves SL et AV hypertrophiées et une augmentation de la prolifération des cellules mésenchymateuses après E15.5 (Iwamoto et al., 2010). De même, une souris déficiente pour l'enzyme TACE/ADAM17 (qui permettrait alors de cliver le précurseur de l'HB-EGF en sa forme active) possède des valves plus épaisses à E14.5, confirmant le rôle inhibiteur des HB-EGFs dans la prolifération cellulaire après l'EMT.

De manière intéressante, un lien entre la synthèse de l'Acide Hyaluronique (AH), composant de la MEC, avec la signalisation ErbB a également été établi. En effet, des embryons de souris KO pour la Hyaluronan Synthase 2 (Has2), une enzyme responsable de la synthèse de l'AH, montrent non seulement une absence totale de formation de la gelée cardiaque et donc d'EMT (Camenisch et al., 2000), mais également une déficience de la phosphorylation de ErbB-3 et ErbB-4 (Camenisch et al., 2002).

5) La voie Wnt : La voie Wnt joue un rôle crucial dans le développement des valves, tant dans l'établissement des progéniteurs cardiaques que dans l'EMT ou la maturation des cellules en valve mature. Son fonctionnement et ses rôles sont décrits plus en détail dans la partie II de ce manuscrit.

Si ces voies de signalisation sont fortement impliquées dans la valvulogénèse, il existe entre elles de nombreuses inter-régulations ou « cross-talk » qui permettent le développement des valves de façon parfaitement synergique.

#### 4. Les cross-talk/régulations entre ces voies de signalisation

De nombreuses études complexifient encore un peu plus la compréhension de l'intégration de toutes ces voies de signalisation lors du développement des valves (Figure 7). Il existe tout d'abord un lien moléculaire étroit entre les voies du BMP et du TGF- $\beta$ , puisque Smad4 est un effecteur commun aux deux voies, et Smad2/3 ou Smad1/5/8 peuvent entrer en compétition pour la liaison à Smad4. Ainsi, l'activation simultanée des récepteurs ALK5 et ALK2/3 peut induire la formation de complexes R-Smad mixtes, par exemple Smad1/2, capable d'activer la transcription via des promoteurs différents de ceux déjà connus (Daly et

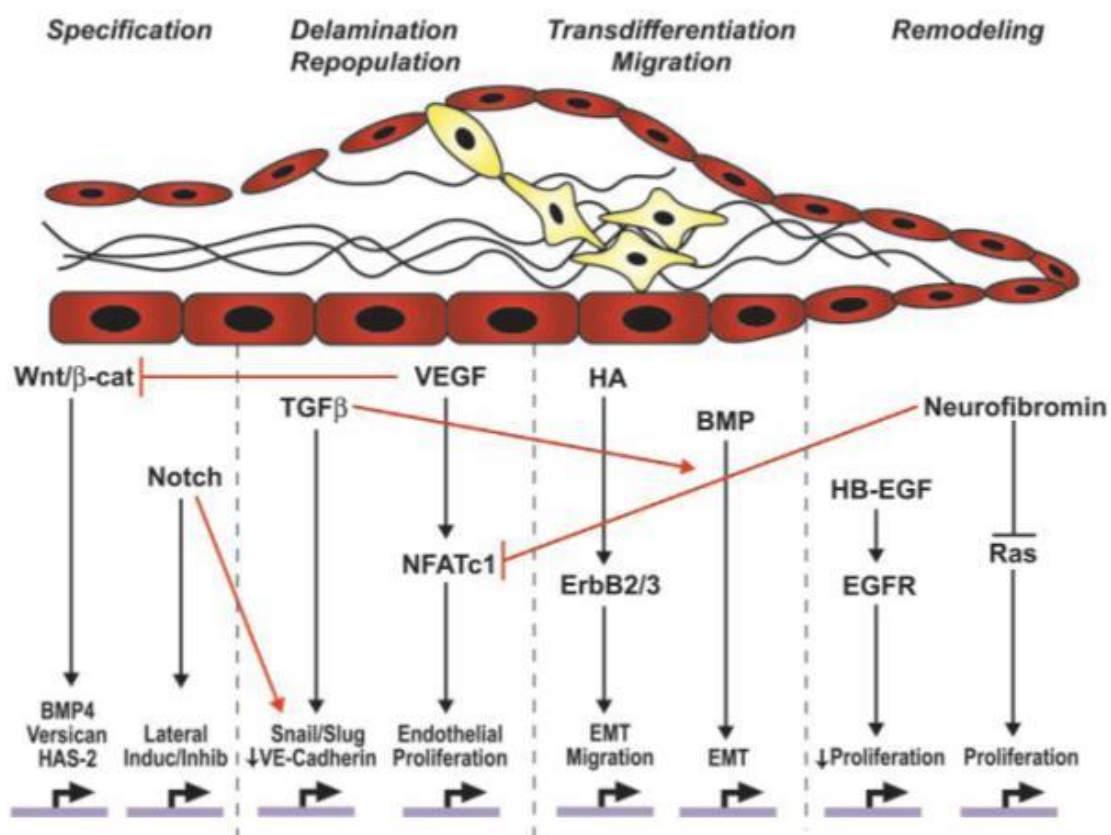
al., 2008). Au cours de la valvulogénèse, il a été montré que le BMP2 myocardique est indispensable au maintien de l'expression du TGF- $\beta$ 2 mais aussi de Notch1 durant la formation des coussins endocardiques (Ma et al., 2005).

En effet, comme décrit précédemment, le Notch1 endocardique et le BMP2 myocardique semblent augmenter de façon synergique l'expression de *Snail*, un des effecteurs de la voie du TGF- $\beta$ , juste avant l'EMT (Timmerman et al., 2004). Notch peut également à son tour réprimer l'expression du BMP2 notamment via la protéine HEY1 ce qui régule négativement l'EMT (Luna-Zurita et al., 2010). Le lien indirect entre Notch et TGF- $\beta$  a été de nouveau confirmé puisqu'une autre étude montre que Notch peut induire la sécrétion de l'Activine A, une protéine membre de la famille du TGF- $\beta$ , qui va alors activer la voie PI3K/Akt et la production d'oxyde nitrique nécessaire à l'EMT (Chang et al., 2011).

Un lien entre la voie Wnt canonique et la voie des facteurs de croissance a également été établi lors du développement des valves. En effet, il a été montré que la voie du VEGF augmente la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine ce qui favorise sa liaison à CD31/PECAM, une protéine impliquée dans les adhésions cellule-cellule (Ilan et al., 1999), diminuant ainsi le pool libre de  $\beta$ -caténine susceptible d'activer la transcription de gènes cibles dans le noyau. Ceci peut être un des mécanismes expliquant l'inhibition de l'EMT par le VEGF, d'autant plus que l'expression de CD31 est diminuée durant l'EMT.

Il a été aussi décrit récemment que l'activité de la voie Wnt canonique et de la signalisation du FGF pouvait induire de façon synergique la prolifération des cellules des coussins endocardiques. En effet, la voie Ras/MAPK (médiée par les pERK1/2) est diminuée lorsque la voie Wnt canonique est inhibée, et qu'à l'inverse la prolifération des cellules est bloquée lorsque l'on traite les cellules à la fois avec Wnt3a et avec un inhibiteur du récepteur au FGF (Bosada et al., 2016). La voie du VEGF est également régulée par la neurofibromine (qui est codée par le gène *NFI*), une GTPase Activating Protein (GAP) qui régule négativement la voie Ras (Xu et al., 1990). Une souris *NFI*<sup>-/-</sup> invalidée spécifiquement dans l'endothélium montre une localisation nucléaire prématurée du facteur de transcription NFATc1 (E9.5 au lieu de E10.5) à l'origine d'un élargissement des coussins endocardiques (Gitler et al., 2003), ce qui suggère un rôle de régulation négative de la neurofibromine sur la voie du VEGF dans l'initiation de l'EMT.

La coopération entre la voie Wnt canonique et la voie du TGF- $\beta$  a également été établie notamment dans le contexte de l'EMT puisque Smad3, la  $\beta$ -caténine et le facteur de transcription CBP interagissent pour réguler la transcription de gènes (Zhou et al., 2012). Dans les chondrocytes, le complexe Smad3/4 se lie à la  $\beta$ -caténine, empêche sa dégradation et favorise sa translocation nucléaire (Zhang et al., 2010). De façon intéressante, il a également été mis en évidence que la déubiquitinase USP9X/FAM stabilise à la fois Smad4 et la  $\beta$ -caténine, empêche leur dégradation et favorise ainsi leur translocation nucléaire (Dupont et al., 2009; Taya, et al., 1999).



**Figure 7 : Récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans la valvulogénèse**

Au moins 7 voies de signalisation différentes (Wnt, Notch, TGF- $\beta$ /BMP, ErbB, NFATc1, VEGF et NF1), leurs effecteurs et cibles transcriptionnelles agissent de façon synergique lors des 4 étapes principales du développement des valves 1) Activation cellulaire 2) Délamination 3) Migration 4) Prolifération/remodelage. De nombreux cross-talk activateurs et inhibiteurs existent entre ces voies de signalisation (représentés par des flèches rouges). (d'après Armstrong et Bischoff, 2010).

Enfin, la voie de signalisation Hippo permet via ses effecteurs TAZ/YAP qui peuvent se lier à Smad/ $\beta$ -caténine et les séquestrer dans le cytoplasme d'inhiber la voie du TGF- $\beta$  et la

voie Wnt canonique (Attisano et Wrana, 2013). Bien qu'il n'y ait pas encore de données sur le rôle de la voie Hippo dans le développement des valves, le recrutement nucléaire de TAZ/YAP ainsi que son rôle régulateur de cibles transcriptionnelles lors de l'EMT a déjà été montré dans un contexte de cellules cancéreuses (Zhao et al., 2007). Son rôle régulateur de la prolifération des cardiomyocytes lors du développement cardiaque a aussi été clairement établi dans de nombreux modèles de souris transgéniques (Zhou et al., 2015). Pour finir, il a été montré de façon intéressante que les protéines TAZ/YAP et notamment leur localisation cellulaire sont particulièrement sensibles au stress mécanique (Dupont et al., 2011). Le rôle de la voie Hippo dans le développement des valves devra être élucidé.

## II. La voie Wnt canonique

La voie Wnt (contraction de Wg pour *Wingless* et int pour site d'intégration) a été découverte vers la fin des années 70. Il a été montré qu'elle régule de nombreux processus physiologiques lors du développement embryonnaire et chez l'adulte (polarisation cellulaire, cardiogénèse, métabolisme...) et qu'elle est impliquée dans le développement de multiples cancers.

### 1. Bref historique de la découverte de la voie Wnt

La voie Wnt est très conservée des non-vertébrés aux mammifères. En effet, les organismes mammifères possèdent 19 gènes codant pour les protéines Wnt, tandis qu'au moins 11 gènes ont été retrouvés chez l'anémone de mer (Kusserow et al., 2005) soulignant l'importance de cette voie et son maintien au cours de l'évolution.

Le gène *Wingless* (« sans aile ») a été découvert en 1980 et faisait partie de 15 gènes qui, s'ils étaient mutés, provoquaient une altération de la polarisation segmentale chez la drosophile (Nüsslein-Volhard et Wieschaus, 1980). Parallèlement, le gène *Wnt1* (initialement appelé *Int-1*) a été découvert chez la souris en 1982 comme étant un site d'intégration d'ADN viral du rétrovirus MMTV (mouse mammary tumor virus) (Nusse et Varmus, 1982). Il s'est avéré plus tard que le gène *Wingless* était en fait l'homologue de *Wnt1* (Rijsewijk et al., 1987). Le gène *Dishevelled* ("ébouffé") a également été découvert chez la drosophile et identifié comme un gène clé de la polarité segmentaire (en effet, les mutants montraient un problème d'orientation des poils sur le corps et les ailes) (Perrimon et Mahowald, 1987). En 1989, il a été montré que l'injection d'ARN murin de *Wnt1* dans un œuf de xénope provoquait une duplication des structures du mésoderme axial (McMahon et Moon, 1989) suggérant son rôle dans la formation de l'axe dorso-ventral chez les vertébrés.

La voie Wnt a été mieux caractérisée depuis avec l'identification de nombreuses protéines : il a été montré l'interaction entre la  $\beta$ -caténine et le facteur de transcription Lymphoid enhancer-binding factor (LEF-1) dans le noyau cellulaire et l'augmentation de la transcription de gènes cibles (Behrens et al., 1996). La même année, il a été montré que XTcf-3, l'homologue de TCF-1 chez le xénope, interagissait avec la  $\beta$ -caténine et ce complexe participait à l'activation de la transcription de gènes cibles (Molenaar et al., 1996). Puis les récepteurs Frizzled ont été identifiés en tant que récepteurs des protéines Wnt comme Dfz2

chez la drosophile (Bhanot et al., 1996) ou les Low Density Lipoprotein (LDL)-Related Proteins (LRPs) en tant que co-récepteurs indispensables à l'activation de la voie Wnt (Wehrli et al., 2000). La gène codant pour la protéine Adenomatous Polyposis Coli (APC) a été premièrement décrit comme étant associé à une forme de cancer colorectal (Kinzler et al., 1991) puis identifié comme un partenaire de la  $\beta$ -caténine dans la voie Wnt (Rubinfeld et al., 1993). Depuis, de nombreux autres éléments de la voie Wnt ont été identifiés et complexifient encore un peu plus la compréhension de cette voie de signalisation.

## 2. La voie Wnt

### a. Wnt et ses récepteurs

Les protéines Wnt ont un poids moléculaire d'environ 40 kDa et sont riches en cystéines. La sécrétion et le transport extracellulaire de ces protéines sont finement régulés, et mettent en jeu l'ajout d'un acide gras mono-insaturé (S-palmitoylation) sur une cystéine particulière, la Cys77 pour la protéine Wnt-3a murine (Willert et al., 2003). Il a également été montré que la Ser209 pouvait également être modifiée par l'ajout d'un acide palmitoléique sur Wnt-3a murine, et qu'une O-acyltransférase appelée Porcupine (Porc) présente dans le réticulum endoplasmique (RE) était nécessaire à cette modification et requise pour l'export de Wnt-3a du RE vers le Golgi (Takada et al., 2006). Les protéines Wntless (WIs) à sept domaines transmembranaires sont localisées dans la membrane du Golgi, des endosomes et dans la membrane plasmique où elles lient les protéines Wnt et permettent leur sécrétion (Bänziger et al., 2006).

La protéine Wnt se lie à un complexe hétérodimérique de récepteurs : le récepteur Frizzled à sept domaines transmembranaires et le co-récepteur LRP 5/6 (Pinson et al., 2000). Il existe dix récepteurs Frizzled chez les mammifères qui possèdent un large domaine extracellulaire (N-terminal) riche en cystéines et qui interagit avec les protéines Wnt (Bhanot et al., 1996). Après la fixation de Wnt à ses récepteurs, la partie intracellulaire de LRP 5/6 est phosphorylée par au moins deux sérine-thréonine kinases constitutivement actives, la Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) et la Casein Kinase 1 (CK1), ce qui permet à la protéine d'échafaudage Axine de se fixer à la partie intracellulaire et phosphorylée de LRP 5/6 (Zeng et al., 2005). Puis la protéine Dishevelled (Dvl) se fixe à la partie cytoplasmique du récepteur Frizzled, et Dvl et l'Axine peuvent interagir via leurs domaines DIX, ce qui contribue au maintien de l'interaction entre Frizzled et LRP (Schwarz-Romond et al., 2007). L'Axine



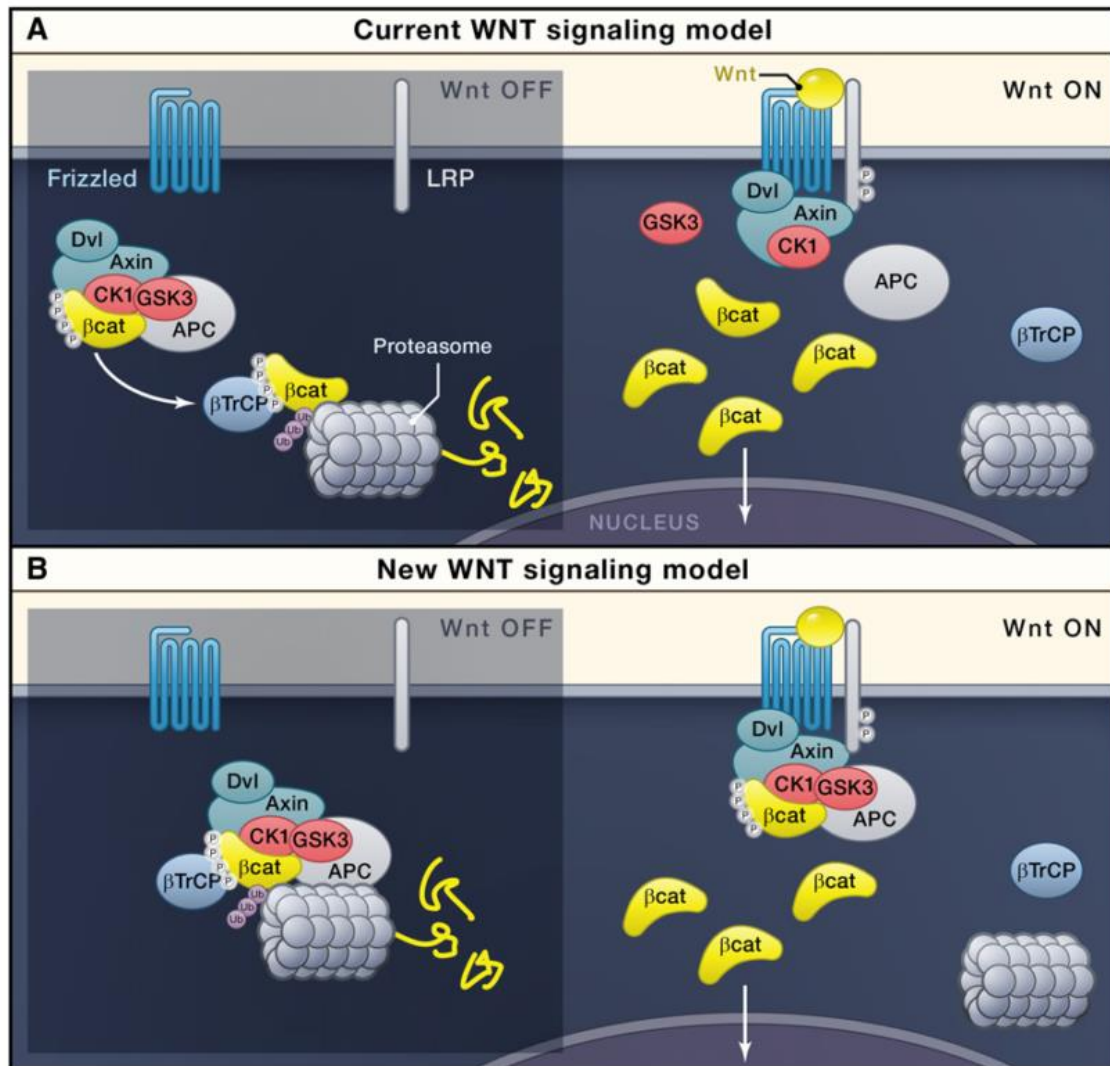
permet l'assemblage de plusieurs protéines qui vont former le complexe de phospho-destruction de la  $\beta$ -caténine dont GSK3, CK1, l'Adenomatous Polyposis Coli (APC) ainsi que la APC membrane recruitment 1/Wilms Tumor gene on the X chromosome (Amer1/WTX) dont les propriétés anti-tumorales ont été décrites respectivement dans le cancer colorectal (Korinek et al., 1997) et la tumeur de Wilms, une tumeur rénale maligne chez l'enfant (Rivera et al., 2007). APC et Amer1/WTX régule la dégradation de la  $\beta$ -caténine mais leurs fonctions moléculaires précises sont encore mal connues. Amer1/WTX participerait à la localisation cellulaire de APC (Grohmann et al., 2007) et à la phosphorylation de LRP6 induite par Wnt (Tanneberger et al., 2011).

#### b. Les mécanismes de stabilisation de la $\beta$ -caténine

Quand la voie n'est pas active et que le complexe de récepteurs Frizzled/LRP est libre, il y a peu de  $\beta$ -caténine libre dans le cytoplasme puisqu'elle est capturée par le complexe de destruction. Les kinases CK1 et GSK3 phosphorylent successivement la  $\beta$ -caténine respectivement sur les résidus Ser45, puis Thr41, Ser37 et Ser33 (Liu et al., 2002). Elle est ensuite reconnue par la  $\beta$ TrCP, une protéine appartenant à un complexe ubiquitine-ligase E3. APC pourrait d'ailleurs faciliter le transfert de la  $\beta$ -caténine phosphorylée sur ce complexe (Su et al., 2008). La  $\beta$ -caténine est par conséquent ubiquitinylée et rapidement dégradée par le protéasome (Aberle et al., 1997). Les événements qui conduisent à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine après la fixation de Wnt aux récepteurs sont assez controversés. Plusieurs modèles différents ont été décrits (Figure 8) :

- 1) Séquestration membranaire de l'Axine : Après un signal Wnt, l'Axine 1 se lie à LRP5/6 et est séquestré à la membrane plasmique, ce qui réduit sa capacité à assembler le complexe de destruction (Mao et al., 2001).
- 2) Dégradation de l'Axine : Dishevelled se lie directement à l'Axine et peut provoquer sa dégradation, notamment *via* les enzymes Tankyrase 1 et 2 (Huang et al., 2009) ou encore *via* une diminution de l'activité de la protéine Disabled-2 (Dab2) qui bloque l'interaction entre l'Axine et la protéine phosphatase 1 (PP1). En effet, PP1 régule l'activité de l'Axine en la déphosphorylant et l'empêchant d'interagir avec la GSK3 (Luo et al., 2007).

- 3) Inhibition de l'activité kinase de la GSK3 : Akt peut se lier au complexe GSK3/Axine en présence de Dvl, phosphoryler GSK3 et diminuer son activité (Fukumoto et al., 2001). Le LRP6 phosphorylé peut également inhiber l'activité de GSK3 indépendamment de la dégradation de l'Axine (Cselenyi et al., 2008).
  
- 4) Séquestration de la GSK3 : Il a été montré que l'interaction entre l'Axine et GSK3 augmente très fortement (> 20 000 fois) la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine, suggérant l'importance de la proximité cellulaire des protéines du complexe de destruction (Dajani et al., 2003). De même, bien qu'elle n'ait pas un rôle crucial dans la voie Wnt, la protéine Frat peut se lier à GSK3 et l'empêcher d'interagir avec l'Axine (Van Amerongen et al., 2005). Il a également été montré qu'un traitement des cellules avec Wnt3a provoque une relocalisation de GSK3 dans de multiples vésicules ce qui réduit son activité (Taelman et al., 2010).
  
- 5) Inhibition de l'activité de la  $\beta$ TrCP sans dissociation du complexe de destruction : Toutes les hypothèses précédentes évoquent une activation de la voie Wnt dépendante de l'inactivation/dégradation d'un membre du complexe de destruction (Axine ou GSK3). Il a été suggéré qu'après un signal Wnt, la composition du complexe de destruction Axine/GSK3-CK1 n'est pas modifiée de même que l'activité des kinases CK1 et GSK3. Dans ce modèle, le complexe est constitutivement actif, et reste actif à la membrane après un signal Wnt, mais la  $\beta$ TrCP n'est plus capable d'interagir avec la  $\beta$ -caténine et l'Axine. La  $\beta$ -caténine phosphorylée s'accumule et sature les sites du complexe de destruction, ce qui l'inactive. La  $\beta$ -caténine néo-synthétisée peut être transloquée dans le noyau cellulaire (Li et al., 2012).



**Figure 8 : Deux modèles pour l'activation de la voie Wnt.**

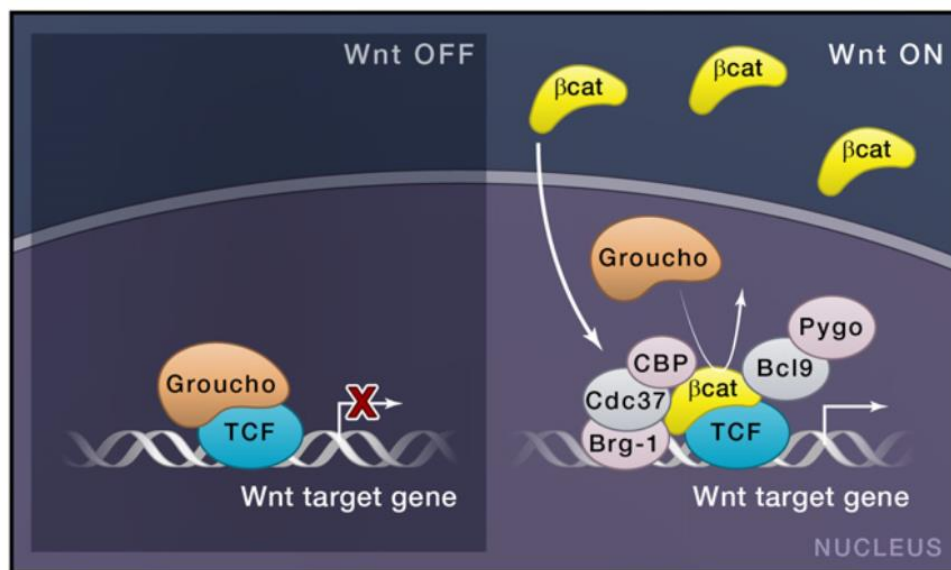
A) Dans le modèle actuel, en l'absence de signal Wnt, le complexe composé de l'Axine, GSK3/CK1 et APC présent dans le cytoplasme interagit avec la  $\beta$ -caténine et la phosphoryle. La  $\beta$ -caténine va ensuite être ubiquitinylée par la  $\beta$ TrCP et être dégradée par le protéasome. En cas d'activation de la voie, la protéine Wnt provoque l'interaction entre l'Axine et le récepteur LRP phosphorylé et le complexe de destruction est dissocié, ce qui permet à la  $\beta$ -caténine d'être stabilisée dans le cytoplasme, de s'accumuler et d'être transloquée dans le noyau cellulaire. B) Un modèle récent suggère qu'après l'activation Wnt, le complexe de destruction est toujours actif, mais c'est l'ubiquitinylation de la  $\beta$ -caténine par la  $\beta$ TrCP qui est bloquée (d'après Clevers et Nusse, 2012).

### c. Du noyau cellulaire à la transcription de gènes

La stabilisation et l'accumulation de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique permet sa translocation dans le noyau mais le mécanisme n'est pas totalement élucidé. Il a été suggéré que la  $\beta$ -caténine pouvait intégrer le noyau en interagissant directement avec des protéines des

pores nucléaires, et sortir du noyau grâce à différentes protéines telles que APC (Henderson et Fagotto, 2002), l'Axine (Cong et Varmus, 2004), la Ran Binding Protein 3 (RanBP3) (Hendriksen et al., 2005) ainsi que Rac1 et JNK2 (Wu et al., 2008).

La  $\beta$ -caténine se lie directement aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (Van de Wetering et al., 1997) qui interagissent avec des motifs consensus appelés Wnt Responsive Element (WRE) dont la séquence est 5'-SCTTTGATS-3'. En l'absence d'activation Wnt, TCF/LEF interagit avec plusieurs corépresseurs en particulier Groucho/TLE1, CtBP et HDAC1, qui maintiennent la compaction de la chromatine et la déacétylation des histones (Cavallo et al., 1998). Groucho/TLE1 interagit avec TCF/LEF et masque le site de liaison à l'ADN (Arce et al., 2009). Quand la voie Wnt est active, la  $\beta$ -caténine, qui n'interagit pas directement avec l'ADN, se lie au TCF et déplace Groucho par compétition (Daniels et Weis, 2005), puis recrute plusieurs coactivateurs de la transcription (Figure 9).



**Figure 9 : Modèle d'activation de la transcription de gènes.**

En l'absence de signal Wnt, la transcription de gènes est réprimée par la protéine Groucho qui se lie à TCF. Lorsque la cellule est activée par Wnt, la  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme, est transloquée dans le noyau où elle va déplacer Groucho et recruter des activateurs de la transcription.

La liste de ces coactivateurs est longue, et comprend des activateurs de la transcription tels que BCL9 et Pygopus (Pygo), des initiateurs de la transcription tels que Mediator (MED), des histone acétyltransférases (HAT) telles que p300/CBP (Hecht et al., 2000) et TRRAP/TIP60 (Cai et al., 2003), des histones méthyltransférases telles que MLL1/2 (Sierra et

al., 2006), des ATPases de la famille des SWI/SNF qui participent au remodelage de la chromatine ainsi que le PAF1, un complexe qui participe à la modification des histones et à l'élongation de l'ARN (Figure 10). Les événements moléculaires précis à l'origine de l'activation de la transcription des gènes sont encore méconnus, mais quelques-uns ont été décrits.

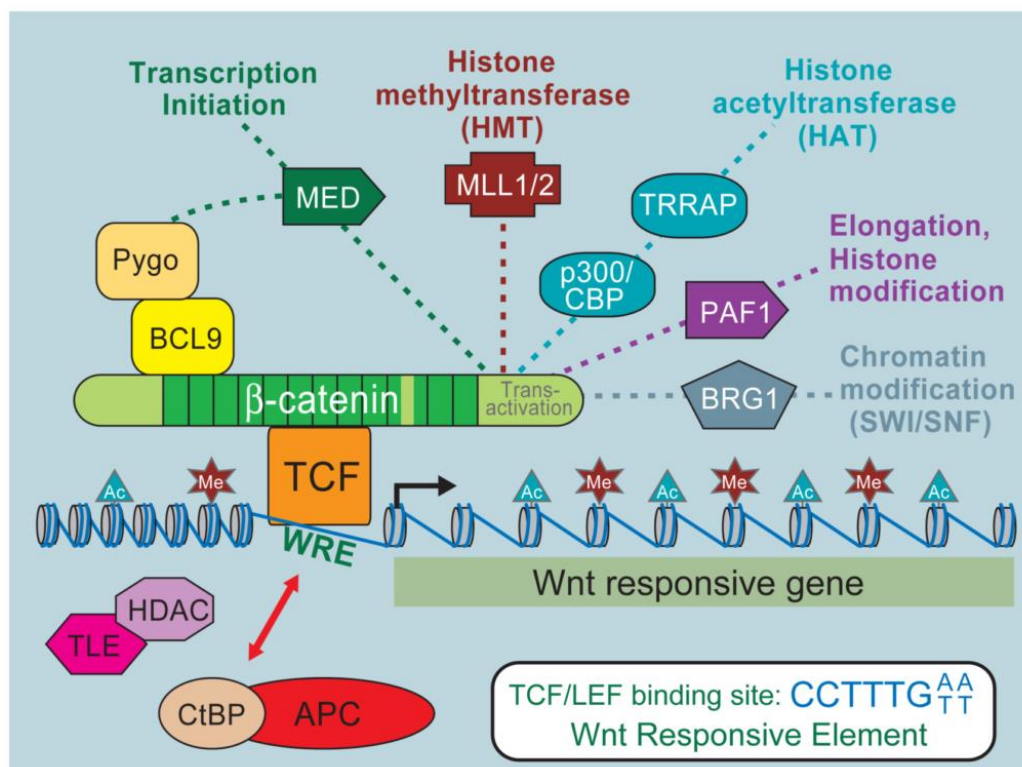
La  $\beta$ -caténine interagit avec TCF-4 par son domaine central et avec Bcl9 par son domaine N-terminal. Il a été suggéré que Bcl9 pouvait agir en favorisant l'interaction de Pygo avec la partie N-terminale de la  $\beta$ -caténine (Kramps et al., 2002). La plupart des autres protéines interagissent avec la  $\beta$ -caténine via son domaine C-terminal, ce qui crée une interface entre les activateurs/répresseurs de la transcription, la machinerie transcriptionnelle et la chromatine. Par exemple, la liaison de CBP/p300 au domaine C-terminal de la  $\beta$ -caténine provoque une acétylation des histones H3 et H4 (Lyu et al., 2011) à priori indispensable pour l'activation Wnt.

Pygo agirait en connectant le complexe activateur formé par TCF/ $\beta$ -caténine avec la machinerie transcriptionnelle, puisqu'il interagit avec MLL1/2 et participe à la triméthylation de H3K4 (Chen et al., 2010), mais il interagit également avec Mediator (Carrera et al., 2008) et TAF4 (Wright et Tjian, 2009) qui sont deux protéines physiquement liées au complexe de l'ARN Polymérase II. Pour résumer, un "phénotype" de liaison des facteurs TCF aux promoteurs et de modulation de la chromatine a ainsi été établi selon le statut d'activation de la voie Wnt. En effet, les promoteurs "Wnt-responsive" sont occupés par des TCFs, l'ADN est hypo-méthylé, l'histone H3 hyper-acétylée et la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) est triméthylée, tandis que les promoteurs "Non responsive" sont libres et l'ADN hyper-méthylé (Wöhrle et al., 2007).

De façon intéressante, une fonction nucléaire de certaines protéines du complexe cytoplasmique de stabilisation ou dégradation de la  $\beta$ -caténine a été envisagée mais reste à confirmer. Par exemple, il a été suggéré qu'APC ait un rôle de modulateur de l'action de la  $\beta$ -caténine en recrutant des corépresseurs de la transcription sur la chromatine, en particulier CtBP avec qui il interagit de façon directe (Sierra et al., 2006). Dans ce modèle, APC une fois phosphorylé par GSK-3 $\beta$  et CK1 pourrait se lier à la  $\beta$ -caténine, la déloger de son site de liaison à TCF/LEF et l'exporter hors du noyau. Il a également été décrit que Dvl-3 pouvait

jouer un rôle majeur dans l'activation de la transcription en favorisant l'interaction entre la  $\beta$ -caténine et TCF-4, ce qui nécessite son interaction directe avec la protéine c-Jun dans le noyau (Gan et al., 2008).

Pour finir, la liste des cibles transcriptionnelles activées par la voie Wnt canonique est très longue. On peut citer en exemple (liste non exhaustive) des composants de la voie Wnt tels que LEF1 (Hovanes et al., 2001), TCF1 (Roose et al., 1999), l'Axine 2 qui induit alors un rétrocontrôle négatif de la voie Wnt (Jho et al., 2002), les métalloprotéinases MMP2 et MMP9 qui ont un rôle dans la dégradation de la MEC (Wu et al., 2007) et la cycline D1 qui régule le cycle cellulaire (Tetsu et McCormick, 1999). La voie Wnt régule également la transcription de cibles d'autres voies de signalisation telles que Jagged 1 (Rodilla et al., 2009), BMP4 (J. S. Kim et al., 2002) et le récepteur à l'EGF (Tan et al., 2005), montrant la complexité des cross-talks entre ces voies.



**Figure 10 : Les protéines du complexe de transcription de la voie Wnt.**

Un signal Wnt va provoquer la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau qui va ensuite se fixer sur la région WRE et recruter un grand nombre de protéines activatrices (coactivateurs de la transcription ou modulateurs de l'état de la chromatine) (d'après MacDonald et al., 2009).

#### d. Auto-régulation de la voie Wnt : les activateurs et inhibiteurs naturels

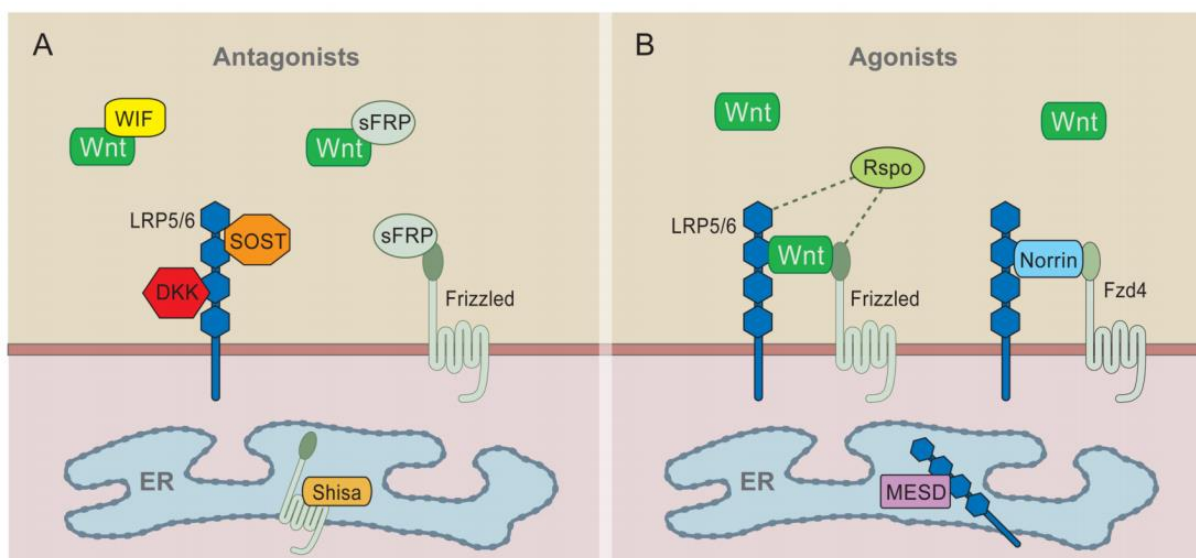
Plusieurs activateurs et inhibiteurs naturels de la voie Wnt ont déjà été décrits (Figure 11). La protéine Norrin est un ligand direct du complexe Frizzled-4/LRP5, et la co-expression de ces trois protéines induit l'activation de la voie Wnt canonique (Xu et al., 2004). Les R-spondines (Rspo) au nombre de quatre chez les vertébrés sont des protéines sécrétées caractérisées par deux domaines furine en N-terminal et un domaine thrombospondine. Les protéines Rspo2 de xénope, Rspo1 à 3 murines et Rspo2 et 3 humaines peuvent activer la voie Wnt dans un modèle *in vitro*. Les Rspo2 et 3 sont d'ailleurs co-exprimées avec des protéines Wnt lors du développement embryonnaire chez le xénope et la souris, respectivement avec XWnt8 et mWnt3 (Kazanskaya et al., 2004). La famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires Lgr5 est également impliquée dans l'activation Wnt. En effet, Lgr4 et Lgr5 peuvent se lier au complexe de récepteurs Frizzled/LRP, et Lgr4, 5 et 6 interagissent avec les Rspo et sont susceptibles de médier leurs réponses cellulaires (de Lau et al., 2011). La protéine chaperonne MESD est indispensable à la maturation de LRP5/6 dans le RE (Lighthouse et al., 2011).

Les Secreted Frizzled-Related Proteins (sFRPs) et les Wnt Inhibitory Factors (WIF) peuvent se lier aux protéines Wnt et empêcher leur interaction avec leur récepteur (Bovolenta et al., 2008). Les protéines Dickkopf (DKK) et SOST agissent en reversant l'interaction entre les récepteurs Frizzled et LRP6 (Semenov et al., 2008; Semenov et al., 2005). APCCD1 est une glycoprotéine qui peut inhiber Wnt en se liant à Wnt ou à LRP (Shimomura et al., 2010). Les antagonistes Chibby et ICAT peuvent interagir avec la  $\beta$ -caténine et rompre la liaison entre celle-ci et TCF (Li et al., 2008; Tago et al., 2000). Il a également été montré que l'activation de la voie Wnt s'accompagne de l'augmentation de la transcription de l'Axine 2 et Dkk1 et d'une diminution de la transcription de Frizzled et LRP6 ce que constitue un feedback négatif (MacDonald et al., 2010). La protéine Shisa agit dans le RE en séquestrant la forme non mature de Frizzled, empêchant ainsi sa translocation vers la membrane cellulaire (Yamamoto et al., 2005).

Aussi, les facteurs de transcription TCF et LEF peuvent avoir un rôle soit activateur (LEF1) soit répresseur de la transcription (TCF3). TCF1 et TCF4 par exemple ont montré des rôles à la fois activateur et répresseur de la transcription en fonction du type cellulaire (Cadigan et Waterman, 2012). La transcription des facteurs TCF/LEF peut également être



activée ou réprimée par la voie Wnt elle-même, puisque tous les promoteurs TCF/LEF (sauf celui pour TCF3) contiennent des domaines WREs prédits, et cette régulation a au moins été validée pour TCF1 et LEF1 (Li et al., 2006; Roose et al., 1999). De façon intéressante, des études ont également montré l'existence de mutants dominants négatifs pour TCF4. En effet, *via* des Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) dans les introns des gènes pouvant changer l'efficacité de splicing ou *via* des modifications alternatives de l'ADN (polyadénylation), il est possible d'aboutir à la synthèse de formes de TCF4 tronquées pour les domaines de liaison à l'ADN ou à la  $\beta$ -caténine (Kennell et al., 2003; Locke et al., 2011). Ces polymorphismes ont d'ailleurs été associés au cancer du colon mais également au diabète de type 2 (Grant et al., 2006). Enfin, plusieurs kinases ont été identifiées telles que HIPK2 et TNIK qui sont recrutées sur les WREs et favorisent respectivement la dissociation de TCF3 de ses séquences cibles et l'activation de TCF4 (Hikasa et al., 2010; Shitashige et al., 2010).



**Figure 11 : Les activateurs et inhibiteurs de la voie Wnt.**

Les répresseurs WIF, sFRP et DKK agissent par compétition en se liant soit aux ligands Wnt et/ou aux récepteurs Frizzled et LRP5/6. Les agonistes des récepteurs Wnt tels que la Norrin et Rspo agissent en se liant à Frizzled et LRP. Shisa et MESD agissent dans le RE pour respectivement séquestrer Frizzled et assurer la maturation de LRP5/6. (d'après MacDonald et al., 2010).



### 3. Implication de la voie *Wnt* dans le développement des valves

Le rôle de la voie *Wnt* canonique dans le développement et l'homéostasie des valves est encore peu décrit. Il a cependant été montré dans l'initiation de l'EMT ainsi que la prolifération des cellules mésenchymateuses et la maturation des valves dans différents modèles *in vivo* et *in vitro*.

#### a. Implication dans l'établissement des progéniteurs cardiaques

Curieusement, la voie *Wnt* jouerait précocement un rôle bivalent dans la spécification et la différenciation des cellules lors du développement du cœur. En effet, un rôle activateur de la voie *Wnt* canonique a été démontré dans l'établissement du mésoderme lors de la formation de l'axe antéropostérieur chez les vertébrés (Huelsen et al., 2000; Liu et al., 1999) et lors de la prolifération des progéniteurs cardiaques *via* *Wnt2* (Tian et al., 2010). En revanche, la répression de la voie *Wnt* canonique semble indispensable à la différenciation des cellules du mésoderme en progéniteurs cardiaques puisqu'elle s'accompagne de la surexpression d'inhibiteurs de la voie *Wnt* tels que *Sfrp1* et *Sfrp5* (Chen et al., 2008), ou *Dkk-1* et *Frizzled-8* (Yamashita et al., 2005) dans des modèles *in vitro* de cellules souches embryonnaires. L'inhibition de la voie *Wnt* est également requise pour la différenciation terminale des progéniteurs cardiaques en cardiomyocytes (Qyang et al., 2007; Zhu et al., 2008). Un modèle a été établi selon lequel durant la valvulogénèse, la voie *Wnt*/ $\beta$ -caténine pourrait maintenir un pool de cellules dans un état non différencié et provoquer un environnement (sécrétion de facteurs de croissance) propice à l'induction de l'EMT (Bosada et al., 2016).

#### b. Implication dans l'EMT

Les premiers résultats montrant la participation de la voie *Wnt* dans l'EMT ont été mis en évidence grâce à des souris TOPGAL (exprimant le gène de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle des promoteurs TCF/LEF) à différents stades du développement des coussins endocardiques (Gitler et al., 2003). A E11.5 et E12.5, l'activité *Wnt* est très localisée et restreinte au niveau des coussins endocardiques dans les régions du TE et du CAV, suggérant l'importance de cette voie de signalisation dans l'EMT. Cette expression très localisée au niveau de l'endocarde du CAV a été également confirmée dans des embryons de poulet pour *Wnt9a* et *Frzb* qui ont des effets antagonistes sur la prolifération des cellules mésenchymateuses lors de l'EMT (Person et al., 2005). L'expression de *Frzb1* dans les

coussins endocardiques pendant l'EMT a également été décrite chez l'embryon de xénope (Lee et Saint-Jeannet, 2009).

Les modèles animaux invalidés pour des acteurs de la voie Wnt ont permis de révéler leur rôle. Ainsi, les cellules endocardiques d'embryons de souris déficients en  $\beta$ -caténine ne sont plus capables de subir l'EMT (Liebner et al., 2004). De plus, l'induction de la production d' $\alpha$ -SMA (marqueur de différenciation/EMT) par le TGF- $\beta$ 2 dans ces cellules est diminuée, signe d'un cross-talk entre les voies Wnt et TGF- $\beta$  lors de la formation des valves. A l'inverse, chez le *zebrafish*, un KO de APC induit une augmentation de l'expression des cibles de la voie Wnt *bmp4* et *versican* dans le myocarde et *notch1b* et *has2* dans l'endocarde provoquant un excès d'EMT (Hurlstone et al., 2003).

### c. Implication dans la maturation des valves

Le rôle de la voie Wnt dans l'élongation et le remodelage des valves n'a été que très peu décrit. De façon intéressante, il a été montré que l'expression de plusieurs protéines de la voie Wnt est particulière et différentielle au cours du développement des valves. En effet, chez la souris, on observe à E12,5 une augmentation de l'expression de gènes activateurs de la voie Wnt tels que *Wnt2*, *Wnt4*, *Wnt5b*, *Wnt9b*, *Lef1*, *Dvl2*, *Dkk1* et *Fzd2*, tandis qu'à E17,5 ce sont plutôt des gènes inhibiteurs de la voie Wnt qui sont surexprimés tels que *Wisp1*, *Wif1*, *Apc* et *Dkk3*, suggérant là encore le rôle bivalent de la voie Wnt dans la maturation des valves (Alfieri et al., 2010).

La modulation de l'expression des acteurs de la voie Wnt par l'invalidation d'autres gènes a également permis d'élucider son rôle. Ainsi l'invalidation de *Tbx20* dans l'endocarde chez la souris provoque à E12.5 une réduction de l'expression de *Wnt7b*, *Wnt9b* et *Lef1*, et l'apparition de valves moins longues et moins cellularisées (Cai et al., 2013). Cependant, aucune différence dans la taille des coussins endocardiques n'est constatée à E10.5 entre contrôle et mutant, ce qui suggère que *Tbx20* n'est pas requis pour l'initiation de l'EMT. De même, l'invalidation du facteur de transcription *Nkx2-5* chez la souris induit une diminution de l'expression de *Rspo3* (agoniste de Wnt) avec pour conséquence une diminution de l'activation de Wnt et de la taille des coussins endocardiques du TE à E12.5 (Cambier et al., 2014), suggérant le rôle de *Nkx2-5* dans la prolifération des cellules.

A présent, le problème soulevé par plusieurs études sur le rôle de la voie Wnt canonique dans l'EMT est qu'il est difficile d'attribuer les effets d'un KO endocardique de la  $\beta$ -caténine à un défaut de transcription TCF/LEF plutôt qu'à un défaut de maintien des jonctions adhérentes au niveau de l'épithélium cellulaire, puisque la  $\beta$ -caténine est impliquée dans ces deux mécanismes. En effet, il existe un cross-talk entre ces deux processus. D'une part la voie Wnt canonique va augmenter l'expression des facteurs de transcription Snail, Slug et Twist et des protéases MMP3, MMP7 et ADAM10 qui respectivement répriment l'expression de la E-cadhérine et la clivent, ce qui diminue les adhésions cellule-cellule et favorise l'EMT. D'autre part, Twist augmente également l'expression de la N-cadhérine, et la voie Wnt canonique augmente l'expression de la fibronectine et la laminine et favorise au contraire les adhésions cellule-matrice (Heuberger et Birchmeier, 2010). La régulation peut également se faire dans l'autre sens, puisqu'il a été montré que le clivage des cadhérines par ADAM10 favorisait la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et la transcription de ses gènes cibles (Maretzky et al., 2005). Aussi, la caténine p120 peut se lier au répresseur de la transcription TCF/LEF Kaiso et le séquestrer dans le cytoplasme et/ou le déplacer de son promoteur cible (Park et al., 2005).

Une récente étude a utilisé un modèle de souris transgénique avec une expression conditionnelle de *Dkk1*, un inhibiteur spécifique de la voie Wnt canonique (Bosada et al., 2016). Cette étude révèle qu'à E10.5, ces embryons de souris ont un défaut de formation des coussins endocardiques du TE mais pas du CAV, ce qui suggère que l'effet observé dans les études montrant un défaut d'EMT au niveau du CAV dans un modèle de souris déficient en  $\beta$ -caténine (Liebner et al., 2004) est davantage dû à un défaut du maintien de l'intégrité de l'épithélium dans l'endocarde qu'à un réel défaut de la voie Wnt canonique. De façon intéressante, l'expression de l'*Axine2*, *Lef1* et la  *$\beta$ -caténine* est plus importante dans le myocarde du TE dès E9.5, ce qui suggère que la voie Wnt canonique pourrait agir dans le myocarde en provoquant la sécrétion de molécules nécessaire à l'EMT. De plus, l'expression de l'*Axine2* (à la fois cible transcriptionnelle et répresseur de la voie Wnt) augmente progressivement dans le myocarde et le mésenchyme des coussins endocardiques du TE et du CAV entre E13.5 et 18.5, ce qui suggère pour la première fois un rétrocontrôle négatif de la voie Wnt canonique qui pourrait participer à l'arrêt de la prolifération cellulaire et de l'expansion des valves. Ces données sont confortées par un modèle de souris KO déficiente pour l'*Axine 2* qui montre des feuillets de la valve mitrale plus larges à E13.5.

#### 4. Wnt et pathologies valvulaires

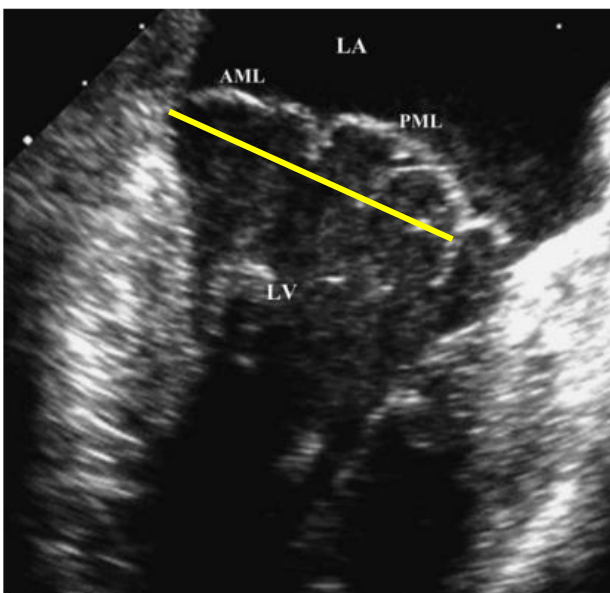
La voie Wnt a d'ores et déjà été impliquée dans plusieurs pathologies notamment dans certains types de cancers (Reya et Clevers, 2005) et dans le diabète de type 2 (Savic et al., 2011) mais son implication dans les dysfonctionnements des valves est encore peu identifiée. Il a été montré que l'expression génique et protéique du récepteur LRP5 est augmentée dans des valves aortiques calcifiées de même que dans des valves mitrales myxoïdes (Caira et al., 2006). Des VICs issues de valves aortiques d'embryons de poulets (E14) traitées avec un milieu ostéogénique ( $\beta$ -glycérophosphate + acide ascorbique) montrent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'ostéogénèse et la calcification des valves tels que les gènes codant la périostine (*POSTN*), la matrix-gla protein (*MGP*), *Runx2*, l'alkaline phosphatase (*ALP*) et l'ostéocalcine (*OCN*). Il a été montré que l'activation de la voie Wnt est indispensable et suffisante pour l'augmentation significative de l'expression de *POSTN* et *MGP* dans ces cellules, suggérant une fois encore le rôle de la voie Wnt dans la calcification des valves (Alfieri et al., 2010).

### III. Le prolapsus valvulaire mitral (PVM)

#### 1. Symptômes et dépistage du PVM

La prévalence du PVM est de 2.5% dans la population générale (Mozaffarian et al., 2015). Si la plupart des patients ne présente pas ou peu de symptômes cliniques (fatigue, anxiété, essoufflement, *etc*), cette pathologie peut néanmoins être associée à des insuffisances et arrêts cardiaques, des arythmies, des endocardites voire au décès des patients chez 20% des cas lorsque la régurgitation mitrale est modérée à sévère (Levine et al., 2016). Pour des raisons encore méconnues, la prévalence du PVM est plus importante chez les jeunes femmes de 20-29 ans tandis que la prévalence chez les hommes est constante (Freed et al., 2002).

Historiquement, le PVM a premièrement été identifié en 1887 par Cuffer et Barbillon qui décrivait un « clic » suivi d'un « murmure » entendus en milieu et fin de systole lors de l'auscultation (Grau et al., 2007). Le « clic » vient du mouvement anormal de la valve mitrale suivi par le « murmure » provoqué par le flux turbulent de sang qui revient dans l'oreillette gauche. Le PVM est défini selon les cardiologues par une protrusion  $\geq 2$  mm d'un ou des deux feuillets de la valve dans l'atrium gauche en systole sur une coupe longitudinale para-sternale grand axe (Figure 12). La coaptation des deux feuillets de la valve n'est alors plus effective ce qui entraîne une régurgitation mitrale modérée à sévère. D'autres paramètres échocardiographiques sont déterminés tels que l'épaisseur (2-3 mm), la longueur des feuillets (22-23 mm pour le feuillet antérieur et 12-13 mm pour le feuillet postérieur), le diamètre de l'anneau mitral (28-30 mm), et la sévérité de la régurgitation mitrale. En effet, chez les patients atteints de PVM, les feuillets sont généralement épaissis, allongés et l'anneau mitral est élargi.



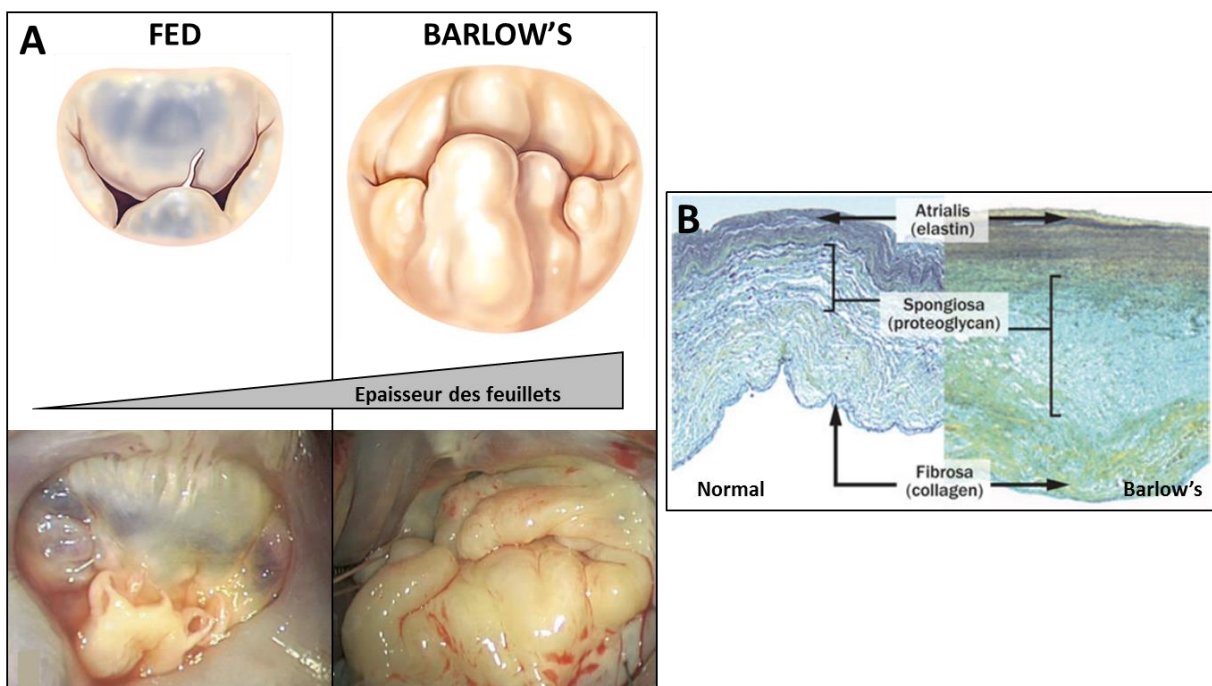
**Figure 12 : Echocardiographie d'un prolapsus valvulaire mitral**

Les deux feuillets de la valve mitrale prolapsent au-dessus du plan de l'anneau mitral dans l'atrium gauche. La ligne jaune représente le plan de fermeture normal des feuillets. LA : atrium gauche ; LV : ventricule gauche ; AML : feuillet mitral antérieur ; PLM : feuillet mitral postérieur (modifié d'après Grau et al., 2007).

## 2. Anatomie et histologie du PVM

Pour des raisons encore méconnues, lors du développement de la pathologie, les cellules interstitielles de valves (VICs) vont être activées et produire une MEC désorganisée. Il existe deux formes de pathologies mitrales dégénératives reliées à deux types de changements de la MEC durant le développement de la pathologie (Figure 13) :

- La dégénérescence myxoïde également appelée maladie de Barlow est caractérisée par un excès de tissu conjonctif myxomateux, des feuillets valvulaires épaissis et jaunâtres, une dilatation de l'anneau mitral et parfois une rupture ou au contraire le plus souvent une calcification des cordages tendineux. Le remodelage de la MEC montre alors une accumulation des protéoglycans et une fragmentation des fibres de collagène et d'élastine. L'épaisseur de la valve est définie par le degré de fibrose au niveau de l'*atrialis* et de l'accumulation de protéoglycans.
- La dégénérescence fibro-élastique (FED) est caractérisée par des valves de taille normale ou plus fine qui ont la particularité d'être translucides, une dilatation de l'anneau mitral modérée et des ruptures de cordages fréquents. Le remodelage de la MEC montre alors une déficience en collagène, élastine et protéoglycans.



**Figure 13 : Différences anatomiques et histologiques entre FED et Barlow's**

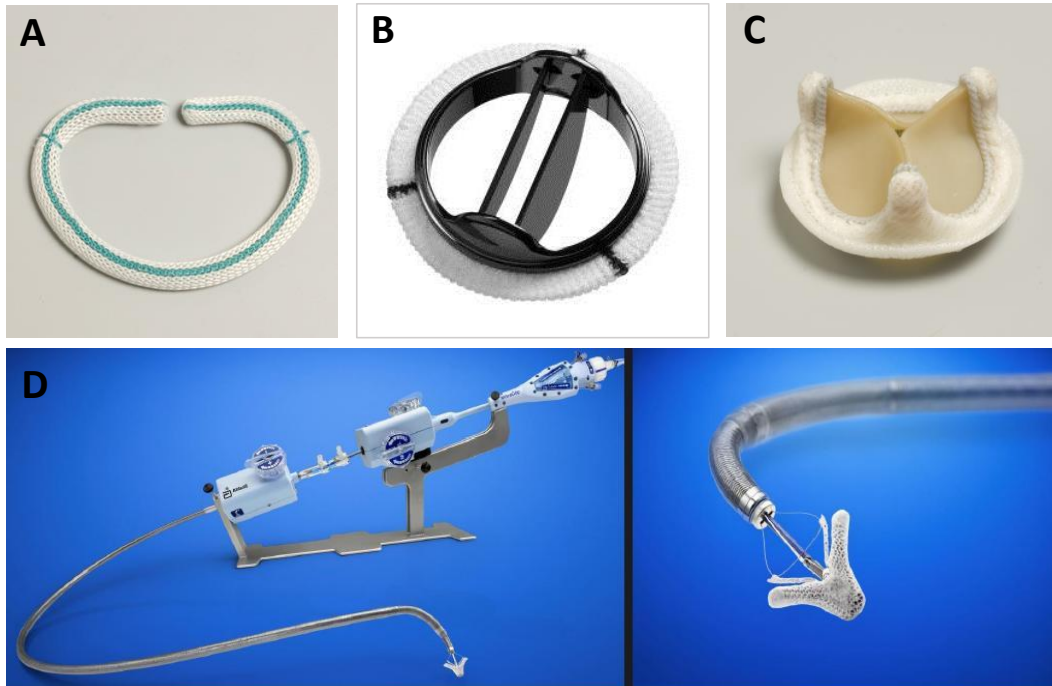
A) La FED est caractérisée par des feuillets de la valve mitrale plus fins et translucides, tandis que la maladie de Barlow's est caractérisée par des feuillets épaissis B) Des feuillets myxoïdes montrent une accumulation de protéoglycans dans la *spongiosa* au détriment des couches *atrialis* et *fibrosa* (modifié d'après Anyanwu et Adams, 2007 ; Levine et al., 2016 ; Adams et al., 2010).

### 3. Traitement du PVM

Il est possible à ce jour de traiter les complications liées aux valvulopathies (médicaments anti-arythmiques, anticoagulants, antibiotiques...) mais aucun traitement médicamenteux ne permet de retarder la chirurgie des valves. Les seuls traitements sont la réparation ou le remplacement de la valve qui sont choisis en fonction de l'importance de la fuite ou de la sténose et de l'état de dégradation des valves :

- La réparation valvulaire chirurgicale : 1) La commissurotomie consiste à pratiquer des incisions entre les feuillets qui sont épaissis et soudés ensemble 2) La décalcification permet de retirer l'excès de calcium sur les feuillets de la valve 3) l'annuloplastie permet de diminuer le diamètre de l'anneau mitral soit en le suturant, soit en fixant un nouvel anneau prothétique (Figure 14A).
- Le remplacement valvulaire chirurgical : 1) La prothèse mécanique en métal, carbone, céramique ou plastique est fixée aux tissus cardiaques du patient par un anneau prothétique. Si ces valves ont une durée de vie très importante, le patient devra néanmoins suivre un traitement anticoagulant à vie afin de prévenir la formation de caillots et le risque de thrombose (Figure 14B) 2) La prothèse biologique provient de tissu animal (valve porcine ou péricarde bovin) ou humain (allogreffe ou autogreffe, prélèvement d'une valvule pulmonaire). Ces valves biologiques ont l'avantage de ne pas nécessiter de traitement anticoagulant (sauf dans les 3 mois suivants la pause) mais ont une durée de vie limitée de 10 à 15 ans environ (Figure 14C).
- La réparation valvulaire non chirurgicale : 1) la valvuloplastie par un ballonnet fixé sur un cathéter placé à l'intérieur de la valve sténosée permet d'élargir l'ouverture des feuillets ou de briser les tissus calcifiés lorsqu'on gonfle le ballonnet 2) De nouveaux types de réparation non chirurgicale ont été récemment développés, par exemple le MitraClip®, une pince métallique introduite *via* un cathéter dans l'artère fémorale et qui permet de maintenir les bords des feuillets de la valve mitrale entre eux et ainsi éviter les fuites (Figure 14D).





**Figure 14 : Différents types de prothèse pour la chirurgie des valves**

A) Un anneau prothétique permet de diminuer le diamètre de l'anneau mitral B) Les prothèses mécaniques ou C) biologiques permettent le remplacement de la valve défectueuse D) La technologie MitraClip® permet d'insérer une pince métallique *via* un cathéter par l'artère fémorale jusqu'à l'oreillette gauche et de maintenir la base des feuillets mitraux pour ainsi réduire la fuite.

#### 4. Génétique du PVM

Le PVM a longtemps été décrit comme une pathologie dégénérative, mais l'existence de formes congénitales tend à montrer que des facteurs génétiques sont impliqués. La plupart des cas de PVM sont sporadiques mais il existe néanmoins de nombreuses formes familiales. Le PVM existe en effet de façon isolée ou fait partie de désordres syndromiques.

##### a. Génétique des formes syndromiques du PVM

Le syndrome de Marfan est une maladie rare qui concerne 1/5000 individus et est caractérisé par une combinaison de symptômes cardiovasculaires (dilatation de l'aorte, PVM dans 28% des cas (Taub et al., 2009), *etc.*), musculo-squelettiques (grande taille, arachnodactylie, déformation scoliothique, *etc.*), ophtalmologiques (myopie axiale) et pulmonaires (pneumothorax). La grande majorité des syndromes de Marfan est la conséquence d'une mutation hétérozygote dans le gène *FBNI* qui code pour la fibrilline 1, une protéine qui est la principale composante des myofibrilles dans la MEC (Dietz et al., 1991).



Le syndrome de Williams dont la prévalence est de 1/25 000 est caractérisé par des dysfonctions cardiaques (sténose aortique supra-valvulaire), des retards psychomoteurs et une dysmorphie du visage. L'apparition du syndrome est apparentée à la délétion du gène *ELN* codant pour l'élastine, une protéine structurale de la MEC et composant principal des fibres élastiques.

Le syndrome de Loeys-Dietz est quant à lui caractérisé par des problèmes cardiovasculaires tels que des anévrismes et dissections aortiques, des tortuosités artérielles, un PVM dans 29% des cas et des anomalies faciales avec entre autres un hypertélorisme (élargissement de la distance interpupillaire) et une division labiale ou palatine. Cette pathologie est associée à des mutations dans les gènes *TGFBR1* et *TGFBR2* codant pour les récepteurs 1 et 2 du TGF- $\beta$ . De plus, une mutation dans le gène *MADH3* qui code pour la protéine Smad3 de la voie du TGF- $\beta$  a été associée à une autre forme du syndrome de Loeys-Dietz : le syndrome d'arthrose-anévrisme (van de Laar et al., 2011). Il est intéressant de noter que dans ces trois pathologies (Marfan, Loeys-Dietz et arthrose-anévrisme) est observée une sur-activation de la voie du TGF- $\beta$  (Levine et al., 2016).

L'ostéogénèse imparfaite également appelée « maladie des os de verre » (1/10 000 à 1/20 000 individus, caractérisée principalement par une faible masse et une fragilité osseuses) et le syndrome d'Ehlers-Danlos (1/5000 à 1/10 000 individus, caractérisé principalement par une hyper-élasticité de la peau et une hyper-laxité articulaire) sont associés à des mutations dans les gènes *COL1A1* et *COL1A2* pour l'ostéogénèse imparfaite, et *COL3A1* pour le syndrome d'Ehlers-Danlos. Ces gènes codent respectivement pour les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du collagène de type 1 et la chaîne  $\alpha 1$  du collagène de type 3, des protéines majeures présentes dans les MEC qui confèrent leur résistance à l'étirement.

Gène	Syndrome	Référence
<b><i>FIBRILLIN-1 (FBN1)</i></b>	Marfan	(Dietz et al., 1991)
<b><i>ELASTIN (ELN)</i></b>	Williams	(D. Y. Li et al., 1997)
<b><i>TGF<math>\beta</math>Receptor-1 (TGFBR1)</i></b>	Loeys-Dietz	(Loeys et al., 2006)
<b><i>COLLAGEN-1 (COL1A1)</i></b>	Osteogenesis imperfecta	(Starman et al., 1989)
<b><i>COLLAGEN-3 (COL3A1)</i></b>	Ehlers-Danlos	(Superti-Furga et al., 1988)

**Tableau 1 : Récapitulatif des gènes impliqués dans les formes syndromiques de PVM (modifié d'après Hinton et Yutzey, 2011)**

## b. Génétique des formes non syndromiques du PVM

Bien que les valvulopathies aient été longtemps décrites comme des pathologies dégénératives, l'existence de formes familiales et de cas congénitaux démontre la forte implication de facteurs génétiques. L'étude de formes familiales a permis l'identification de variants rares associés au PVM. Plus récemment, il a été mis en évidence que des variants fréquents, dont l'effet individuel est faible, peuvent également contribuer au développement de la pathologie.

### 1) Implication des variants rares

Les études génétiques des formes familiales non syndromiques de PVM ont d'ores et déjà permis d'identifier plusieurs gènes causaux. Une forme récessive de prolapsus mitral liée à l'X a été premièrement décrite par Monteleone et Fagan en 1969 puis par Newbury-Ecob en 1993. Grâce aux investigations génétiques sur une grande famille française d'environ 300 individus, le premier gène responsable d'une forme familiale non syndromique de PVM a été découvert à l'institut du thorax à Nantes (Kyndt et al., 2007). Il s'agit du gène *FLNA* codant pour la Filamine A, une protéine impliquée dans la structure et l'organisation du cytosquelette d'actine.

Le séquençage du gène *FLNA* de la première famille puis d'autres cas de PVM a permis d'identifier quatre mutations (p.P637Q d'une part, puis p.G288R, p.V711D et p.H743P) et une délétion de 182 acides aminés. Les mutations p.G288R et p.P637Q induisent des défauts d'adhésion, d'étalement et de migration cellulaires, et ces défauts sont dus à une dérégulation de la balance des GTPases RhoA et Rac1 en faveur de RhoA potentiellement via l'altération de l'activité de la protéine FilGAP, une GAP spécifique de Rac (Duval et al., 2014). De plus, une autre étude a permis de montrer que les variants p.G288R, p.P637Q et p.H743P perturbent l'interaction entre la FlnA et PTPN12 (PTP-PEST), une tyrosine phosphatase impliquée dans les réponses cellulaires au stress mécanique (Duval et al., 2015 publication en 2<sup>ème</sup> auteur, voir Annexe 2).

De façon intéressante, le séquençage du gène *ARHGAP24* qui code pour FilGAP dans une cohorte de 95 patients atteints de dégénérescence fibro-élastique a permis d'identifier trois nouvelles mutations potentiellement causales : p.R95Q, p.P417H et p.T481M. Il a été montré que ces mutations sont perte de fonction et provoquent alors une augmentation de l'activité de Rac (Duval et al., en cours d'écriture).

Récemment, deux mutations p.P197L et p.R2513H qui sont perte de fonction ont été identifiées dans le gène *DCHS1* chez des patients atteints de PVM (forme autosomique dominante) par une approche de séquençage d'exome dans trois familles (Durst et al., 2015). Le gène *DCHS1* code pour l'homologue humain de dachsous chez la drosophile, une protéine impliquée dans la polarité cellulaire et membre de la superfamille des cadhérines. La souris *Dchs1*<sup>-/-</sup> montre des feuillets de la valve mitrale épaissis et plus longs en particulier le feuillet postérieur. Les mutations altèrent la stabilité de la protéine et augmentent la migration des cellules dérivées de l'épicarde dans le feuillet postérieur entre E15.5 et E17.5, affectant leur organisation et leur alignement au sein de la valve.

Les nouvelles technologies de séquençage à haut débit se sont considérablement développées ces dernières années, et permettent de séquencer les régions codantes (exome) et même le génome entier des individus. Ces technologies accélèrent l'identification de variants potentiellement impliqués dans le PVM. Cette approche d'analyse génétique à haut débit sur des familles atteintes de PVM conduit à l'identification de plusieurs variants candidats au sein d'une même famille.

Récemment au laboratoire à Nantes, ces analyses ont permis d'identifier par séquençage d'exome des variants rares dans **deux nouveaux gènes potentiellement causaux, *LRRFIP1* et *PTPRF***, sur lesquels j'ai effectué mon travail de thèse et qui sont présentés dans la suite de ce manuscrit.

2) Implication des variants fréquents

Une étude d'association génome entier (GWAS) a récemment permis d'identifier six loci de prédisposition au PVM (Dina et al., 2015). Deux gènes, *TNSI* et *LMCD1*, retrouvés au sein des six loci ont été choisis par rapport à leur expression cardiaque et leur relevance dans les processus développementaux des valves, puis investigués par des approches fonctionnelles. Ces études montrent notamment une augmentation significative du taux de régurgitation valvulaire chez des *Zebrafish* invalidés pour ces gènes qui codent respectivement pour la Tensine 1 et la « LIM and cysteine-rich domain 1 », deux protéines essentielles dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine.

# PROJET 1 -

Étude de l'implication du gène *LRRFIP1*  
dans le Développement Valvulaire Mitral

**Projet 1 : Étude de l'implication du gène *LRRFIP1* dans le Développement  
Valvulaire Mitral**

Caractérisation d'une nouvelle isoforme *LRRFip1-iso1*

Dans mon premier projet, j'ai caractérisé le rôle et les fonctions d'une nouvelle isoforme humaine de *LRRFIP1* qui n'a pas encore été décrite à ce jour, LRRFip1-iso1.

J'ai travaillé sur des modèles de réexpression cellulaire afin de les faire surexprimer une forme taguée HA (Hémagglutinine) de LRRFip1. J'ai utilisé d'abord pour tout l'aspect moléculaire et biochimique des HEK 293, puis pour l'aspect fonctionnel un modèle de culture primaire de VICs de rat.

Mon travail, qui fait l'objet d'une publication a permis d'identifier LRRFip1-iso1 comme un (co-)facteur de transcription de la voie de signalisation Wnt canonique de part 1) sa localisation nucléaire 2) sa forte activation des promoteurs TCF/LEF 3) son interaction avec la  $\beta$ -caténine 4) son activation/répression de cibles transcriptionnelles en lien avec la voie Wnt canonique et le développement cardiaque (TCF7, SFRP2, NOV). En collaboration avec José-Luis De la Pompa (Madrid), un modèle de *zebrafish* KO pour l'orthologue de LRRFip1-iso1 suggère l'implication de cette protéine dans la voie Wnt.

Ces données nous permettent de supposer un rôle de *LRRFIP1* dans le développement et l'homéostasie des valves de part sa forte expression dans le coeur et les valves cardiaques à des stades précoces de l'embryogénèse et son rôle d'activateur de la voie Wnt canonique et de régulateur de cibles transcriptionnelles importantes dans le développement du coeur et des valves.

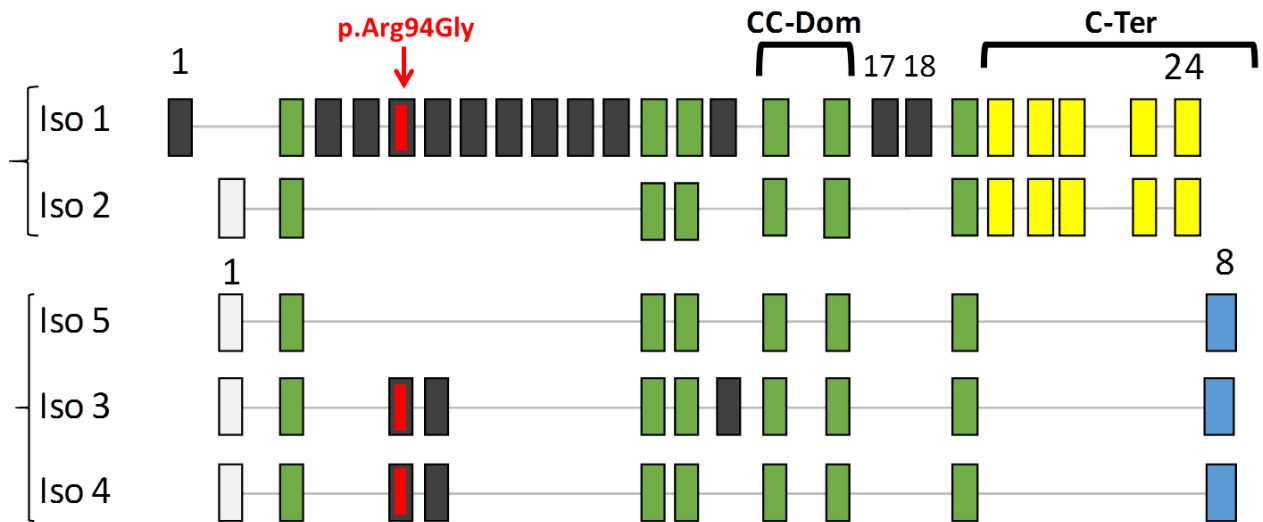
## ***Introduction Projet 1 – Étude de l'implication du gène LRRFIP1 dans le développement valvulaire***

Un séquençage d'exome a permis d'identifier un variant d'intérêt dans une famille atteinte de PVM : p.Arg94Gly dans le gène *LRRFIP1* (voir partie III des résultats). Ce variant est le meilleur candidat de par 1) sa ségrégation dans la famille 2) la participation de LRRFip1 à des voies de signalisation (voie Wnt canonique, réponse au stress mécanique) impliquées dans la valvulogénèse. La caractérisation biochimique et fonctionnelle de l'isoforme 1 humaine de *LRRFIP1* fait l'objet d'une publication qui sera prochainement soumise au journal *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* (voir partie I des résultats).

### **I. LRRFip1 : structure et rôles de la protéine**

#### **1. Structure du gène/protéine LRRFip1**

Cinq isoformes de la protéine LRRFip1 (Leucine Rich-Repeat in Flightless-Interacting Protein 1) sont déterminées chez l'homme par épissage alternatif du gène *LRRFIP1* (Figure 15). Parmi ces cinq isoformes, seulement trois sont susceptibles de porter la mutation p.R94G (iso1, 3 et 4). Toutes les isoformes comportent un domaine coiled-coil qui a déjà été décrit comme participant à l'interaction de LRRFip1 avec la protéine Flightless-1 impliquée dans la voie Wnt (Liu et Yin, 1998; Nguyen et Modis, 2013). Il est important de relever que les isoformes 3, 4 et 5 présentent une forte homologie structurale. L'isoforme 1 se différencie par la présence de sept exons spécifiques avant le domaine coiled-coil et deux exons 17-18 juste après le domaine coiled-coil. Elle comporte également une partie C-terminale différente des isoformes 3, 4 et 5. L'isoforme 2 quant à elle est très proche de la structure de l'iso5 mais comprend la partie C-terminale de l'iso1. Chez la souris, il existe trois isoformes de *LRRFIP1*. Il est intéressant de noter que l'isoforme 2 murine présente une très forte homologie avec l'isoforme 1 humaine (86%). L'homologue de l'isoforme 5 humaine est l'isoforme 1 murine, appelée également FLAP-1.



**Figure 15 : Épissage alternatif de *LRRFIP1* humain.**

Les rectangles correspondent aux exons. Les domaines coiled-coil (CC-Dom) et C-terminal (C-Ter en jaune pour LRRFip1-iso1 et 2 et en bleu pour LRRFip1-iso3, 4 et 5) sont représentés. Les exons en verts sont ceux communs à toutes les isoformes. Le variant p.R94G qui ne cible que les isoformes 1, 3 et 4 est représentée en rouge.

## 2. Expression tissulaire et cellulaire de LRRFip1

L'expression tissulaire et cellulaire de LRRFip1 humaine a été partiellement caractérisée puisque des expériences d'hybridation ARN ont révélé l'expression très ubiquitaire d'un ARNm de 4.2 Kb qui correspond à l'isoforme 5 (GCF2). LRRFip1-iso5 est également exprimé dans de nombreuses lignées cancéreuses et différenciellement exprimé dans le cytoplasme et le noyau cellulaire suivant les lignées cellulaires utilisées (Rikiyama et al., 2003).

Plusieurs publications relèvent que le poids moléculaire de 160 kDa observé par migration de la protéine LRRFip1-iso3-4-5 sur un gel SDS-page ne correspond pas au PM attendu (83 kDa). Des expériences de dichroïsme circulaire, de SAXS (Diffusion des rayons X aux petits angles) et de chromatographie en colonne d'exclusion ont révélé que la partie C-terminale de l'iso5 est peu structurée avec une forme dépliée et/ou très allongée et flexible, ce qui freinerait la migration sur gel. Le coiled-coil a également été caractérisé comme un domaine avec 10 répétitions d'heptades et 22 hélices alpha capable de se dimériser et d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques (Nguyen et al., 2013).



### 3. Rôles de la protéine LRRFip1

Toutes les données sur la protéine LRRFip1 humaine ciblent exclusivement les isoformes 3, 4, et 5 respectivement appelées LRRFip1, TAR RNA interacting protein (TRIP) et GC-Binding Factor 2 (GCF2) (Gubern et al., 2014).

LRRFip1-iso5 a été initialement décrite ainsi que son homologue murin FLAP-1 comme interagissant dans des expériences de double-hybride avec la protéine Flightless-1 humaine (Fong et al., 1999; Liu et al., 1998). Cette étude a également identifié LRRFip2, une protéine comprenant 3 isoformes chez l'homme dont l'isoforme 1 présente le plus d'homologie avec LRRFip1-iso1 (48%). Ces protéines interagissent avec le domaine LRR (Leucine Repeat, motif d'interaction protéine-protéine retrouvé dans de multiples fonctions cellulaires) de Fli-1 via son domaine coiled-coil.

#### a. Rôle dans la répression de la transcription de gènes

LRRFip1-iso5/GCF2 a été principalement décrit comme répresseur de la transcription de gènes. Ainsi, LRRFip1-iso5 se lie au promoteur de l'EGFR (mais également au SV40 et RSV) et réprime sa transcription (Reed et al., 1998). Le domaine de liaison de LRRFip1-iso5 au promoteur de l'EGFR a depuis été caractérisé et concerne les acides aminés (aa) compris entre 429 et 528 (sur 752) dans le domaine C-terminal de LRRFip1 (Rikiyama et al., 2003). LRRFip1-iso5 réprime aussi l'activité du TNF- $\alpha$  en se liant seul ou avec le facteur de transcription Ets-1 à son promoteur. L'expression de LRRFip1 est également induite par le phorbol myristate acetate (PMA) et le lipopolysaccharide (LPS) qui sont des activateurs du TNF- $\alpha$  ce qui suggère l'implication de LRRFip1 dans une boucle de rétrocontrôle (Suriano et al., 2005).

LRRFip1-iso5 réprime également la transcription du promoteur du facteur de croissance plaquettaire PDGF-A (Platelet-Derived Growth Factor A chain, un facteur mitogène et chémoattractant exprimé dans de nombreux types cellulaires) après une « blessure » mécanique dans des cellules musculaires lisses vasculaires et provoque une diminution de leur prolifération (Khachigian et al., 1999) à court terme. En revanche, une deuxième étude montre que LRRFip1-iso5, dont l'expression est régulée par le micro-ARN miR-132, a un effet pro-prolifératif sur ces cellules musculaires lisses à plus long terme (Choe et al., 2013). Ces résultats suggèrent le rôle important de LRRFip1-iso5 dans la prolifération des cellules vasculaires. Enfin, LRRFip1-iso5 réprime le promoteur du gène *Igf2* impliqué dans la méthylation de l'ADN (Eden et al., 2001).

LRRFip1-iso5 a également été impliqué dans l'ischémie cérébrale. En effet, il réprime le promoteur du transporteur de glutamate *EAAT2* (aussi nommé GLT-1) humain transfecté dans des astrocytes de rats ischémiques (Mallolas et al., 2006). Chez le rat, trois isoformes de LRRFip1 présentant une forte homologie avec les isoformes de souris : rLRRFip1 (84% d'homologie avec l'isoforme 1 murine), rFLAP-1 (homologue avec l'isoforme 2 = FLAP-1 murine) et CRA\_g (forte homologie avec l'isoforme 3 murine et respectivement 87 et 97% d'homologie avec les isoformes 1 et 2 humaines) ont été caractérisées (Gubern et al., 2014). De plus, un knock-down de rLRRFip1 dans des astrocytes de rat diminue l'expression des formes phosphorylées de la  $\beta$ -caténine (Ser552), Akt (Ser473) et m-TOR (Ser2448), ainsi que de GLT-1.

#### b. Rôle dans les réponses du système immunitaire

Les rôles de LRRFip1-iso5 et LRRFip1-iso3 ont été également décrits dans les réponses du système immunitaire.

En effet, LRRFip1-iso3 humain augmente l'expression de IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  dans des monocytes humains stimulés avec du LPS. Sa phosphorylation et son adressage vers les lysosomes contenant des ARN ont été impliqués dans ces réponses immunitaires (Arakawa et al., 2010). De plus, une étude a montré que chez la souris, l'isoforme 3 active la production d'INF- $\beta$  via son interaction avec la  $\beta$ -caténine et sa phosphorylation (Ser552) dans des macrophages murins infectés par *Listeria monocytogenes* (P. Yang et al., 2010).

Enfin, l'homologue murin de LRRFip1-iso5, FLAP-1, interagit avec la protéine d'échafaudage MyD88 (intervenant dans les réponses à une stimulation par un Toll Like Receptor) après stimulation avec du LPS et active la voie NF- $\kappa$ B (Dai et al., 2009).

LRRFip1-iso4 humain a été décrit comme une protéine ayant une forte affinité envers les ARN db riches en motifs GC, avec qui il interagit via un domaine supposé entre les aa 388 et 510 (Wilson et al., 1998), qui correspond également au domaine d'interaction avec le promoteur de l'EGFR décrit dans l'étude de Rikiyama et al., 2003. Ces données confirment le rôle de la partie C-terminale de LRRFip1-iso3, 4 et 5 dans sa liaison avec les acides nucléiques. Son interaction avec la molécule d'ARN TAR, le site de liaison à la protéine Tat du virus HIV-1, a été caractérisée en premier d'où le nom donné de TAR RNA Interacting Protein, TRIP. L'interaction entre Fli-1 et LRRFip1-iso4 a aussi été confirmée. TRIP est exprimée dans la plupart des tissus et est localisée dans le cytoplasme des cellules.

c. Rôle dans la voie Wnt

De nombreuses études ont démontré l'implication de LRRFip1-iso5 dans la voie de signalisation Wnt canonique. En effet, LRRFip1-iso5 interagit via son domaine coiled-coil (aa entre 42 et 208) avec le domaine PDZ de Dvl-2 et Dvl-3, des protéines cruciales pour l'activation de la voie Wnt, et ces protéines sont co-localisées dans le cytoplasme et autour du noyau cellulaire (Ohtsuka et al., 2011). LRRFip1-iso5 active la voie Wnt canonique et est également co-localisée avec les protéines du complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine telles que APC, l'Axine et GSK-3 $\beta$ . Un knock-down de LRRFip1-iso5 provoque une augmentation de l'expression de GSK-3 $\beta$  et de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine (alors ciblée pour sa dégradation par le protéasome) suggérant que LRRFip1 pourrait réguler la stabilisation de la  $\beta$ -caténine (Douchi et al., 2015).

De même, un modèle a été développé selon lequel FLAP-1, l'homologue murin de LRRFip1-iso5, participe à un complexe nucléaire avec les trois facteurs de transcription p300, GRIP-1 et la  $\beta$ -caténine qui est recruté sur les sites TCF/LEF pour activer la transcription des gènes. Fli-1 agirait comme un inhibiteur de ce complexe en séquestrant FLAP-1 (Lee et al., 2006). De façon intéressante, LRRFip2 interagit également avec Dvl-3 et active la voie Wnt canonique dans l'embryon de xénope, provoquant ainsi l'expression de gènes cibles de la voie Wnt impliqués dans le développement de l'axe dorso-ventral tels que *Siamois* et *Xnr3* (Liu et al., 2005).

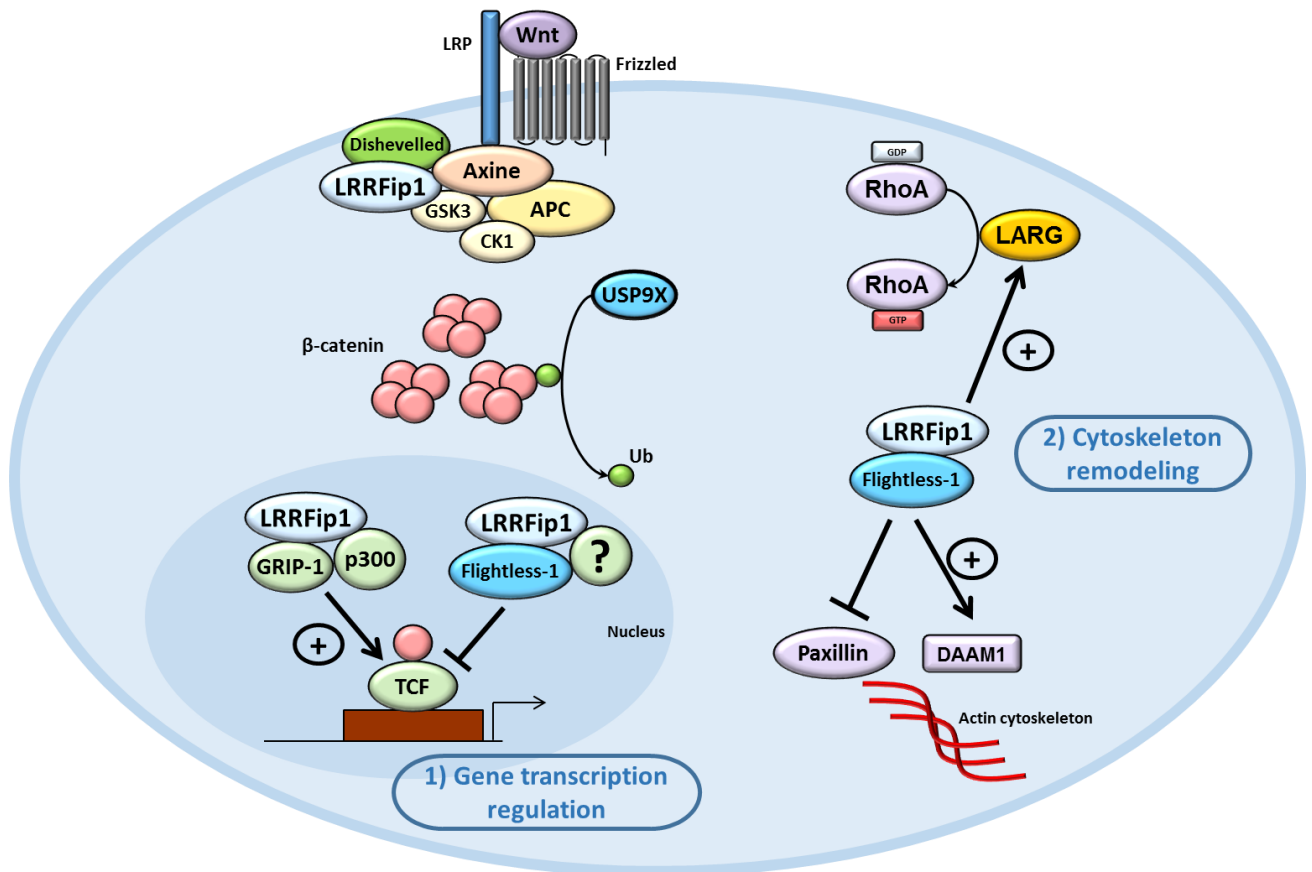
d. Rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine

Le rôle de LRRFip1-iso5 dans les processus de migration, adhésion et invasion cellulaires a aussi été établi, suggérant son implication dans le développement de métastases lors des cancers. En effet, LRRFip1-iso5 interagit avec Fli-1 qui est impliquée dans l'inhibition du turn-over des points focaux d'adhésion par diminution de la phosphorylation de la paxilline (Kopecki et al., 2011). Fli-1 interagit également avec DAAM1 et mDia1, deux formines participant à l'assemblage des filaments d'actine, et augmente leur activité (Higashi et al., 2010). Une autre étude a montré que le knock-down de LRRFip1-iso5 entraîne le recrutement de la  $\beta$ -caténine ainsi que de la E-cadhérine à la membrane plasmique. L'expression des gènes Snail, Slug et Twist (facteurs de transcription connus pour diminuer l'expression de la E-cadhérine) est fortement diminuée, suggérant un rôle possible de LRRFip1 dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Douchi et al., 2015).

LRRFip1-iso5 active également RhoA et augmente la migration cellulaire induite par une activation avec Wnt-3a. Ce même résultat a été observé dans des cellules HeLa ainsi que dans des cellules DLD-1 mutées pour la protéine de la voie Wnt canonique APC (domaine de liaison à l'Axine inactif) suggérant que l'activation de RhoA par LRRFip1-iso5 est indépendante de la voie Wnt canonique (Ohtsuka et al., 2011). Dans ce sens, un knock-down de LRRFip1-iso5 a également montré une inhibition de la migration cellulaire dans des lignées de cellules pancréatiques cancéreuses (Douchi et al., 2015). De même, l'injection de cellules HT29 KO pour LRRFip1-iso5 dans la rate de souris SCID (Severe Combined Immunodeficient) induit la diminution de la formation de tumeurs métastatiques dans le foie (Ariake et al., 2012). Le knock-down de LRRFip1-iso5 dans ces cellules induit une diminution de l'adhésion à certains composants de la MEC comme le collagène I, la fibronectine et la vitronectine, une diminution de l'invasion des cellules et de leur migration. Le rôle précis de LRRFip1 quant à l'activation de RhoA a également été précisé puisque cette étude montre que LRRFip1-iso5 interagit avec LARG (Leukemia Associated RhoGEF), une GEF de RhoA.

e. Rôle dans la différenciation musculaire

Récemment, une équipe a identifié la protéine SRSF10 comme étant impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif de LRRFip1 (Wei et al., 2015). En effet, l'inclusion des exons 16 et 17 de LRRFip1-iso2 chez la souris (homologues des exons 17 et 18 chez l'iso1 humaine) est muscle-spécifique. Cette étude montre que LRRFip1-iso2-ex17-18 est exprimée dans le cœur embryonnaire et adulte et dans le muscle squelettique de souris, et que son expression dans un modèle de myoblastes murins C2C12 augmente lors de la différenciation des cellules en myofibrilles. De plus, un KO de SRSF10 ou de LRRFip1-iso2-ex17-18 dans des C2C12 provoque l'augmentation de l'expression de *SFRP2* et *NOV*, deux cibles connues pour réprimer la différenciation musculaire (Anakwe et al., 2003; Sakamoto et al., 2002). Cette étude suggère un rôle important de LRRFip1 dans la différenciation musculaire et le développement cardiaque.



**Figure 16 : Récapitulatif des rôles cellulaires de LRRFip1-iso5 dans la voie Wnt et la régulation du cytosquelette.**

1) LRRFip1 régule positivement la voie de signalisation Wnt canonique en formant un complexe activateur nucléaire avec les facteurs de transcription GRIP1 et p300 qui va être recruté par la β-caténine. Fli-1 inhibe la formation de ce complexe activateur en séquestrant LRRFip1. La protéine USP9X facilite la déubiquitination de la β-caténine et participe à sa stabilisation. 2) LRRFip1 active LARG, une GEF de RhoA, et pourrait également réguler l'activité de Flightless-1 sur la paxilline et DAAM1, participant ainsi au remodelage du cytosquelette d'actine.



## ***Résultats Projet 1 – Étude de l'implication du gène LRRFIP1 dans le développement valvulaire***

### **I. Caractérisation de LRRFip1-iso1 (Article)**

Mon travail autour de la caractérisation biochimique de l'isoforme 1 humaine de *LRRFIP1* et de son rôle dans la voie de signalisation Wnt canonique fait l'objet d'une publication en 1<sup>er</sup> auteur qui est en cours de rédaction (voir manuscrit ci-après) et sera soumise très prochainement à la revue *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*.





**The alternatively spliced LRRFIP1 Isoform-1 is a key regulator of the Wnt/ $\beta$ -catenin transcription pathway.**

Pauline Labbé<sup>1</sup>, Emilie Faure<sup>2</sup>, Simon Lecointe<sup>3</sup>, Soléna Le Scouarnec<sup>1</sup>, Florence Kyndt<sup>3</sup>, Marie Marrec<sup>3</sup>, Thierry Le Tourneau<sup>3</sup>, Bernard Offmann<sup>4</sup>, Cécile Duplaà<sup>5</sup>, Jean Jacques Schott<sup>1,4</sup>, Stéphane Zaffran<sup>2</sup>, Jean Merot<sup>1\*</sup>.

1- l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

2- Aix Marseille Univ, INSERM, GMGF, Marseille, France

3- l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

4- UMR CNRS 6286, UNIV Nantes, Nantes, France.

5- INSERM, Biology of cardiovascular diseases, U1034, F-33600 Pessac, France

Corresponding author

Dr MEROT Jean.  
Institut du Thorax.  
INSERM UMR1087, CNRS 6291  
8 Quai Moncoussu  
44007 Nantes Cedex.  
France  
Email : jean.merot@univ-nantes.fr  
Tel 33 (0)2.28.08.01.64/ Fax 33 (0)2.28.08.01.30

## **Abstract.**

The GC-rich Binding Factor 2/Leucine Rich Repeat in the Flightless 1 Interaction Protein 1 gene (*GCF2/LRRFIP1*) is predicted to be alternatively spliced in five different isoforms. Although important peptide sequence differences are expected to result from this alternative splicing, to date, only the gene transcription regulator properties of LRRFIP1-Iso5 were unveiled. Based on molecular, cellular and biochemical data, here we show that the five isoforms define two molecular entities with different expression profiles in human tissues, subcellular localizations, oligomerization properties and transcription enhancer properties of the canonical Wnt pathway. We demonstrated that LRRFIP1-Iso3, -4 and -5, which share over 80% sequence homology, are primarily located in the cell cytoplasm and form homo and hetero-multimers between each other. In contrast, LRRFIP1-Iso1 and -2 are primarily located in the cell nucleus in part thanks to their shared C-terminal domain. Furthermore, we showed that LRRFIP1-Iso1 is preferentially expressed in the myocardium and skeletal muscle. Using the *in vitro* Topflash reporter assay we revealed that among LRRFIP1 isoforms, LRRFIP1-Iso1 is the strongest enhancer of the  $\beta$ -catenin Wnt canonical transcription pathway thanks to a specific N-terminal domain harboring two critical tryptophan residues (W76, 82). In addition, we showed that the Wnt enhancer properties of LRRFIP1-Iso1 depend on its homo-dimerisation which is governed by its specific coiled coil domain. Together our study identified LRRFIP1-Iso1 as a critical regulator of the Wnt canonical pathway in myocyte suggesting a role in myocyte differentiation and myogenesis.

## **Introduction.**

The GC-rich Binding factor 2/Leucine rich repeat in the Flightless 1 interaction protein 1 gene (*GCF2/LRRFIP1*) was first identified as encoding a 752-amino acid (aa) protein. Studies by Fong and de Couet revealed its abundant expression in most human tissues except brain, heart and skeletal muscle [1, 2]. In addition to the 4.2 kbp mRNA described by Fong and Couet, subsequent studies and comprehensive human genome sequencing revealed extensive alternative splicing of the transcripts that gives rise to at least five LRRFIP1 isoforms. However, most of the structural and functional studies conducted to date focused on the initially identified 752 aa long protein corresponding to LRRFIP-isoform-5 (LRRFIP-Iso5).

LRRFIP-Iso5 was shown to participate in different cellular functions ranging from gene transcription regulation to actin cytoskeleton remodeling and thus to be involved in carcinogenesis, developmental processes or immune response. For example, LRRFIP-Iso5 binds to the promoter regions of EGFR, PDGF and TNF- $\alpha$  and repress their transcription [3-5]. It also binds exogenous viral nucleic acids in cells' cytosol and increases the expression of IFN- $\beta$  involved in immune response through interactions with  $\beta$ -catenin. In fact, the LRRFIP1-Iso5/ $\beta$ -catenin complex binds to the C-terminal domain of the transcription factor IRF3 which in turn increases IFN- $\beta$  expression [6]. LRRFIP1-Iso5 interacts with  $\beta$ -catenin as well as Flightless1 (Fli1) and Dishevelled (Dvl) which are also implicated in Wnt canonical and non-canonical Planar Cell polarity (PCP) pathways. Indeed, opposing effects of Fli-1 and LRRFIP1-Iso5 in  $\beta$ -catenin and LEF1/TCF-mediated transcription were reported [1, 7].

On the other hand, the interactions with the key determinant of Wnt downstream cascades Dvl mediate the activation of the small RhoA GTPase involved in the Wnt PCP pathway [8]. Although the molecular mechanisms remain to be fully established, the modulation of RhoA activation by the guanine nucleotide exchange factor RhoGEF (LARG)

seems to participate to the metastatic potential of LRRFIP1 in colorectal cancer [9]. Very recently, Wei et al identified *LRRFIP1* gene as a target of the splicing factor SRSF10 during striated muscle development and showed that the inclusion of alternative exons 16 and 17 of mouse *LRRFIP1* is a muscle-specific event essential for myoblast differentiation [10].

The structural features of LRRFIP1 were recently investigated in details by Nguyen and Modis [11]. Consistent with its dual ability to participate in complex signaling networks and to interact with nucleic acids, they identified two main structural entities in LRRFIP1. Notably, they showed that the Fli1 and Dvl interacting domain of LRRFIP1 forms a classic parallel coiled coil domain (CC-Dom) containing a leucine zipper that assembles in soluble homodimers. This coiled coil domain is flanked by an elongated carboxy-terminal (C-Ter), partially unfolded domain which confers LRRFIP1 a high molecular weight (220 kDa) and the ability to assemble into higher order oligomers in solution. Indeed, this C-Ter domain [10] harbors the DNA and RNA binding domains of LRRFIP1 involved in EGFR, TNF- $\alpha$  transcriptional regulation and constitutes the cytosolic nucleic acid sensor of LRRFIP1 when it modulates interferon production of macrophages in response to viral infection [2, 6, 12].

Importantly, as mentioned above, *LRRFIP1* gene is predicted to be spliced in at least 4 other isoforms. Based on the exon splicing pattern in human Refseq database and protein sequence alignment analysis, two molecular subgroups emerge: one containing Isoform-1 and 2 (Iso1 and Iso2) and the other: Iso3, Iso4 and Iso5 (Fig 1A). Although, some light was shed on LRRFIP1-Iso5 structure, oligomerisation properties, function and expression profile, little is known on the properties of the other isoforms and, in particular, on Iso1-2 subgroup [10].

In the present study we analyzed the properties of these isoforms and showed that the two subgroups indeed define two distinct molecular entities with different subcellular localizations, oligomerization properties and expression profiles. In addition, we unveil the

unique molecular characteristics of LRRFIP1-Iso1 which place it as a key regulator of the Wnt canonical transcription pathway.

## **Materials and methods.**

### Plasmid constructions and reagents

The cDNA encoding the human Iso1, 3, 4 and 5 of LRRFIP1 obtained from Genscript were C-terminally tagged with HA or Myc and then sub-cloned in pcDNA3 vector. LRRFIP1-Iso2 was obtained by sub-cloning the N-terminal Iso5 region encoding M1-S234 peptide in place of Iso1 M1-S480 coding region using the SalI restriction site shared by the two isoforms. All the mutant constructs used here were made using PCR based mutagenesis kit (Quickchange or Q5 kits from Agilent Technologies and New England Biolabs, respectively). TopFlash TCF-LEF luciferase reporter assay plasmid was a kind gift of Dr. C. Dupl a (INSERM U1034, Pessac, France). Polyclonal antibodies for GAPDH (1:10 000) and HRP-conjugated antibodies (1:10 000) were purchased from Santa Cruz Biotchnology. Monoclonal antibodies were purchased from Roche (HA, 1:2000), Millipore (MYC, 1:1000; Active-beta-catenin, 1:500, phospho-Histone H2A.X, 1:1000), Sigma-Aldrich (Total beta-catenin, 1:3000) and Santa Cruz (Lamin A/C, 1:1000; ERK, 1:1000),

### Cell culture and transfection.

HEK293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptoMycin. The cells were transfected using Lipofectamine (Invitrogen) or Genecellin (BiocellChallenge) according to the manufacturers' specifications. Primary culture of valvular interstitial cells were prepared from four 7-weeks-old Sprague Dawley rat males. Briefly, dissected mitral valve leaflets were digested overnight with collagenase II (200U/ml, Lifetechnology) and seeded on 2kPa collagen coated 35mm dish (Cell Guidance System) for 2 passages and then on regular plastic petri dishes. Cells were used between passages 4-6 and transfected by electroporation according to the manufacturer's recommendations (Nucleofector, Lonza).

### RT-PCR.

Human multiple tissue panel of cDNA was purchased from Clontech (MTC Panel D). The following forward (F) and reverse (R) isoforms specific *LRRFIP1* primers were used: Iso1-F: 5'-CGTAAGGAGTGAACGGGATG -3'; Iso1-R: 5'GTCTGTCCCGTTTTCCAAGA -3'; Iso2-F: 5'-GGGAGATCGACTGTTTGAGC -3'; Iso2-R: 5'CCGTTTCATCAACCAGCTTTT-3'; Iso3-F: 5'AGATTCAGGATGTAGAAGGCAAA-3'; Iso3-R: 5'-TCACCAGCAGGGAATACCTC-3'; Iso4-F: 5'GCAGCAGAAGGAGGAAGACA -3'; Iso4-R: 5'AGTCCTTGATTTCCCTGATGG-3'; Iso5-F: 5'GGCAGCAGAAGGAGGTAGAA-3'; Iso5-R: 5'CCACTTCACTGGCTCTTCCTA -3'. For GAPDH we used GAPDH-F: 5'-TTCATTGACCTCAACTACATGGT-3'; GAPDH-R: 5'-CTCAGTGTAGCCCAGGATGCCCTT-3'. Specific Hum-LRRFIP1-Iso1 QPCR expression profiling using forward 5' ACAGCAGAAACAGGCGAGTTC 3' and reverse: 5' TCTAAGATCATCCCGTTCACTCC 3' primers was made using standard methods.

### Co-immunoprecipitation and immunoblotting.

HEK293 cells transfected with C-terminally HA or MYC-tagged LRRFIP1 WT or mutants were lysed in: 100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaF, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 1X protease inhibitor cocktail (Roche) and lysates clarified by centrifugation (21,000g for 10 min at 4°C). To immunoprecipitate endogenous Dvl-1 or Fli-1, 0.5-1.0 mg of cell lysates were incubated with 3 µg of anti-Dvl1 or anti-Fli1 antibody cross linked to 12.5 µL of protein A conjugated magnetic beads (Dynabeads, Invitrogen). HA-tagged LRRFIP1 was immunoprecipitated using Pierce anti-HA magnetic beads (20 µL) (Life Technologies). Lysates were incubated for 2 h at 4°C, the immunoprecipitates washed three times with lysis buffer and eluted in 1X Laemmli sample buffer (Bio-Rad) for 10 min at 95°C. Eluted proteins were denatured for 5 min at 95°C in the presence of 10 mM DTT, separated by SDS-PAGE

and transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad Transblot). Immunoblots were probed with appropriate antibodies and revealed using enhanced chemiluminescence kit (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Life Technologies). Chemiluminescence signals were quantified using an Imager system (Roche Diagnostic) and the data normalized with respect to GAPDH.

#### Cell fractionation.

Subcellular protein fractionation of HEK293 cells transfected with LRRFIP1 constructs was performed using Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen) according to the manufacturers' specifications.

#### TCF/LEF reporter luciferase assay.

Cells were transfected with TopFlash TCF-LEF Firefly luciferase assay plasmid (0.25 µg) and LRRFIP1 WT or mutants (0.25 µg) for 48 h and lysed in Passive Lysis buffer 5X (Promega). Lysates were clarified by centrifugation (13000 rpm for 3 min at RT). The luminescence was measured using a Victor X3 spectrophotometer (PerkinElmer) and the Luciferase assay kit (Promega) according to the manufacturer's specifications. In each experiment, LRRFIP1 expression was assessed by western blotting and normalized with respect to GAPDH detection. TopFlash construct containing mutant TCF binding promoter was used as a control. Renilla plasmid co-transfection (0.1 µg) with Firefly was used in a set of experiments to normalize variations in transfection efficiencies.

#### Immunofluorescence.

Cells were plated for 24h on coverslips, washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min. They were permeabilized with ethanol absolute for 30 min, incubated with anti-MYC antibody (1/1000) overnight and then with Alexa 488 conjugated secondary antibody



for 1h. Samples were mounted in Prolong gold and observed on a microscope equipped for epifluorescence (Zeiss).

#### Whole mount *in situ* Hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization was performed as previously described [13]. The riboprobes used in this study were generated by PCR amplification with the following primers: ms-Lrrfip1-Iso1: 5'-AGGAAATTGTGGAGAAAGTGGG-3' and 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAACCTGTTGCTCACATTTGG-3'; and ms-Lrrfip1-Iso2: 5'-CATCGAGCAGTGGATGGAAGA-3' and 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTGCCATATTCTGAGGGTG-3'. Hybridization signals were then detected by alkaline phosphatase (AP)-conjugated anti-DIG antibodies (1/2000; Roche), which were followed by color development with NBT/BCIP (magenta) substrate (Promega). After staining, the samples were washed in PBS and post-fixed. Embryos were photographed using a Zeiss Axiozoom coupled to an Axiocam digital camera (AxioVision 4.4, Zeiss). A minimum of three embryos was examined at each stage.

#### 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 one and two-ways ANOVA and Mann Whitney tests: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

## Results

### **The five alternatively spliced LRRFIP1 variants are differentially expressed in human tissues.**

Refseq gene database indicates that human *LRRFIP1* gene can be spliced in five alternative isoforms (Fig 1A). Interestingly, although the five isoforms (Iso) share six common exons, two of which encode a coiled-coil structural domain (CC-dom), two groups of spliced variants emerge (Fig 1A and Supplemental data S1). LRRFIP1-Iso5 together with Iso3 and Iso4 share over 80% peptide sequence homology whereas LRRFIP1-Iso1 shares 79% homology with Iso2 but only 53% with Iso5 (Supplemental data S1). To ascertain the effective alternative splicing of *LRRFIP1* gene, we investigated the expression profile of the predicted LRRFIP1 isoforms by RT-PCR in a panel of human tissues using isoform specific primers (Fig 1A and B). The results show that in fact, alternative splicing of *LRRFIP1* gives rise to the five predicted mRNA isoforms that were readily amplified and whose sequence was confirmed by amplicon sequencing (not shown). Furthermore, differential processing was clearly established between the tested tissues. LRRFIP1-Iso5 was detected in all the tested organs except brain. Iso3 and 4 were barely amplified in our conditions. Iso3 in lung and heart, and Iso4 preferentially in lung. On the other hand, LRRFIP-Iso2 was readily detected in most tissues but brain, liver and skeletal muscle while LRRFIP1-Iso1 was preferentially expressed in brain, muscle and heart. As far as heart is concerned, semi quantitative PCR experiments showed that Iso1 was expressed at low level in non-contractile tissues (mitral valve) compared to left and right ventricles or right atrium (Fig 1C). Consistent with previous studies [10], *in situ* hybridization confirmed the predominant expression of the Hum-LRRFIP1-Iso1 ortholog in mouse (Ms-LRRFIP1-Iso2) in embryonic hearts and somites between embryonic days E8.5 to E10.5 (Fig 1D). Note that the Hum-Iso5 ortholog (Ms-LRRFIP1-Iso1) was poorly detected at E10.5 (Fig 1D and legend).

These results show that *LRRFIP1* is differentially spliced in human tissues and suggest that the variants may define two molecular subgroups.

### **LRRFIP1-Iso1 is a nuclear protein with specific oligomerisation properties.**

Because the five isoforms share the CC-dom involved in LRRFIP1-Iso5 oligomerisation (Fig 1A), we analyzed the capacities of LRRFIP1 isoforms to form homo and heterodimers [11]. First, the five C-terminally HA-tagged isoforms were transfected in HEK293 cells and analyzed by western blotting (Fig 2A). Consistent with the existence of two molecular subgroups, LRRFIP1-Iso1 and Iso2, but not Iso3, -4 and -5, were detected according to their expected apparent MWs. LRRFIP1-Iso1 and -2 were detected around 85 and 50 kDa (73 and 45 kDa predicted MWs, respectively). On the other hand, Iso3, -4 and -5 appeared as single bands (150-180 kDa) despite their expected MWs ranged between 89, 86 and 83 kDa, respectively [8, 11].

Oligomerisation properties of the five isoforms were then investigated in co-immunoprecipitation experiments. Myc-tagged LRRFIP1-Iso5 was co-transfected with the five HA-tagged isoforms and immunoprecipitated using anti-Myc antibody. Consistent with previous studies [11], the results show that Iso5 forms homo-multimers (Fig 2B, (left hand blots lane 5). It also forms hetero-multimers with Iso3 and -4 and to a lower extent with Iso2 but not with Iso1 (lanes, 3, 4, 2 and 1, respectively). Similar oligomerisation profiles were obtained with Iso3 and -4 (not shown). The peculiar oligomerisation properties of Iso1 were then directly assessed. As illustrated on the right-hand blots (Fig 2B), Myc-tagged Iso1 only co-immunoprecipitated Iso1 and -2 but not Iso3, -4 or -5. Control immunoprecipitations confirmed that the anti-Myc antibody did not immunoprecipitate HA-tagged LRRFIP1s (Fig 2B, lanes 6 and 12).

In order to determine whether structural determinants and/or distinct subcellular localizations govern the oligomerisation process of the isoforms, cell fractionation experiments were conducted to analyze their cytoplasmic and nuclear distributions. The results show that Iso1 and -2 were preferentially detected in the nuclear fraction of the cells whereas the Iso3, -4 and -5 are mostly localized in the cytoplasmic fraction (Fig 3A). Microscope observation confirmed the preferential nuclear and cytoplasmic localizations of Iso1 and -5, respectively (Fig 3B). Considering that Iso2 appears as a chimera made of the N-terminus and CC-dom of Iso5 fused to the C-Ter of Iso1, suggests that either the C-Ter of Iso1 participates to its nuclear localization and/or that the C-Ter of Iso5 impedes its nuclear targeting. In fact, we showed that the deletions of Iso1 and Iso5 C-termini suppress their preferential nuclear and cytoplasmic targetings respectively (Fig 3C). Consistent with the idea that their subcellular localization participates to the specific subunit assemblies of LRRFIP1-Iso1 and 5, the C-terminally truncated isoforms exhibit reduced homo-dimerisation capacities (Fig 3D). However, the exclusive co-immunoprecipitation profile of Iso1 suggests that structural determinants also contribute to its subunit assembly.

Secondary structure predictions indicate that Iso1 differs from the four other LRRFIP1 isoforms by two specific features: a) a long unfolded N-terminal domain (aa 60-255) and b) an  $\alpha$ -helix forming domain (aa 382-441 encoded by exons 17 and 18/24). We focused on this later domain because secondary structure prediction analysis showed that it enlarges the CC-dom of Iso1 (Fig S2) which was previously shown to be crucial in LRRFIP1-Iso5 oligomerisation [11]. Indeed, co-immunoprecipitation experiments showed that the deletion of this  $\alpha$ -helical region (Iso1- $\Delta$ ex17-18) drastically reduced its interaction with full length Iso1 (Fig 4A) but not its preferential nuclear localization (Fig 4B).

Together these data reveal that both structural determinants and specific subcellular targeting determine LRRFIP1 assembly and point to LRRFIP1-Iso1 as a peculiar molecular entity. We then addressed its potential function.

### **LRRFIP1-Iso1 is a strong activator of the Wnt canonical pathway.**

Previous studies identified LRRFIP1-Iso5 as a coactivator of the  $\beta$ -catenin dependent Wnt transcription pathway [7, 8, 14]. Based on its structural homology with Iso5 and its predominant nuclear localization, Iso1 thus appeared as a potential regulator of the Wnt pathway. The TCF/LEF1-dependent transcriptional “TopFlash” reporter assay was used to assess this function. In fact, Iso1 increased TopFlash signal four-fold compared to control Pcdna3 transfected-cells but remained without effect on the mutant reporter FOP-Flash (Fig 5A). Furthermore, Iso1 turned out to be the strongest activator compared to Iso2 and 5. Similar data were obtained using mouse derived 3T3 cells and when the variations in transfection efficiencies were corrected using Renilla luciferase normalization (Fig S5). Also consistent with a role in the Wnt canonical pathway, Iso1 dependent increase in transcription was further enhanced by LiCl treatment (10 mM overnight) and abolished by siRNA mediated  $\beta$ -catenin extinction (Fig 5B, C).

Together, these data point to LRRFIP1-Iso1 as a regulator of the Wnt  $\beta$ -catenin dependent gene transcription pathway.

### **The N-terminal region of LRRFIP1-Iso1 determines its transcriptional activity.**

We then identified the molecular determinants involved in the transcriptional properties of LRRFIP1-Iso1. Considering the lack of effect of Iso2 on Wnt transcription (Fig 5A) and the

fact that Iso1 mostly differs from the later by the presence of a 148 amino acid long N-terminal domain (I62-V211)(Fig 1A, S1), we addressed the role of this domain in TopFlash assay using several truncation mutants. Deletion of the last 55 amino acids of this domain (Iso1- $\Delta$ A156-V211) or between serine-98 and glycine-124 (Iso1- $\Delta$ S98-G124) did not alter Wnt activation. On the other hand, truncating the initial N-terminal region (Iso1- $\Delta$ I62-G124) drastically reduced it (Fig 6A). Additional deletions defined the amino acid stretch between Isoleucine-62 (I62) and Serine-90 (S90) as the critical domain for Wnt activation. Interestingly, this region contains two tryptophan residues (W76 and W82) that are key amino acids in hydrophobic protein-protein interactions and protein structure stabilization [15]. Their critical role in LRRFIP1 transcriptional activity was demonstrated by the loss of function of LRRFIP1 when both were substituted by alanine (Iso1-W76,82-AA) (Fig 6A). Importantly, neither the deletion nor the alanine substitution of the tryptophan residues affected LRRFIP1 nuclear localization (Fig S4). Together these data define the region centered on tryptophans W76 and W82 as a critical determinant of LRRFIP1 transcriptional activity in canonical Wnt pathway.

We then took advantage of this non-functional Iso1-W76,82-AA mutant to analyze the role of LRRFIP1 oligomerization in Wnt transcription. Co-transfection experiments using different ratios of W76,82-AA-mutant and WT-Iso1 constructs were performed. These experiments revealed that the non-functional Iso1-W76,82-AA mutant non-linearly inhibited wildtype LRRFIP1-Iso1 function (Fig 6B). On the other hand, Iso1-W76,82-AA linearly decreased the TopFlash signal of the interaction deficient Iso1- $\Delta$ Ex17-18 (Fig 6B). Note that Iso1- $\Delta$ Ex17-18 mutant is functional (Fig 6B) and able to form homo-dimers (Fig 6C lane 6) but not hetero-dimers with wildtype Iso1 and Iso1- W76,82-AA (Fig 6C lanes 3 and 5 respectively). Although the precise stoichiometry remains to be defined, these data are consistent with an allosteric effect of LRRFIP1-Iso1 on Wnt activation.

We then tested LRRFIP1-Iso1 effect on the cellular endogenous Wnt target; TCF7. As shown in Figure 7, TCF7 transcription level was significantly increased in primary culture of cardiac mitral valve interstitial cells transfected with LRRFIP1-Iso1 and treated with 10 mM LiCl. Importantly, LRRFIP1-Iso1 effect was blocked by PKF118 (10  $\mu$ M) which selectively disrupts  $\beta$ -catenin/TCF interaction [16].

## **Discussion.**

The extensive alternative splicing of *LRRFIP1* gene has obscured the analysis of its function. As a matter of fact, only LRRFIP1-Iso5 function was reported to date and the later was shown to participate in biological processes ranging from carcinogenesis, developmental processes to immune response. In the present study, using molecular, cellular and biochemical approaches, we have shown that the five alternatively spliced LRRFIP1 isoforms define two molecular subgroups with different expression profile, subcellular localization and function. In addition we identified LRRFIP1-Iso1 as an enhancer of the Wnt canonical pathway.

LRRFIP1-Iso5 together with Iso3 and Iso4 define one subgroup. The strong homology between these isoforms precluded the design of specific nucleotide probes or antibodies to precisely quantify their expression levels in human tissues. Nevertheless, in this subgroup LRRFIP1-Iso5 was readily detected by PCR and appeared the most expressed in a large set of organs. Iso3,4, and 5 also share peculiar biochemical properties. They all exhibit much larger apparent MW than that expected from their amino acid sequences. Interestingly, Iso5 deleted of its C-terminus exhibited the expected MW (35 kDa) (Fig 3C,D). These data are consistent with the structural analysis performed by Nguyen & Modis who showed that the C-terminus shared by the three isoforms is elongated, flexible, mostly unfolded and eluted as a 250kDa protein from size exclusion column [11]. In addition, we showed here that this elongated domain also participates to the restricted cytoplasmic localization of Iso3,4 and -5 (Fig 3C). Considering the fact that this unstructured domain also constitutes the DNA binding domain of LRRFIP1-Iso5 [11], these data strengthen the idea that LRRFIP1-Iso3,4,5 constitute a subgroup of cytosolic nucleic acid sensors that participate to the immune response to viral and non-viral pathogens. Indeed, the expression of the mouse ortholog of human-LRRFIP1-Iso5 is modified in virus infected cells and Yang et al showed that LRRFIP1 mediates the production of interferon- $\beta$  induced by viral DNA infection in macrophages through a cascade involving



$\beta$ -catenin and the transcription factor IRF3 [6, 17, 18]. However, in addition to its role as a cytoplasmic nucleic acid sensor this subgroup of LRRFIP1 isoforms (recognized by anti-GFC2 raised against their shared C-terminal domain) was also identified as a repressor of EGFR, PDGF and TNF- $\alpha$  genes transcription [3-5, 12]. Notably, LRRFIP1-Iso5 binds, most probably in association with non-coding RNA, a specific region of TNF- $\alpha$  promoter and represses TNF transcription [5, 12].

Soon after its cloning, LRRFIP1-Iso5 was identified as a binding partner of the Gelsolin-like protein Flightless-I (Fli-1) and the key regulator of the Wnt pathway, Disheveled-3 (Dvl3) [1, 8]. In fact, together with the homologous LRRFIP2 protein which also binds the Leu Rich Repeat (LRR) of Fli-1, LRRFIP1-Iso5 was shown to activate the Wnt/ $\beta$ -catenin transcription pathway [7, 8, 19]. In the present study, although LRRFIP1-Iso5 (as well as Iso3 and -4; not shown) slightly increases LEF/TCF transcription, the effect did not reach statistical significance (Fig 5A,C). This discrepancy most probably results from different experimental conditions used in the TopFlash reporter assay such as: higher amount of LRRFIP1 cDNA used (0.5-2 $\mu$ g vs 0.25 $\mu$ g here) [8] and the co-transfection with exogenous  $\beta$ -catenin cDNA [7]. Together with their preferential cytoplasmic localizations, the fact that LRRFIP1-Iso5 activation of LEF/TCF transcription remained much lower than that of Iso1 in the two cell lines tested here (HEK293 and 3T3) suggests that the Wnt transcriptional activity is not a core characteristic of the Iso3,-4 and -5 subgroup.

Based on their sequence homology as well as on their similar nuclear localization and biochemical properties, we defined another LRRFIP1 subgroup including Iso1 and Iso2. This classification was also supported by the preferential interaction that these isoforms exhibit in co-immunoprecipitation experiments (Fig 2B). However, it is worth noting that their different expression profiles in human tissues make unlikely that they interact *in vivo*. Indeed, Iso1 but

not Iso2 appeared to be strongly expressed in cardiac and skeletal muscles from early development (in the mouse) to adulthood (Fig 1). The muscular expression of LRRFIP1-Iso1 detected here also corroborates the recent observations of Wei et al [10].

We showed that among all the LRRFIP1 isoforms, LRRFIP1-Iso1 is the strongest activator of the Wnt/ $\beta$ -catenin transcription pathway. Iso1 also increases the endogenous transcription of *TCF7* in primary cultures of valvular cells. We narrowed the critical region responsible for this activation down to its N-terminal domain (aa Iso62-Ser-90) and identified two tryptophans (W76 and W82) as key residues in this activation. Interestingly, structure prediction analysis indicated that the LRRFIP1-Iso1 N-terminal domain is largely unstructured and previous studies demonstrated that these disordered regions are often functional. In fact, many disordered segments fold on binding to their biological targets (coupled folding and binding), whereas others constitute flexible linkers that have a role in the assembly of macromolecular arrays [20]. Its coiled coil domain is another structural feature which demarks Iso1 from the other LRRFIP1 isoforms. Structure prediction indicates that the Iso1-specific exons Ex17 and Ex18 increase the length of the coiled coil domain and we showed their deletion precludes the formation of WT/mutant heterodimers (Fig 6B, C and S2). These data support the role of the coiled coil domain in LRRFIP1 dimerization and the specific assembly of the different LRRFIP1 isoforms. In addition, we have demonstrated here the importance of dimerization in the transcriptional activity of LRRFIP1 (Fig 6B).

Because Fli-1 and Dvl were identified as LRRFIP1 binding partners modulating Wnt transcription [7], we tested their interaction with mutant LRRFIP1-Iso1. Our preliminary results indicate that neither W/A substitutions nor the deletion of I62-S90 domain affected their interaction with LRRFIP1-Iso1 (Suppl Fig S6). Interestingly, although the functional impact was not established, previous mass spectrometry studies revealed LRRFIP1-Iso5 interacts with another LRR containing transcription factor, LRRFIP2 [21]. Whether

LRRFIP1-Iso1 also interacts with LRRFIP2 remains to be elucidated. However it is worth noting that *LRRFIP2* gene is alternatively spliced in three isoforms one of which (LRRFIP2-Iso1) activates Wnt transcription and shares sequence homology with LRRFIP1-Iso1 including a long coiled-coil domain and a N-terminal domain harboring tryptophan residues [19]. Whether LRRFIP2 or other binding partner(s) are implicated in the activation of Wnt transcription by LRRFIP1-Iso1 remain(s) to be identified but this suggests that LRRFIP might work as a platform which recruits actors of the  $\beta$ -catenin LEF/TCF transcriptional complex.

Considering that large interconnected regulatory transcription networks govern the regulated programs of gene expression, it is most likely that LRRFIP1 isoforms participate to other transcriptional pathways aside the Wnt pathway [22]. In fact, LRRFIP1-Iso5 was also identified as a Wnt enhancer and as a repressor of TNF and PDGF gene expression [4, 5, 12]. Also, recent studies established that LRRFIP1-Iso1 is involved in myoblasts (C2C12 cells) differentiation and modulates *NOV*, *SFRP2*, *ID3* and *DCN* which are known inhibitors of muscle differentiation not directly targeted by Wnt pathway [10]. Whether LRRFIP1-Iso1 impacts these genes and participates in muscle homeostasis and repair through its role in the Wnt pathway will require future studies [23].

## **Acknowledgments**

We thank Steven Nedellec and Philippe Hulin and the microscopic facility MicroPICell SFR Bonamy in Nantes for their technical expertise and assistance cell imaging experiments. This work was funded by the Fédération Française de Cardiologie, Grant R15107NN-RAK15146NNA (TLT, JM) and the Fondation Coeur et Recherche (FCR PVM-Fed, Paris, France). T Le Tourneau is supported by Inserm (Inserm Translational Research Program 2012–2016), the AAP Interdisciplinaire STIC-Santé de l'Université de Nantes “LIU” (BO, JM). E.F. received a postdoctoral fellowship by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Telethon). Work in S.Z lab is supported by the INSERM and the Association Française contre les Myopathies (AFM-Telethon; Projet stratégique: TRIM-RD).

## Bibliographic references.

- [1] K.S. Fong, H.G. de Couet, Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system, *Genomics*, 58 (1999) 146-157.
- [2] T. Rikiyama, J. Curtis, M. Oikawa, D.B. Zimonjic, N. Popescu, B.A. Murphy, M.A. Wilson, A.C. Johnson, GCF2: expression and molecular analysis of repression, *Biochim Biophys Acta*, 1629 (2003) 15-25.
- [3] A.L. Reed, H. Yamazaki, J.D. Kaufman, Y. Rubinstein, B. Murphy, A.C. Johnson, Molecular cloning and characterization of a transcription regulator with homology to GC-binding factor, *J Biol Chem*, 273 (1998) 21594-21602.
- [4] L.M. Khachigian, F.S. Santiago, L.A. Rafty, O.L. Chan, G.J. Delbridge, A. Bobik, T. Collins, A.C. Johnson, GC factor 2 represses platelet-derived growth factor A-chain gene transcription and is itself induced by arterial injury, *Circ Res*, 84 (1999) 1258-1267.
- [5] A.R. Suriano, A.N. Sanford, N. Kim, M. Oh, S. Kennedy, M.J. Henderson, K. Dietzmann, K.E. Sullivan, GCF2/LRRFIP1 represses tumor necrosis factor alpha expression, *Mol Cell Biol*, 25 (2005) 9073-9081.
- [6] P. Yang, H. An, X. Liu, M. Wen, Y. Zheng, Y. Rui, X. Cao, The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway, *Nat Immunol*, 11 (2010) 487-494.
- [7] Y.H. Lee, M.R. Stallcup, Interplay of Fli-I and FLAP1 for regulation of beta-catenin dependent transcription, *Nucleic Acids Res*, 34 (2006) 5052-5059.
- [8] H. Ohtsuka, M. Oikawa, K. Ariake, T. Rikiyama, F. Motoi, Y. Katayose, M. Unno, A.C. Johnson, GC-binding factor 2 interacts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines, *Int J Cancer*, 129 (2011) 1599-1610.
- [9] K. Ariake, H. Ohtsuka, F. Motoi, D. Douchi, M. Oikawa, T. Rikiyama, K. Fukase, Y. Katayose, S. Egawa, M. Unno, GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation, *Cancer Lett*, 325 (2012) 99-107.
- [10] N. Wei, Y. Cheng, Z. Wang, Y. Liu, C. Luo, L. Liu, L. Chen, Z. Xie, Y. Lu, Y. Feng, SRSF10 Plays a Role in Myoblast Differentiation and Glucose Production via Regulation of Alternative Splicing, *Cell Rep*, 13 (2015) 1647-1657.
- [11] J.B. Nguyen, Y. Modis, Crystal structure of the dimeric coiled-coil domain of the cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1, *J Struct Biol*, 181 (2013) 82-88.
- [12] L. Shi, L. Song, M. Fitzgerald, K. Maurer, A. Bagashev, K.E. Sullivan, Noncoding RNAs and LRRFIP1 regulate TNF expression, *J Immunol*, 192 (2014) 3057-3067.
- [13] L. Ryckebusch, N. Bertrand, K. Mesbah, F. Bajolle, K. Niederreither, R.G. Kelly, S. Zaffran, Decreased levels of embryonic retinoic acid synthesis accelerate recovery from arterial growth delay in a mouse model of DiGeorge syndrome, *Circ Res*, 106 (2010) 686-694.
- [14] S.A. Wilson, E.C. Brown, A.J. Kingsman, S.M. Kingsman, TRIP: a novel double stranded RNA binding protein which interacts with the leucine rich repeat of flightless I, *Nucleic Acids Res*, 26 (1998) 3460-3467.
- [15] C.M. Santiveri, M.A. Jimenez, Tryptophan residues: scarce in proteins but strong stabilizers of beta-hairpin peptides, *Biopolymers*, 94 (2010) 779-790.
- [16] M. Lepourcelet, Y.N. Chen, D.S. France, H. Wang, P. Crews, F. Petersen, C. Bruseo, A.W. Wood, R.A. Shivdasani, Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex, *Cancer Cell*, 5 (2004) 91-102.
- [17] Y. Liu, Z. Zou, B. Zhu, Z. Hu, P. Zeng, L. Wu, LRRFIP1 Inhibits Hepatitis C Virus Replication by Inducing Type I Interferon in Hepatocytes, *Hepat Mon*, 15 (2015) e28473.
- [18] S. Boudreault, C. Martenon-Brodeur, M. Caron, J.M. Garant, M.P. Tremblay, V.E. Armero, M. Durand, E. Lapointe, P. Thibault, M. Tremblay-Letourneau, J.P. Perreault, M.S. Scott, G. Lemay, M. Bisailon, Global Profiling of the Cellular Alternative RNA Splicing Landscape during Virus-Host Interactions, *PLoS One*, 11 (2016) e0161914.

- [19] J. Liu, A.G. Bang, C. Kintner, A.P. Orth, S.K. Chanda, S. Ding, P.G. Schultz, Identification of the Wnt signaling activator leucine-rich repeat in Flightless interaction protein 2 by a genome-wide functional analysis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005) 1927-1932.
- [20] H.J. Dyson, P.E. Wright, Intrinsically unstructured proteins and their functions, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (2005) 197-208.
- [21] A.H. Goodall, P. Burns, I. Salles, I.C. Macaulay, C.I. Jones, D. Ardissino, B. de Bono, S.L. Bray, H. Deckmyn, F. Dudbridge, D.J. Fitzgerald, S.F. Garner, A. Gusnanto, K. Koch, C. Langford, M.N. O'Connor, C.M. Rice, D. Stemple, J. Stephens, M.D. Trip, J.J. Zwaginga, N.J. Samani, N.A. Watkins, P.B. Maguire, W.H. Ouwehand, C. Bloodomics, Transcription profiling in human platelets reveals LRRFIP1 as a novel protein regulating platelet function, *Blood*, 116 (2010) 4646-4656.
- [22] F. Spitz, E.E. Furlong, Transcription factors: from enhancer binding to developmental control, *Nat Rev Genet*, 13 (2012) 613-626.
- [23] A. Rudolf, E. Schirwis, L. Giordani, A. Parisi, C. Lepper, M.M. Taketo, F. Le Grand, beta-Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair, *Cell Rep*, 15 (2016) 1277-1290.

## Figure legends.

### Figure 1: LRRFIP1 alternative splicing and expression profile.

**A:** Schematic representation of *LRRFIP1* exon splicing pattern in five isoforms. The 24 and 8 exons of Iso1 and Iso5 are indicated. The color code corresponds to that used in the peptide sequences given in supplemental figure S1. The exons encoding the coiled-coil domain (CC-Dom) shared by all the isoforms and carboxy-terminal domain (C-Ter) are indicated. The position of the isoform specific primers used in PCR experiments (**B**) is indicated by the arrows. **B:** Differential expression pattern of the five isoforms detected by PCR on a panel of human tissue cDNAs (see text for comments). In the first well the cDNA (10 pg) of each isoform was used as a template. GAPDH was used as an internal control. Sk Mscl: Skeletal Muscle. **C:** Semi quantitative PCR quantification of LRRFIP1-Iso1 expression in 2,5 ng of total mRNA extracted from human cardiac tissue samples. Valve: mitral valve, RV; Right Ventricle, RA; Right Atrium, LV; Left Ventricle, Sk M; Skeletal Muscle. **D:** Whole-mount *in situ* hybridization analysis of embryos with the Hum-*LRRFIP1-Iso5* ortholog (Ms-*LRRFIP1-Iso1*) and the Hum-*LRRFIP1-Iso1* ortholog (Ms-*LRRFIP1-Iso2*) probes. (a) Lateral view of E10.5 embryo. Ms-*LRRFIP1-Iso1* is poorly detected. Coloration in the brain is probably due to strong background. (b,c) Lateral views of E8.5 and E9.5 embryos. Ms-*LRRFIP1-Iso2* is detected in the heart and the forming somites. (d) Ventral view of a dissected E10.5 heart. Ms-*LRRFIP1-Iso2* is expressed in the four cardiac chambers. Scale bars: 500µm (a, c), 200µm (b, d).

### Figure 2: LRRFIP1 isoforms determine two molecular entities with different oligomerisation properties.

**A:** Western blot of HEK293 cells transfected with HA-tagged LRRFIP1-Iso1-5 cDNAs probed with anti-HA antibody. Note that Iso1 and 2 were detected according to their expected

MWs (85 and 50 kDa, respectively) but not Iso3,4,5 that were detected around 150-180 kDa instead of the expected apparent MWs ( $\approx$ 83-89 kDa). GAPDH was used as an internal gel loading control. **B:** Left panels, HEK293 cells were co-transfected with Myc-tagged LRRFIP-Iso5 and HA-tagged LRRFIP1-Iso1-5 (lanes 1 to 5, respectively). HA-tagged-Iso3,4-5 and to a lower extent Iso2 but not Iso1 were readily co-immunoprecipitated with Iso5 using anti-MYC antibody (Upper blot). The specificity of the co-Ips was attested by the absence of immunoprecipitation of HA-tagged Iso5 by anti-Myc antibody (lane 6). The lower blots show the similar expression levels of the isoforms in the different conditions. Right panels, mirror experiments of left panels in which Myc-tagged-Iso1 was co-transfected with HA-tagged isoforms and co-ipped using anti-Myc. Only Iso1 and 2 interacted with Iso1. Similar results were obtained at least three times.

**Figure 3: LRRFIP1-Iso1 is a nuclear protein.**

**A:** Western blot illustrating the detection of LRRFIP1 isoforms in cytoplasmic (C) and nuclear (N) cellular fractions (left). GAPDH and Histone H2B (H2B) were used as cytoplasmic and nuclear fraction markers, respectively. The histogram gives the quantification of Iso1,2 and 5 in nuclear fractions. \* indicates statistical difference (Mann Whitney  $p < 0.05$   $n=6$ ). **B:** Immunolocalization of Myc-tagged LRRFIP1-Iso1 and -5 using anti-Myc antibody (left images). Arrows point to the presence and the absence of LRRFIP1 Iso1 and 5 in the nuclei of transfected cells, respectively. Overlay with nuclei labelling using Dapi is shown in right-hand images. **C:** Deletion of the carboxy termini ( $\Delta$ Cter) LRRFIP1-Iso1 and 5 results in their equal repartition in cytoplasmic (C) and nuclear (N) cell fractions (compare with respective nuclear and cytoplasmic expression of full-length isoforms illustrated in **A**). **D:** Mutant ( $\Delta$ Cter) and full-length Myc-tagged Iso1 or 5 were co-transfected with their respective full-length HA-tagged isoforms and immuno-precipitated using anti-Myc antibody. The upper blot illustrates the decrease co-immuno-precipitation of Iso1 (lane 2) and



Iso5 (lane 4) when their carboxy termini were deleted compared to the full-length isoforms (lanes 1 and 3, respectively). The lower blots show the expression levels of the transfected constructs. The arrowhead points to Iso5- $\Delta$ Cter (expected MW 27kDa, lane 4). The band above (60-65kDa) most probably represents non-denatured dimers. Similar results were obtained in 3 experiments.

**Figure 4: Exons 17 and 18 coding sequences are crucial to LRRFIP1-Iso1 oligomerisation.**

**A:** Myc-tagged LRRFIP1-Iso1 was co-transfected with HA-tagged full-length or ( $\Delta$ Ex17-18) Iso1. Upper blot shows that the deletion of exons 17-18 ( $\Delta$ Ex17-18) drastically reduces its co-IP with full-length Iso1. Lower blots illustrate the similar expression levels of the different isoforms in these experiments that were reproduced three times. **B:** Upper blot illustrates the repartition of full-length and  $\Delta$ Ex17-18 mutant in the cytoplasmic (C) and nuclear (N) cell fractions. Both constructs were enriched in the nuclear fractions. In the lower blots, Lamin A/C and Erk-1 were used as nuclear and cytoplasmic markers, respectively.

**Figure 5: LRRFIP1-Iso1 is a strong activator of canonical Wnt transcription.**

**A:** HEK293 cells were transfected with the TopFlash reporter plasmid and LRRFIP1-Iso1,2 or 5 constructs and luciferase activity measured. Only LRRFIP1-Iso1 significantly increased the luciferase activity of control (pCDNA3 transfected) cells but remains ineffective on nonfunctional (Fop-flash) reporter. \*\*\* indicates statistical difference ( $p < 0.001$ ,  $n = 34$ ) with pCDNA3 transfected cells. **B:** TopFlash activation by LRRFIP1-Iso1 was abolished by  $\beta$ -catenin extinction (see Fig S2) achieved using siRNA (CTNNB1) but not control (Ctl) siRNA. \*\*\* see above and \* indicates statistical difference ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) between  $\beta$ -catenin and control siRNA treated cells. **C:** The TopFlash activation by LRRFIP1-Iso1 but not that of Iso2, Iso5 or Fop-Flash reporter was significantly increased by LiCl pre-treatment (10 mM). \*

indicates significant difference ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) with non-treated Iso1 transfected cells (see in A).

**Figure 6: The N-terminal domain specific of LRRFIP1-Iso1 and oligomerization determine its Wnt transcriptional activity.**

**A:** Schematic representation of the deletions made between LRRFIP1-Iso1 amino acid residues I62 to V211 and the corresponding TopFlash reporter activity. In the bottom scheme, the sequence between I62 to S98 and in which the two tryptophan residues (W76 and W82 indicated by the red arrows) were mutated in alanine (W76,82-AA) is given. \*\* indicates statistical difference ( $p < 0.01$ ,  $n = 8$ ) with full-length Iso1 transfected cells. **B:** LRRFIP1-Iso1 oligomerisation participates to Wnt transcription activation. Cells were co-transfected with different ratios (0 to 100%) of the non-functional Iso1 (W76,82-AA) and WT (left histogram) or the oligomerisation deficient Iso1- $\Delta$ Ex17-18 (right histogram). The nonlinear reduction of WT-Iso1 dependent luciferase activity by W76,82-AA indicates oligomerisation of LRRFIP1-Iso1 is critical to its activity. On the other hand, Iso1-W76,82-AA has no effect on Iso1- $\Delta$ Ex17-18 luciferase activation with which it cannot interact. These experiments were repeated at least three times. **C:** Co-immunoprecipitation of WT/ W76,82-AA and  $\Delta$ Ex17-18/W76,82-AA co-transfection (50/50 ratio condition). Myc tagged constructs were immunoprecipitated and the co-ipped HA-tagged constructs revealed by Western blot. Note that Iso1-W76,82-AA is able to form homo-dimers (lane 4) and hetero-dimers with WT-Iso1 (lane 2) but not hetero-dimers with Iso1- $\Delta$ Ex17-18 (lane 5). Also, Iso1- $\Delta$ Ex17-18 forms dimers (lane 6) but no hetero-dimers with either Iso1-WT or Iso1-W76,82-AA (lanes 3 and 5, respectively).

**Figure 7: LRRFIP1-Iso1 activates Wnt transcription in situ.**

**A:** TCF7 mRNA expression levels was assessed by semi quantitative qPCR in rat mitral valve interstitial cells grown in primary culture and transfected with pcDNA3-GFP used as a control or LRRFIP1-Iso1 (Iso1). Cells were treated or not with LiCl (10 mM) or LiCl (10 mM) plus PKF118 (10  $\mu$ M) (see methods).\*\* indicates statistical difference ( $p < 0.01$  n=4).

**Supplemental Figure S1: LRRFIP1 protein sequence alignment shows two molecular subgroups.**

Amino-acids sequences alignment for the 5 Hum-LRRFIP1 isoforms (Clustal Omega) shows the sequence homology between Iso1-2 and Iso3-4-5. The color code corresponds to that used in Figure 1A. The tryptophans (W76;82) critical for Wnt activation are colored in red. The black bar indicates the coiled coil domain (PDB:4H22) identified in LRRFIP1-Iso3 by Nguyen et al (11).

**Supplemental Figure S2: Structural prediction of LRRFIP1-Iso1 coiled-coil domain.**

“Coils” software (Expasy Bioinformatics Resource Portal) was used to compute Coiled-Coil structure prediction for Isoform1 (aa 250-500) and Isoform-3 (aa-133-383) which shows the highest homology with Iso1 in this protein region except for Exon17-18 encoded peptide. The graphs show that Isoform1 coiled coil domain is indeed longer than that of Isoform3. The respective domains are boxed in red (Iso1) and black (Iso2,3,4,5) in the bottom alignment.

**Supplemental Figure S3: LRRFip1-iso1 activates Wnt pathway in mouse 3T3 cells and in HEK 293 using Renilla assay system.**

**A:** Mouse derived 3T3 cells were transfected with the TopFlash reporter plasmid and LRRFIP1-Iso1,2 or 5 constructs and luciferase activity measured. As shown in Hek293 cells (Fig 5), only LRRFIP1-Iso1 increased the luciferase activity in 3T3 cells. **B:** To ascertain the differences in Wnt activation reporter assay observed between LRRFIP1-Iso1,2 and -5 were not due to different transfection efficiencies between experiments, the measurement were normalized using Renilla reporter. Hek293 cells were transfected with the TopFlash Firefly and Renilla reporter plasmid and LRRFIP1-Iso1 and luciferase activity measured. A four-fold increase in luciferase activity of control cells is observed for LRRFIP1-Iso1 also when the variations in transfection efficiencies are normalized using Renilla luciferase.

**Supplemental Figure S4: The alanine substitution of the tryptophan residues does not affect LRRFIP1 nuclear localization.**

Western blot illustrating the detection of LRRFIP1-Iso1, -2, -5 and W76;82-AA mutant in cytoplasm (left) and nucleus (right) cellular fractions. In this experiment Wnt activation using 10 mM LiCl was also tested. Note that the W76;82-AA does not modify LRRFIP1-Iso1 nuclear localization.

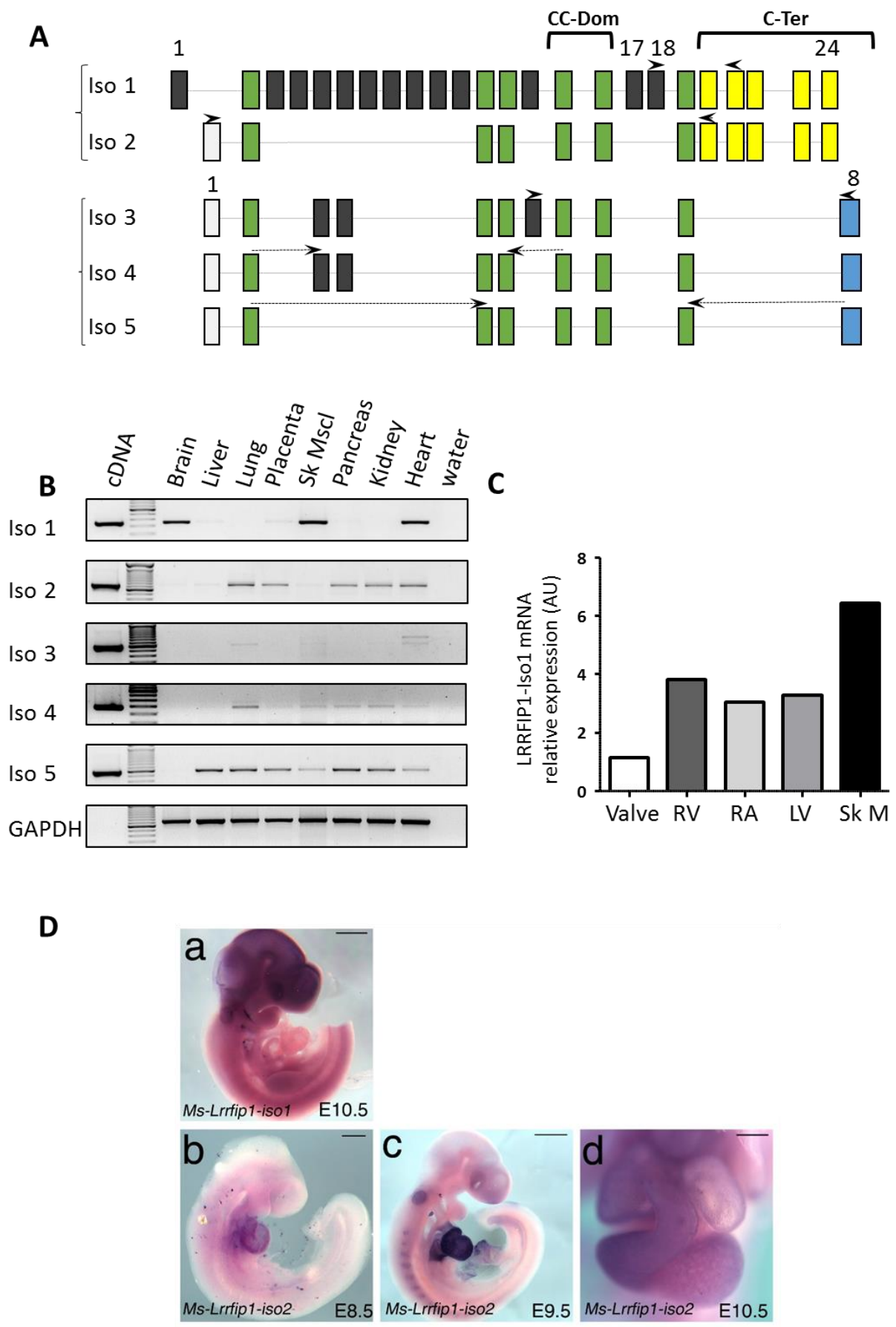
**Supplemental Figure S5:  $\beta$  catenin (CTNNB1) protein extinction by siRNA.**

Western blot of cellular lysates of HEK 293 transfected with siRNA (CTNNB1) revealed a  $\approx$ 50% extinction of endogenous  $\beta$ -catenin expression compared to those transfected with control (Ctl) siRNA (N=3).

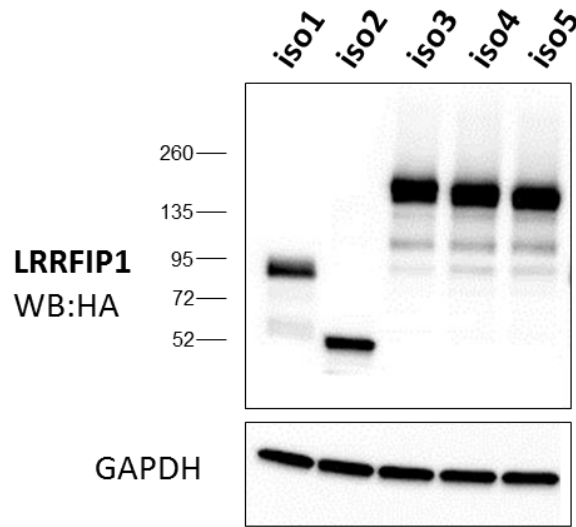
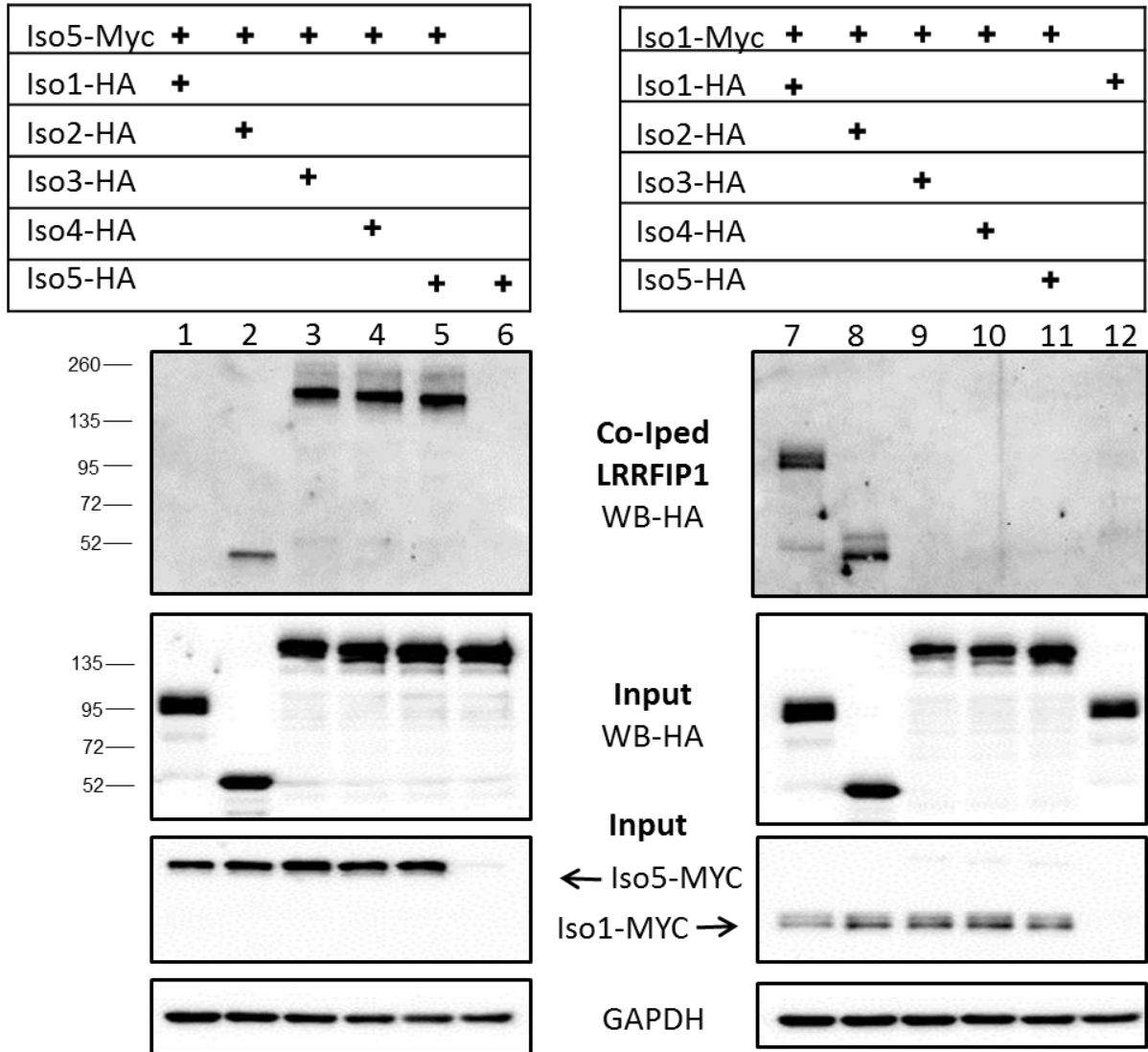
**Supplemental Figure S6. Wnt deficient mutant LRRFIP1-Iso1 (W76,82-AA and  $\Delta$ I62-S90) interact with Fli and Dvl1.**

Immunoprecipitation made from HEK cell were transfected with Iso1-WT, W76,82-AA and  $\Delta$ I62-S90 using anti-Fli (A) or anti-Dvl1 (B) antibodies revealed the mutations do not affect the interaction LRRFIP1.

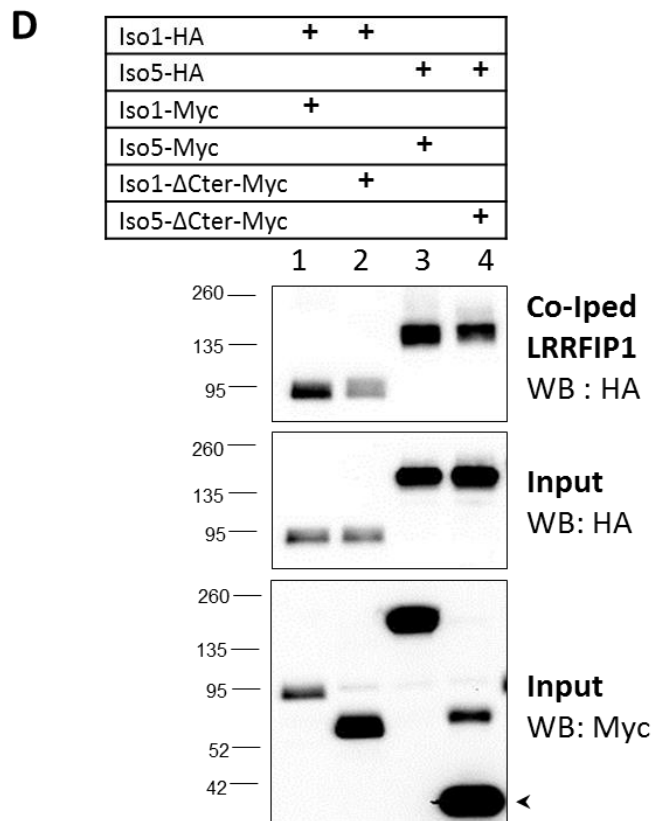
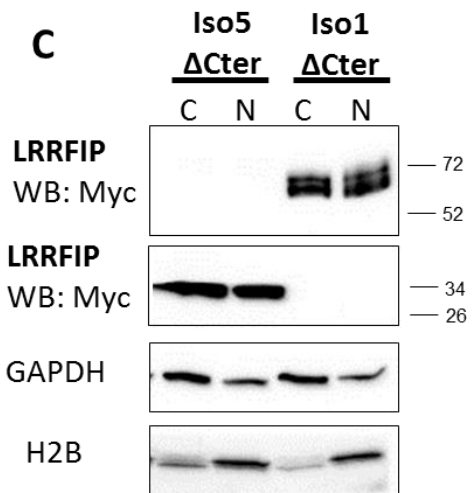
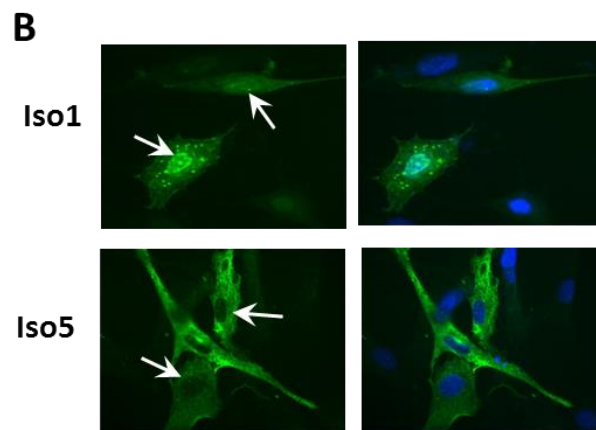
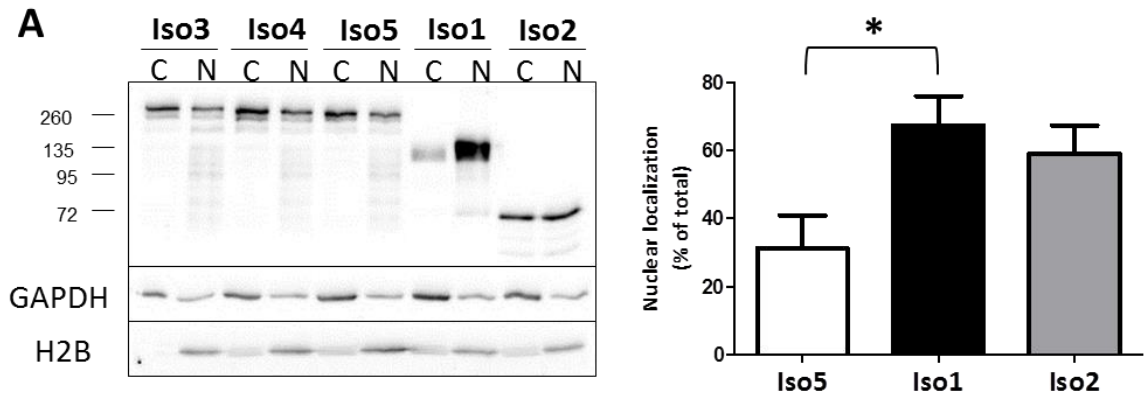




**Fig 1**

**A****B****Fig 2**

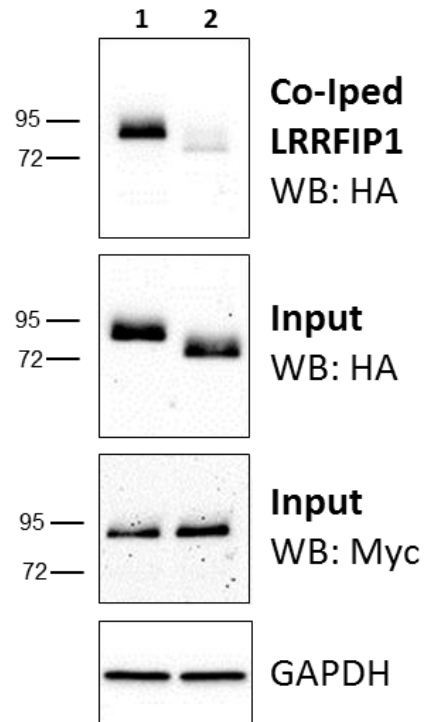
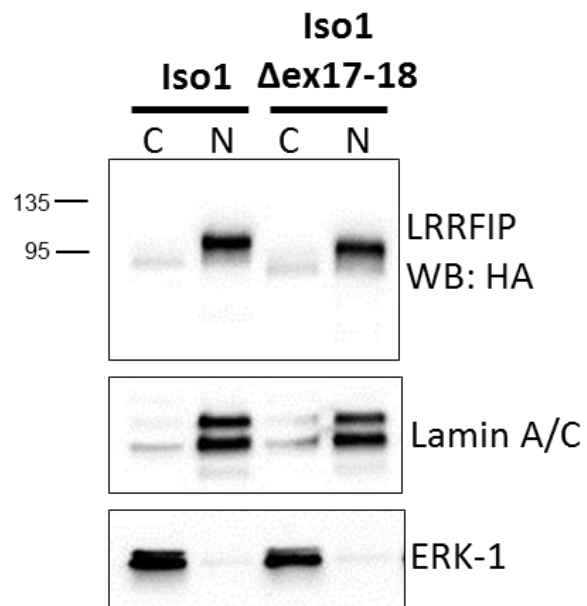


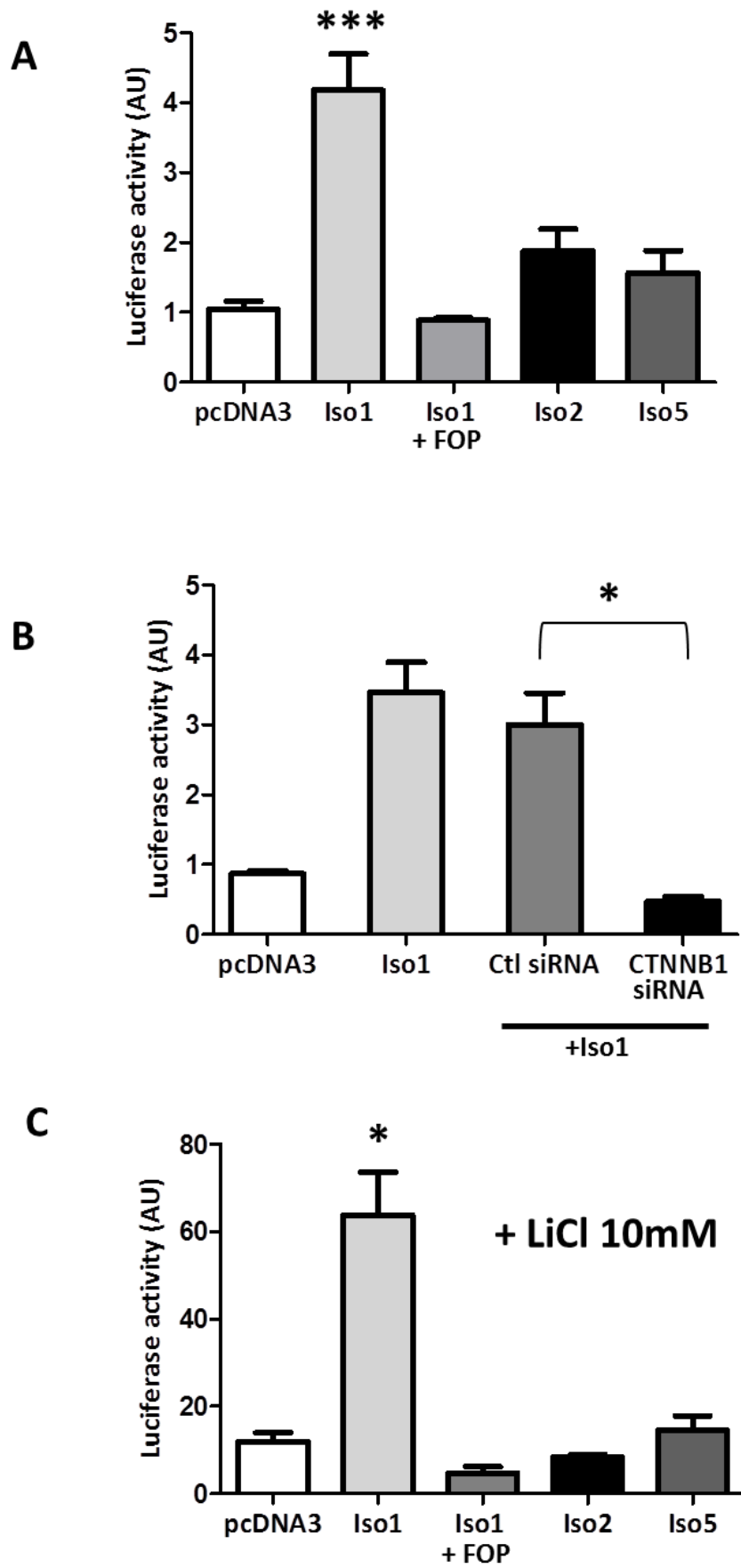


**Fig 3**

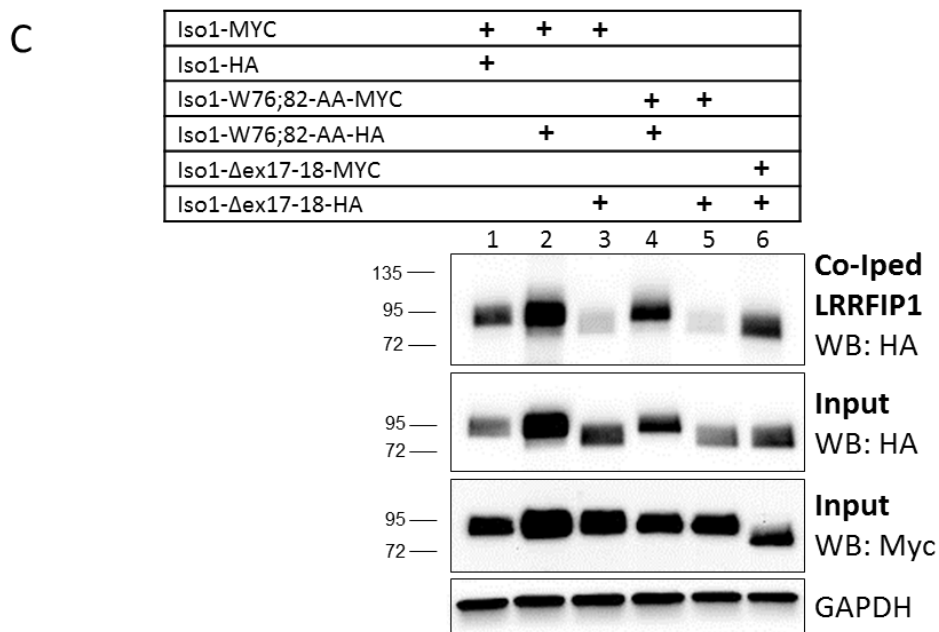
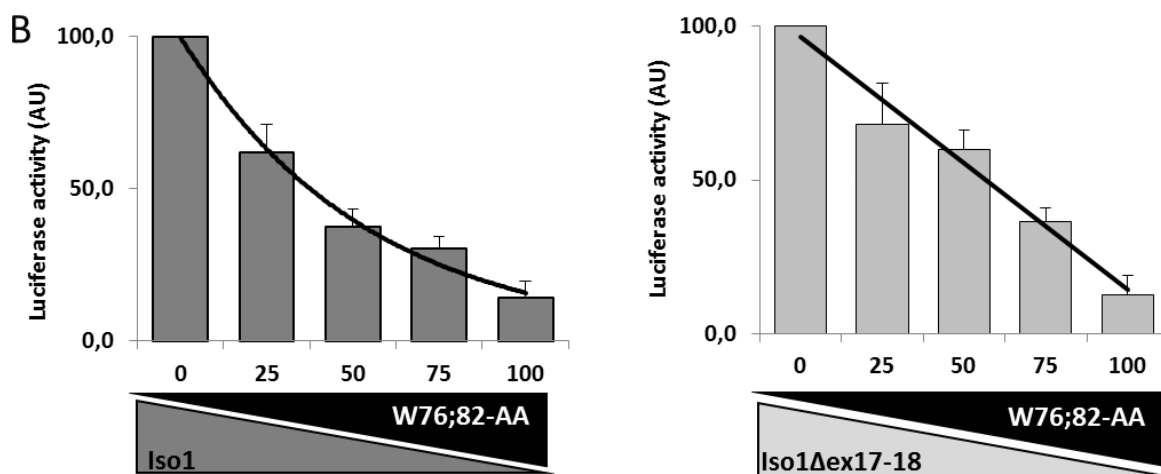
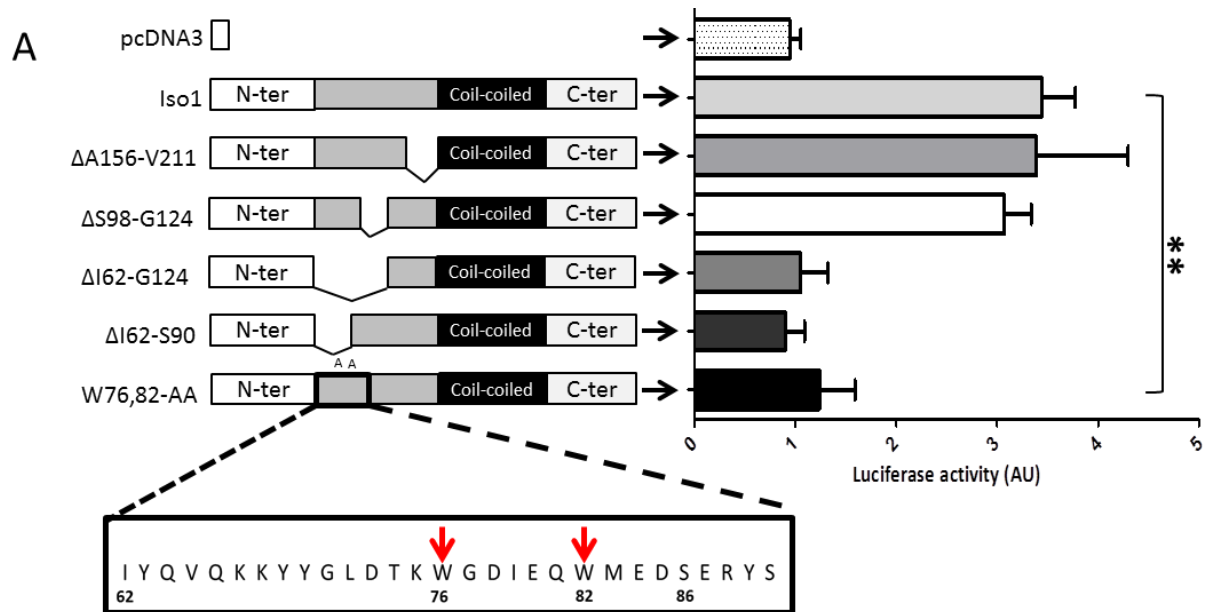
**A**

Iso1-MYC	+	+
Iso1-HA	+	
Iso1- $\Delta$ ex17-18-HA		+

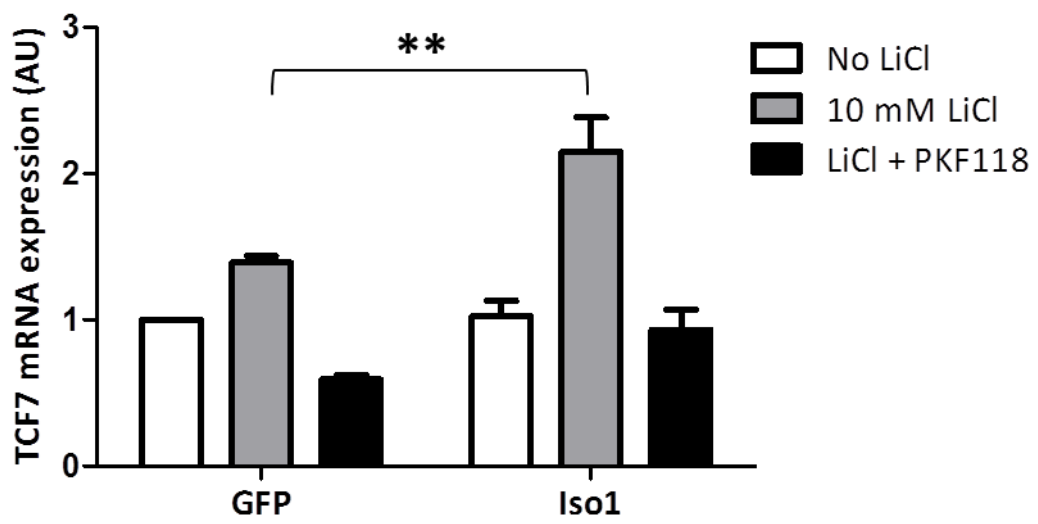
**B****Fig 4**



**Fig 5**



**Fig 6**



**Fig 7**

```

Iso1 MDMGTQGSGRKLPNRERLTAEDDALNQTAREAEARLAAKRAARAAREAREIRMKELERQOKEIYQVQKKYYGLDTKCDIEQMEDSERYSRSSRRNTSASDEDERMSVSGRGLRSQPDL 120
Iso2 --MTSPAAAQSRE--IDCLSPEAQKL-----AEARLAAKRAARAAREAREIRMKELERQOKE----- 51
Iso3 --MTSPAAAQSRE--IDCLSPEAQKL-----AEARLAAKRAARAAREAREIRMKELERQOKE-----EDSERYSRSSRRNTSASDEDERMSVSGRGLR----- 83
Iso4 --MTSPAAAQSRE--IDCLSPEAQKL-----AEARLAAKRAARAAREAREIRMKELERQOKE-----EDSERYSRSSRRNTSASDEDERMSVSGRGLR----- 83
Iso5 --MTSPAAAQSRE--IDCLSPEAQKL-----AEARLAAKRAARAAREAREIRMKELERQOKE-----EDSERYSRSSRRNTSASDEDERMSVSGRGLR----- 51
      * : : : * : * : * *****

Iso1 EYGGPYAWTNGYDGEYGSQSLNRRSRPSCLYSAARPSGYSRASVLDGSGFGGTRRGSTSGSRAPSEYSGHLNSSSRASSRASSARASPVVEERPEKDFTEKGRNMPGLSAATLASLG 240
Iso2 -----VEERPEKDFTEKGRNMPGLSAATLASLG 80
Iso3 -----VEERPEKDFTEKGRNMPGLSAATLASLG 112
Iso4 -----VEERPEKDFTEKGRNMPGLSAATLASLG 112
Iso5 -----VEERPEKDFTEKGRNMPGLSAATLASLG 80
      *****

Iso1 GTSSRRSGDTSISIDTEASIREIKELNELKDKIQDVEGKYMQLKEMKDSLAEEVEEKYKAMVSNQAQLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKNKFEFEREKHAHSILQF 360
Iso2 GTSSRRSGDTSISIDTEASIREIK-----DSLAEEVEEKYKAMVSNQAQLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKNKFEFEREKHAHSILQF 176
Iso3 GTSSRRSGDTSISIDTEASIREIKELNELKDKIQDVEGKYMQLKEMKDSLAEEVEEKYKAMVSNQAQLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKNKFEFEREKHAHSILQF 232
Iso4 GTSSRRSGDTSISIDTEASIREIK-----DSLAEEVEEKYKAMVSNQAQLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKNKFEFEREKHAHSILQF 208
Iso5 GTSSRRSGDTSISIDTEASIREIK-----DSLAEEVEEKYKAMVSNQAQLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKNKFEFEREKHAHSILQF 176
      *****

Iso1 QFAEVKEALKQREEMLEIEIRLQKQKASSIREISDLQETIEWDKKIGALERQKEFFDSVRSERDDLREEVVMLKEELKHGIIINSEIATNGETSDTLNNVGYQGPTKMTKEELNALKS 480
Iso2 QFAEVKEALKQREEMLE-----KHGIIINSEIATNGETSDTLNNVGYQGPTKMTKEELNALKS 225
Iso3 QFAEVKEALKQREEMLE-----KHGIIINSEIATNGETSDTLNNVGYQGPTKMTKEELNALKS 290
Iso4 QFAEVKEALKQREEMLE-----KHGIIINSEIATNGETSDTLNNVGYQGPTKMTKEELNALKS 266
Iso5 QFAEVKEALKQREEMLE-----KHGIIINSEIATNGETSDTLNNVGYQGPTKMTKEELNALKS 234
      *****

Iso1 TGDGTLDIRLKKLVDERECLLEQIKKLGQLEERQKIGKLDNLRSEDDVLENGTDMHVMDLQRDANRQISDLKFKLAKSEQEITALEQNVIRLESQVSRYSKSAENAIEDELKAEKRR 600
Iso2 TGDGTLDIRLKKLVDERECLLEQIKKLGQLEERQKIGKLDNLRSEDDVLENGTDMHVMDLQRDANRQISDLKFKLAKSEQEITALEQNVIRLESQVSRYSKSAENAIEDELKAEKRR 354
Iso3 TGDGTLGRASEVEVKNEIVANVGKREILHNTKEQHTEDTVKDCVDIEVFPAGENTEDQKSSDAPFLGTLAGATYEEQVQSQILESSSLPENTVQVESNEVMGAPDDRTRTPLEPSNC 410
Iso4 TGDGTLGRASEVEVKNEIVANVGKREILHNTKEQHTEDTVKDCVDIEVFPAGENTEDQKSSDAPFLGTLAGATYEEQVQSQILESSSLPENTVQVESNEVMGAPDDRTRTPLEPSNC 386
Iso5 TGDGTLGRASEVEVKNEIVANVGKREILHNTKEQHTEDTVKDCVDIEVFPAGENTEDQKSSDAPFLGTLAGATYEEQVQSQILESSSLPENTVQVESNEVMGAPDDRTRTPLEPSNC 354
      *****

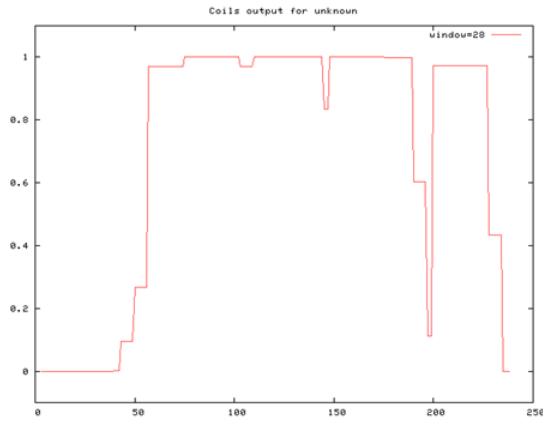
Iso1 LQRELSALDKTEELEVSNGHLVKRLEKMKANRSALLSQ 640
Iso2 LQRELSALDKTEELEVSNGHLVKRLEKMKANRSALLSQ 394

Iso3 WSDLDGNGHTENVGEAAVTQVEEQAGTVASCPHGSDDTVYHDDKCMVEVPQLETSSTGHSLEKEFTNQEAAEPKEVPAHSTEVGRDHNEEGEETGLRDEKPIKTEVPGSPAGTEGNCQ 532
Iso4 WSDLDGNGHTENVGEAAVTQVEEQAGTVASCPHGSDDTVYHDDKCMVEVPQLETSSTGHSLEKEFTNQEAAEPKEVPAHSTEVGRDHNEEGEETGLRDEKPIKTEVPGSPAGTEGNCQ 508
Iso5 WSDLDGNGHTENVGEAAVTQVEEQAGTVASCPHGSDDTVYHDDKCMVEVPQLETSSTGHSLEKEFTNQEAAEPKEVPAHSTEVGRDHNEEGEETGLRDEKPIKTEVPGSPAGTEGNCQ 476

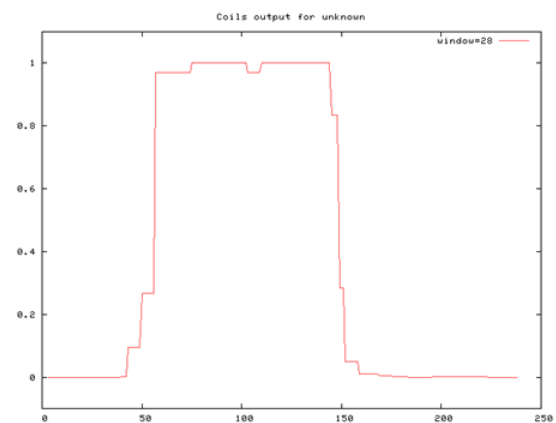
Iso3,4,5 EATGPSTVDTQNEPLDMKEPDEEKSDQQGEALDSSQKTKNKKKKKKKSPVPVETLKDVKKELTYQNTDLSEIKEEQVKSTDRKSAVEAQNVEVTENPKQKIAAESSENVDPCPE
Iso3,4,5 NPKIKLEADGKLDQEGDDVQTAAEVLADGDTLDFEDDTVQSSGPRAGGEELDEGVAKDNAIDGATQSSPAEPKSEADRCRTLPEHSPSQDISDACEAESTERCEMSEHPQTV
Iso3,4,5 RKALDNSLENDEADLSAPGREPGHFNPESEDTRGGNEKGSKEDCTMS 809,784,753

```

Fig S1



Iso1 (250-500) coil-coiled prediction



Iso3 (133-383) coil-coiled prediction

```

Iso1 MDMGTQGSGRKRLPNRRLTAEDDALNQIAREAEARLAAKRAARAAREIRMKELERQOKEIYQVQKCYGLDTRKGDIEQIMEDSEYRSTRSRNT SASDEDERMSVSGRGLRSQPDL 120
Iso2 --MTSPAAAQSRE--IDCLSPEAQKL-----AEARLAAKRAARAAREIRMKELERQOKE-----EDSERYRSTRSRNT SASDEDERMSVSGRGLRS----- 51
Iso3 --MTSPAAAQSRE--IDCLSPEAQKL-----AEARLAAKRAARAAREIRMKELERQOKE-----EDSERYRSTRSRNT SASDEDERMSVSGRGLRS----- 83
Iso4 --MTSPAAAQSRE--IDCLSPEAQKL-----AEARLAAKRAARAAREIRMKELERQOKE-----EDSERYRSTRSRNT SASDEDERMSVSGRGLRS----- 83
Iso5 --MTSPAAAQSRE--IDCLSPEAQKL-----AEARLAAKRAARAAREIRMKELERQOKE-----EDSERYRSTRSRNT SASDEDERMSVSGRGLRS----- 51
* : . : . : * : * : * : *
*****

Iso1 EYGGPYAWTNGYDGE LYGSQSLNRRSGRPSCLYSAARPSG SYRASVLDGSGFGTRRGSTSGSRAPSEYSGHLNSSSRASSRASSARASPVVEERPEKDFTEKGSRNMPGLSAATLASLG 240
Iso2 -----VEERPEKDFTEKGSRNMPGLSAATLASLG 80
Iso3 -----VEERPEKDFTEKGSRNMPGLSAATLASLG 112
Iso4 -----VEERPEKDFTEKGSRNMPGLSAATLASLG 112
Iso5 -----VEERPEKDFTEKGSRNMPGLSAATLASLG 80
*****

Iso1 GTSSRRGSGDTSISIDTEASIREIKELNELKDKIQDVEGKYMQG LKEMKISLAEVEEKYKAMVSNAGLDNEKTNFMVQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKQKEFEREKHAHSILO 360
Iso2 GTSSRRGSGDTSISIDTEASIREIK-----ISLAEVEEKYKAMVSNAGLDNEKTNFMVQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKQKEFEREKHAHSILO 176
Iso3 GTSSRRGSGDTSISIDTEASIREIKELNELKDKIQDVEGKYMQG LKEMKISLAEVEEKYKAMVSNAGLDNEKTNFMVQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKQKEFEREKHAHSILO 232
Iso4 GTSSRRGSGDTSISIDTEASIREIK-----ISLAEVEEKYKAMVSNAGLDNEKTNFMVQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKQKEFEREKHAHSILO 208
Iso5 GTSSRRGSGDTSISIDTEASIREIK-----ISLAEVEEKYKAMVSNAGLDNEKTNFMVQVDTLKDMLLELEEQLAESRRQYEEKQKEFEREKHAHSILO 176
*****

Iso1 QFAEVKALKQREEMLEIRQLQKQAS SIREISD LQETI EWKDKKIGALERQKEFPDVSRSERDDLRE EVVMLKEELKSHGIIINSEIATNGE TSD TLNNVGYGGPTTKTKEELNALKS 480
Iso2 QFAEVKALKQREEMLE-----KHGIIILNSEIATNGE TSD TLNNVGYGGPTTKTKEELNALKS 225
Iso3 QFAEVKALKQREEMLE-----KHGIIILNSEIATNGE TSD TLNNVGYGGPTTKTKEELNALKS 290
Iso4 QFAEVKALKQREEMLE-----KHGIIILNSEIATNGE TSD TLNNVGYGGPTTKTKEELNALKS 266
Iso5 QFAEVKALKQREEMLE-----KHGIIILNSEIATNGE TSD TLNNVGYGGPTTKTKEELNALKS 234
*****

Iso1 TGDGTLDIRLKKLVDERECLLEQIKKLGQLEERQKIGKLDNLRSEDDVLENGTDMHVMDLQRDANRQISDLKFKLAKSEQEITALEQNVIRLE SQVSRYSKAAENAIEKIEDELKAEKRSK 600
Iso2 TGDGTLDIRLKKLVDERECLLEQIKKLGQLEERQKIGKLDNLRSEDDVLENGTDMHVMDLQRDANRQISDLKFKLAKSEQEITALEQNVIRLE SQVSRYSKAAENAIEKIEDELKAEKRSK 354
Iso3 TGDGTLGRASEVEVQNEIVANVGKREILHNTKEQHTEDTVKDCVDIEVFPAGENTEDQKS SEDTAPFLGTLGATYEEQVQSQILESSSLPENTVQVESNEVMGAPDDRTRTLPLEPNSC 410
Iso4 TGDGTLGRASEVEVQNEIVANVGKREILHNTKEQHTEDTVKDCVDIEVFPAGENTEDQKS SEDTAPFLGTLGATYEEQVQSQILESSSLPENTVQVESNEVMGAPDDRTRTLPLEPNSC 386
Iso5 TGDGTLGRASEVEVQNEIVANVGKREILHNTKEQHTEDTVKDCVDIEVFPAGENTEDQKS SEDTAPFLGTLGATYEEQVQSQILESSSLPENTVQVESNEVMGAPDDRTRTLPLEPNSC 354
*****

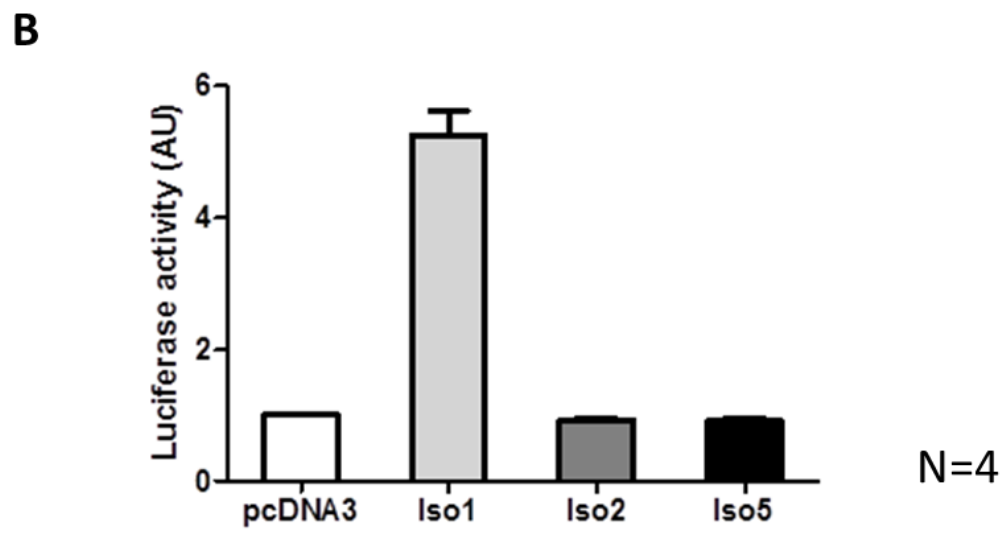
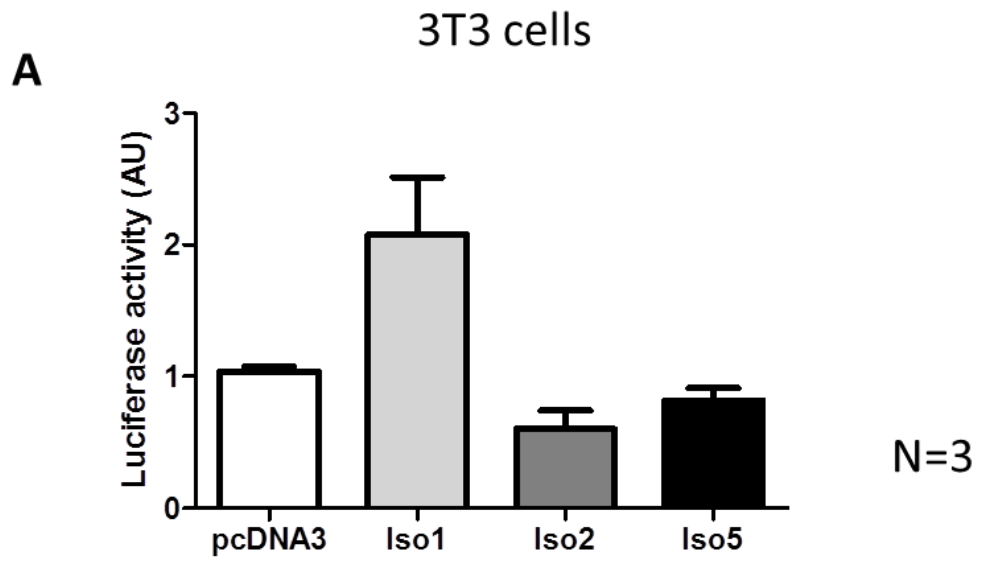
Iso1 LQRELRSA LDKTEELVSNHGLVFRLEKMKANRSALLSQ 640
Iso2 LQRELRSA LDKTEELVSNHGLVFRLEKMKANRSALLSQ 394

Iso3 WSDLDGGNHTENVGEAAVTQVEEQAGTVASCPLGHSDDTVYHDDKCMVEVPQJLETS TGHSLKEKEFTNQEAABPKVEVPAHSTEVGRDHNEE EGEETGLRDEKPIKT E VPGSPAGTEGNCQ 532
Iso4 WSDLDGGNHTENVGEAAVTQVEEQAGTVASCPLGHSDDTVYHDDKCMVEVPQJLETS TGHSLKEKEFTNQEAABPKVEVPAHSTEVGRDHNEE EGEETGLRDEKPIKT E VPGSPAGTEGNCQ 508
Iso5 WSDLDGGNHTENVGEAAVTQVEEQAGTVASCPLGHSDDTVYHDDKCMVEVPQJLETS TGHSLKEKEFTNQEAABPKVEVPAHSTEVGRDHNEE EGEETGLRDEKPIKT E VPGSPAGTEGNCQ 476

Iso3,4,5 EATGPSTVDTQNEPLDMKEPDEEKSDQOGEALDSSQKTKNKGKGGKGGKSPVPEVETLKDVKKELTYQNTDLS EIKEEEQVKS TDRKSAVEAQNEVTENPKQKIAAESSENVDPCPE
Iso3,4,5 NPKIKLEADGKLDQEGDDVQTAEEVLADGDTLDFEDDTVQSSGPRAGEEELDEGVAKDNAKIDGATQSPAEPKSEDADRC TLPHEHSP SQDISDACEAES TERCEMSEHFSQTV
Iso3,4,5 RKALDSNLENDEADLSAPGREPHFNPESREDRTRGNEKGGKSKEDCTMS 809,784,753

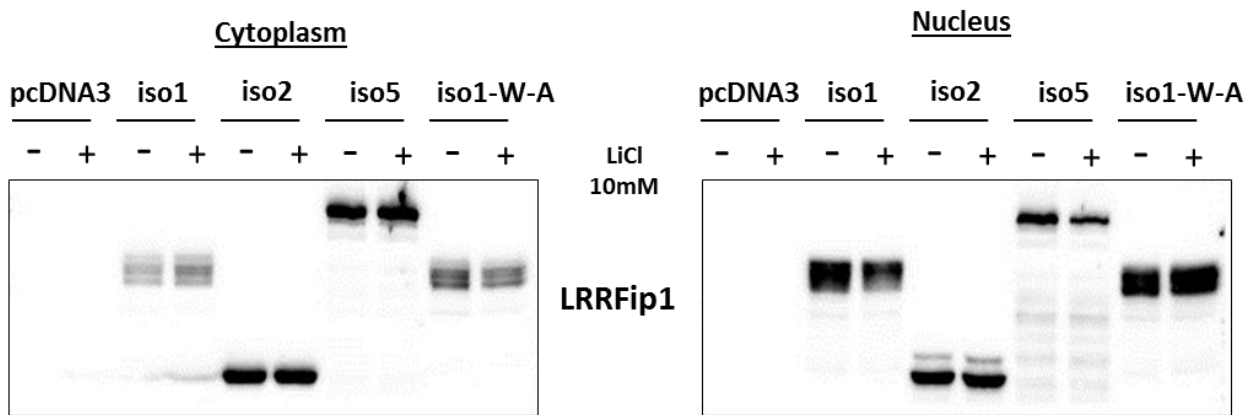
```

Fig S2

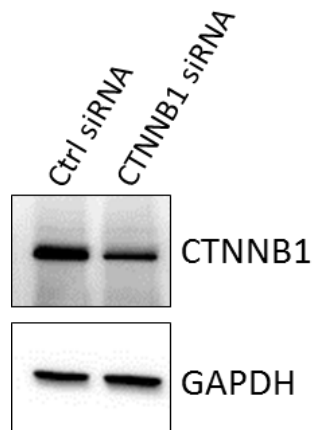


**Fig S3**

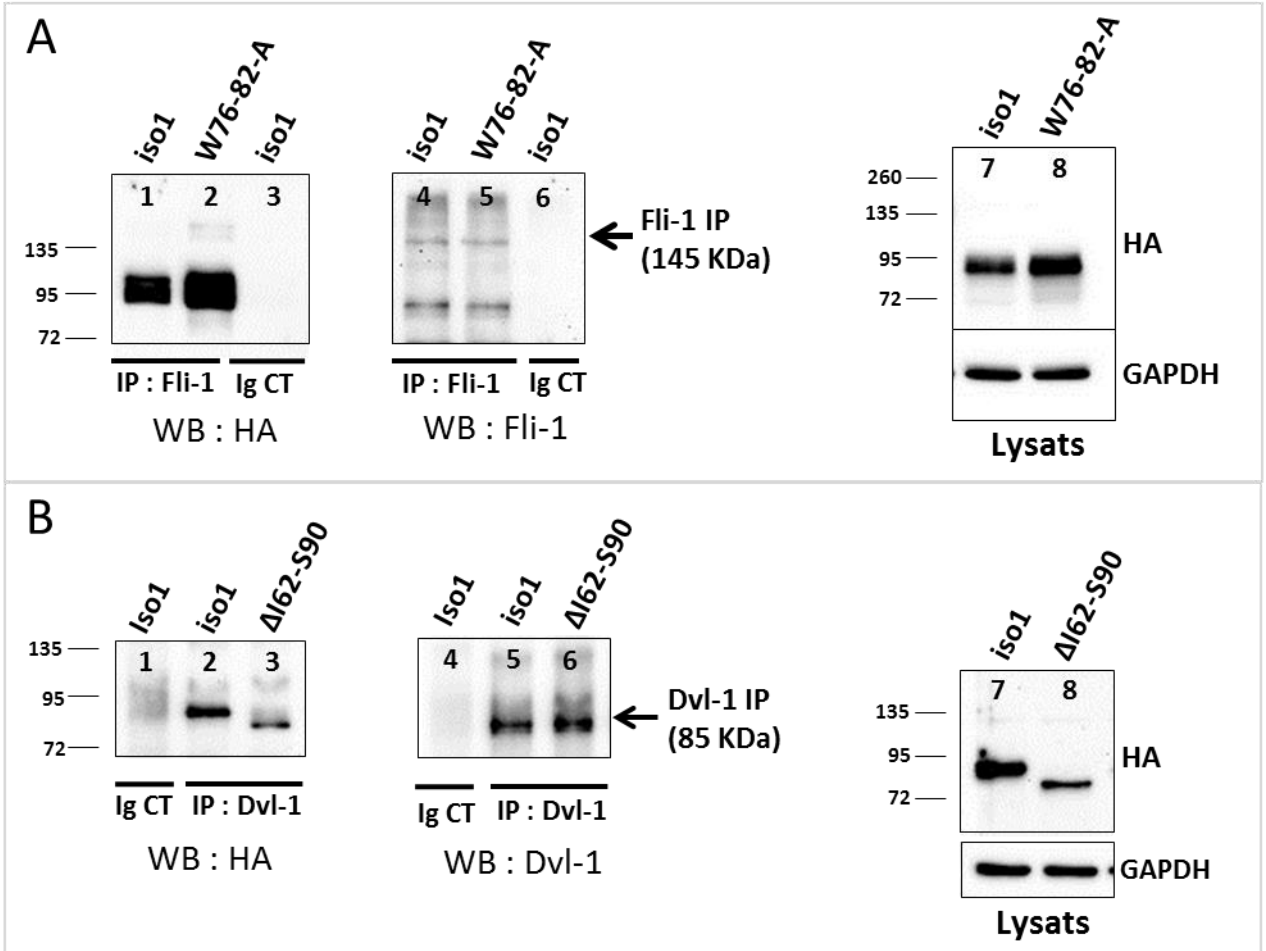




**Fig S4**



**Fig S5**



**Fig S6**

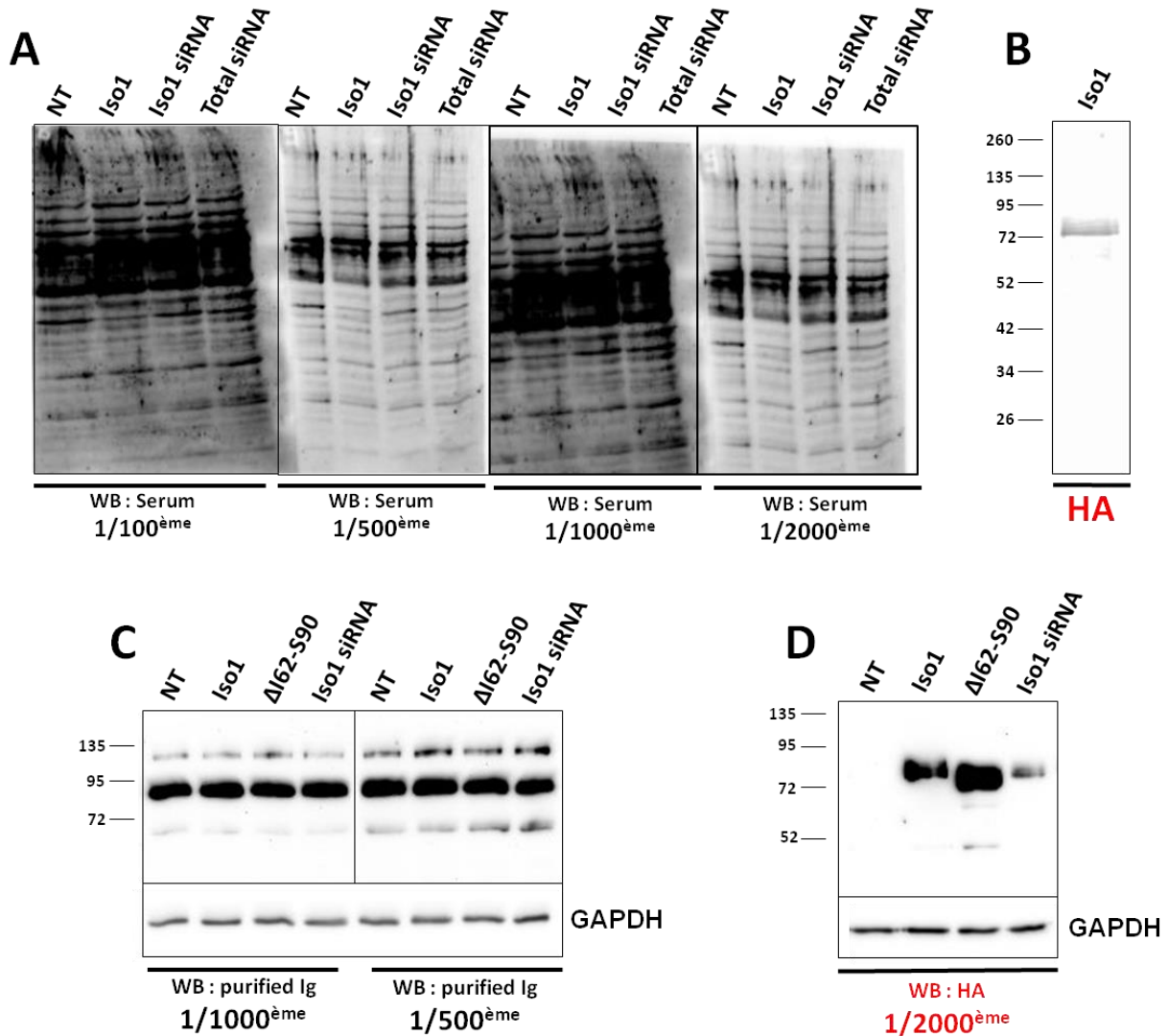
## II. Production d'un anticorps anti-LRRFip1-iso1

Il n'existe pas actuellement d'anticorps reconnaissant l'isoforme 1 humaine de LRRFip1. En effet, les seuls anticorps commerciaux ciblant LRRFip1 sont dirigés contre la partie C-terminale des isoformes 3-4-5. Nous avons donc été contraints d'introduire un tag HA en C-terminal des isoformes de LRRFip1. Néanmoins, nous avons essayé de faire développer un anticorps dirigé contre LRRFip1-iso1 par la société Eurogentec. La Figure 17 montre un alignement des séquences protéiques des isoformes humaines de LRRFip1. Le domaine coiled-coil commun aux cinq isoformes est représenté en vert selon les données précédemment publiées (Nguyen et Modis, 2013) et selon une analyse bioinformatique réalisée par B. Hoffmann (Université de Nantes), qui révèle également l'existence d'une région dite « désordonnée » représentée en jaune dans la séquence de LRRFip1-iso1 (aa 62 à 210). Cette région ne présente en effet aucune structure secondaire ni tertiaire, mais est susceptible de se structurer en présence de partenaires protéiques. Nous avons choisi de faire synthétiser deux courts peptides dans deux régions spécifiques de LRRFip1-iso1 : en N-terminal (aa 1 à 32) et dans le domaine coiled-coil (aa 378 à 436). Nous n'avons pas ciblé la région désordonnée car les épitopes reconnus par l'anticorps étaient susceptibles d'être masqués en cas de modification de sa structure. Les deux peptides ont été synthétisés puis injectés à quatre reprises chez un lapin. La spécificité des anticorps anti-LRRFip1-iso1 du sérum final (après les quatre injections) a été testée par Western Blot. Pour cela, des cellules HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 tagué HA, un siRNA dirigé contre LRRFip1-iso1 (cible les aa SLNRRS de 141 à 146 dans la région désordonnée) et un siRNA dirigé contre les cinq isoformes de LRRFip1 (cible les aa RCEMSEH de 693 à 699 dans la partie C-terminale). Les cellules ont été lysées puis un Western Blot a été réalisé et révélé avec le sérum de lapin à différentes concentrations. La Figure 18A montre un grand nombre de bandes détectées, mais aucune ne semble spécifique de LRRFip1-iso1 (normalement détecté vers 80 kDa). La Figure 18B montre que LRRFip1-iso1-HA est correctement surexprimé dans cette expérience.

Après une étape de purification des anticorps de ce sérum de lapin par Eurogentec, un nouveau test a été réalisé par Western Blot. Cette fois, des HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 WT et mutant iso1 $\Delta$ I62-S90 (un « shift » de quelques kDa devait ainsi être visible) tagués HA ainsi que le siRNA dirigé contre LRRFip1-iso1. Un Western Blot a été réalisé et incubé avec les anticorps purifiés à deux concentrations différentes. La Figure 18C montre le même profil de bandes pour toutes les conditions.



La Figure 18D montre cependant que l'expression des protéines ainsi que la répression de l'expression de LRRFip1-iso1 par le siRNA sont correctes. Les anticorps purifiés ont été testés dans d'autres conditions : autre type cellulaire (cellules HT 1080), conditions de dénaturation différentes, membrane de PVDF (au lieu de nitrocellulose) lors du transfert, mais aucun signal spécifique de LRRFip1-iso1 n'a été détecté.



**Figure 18 : Test par Western Blot des anticorps anti-LRRFip1-iso1 (Eurogentec).**

Des HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 WT et mutant  $\Delta$ I62-S90 tagués HA ainsi qu'avec un siRNA ciblant spécifiquement LRRFip1-iso1 ou ciblant les cinq isoformes (total). Les protéines ont été extraites puis séparées par électrophorèse sur un gel d'agarose, transférées sur membrane de nitrocellulose et incubées avec A) et B) le sérum final de lapin après les quatre injections de peptide et C) et D) les anticorps purifiés. A chaque fois, l'expression de LRRFip1-iso1 a été vérifiée grâce à l'anticorps anti-HA.

### III. Identification du variant p.R94G dans le gène LRRFIP1

Une étude clinique dans la famille MOR (Figure 19) a montré par une série d'échographies transthoraciques que 12 patients étaient atteints par un PVM. Le PVM concerne principalement le feuillet postérieur de la valve mitrale et ne montre pas de modifications importantes des valves semi-lunaires et tricuspides. En revanche, le propositus (III:6) montre un prolapsus des deux feuillets de la valve, avec un épaissement et un allongement des feuillets sans rupture de cordage. Chez ce patient, la mauvaise coaptation des deux feuillets de la valve provoque de fait une régurgitation mitrale importante. En revanche, tous les autres patients présentent une régurgitation mitrale modérée ou inexistante. Les données phénotypiques pour les 10 patients atteints de PVM de la famille MOR sont indiquées dans le Tableau 2.

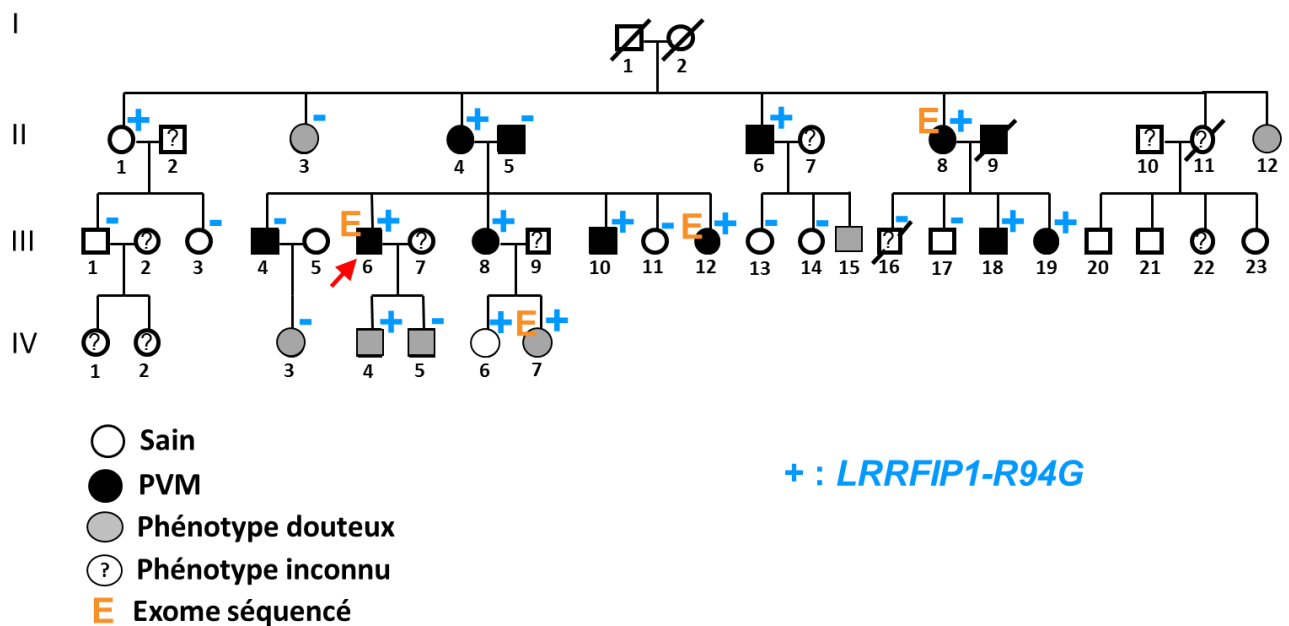


Figure 19 : Arbre généalogique de la famille MOR et représentation du phénotype PVM.

La partie de la famille étudiée comporte 10 membres atteints par un PVM (plus 2 conjoints également atteints). Parmi eux quatre séquençages d'exome ont permis d'identifier la mutation p.R94G sur le gène *LRRFIP1*. La mutation est présente chez 9/10 patients affectés par la pathologie. Le propositus (III:6) est indiqué par une flèche rouge.

Cette famille est complexe puisque deux soeurs atteintes de PVM de cette famille (II:4 et II:8) ont épousé deux frères eux aussi atteints de PVM d'une autre famille (II:5 et II:9), ce qui suggère que plusieurs gènes peuvent être impliqués dans le développement de la

pathologie. Le patient II:5 ainsi que d'autres membres de sa famille dont ses enfants atteints (III:4 ; III:6 ; III:8 ; III:10 ; III:12) partagent un variant d'intérêt préalablement identifié et potentiellement associé au PVM. Mais le patient II:4 ainsi que les membres de sa famille (II:6 ; II:8 ; III:18 ; III:19) ne présentent pas ce variant. **L'hypothèse d'un autre déterminant génétique associé au PVM** dans cette famille a donc été envisagée.

Individu	Age	PVM	Prolapsus V. ant (mm)	Prolapsus V. post (mm)
II:4	78	Atteint	1,3	-5,9
II:6	69	Atteint	0	-5,2
II:8	77	Atteint	-4,7	-7,5
III:4	55	Atteint	-2	-4
III:6	49	Atteint	Chirurgie de la valve mitrale	
III:8	42	Atteint	-2,1	-3,9
III:10	55	Atteint	-1,1	-3,9
III:12	39	Atteint	0	-4,1
III:18	37	Atteint	0,2	-4
III:19	40	Atteint	-2,3	-1,8

**Tableau 2 : Données phénotypiques des patients atteints de PVM de la famille MOR.**

Les mesures de prolapsus des valvules mitrales, antérieure (V. Ant) et postérieure (V. Post) sont reportées en millimètres. Les mesures négatives correspondent aux mesures au-dessus du plan de l'anneau.

Un séquençage d'exome chez 3 patients atteints de PVM (II:8, III:6, III:12) et une patiente probablement atteinte compte tenu de son jeune âge (IV:7, diagnostiquée à l'âge de 12 ans) a été réalisé et a permis d'identifier 7 variants rares (fréquence < 0,1%) partagés par les 4 exomes. Le Tableau 3 présente les 7 variants identifiés dans les 4 exomes de la famille et partagés par au moins 5 autres patients atteints de PVM. Il est important de noter **qu'aucun variant ne ségrègait parfaitement avec le PVM** dans cette famille. Cinq variants présentent une phénocopie respectivement chez le patient III:4 pour les gènes *LRRFIP1*, *COL6A3* et *MCF2L2*, chez le patient III:18 pour le gène *ENPP3* et chez le patient III:19 pour le gène *MYH4*. Comme décrit précédemment, le patient III:4 est particulier car il partage avec le patient II:5 (son père) le variant d'intérêt qui pourrait également contribuer au développement du PVM, tandis que les patients III:18 et III:19 ne le présentent pas.

Le variant dans le gène *LRRFIP1* nous est alors apparu comme le meilleur candidat puisque 1) l'expression de *LRRFIP1* avait alors été confirmée dans la valve mitrale humaine par un RNA-seq réalisé par le Centre de Recherche Génomique (CRG) à Barcelone et 2) *LRRFIP1* avait été décrit comme participant aux voies de signalisation impliquées dans la

valvulogénèse (voies Wnt canonique et réponses au stress mécanique), il nous semblait alors le gène le plus susceptible d’être associé au développement du PVM (voir partie I de l’introduction du projet 1). Le gène *LRRFIP1* est situé sur le chromosome 2. Le variant induit une substitution d’une Arginine en Guanine en position 94 (locus NC\_000002.11:g.238628196). Cette substitution R94G a été ensuite validée par séquençage de Sanger et est présente chez 9/10 patients affectés par le PVM, ce qui suggère un rôle de ce variant dans le phénotype observé.

		Variants partagés par au moins 9 atteints (positions génomiques hg19)						
		<i>LRRFIP1</i> (faux-sens)	<i>COL6A3</i> (faux-sens)	<i>MCF2L2</i> (faux-sens)	<i>ENPP3</i> (faux-sens)	<i>MYH4</i> (non-sens)	<i>ZNF223</i> (faux-sens)	<i>ZNF223</i> (faux-sens)
Individu	Phénotype	chr2:23862 8196 A>G	chr2:23823 3440 C>T	chr3:18304 1127 T>C	chr6:13199 5406 G>C	chr17:1034 8646 C>A	chr19:4457 1407 T>G	chr19:4457 1414 T>A
II:4	atteint	+	+	+	+	+	+	+
II:6	atteint	+	+	+	+	+	+	+
II:8	atteint (exome)	+	+	+	+	+	+	+
III:4	atteint	-	-	-	+	+	+	+
III:6	atteint (exome)	+	+	+	+	+	+	+
III:8	atteint	+	+	+	+	+	+	+
III:10	atteint	+	+	+	+	+	-	-
III:12	atteint (exome)	+	+	+	+	+	+	+
III:18	atteint	+	+	+	-	+	-	-
III:19	atteint	+	+	+	+	-	+	+
IV:7	probablement atteint à 12 ans (exome)	+	+	+	+	+	+	+

**Tableau 3 : Liste des variants partagés par au moins 9 patients atteints de PVM de la famille MOR.**

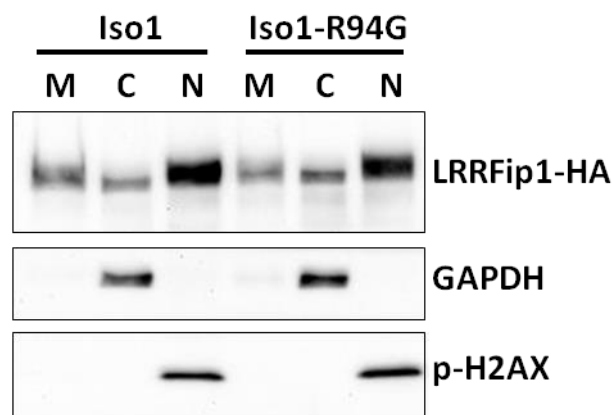
A) 7 variants (dont *LRRFIP1*) ont été retrouvés partagés par les 4 exomes et par au moins 5 autres patients atteints de PVM. Le tableau ci-dessus présente la présence ou non du variant dans les gènes *LRRFIP1*, *COL6A3*, *MCF2L2*, *ENPP3*, *MYH4* et *ZNF223* pour les 11 patients testés. Le + représente la présence à l’état hétérozygote du variant.



## IV. Effets physiopathologiques de la mutation p.R94G

### 1. Expression et localisation de LRRFip1-iso1-R94G

L'expression et la localisation du mutant p.R94G ont été vérifiées par Western Blot après la lyse et le fractionnement cellulaire de HEK 293 transfectées avec LRRFip1-iso1 WT et R94G. La Figure 20 montre que LRRFip1-iso1R94G est correctement exprimé et préférentiellement nucléaire comme le WT, ce qui suggère que la mutation p.R94G ne modifie pas de façon importante l'adressage, la structure, ou la stabilité de la protéine.

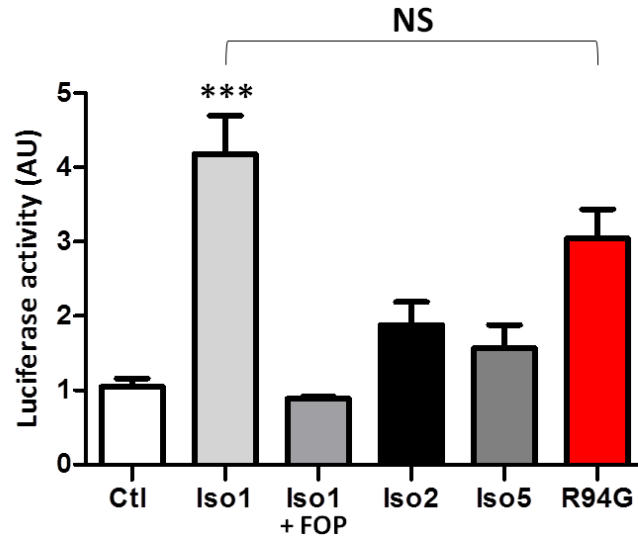


**Figure 20 : Localisation de LRRFip1-iso1 WT et R94G.**

Des HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 WT et R94G, lysées et fractionnées. La GAPDH et p-Histone2AX permettent respectivement le contrôle de la qualité des fractions cytoplasmique et nucléaire.

### 2. Activation de la voie Wnt

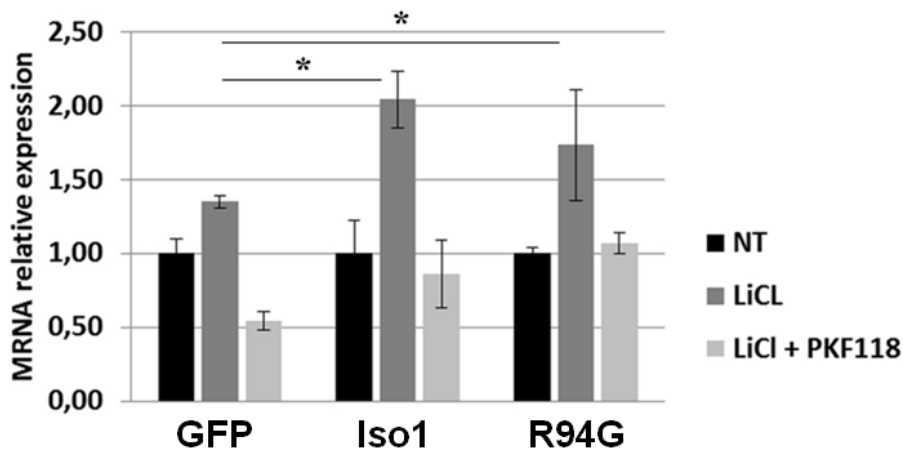
J'ai voulu déterminer si la mutation p.R94G avait un effet sur l'activation de la voie Wnt canonique par LRRFip1-iso1. Pour cela, des HEK 293 ont été co-transfectées avec LRRFip1 et le plasmide TOP Flash codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur comportant une répétition X8 des motifs de liaison pour les facteurs de transcription TCF/LEF. La Figure 21 montre que si l'activation de la voie Wnt par LRRFip1-iso1 WT est significativement augmentée, ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence un effet majeur de la mutation p.R94G puisqu'on observe une diminution non significative de l'activation de la voie Wnt d'environ 30% (non significatif ;  $p > 0.05$  ;  $N \geq 3$ ).



**Figure 21 : Effet du mutant R94G sur la voie Wnt canonique.**

Des HEK 293 ont été co-transfectées avec LRRFip1 et le plasmide TOP Flash, puis l'activation de la voie Wnt a été mesurée par dosage de la luciférine. Pour le test statistique, une ANOVA à une voie a été réalisée ( $p > 0.05$  ;  $N \geq 3$ ). NS : Non significatif.

Puis l'expression de TCF-7, une cible endogène de la voie Wnt, a été évaluée par des expériences de qPCR réalisées par l'équipe de S. Zaffran (Marseille) dans des VICs de rat transfectées avec de la GFP, LRRFip1-iso1 WT et mutant R94G. La Figure 22 montre que LRRFip1-iso1 augmente significativement l'expression de TCF-7 dans des cellules traitées avec du LiCl à 10mM. Là encore la mutation R94G diminue l'effet de LRRFip1-iso1 sur l'expression de TCF-7 mais de manière non significative comme ce qui a été observé pour l'activation de Wnt (voir Figure 21).



**Figure 22 : Effet du mutant R94G sur l'expression de TCF-7.**

Des VICs de rat ont été transfectées avec la GFP (contrôle), LRRFip1-iso1 WT et mutant R94G. Les ARNm ont été extraits, rétrotranscrits en ADNc puis l'expression de TCF-7 a été évaluée. Une ANOVA à une voie a été réalisée pour le test statistique ( $p > 0.05$  ;  $N \geq 3$ ).

### 3. Interaction avec les protéines partenaires de LRRFip1-iso1

Les effets du mutant R94G, mais aussi des mutants  $\Delta I62-S90$  et W76;82-AA qui sont plus représentatifs de la forte diminution de l'activation de la voie Wnt canonique par LRRFip1-iso1 (au moins 80%, contre  $\approx 30\%$  pour le mutant R94G) ont été étudiés notamment sur l'interaction de LRRFip1-iso1 avec ses protéines partenaires dans la partie V ci-après.

## V. Identification des protéines partenaires de LRRFip1

Avant même de déterminer la localisation nucléaire et le rôle activateur de la voie Wnt canonique de LRRFip1-iso1, nous avons entrepris d'identifier ses partenaires protéiques afin d'avoir une idée des voies de signalisation dans lesquelles cette protéine pouvait être impliquée.

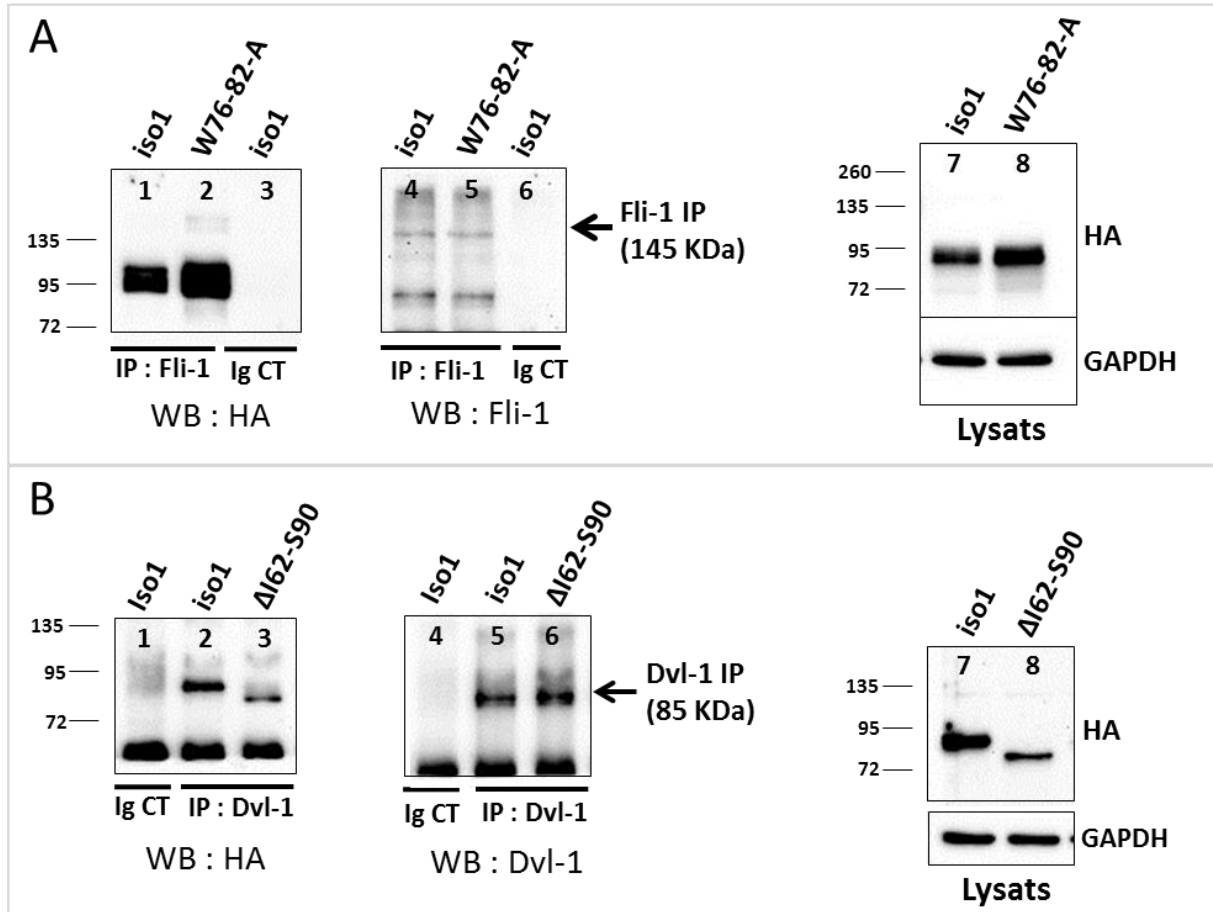
### 1. Identification des protéines cytoplasmiques

Afin d'identifier les protéines interagissant spécifiquement avec LRRFip1-iso1, nous avons utilisé deux approches. La 1ère consistait à vérifier l'interaction entre LRRFip1-iso1 et certaines protéines de la voie Wnt par co-immunoprécipitation (voir protocole partie V.4). La 2ème a consisté à identifier de manière plus exhaustive les protéines partenaires de LRRFip1-iso1 en réalisant une spectrométrie de masse sur un échantillon de LRRFip1-iso1 immunoprécipité. Cette technique nous a permis de confirmer certaines interactions et d'identifier un nouveau partenaire intéressant, la déubiquitinase USP9X.

#### a. Identification de Dishevelled et Flightless-1 par co-immunoprécipitation

Afin de déterminer si LRRFip1-iso1 interagissait avec Dvl-1 et Fli-1 (comme cela a déjà été décrit pour LRRFip1-iso5) et si cette interaction était indispensable à l'activation Wnt par LRRFip1-iso1, une immunoprécipitation de ces protéines endogènes a été réalisée dans un lysat de HEK 293 transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou mutants (iso1W76;82-AA ou iso1 $\Delta I62-S90$  qui diminuent tous les deux de 80% l'activation de la voie Wnt) taggés HA. La Figure 23 montre que LRRFip1-iso1 WT interagit avec Fli-1 (Figure 23A piste 1) et Dvl-1 ((Figure 23B piste 2) et que les mutations iso1W76;82-AA et iso1 $\Delta I62-S90$  ne modifient pas cette interaction (respectivement Figure 23A piste 2 et Figure 23B piste 3). Rien n'est immunoprécipité dans l'immunoprécipitation contrôle avec l'Ig de souris (Figure 23A piste 3 et Figure 23B piste 1). Cette expérience a été reproduite plusieurs fois et n'a pas permis de mettre en évidence des différences d'interaction entre les mutants de LRRFip1-iso1 et Fli-1

ou Dvl-1. Ce résultat suggère donc que nous ne pouvons pas expliquer la perte d'activation de la voie Wnt des mutants iso1W76;82-AA et iso1ΔI62-S90 par une modification de l'interaction avec les protéines Fli-1 et Dvl-1. La co-immunoprécipitation du mutant R94G avec Dvl-1 et Fli-1 a également été testée mais n'a pas montré de différence d'interaction par rapport au WT.



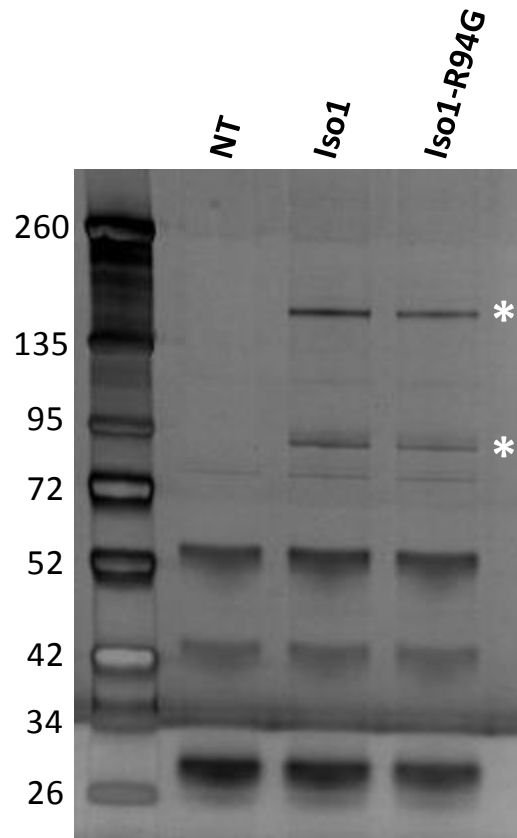
**Figure 23 : Interaction de LRRFip1-iso1 avec Fli-1 et Dvl-1.**

Immunoprécipitation de Fli-1 (A) et Dvl-1 (B) et révélation de LRRFip1-iso1-HA dans des HEK 293 transfectées avec LRRFip1 WT ou mutants. L'immunoprécipitation de LRRFip1-iso1 avec une Ig de souris sert de contrôle négatif. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

#### b. Identification de USP9X par Spectrométrie de Masse

Une analyse par Spectrométrie de Masse des protéines co-immunoprécipitées avec LRRFip1-iso1 nous a permis de déterminer de façon exhaustive les protéines interagissant spécifiquement avec. Pour cela, des HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 WT et R94G taggés HA afin de déterminer si la mutation R94G pouvait provoquer des modifications d'interaction. Des HEK 293 non transfectées (NT) ont été utilisées en contrôle de l'immunoprécipitation. LRRFip1-iso1 a été immunoprécipité et un aliquot de cet

immunoprécipitat a été déposé sur gel d'acrylamide puis coloré au Nitrate d'Argent. En effet, la condition imposée par la plateforme *EDyP* au CEA à Grenoble pour réaliser la spectrométrie de masse était de pouvoir identifier distinctement une bande pouvant correspondre à LRRFip1-iso1 sur un gel d'acrylamide coloré au Bleu de Coomassie ou au Nitrate d'Argent. La Figure 24 montre l'image du gel où une bande pouvant correspondre à LRRFip1-iso1 ( $\approx 80$  kDa) est clairement visible seulement dans la condition transfectée.

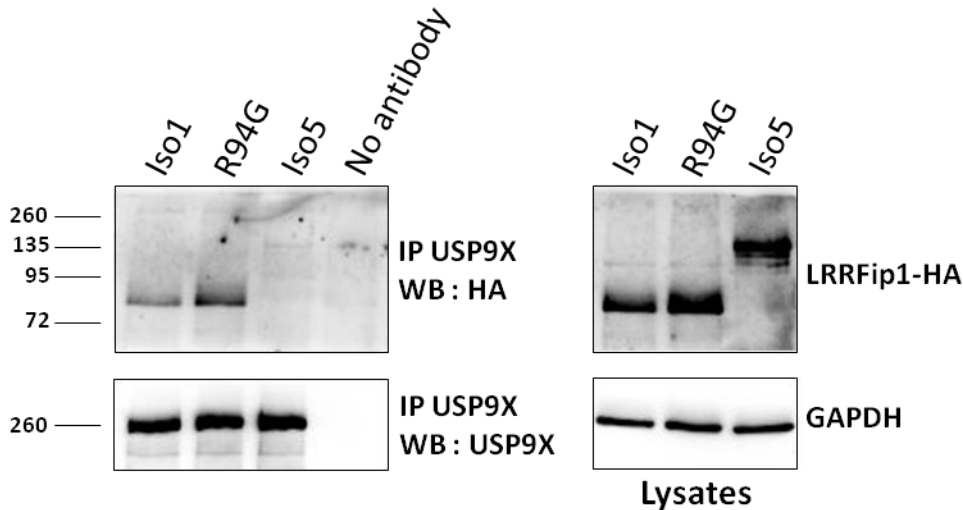


**Figure 24 : Image d'un gel coloré au Nitrate d'Argent sur lequel a été séparé par électrophorèse l'immunoprécipitat de LRRFip1-iso1 WT et R94G.**

Des bandes correspondant potentiellement à LRRFip1-iso1 ( $\approx 80$  kDa) et Fli-1 ( $\approx 145$  kDa) apparaissent nettement sur le gel (indiquées par une étoile blanche). Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

Le reste de l'immunoprécipitat a été envoyé à la plateforme *EDyP* à Grenoble où la Spectrométrie de Masse a été réalisée (voir bilan en Annexe 2). Plusieurs protéines identifiées dans cette expérience étaient des interactants connus de LRRFip1-iso5 tels que LRRFip1 lui-même (dimérisation), Fli-1 et LRRFip2. De façon intéressante, USP9X qui est impliquée à la fois dans la déubiquitination de Smad4 et de la  $\beta$ -caténine (Dupont et al., 2009; Taya et al., 1999), est apparue comme une nouvelle protéine interagissant avec LRRFip1-iso1. Cette interaction a été vérifiée par immunoprécipitation de USP9X endogène dans des HEK 293

transfectées avec LRRFip1-iso1, iso5 et R94G. La Figure 25 montre que LRRFip1-iso1 WT et mutant R94G interagissent avec USP9X, mais pas LRRFip1-iso5, suggérant la spécificité de l'interaction entre USP9X et LRRFip1-iso1. La plus forte interaction observée entre USP9X et le mutant R94G n'a pas été reproduite et est probablement due dans cette expérience à la plus forte expression de LRRFip1-R94G dans les lysats.

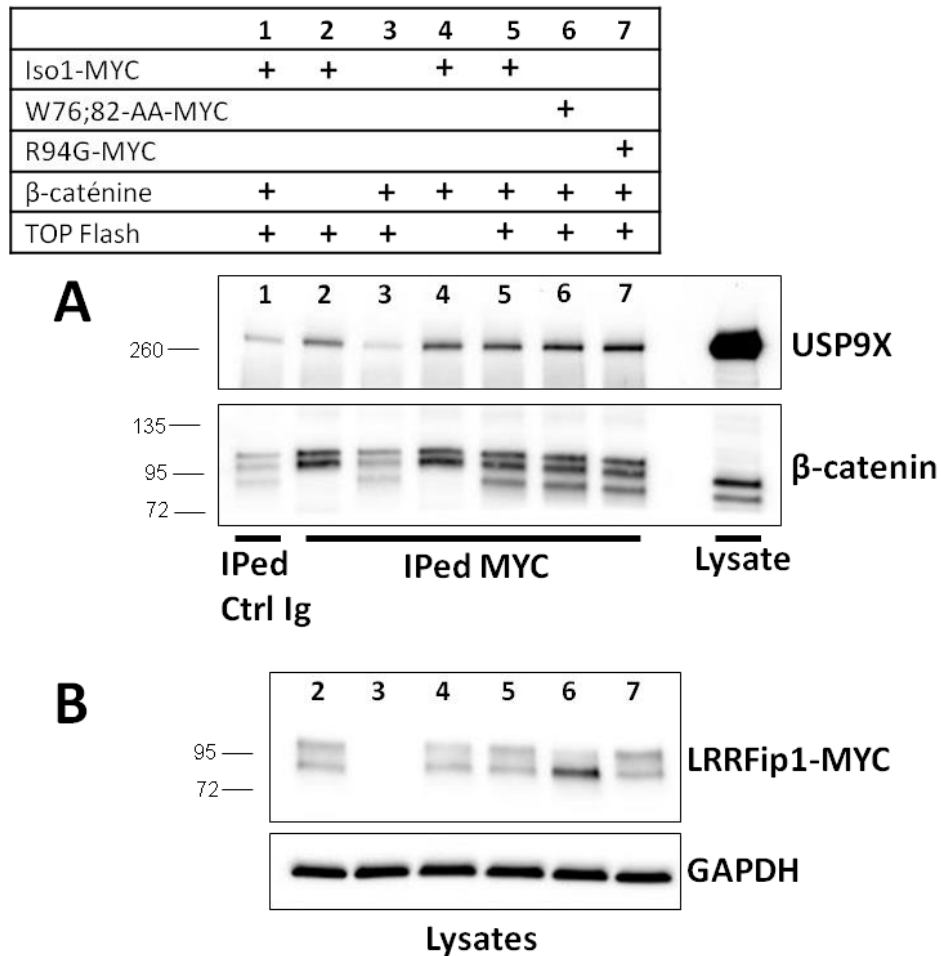


**Figure 25 : Interaction de LRRFip1 avec USP9X.**

Immunoprécipitation de USP9X (PM = 290 kDa) et révélation de LRRFip1-HA dans des HEK 293 transfectées avec LRRFip1-iso1 et iso5 WT et mutant iso1-R94G. Le contrôle négatif sans anticorps permet de vérifier que LRRFip1-HA ne s'accroche pas aux billes magnétiques. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

J'ai ensuite entrepris de vérifier si LRRFip1-iso1 pouvait former un complexe avec USP9X et la  $\beta$ -caténine, et si ces interactions pouvaient être perturbées par les mutants iso1-W76;82-AA et iso1-R94G. Des expériences d'immunoprécipitation de LRRFip1-HA et révélation de la  $\beta$ -caténine ou inversement dans des HEK 293 transfectées avec LRRFip1-HA n'ont pas permis de déterminer une interaction entre ces deux protéines. Afin de "forcer" l'interaction et de recruter la  $\beta$ -caténine, USP9X et LRRFip1 sur un promoteur cible, des cellules HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1 tagué MYC, le plasmide TOP Flash ainsi qu'un plasmide codant pour la  $\beta$ -caténine, et une immunoprécipitation du MYC a été réalisée. La Figure 26A montre qu'en présence de LRRFip1-iso1 WT aussi bien que mutants, USP9X et la  $\beta$ -caténine sont immunoprécipités (pistes 5-6-7). Ces protéines sont également immunoprécipitées dans les conditions sans  $\beta$ -caténine (piste 2) et sans TOP Flash (pistes 4). Un faible signal aspécifique est également présent dans les conditions d'immunoprécipitation avec une Ig Ctrl de souris (pistes 1) et sans transfection de LRRFip1-MYC (piste 3). On peut remarquer que dans les conditions 5, 6 et 7, la  $\beta$ -caténine est détectée avec trois bandes bien

distinctes à 95 kDa (PM attendu) et au-dessus et en-dessous qui correspondent probablement respectivement à une modification post-traductionnelle (phosphorylation) et à un produit de dégradation. Les lysats révélés en MYC (Figure 26B) montre une expression équivalente de LRRFip1-iso1 WT et mutants entre les conditions, sauf pour le W76;82-AA qui montre un profil différent (piste 6). En effet son expression est plus forte et il semble moins phosphorylé (voir détection des formes phosphorylées de LRRFip1-iso1 dans la partie V.1.e). Ce résultat qui n'a pas été observé précédemment simplement en condition de transfection avec LRRFip1-W76;82-AA devra être confirmé.

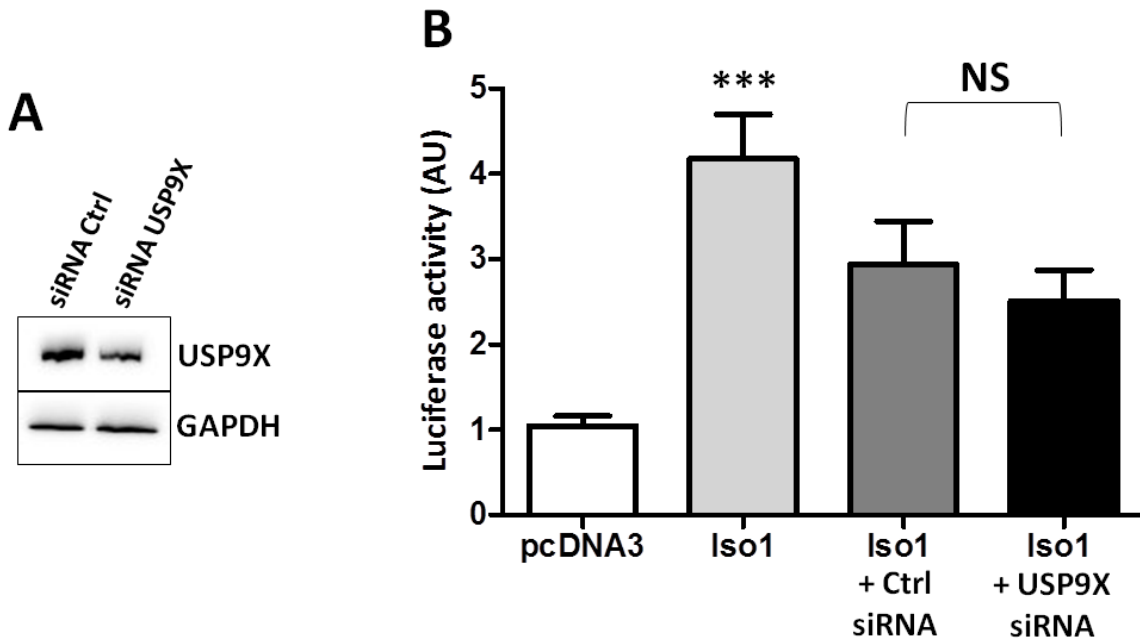


**Figure 26 : Interaction de LRRFip1-iso1 avec USP9X et la β-caténine.**

Des HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1-MYC WT ou mutants R94G et W76;82-AA et/ou le plasmide TOP Flash et/ou la β-caténine, puis une immunoprécipitation du MYC a été réalisée. Un Western Blot a permis de révéler la co-immunoprécipitation de USP9X et de la β-caténine. La GAPDH sert de contrôle de la quantité de protéines déposées dans les puits. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

Ces résultats suggèrent que LRRFip1-iso1 interagit à la fois avec USP9X et la  $\beta$ -caténine, mais que les mutations R94G et W76;82-AA ne perturbent pas cette interaction.

Pour finir, il a été vérifié si l'activation de la voie Wnt par LRRFip1-iso1 pouvait passer par l'intermédiaire de USP9X. Pour cela, des HEK 293 ont été transfectées avec un siRNA anti-USP9X ainsi qu'avec LRRFip1-iso1 et un test d'activation à la luciférase a été réalisé. La Figure 27A montre la diminution de l'expression de USP9X par le siRNA déterminée par Western Blot (environ 30% en moyenne). La Figure 27B montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la condition iso1 + siRNA Ctrl et la condition iso1 + siRNA USP9X, ce qui suggère que USP9X n'est pas indispensable à l'activation de la voie Wnt par LRRFip1-iso1, ou que l'efficacité de l'extinction de l'expression de USP9X par le siRNA est insuffisante pour déterminer un effet.



**Figure 27 : Effet de l'extinction de l'expression d'USP9X sur l'activation de la voie Wnt par LRRFip1.**

A) L'expression de USP9X est diminuée en moyenne d'environ 30% entre une condition transfectée avec un siRNA anti-USP9X par rapport à un siRNA Ctrl. B) Des HEK 293 ont été transfectées avec le siRNA contrôle ou anti-USP9X et les plasmides TOP Flash et LRRFip1-iso1. Les cellules ont été lysées et une mesure de l'activité de la luciférase a été réalisée. NS : Non significatif.  $N \geq 3$  ;  $p < 0.05$ .

Ces données ont permis de confirmer par immunoprécipitation l'interaction entre USP9X et LRRFip1-iso1 suggérée par les résultats de Spectrométrie de Masse, mais n'ont cependant pas apporté de réponses quant au rôle de USP9X dans l'activation de la voie Wnt



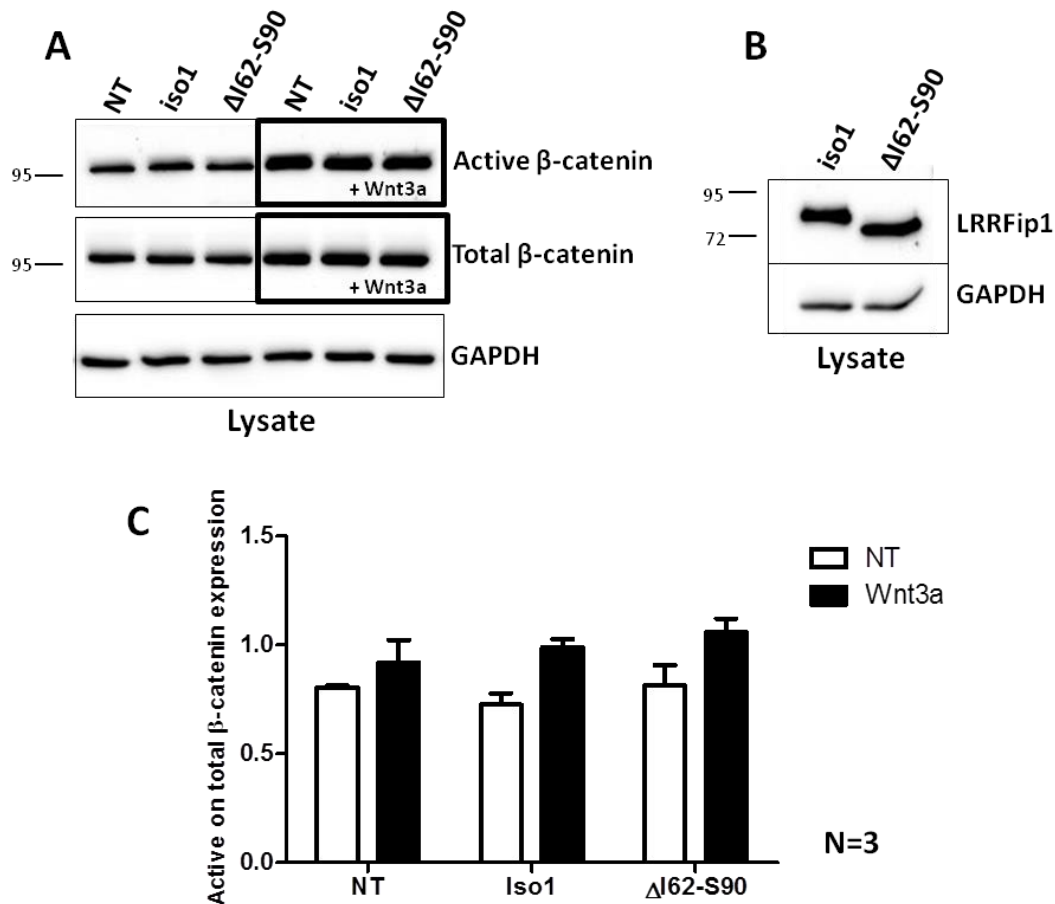
canonique médiée par LRRFip1-iso1. Nous avons donc voulu vérifier par la suite si cette activation pouvait induire des modifications dans l'expression, la localisation et les niveaux de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine qui est l'effecteur majeur de la voie Wnt canonique, et si ces modifications pouvaient être perturbées par les mutants de LRRFip1-iso1.

c. Étude de l'effet de LRRFip1-iso1 sur les niveaux de phosphorylation/ubiquitination de la  $\beta$ -caténine

Étant donné l'interaction de LRRFip1-iso1 avec USP9X et la  $\beta$ -caténine montrée précédemment, il était important de regarder les changements d'expression/localisation et les niveaux de phosphorylation/ubiquitination de la  $\beta$ -caténine qui pouvaient être modifiés par LRRFip1-iso1.

Premièrement, je me suis intéressée à l'expression cellulaire de la  $\beta$ -caténine en présence de LRRFip1-iso1. En effet, il est reconnu que l'activation de la voie Wnt canonique induit une augmentation des niveaux d'expression de la  $\beta$ -caténine notamment *via* une diminution de sa dégradation (Giarré et al., 1998). L'expression cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine a été évaluée dans des HEK 293 transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou mutant  $\Delta$ I62-S90 et traitées avec Wnt3a. La Figure 28A montre que si l'expression de la  $\beta$ -caténine active et totale augmente sensiblement avec le traitement Wnt3a, elle n'est pas modifiée en présence de LRRFip1-iso1 WT ou mutant. L'anticorps dirigé contre la forme active de la  $\beta$ -caténine reconnaît une forme non phosphorylée sur les Ser33/37 et la Thr41, puisque la phosphorylation de ces sites entraîne la dégradation de la  $\beta$ -caténine (Liu et al., 2002).

La quantification de 3 expériences distinctes n'a pas permis de mettre en évidence des modifications des niveaux d'expression ou d'activation de la  $\beta$ -caténine par LRRFip1-iso1 (Figure 28C). Cependant, l'analyse réalisée ici du niveau global (cellulaire) de l'expression de la  $\beta$ -caténine peut masquer des changements plus discrets au niveau subcellulaire notamment nucléaire de son expression.

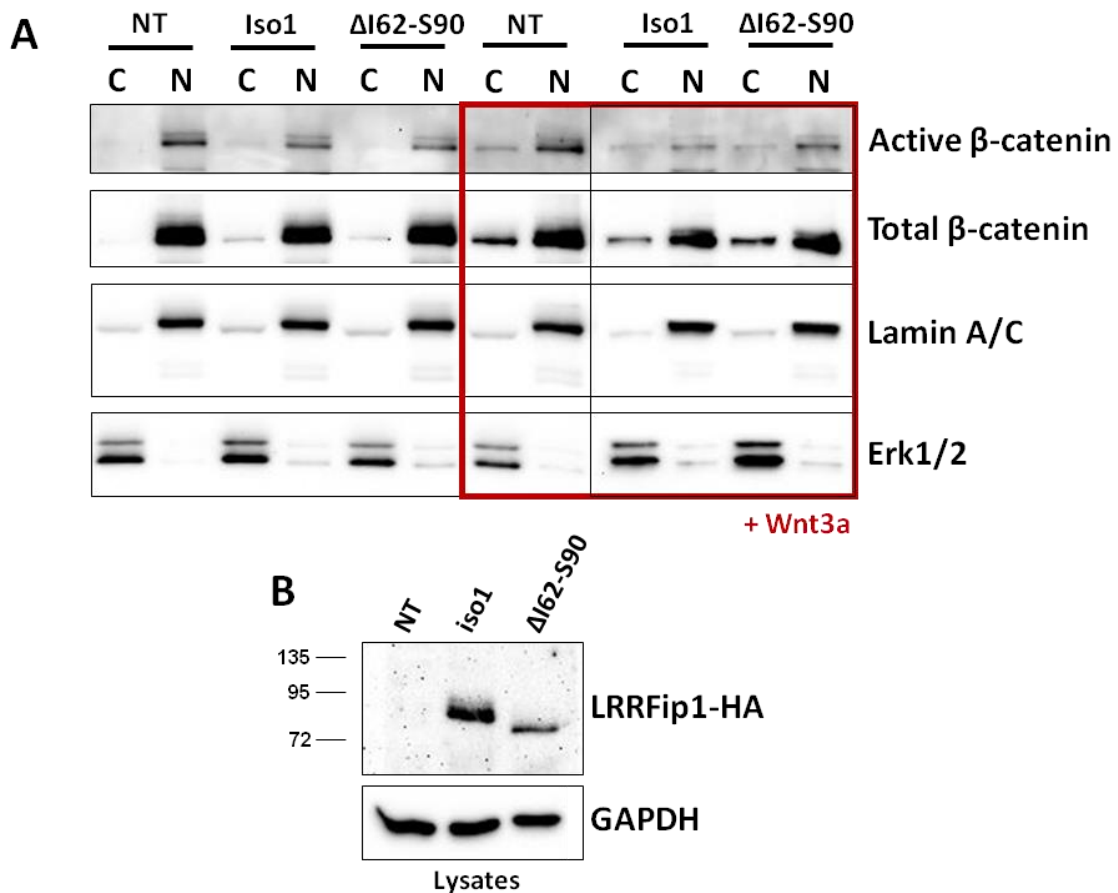


**Figure 28 : Effet de LRRFip1 sur l'expression de la  $\beta$ -caténine active et totale.**

Des HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou mutant ( $\Delta$ I62-S90), traitées 24H après avec du surnageant Wnt3a pendant 15H puis lysées en NP40 1%. A) Expression de la  $\beta$ -caténine active et totale en Western Blot B) Expression de LRRFip1 dans les lysats transfectés C) Quantification sur 3 expériences des niveaux de  $\beta$ -caténine active sur totale. La GAPDH sert de contrôle de la quantité de protéines déposées dans les puits. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

Dans un deuxième temps, je me suis donc intéressée à la localisation cellulaire de la  $\beta$ -caténine en présence de LRRFip1-iso1. En effet, il est reconnu que l'activation de la voie Wnt induit une translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine qui a été mise en évidence en Western Blot ou en immunofluorescence (Jamieson et al., 2016). La Figure 29 montre un isolement des fractions cytoplasmiques et nucléaires sur des cellules HEK 293 non transfectées (contrôle) et transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou mutant ( $\Delta$ I62-S90). L'expression de la  $\beta$ -caténine active et totale est seulement augmentée dans le cytoplasme dans la condition stimulée avec Wnt3a par rapport à la condition non stimulée. Étonnamment dans cette lignée de cellules, la majorité de la  $\beta$ -caténine exprimée se trouve dans le noyau même sans activation de la voie Wnt. La synthèse de deux expériences n'a pas permis de montrer une différence significative

des niveaux d'expression et localisation de la  $\beta$ -caténine entre la condition contrôle (NT) et les conditions transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou mutant.

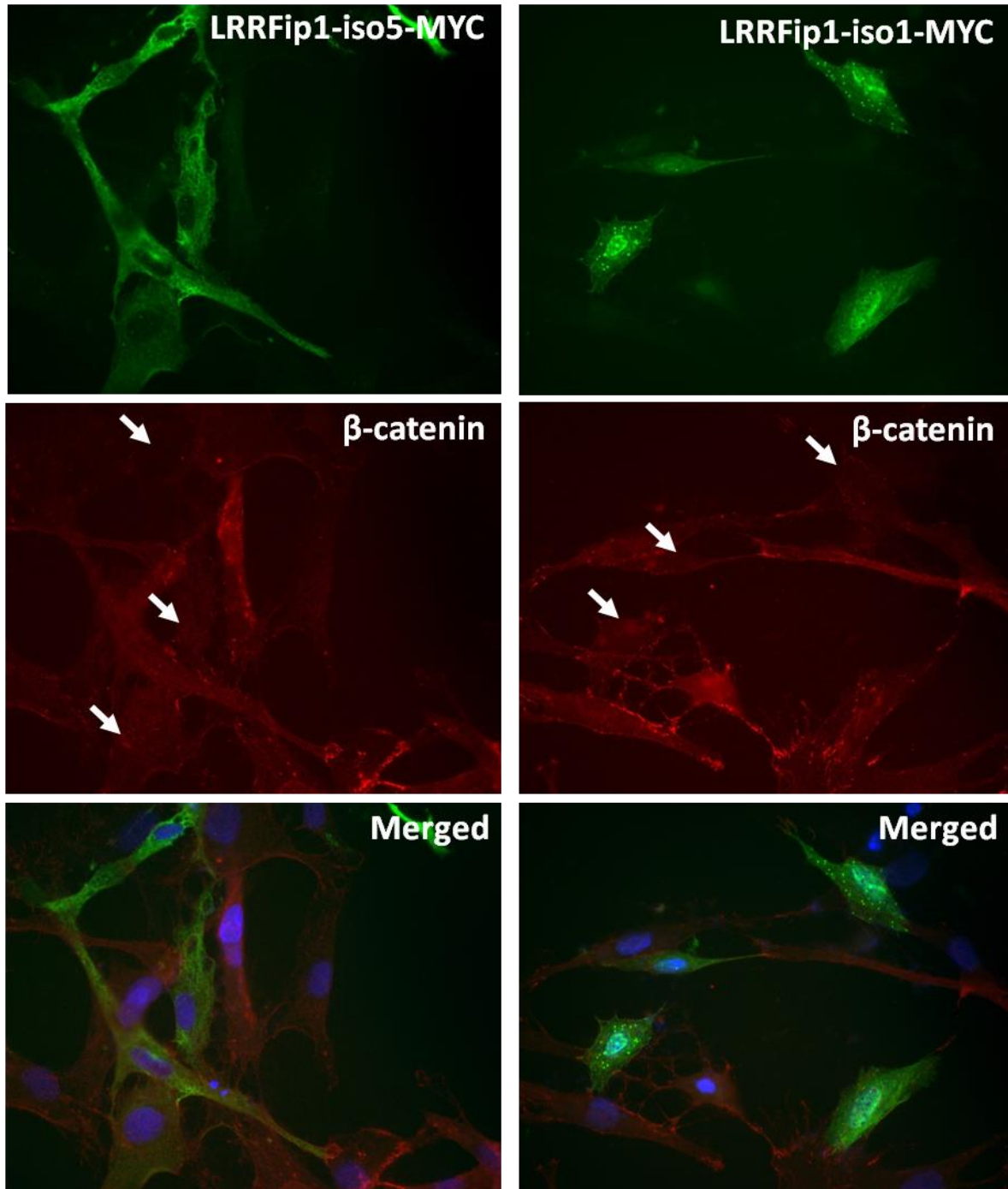


**Figure 29 : Effets de LRRFIP1 sur les localisations cytoplasmique et nucléaire de la  $\beta$ -caténine.**

Des HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou mutant ( $\Delta$ I62-S90), traitées 24H après avec du surnageant Wnt3a pendant 15H puis lysées et fractionnées. A) Expression de la  $\beta$ -caténine active et totale en Western Blot. C = Cytoplasme ; N = Noyau. Erk1/2 et la lamine A/C servent respectivement de contrôle de la qualité des fractions cytoplasmiques et nucléaires. B) Expression de LRRFip1 dans les lysats transfectés. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

La localisation de la  $\beta$ -caténine dans des cellules surexprimant LRRFip1-iso5 en contrôle et LRRFip1-iso1 a également été analysée par immunomarquage. Des cellules MRC5, une lignée de fibroblastes de poumon humain, ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 et iso5 tagués MYC, fixées, perméabilisées puis marquées avec des anticorps anti-MYC et anti- $\beta$ -caténine active (non phosphorylée sur les Ser33/37 et la Thr41). La Figure 30 ne montre pas de translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine visible dans les cellules transfectées

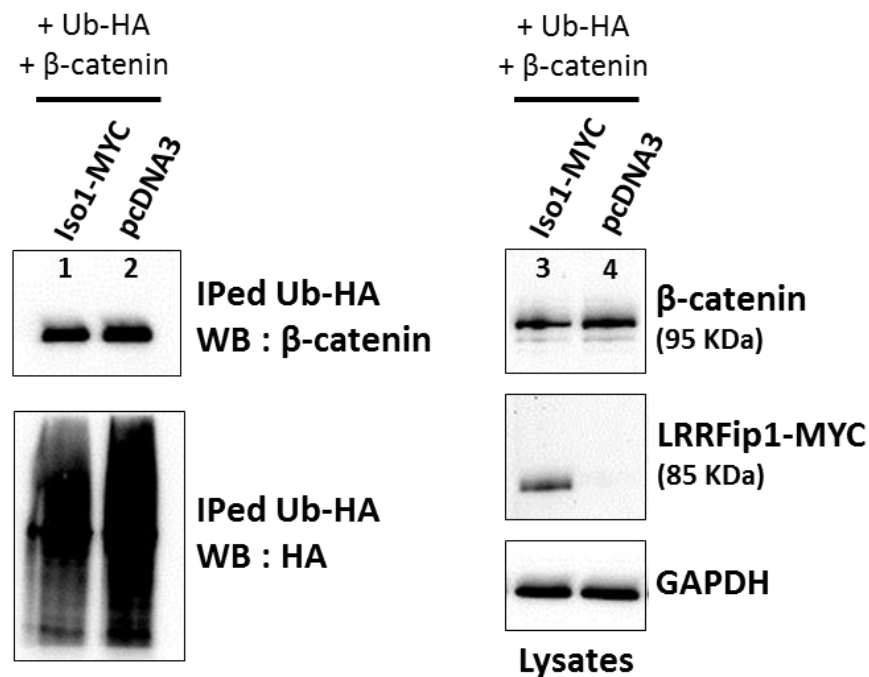
avec LRRFip1-iso1, mais plutôt une diminution de l'intensité du marquage (indiquée par les flèches blanches). L'ensemble de ces résultats ne nous a pas permis de mettre en évidence un changement de localisation de la  $\beta$ -caténine induit par LRRFip1-iso1.



**Figure 30 : Effet de LRRFip1 sur la localisation de la  $\beta$ -caténine.**

Des cellules MRC5 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 et iso5 tagués MYC, fixées en PFA 4%, perméabilisées en éthanol absolu puis marquées avec des anticorps primaires anti-MYC et anti- $\beta$ -caténine active puis avec des anticorps secondaires Alexa 488 et Alexa 568. La condition Merged représente la superposition des images du marquage LRRFip1 et  $\beta$ -caténine.

Pour finir, je me suis intéressée aux changements des niveaux d'ubiquitination de la  $\beta$ -caténine qui, en l'absence d'activation de la voie Wnt canonique, est ubiquitinée avant d'être dégradée par le protéasome (Aberle et al., 1997). J'ai co-transfecté une ubiquitine taguée HA, la  $\beta$ -caténine ainsi que LRRFip1-iso1 tagué MYC ou un plasmide pcDNA3 en contrôle dans des HEK 293, et immunoprécipité les protéines ubiquitinylées avec un anticorps anti-HA. La Figure 31 montre qu'une forme ubiquitinylée HA de la  $\beta$ -caténine est bien immunoprécipitée mais qu'elle n'est pas modifiée par LRRFip1-iso1 (piste 1) par rapport au pcDNA3 (piste 2). Ce résultat (N=1) suggère que l'activation de la voie Wnt par LRRFip1-iso1 n'est pas dépendante d'une modification de l'ubiquitination de la  $\beta$ -caténine.



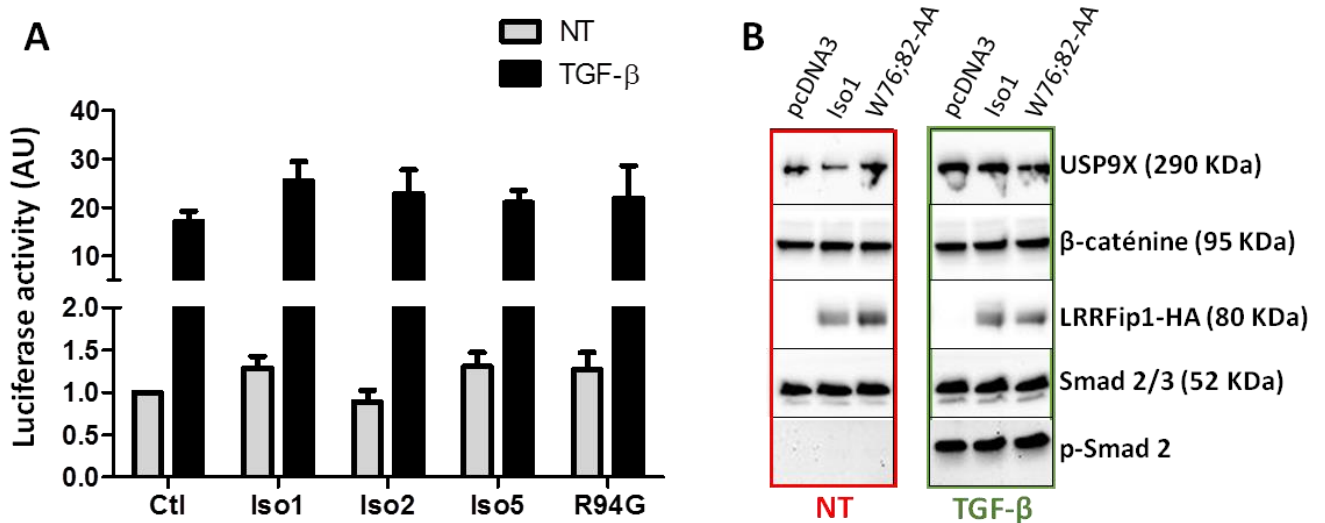
**Figure 31 : Effet de LRRFip1 sur l'ubiquitination de la  $\beta$ -caténine.**

Une triple transfection a été réalisée dans des HEK 293 avec trois plasmides codant pour l'ubiquitine-HA, la  $\beta$ -caténine et LRRFip1-iso1-MYC ou pcDNA3 en contrôle négatif. L'ubiquitine-HA a été immunoprécipitée et la  $\beta$ -caténine spécifiquement ubiquitinée révélée. Le « smear » dans les pistes 1 et 2 correspond à la révélation de toutes les protéines ubiquitinées.

#### d. Activation de la voie du TGF- $\beta$ par LRRFip1

USP9X est une déubiquitinase à la fois de la  $\beta$ -caténine (Taya et al., 1999) mais également de Smad4 qui est un acteur essentiel de la voie du TGF- $\beta$  (Dupont et al., 2009). De plus, de nombreux travaux ont établi un « cross-talk » entre la voie Wnt et la voie du TGF- $\beta$  notamment dans les processus d'EMT (Zhang et al., 2010; Zhou et al., 2012). Aussi, j'ai

analysé si LRRFIP1 avait un effet sur la voie du TGF- $\beta$  et si son interaction avec USP9X participait à cette modulation. Pour cela, des HEK 293 ont été transfectées avec un plasmide (CAGA9-luc) contenant le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur avec une répétition X9 des motifs CagA ciblés par Smad2/3/4. Ces cellules ont été traitées ou non avec du TGF- $\beta$ 1 pendant 24h puis lysées, et l'expression de la luciférase dosée. La Figure 32A montre que LRRFip1-iso1, 2 et 5 n'activent pas la voie du TGF- $\beta$  de façon significativement différente du contrôle avec ou sans traitement avec le TGF- $\beta$ 1. Le mutant p.R94G aussi testé n'a pas non plus d'effet. L'expression de plusieurs effecteurs de la voie du TGF- $\beta$  tels que USP9X, Smad2/3 et phospho-Smad2 en présence de LRRFip1-iso1 WT ou du mutant W76;82-AA a également été analysée par Western Blot. La Figure 32B montre que alors que Smad2 est bien phosphorylé en présence de TGF- $\beta$ , il n'y a pas de différence majeure dans l'expression de ces protéines en présence ou non de LRRFIP1-WT et mutant par rapport au pCDNA3. Ces résultats (N=3) n'ont pas permis de mettre en évidence une activation de la voie du TGF- $\beta$  par LRRFip1-iso1.



**Figure 32 : Etude de l'activation de la voie du TGF- $\beta$  par LRRFip1.**

A) Des HEK 293 ont été co-transfectées avec LRRFip1 et le plasmide CAGA9-luc et activées (TGF- $\beta$ ) ou non (NT) avec du TGF- $\beta$ 1 pendant 24h. L'activation de la voie du TGF- $\beta$ 1 a été mesurée par dosage de la luciférase.  
 B) Expression par Western Blot de USP9X, Smad2/3, phospho-Smad2 et la  $\beta$ -caténine dans des HEK 293 transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou mutant W76;82-AA et traitées ou non avec du TGF- $\beta$ 1 pendant 24h.

e. Etude des modifications post-traductionnelles de LRRFip1-iso1

Dans cette partie de mon travail j'ai étudié si des modifications post-traductionnelles de LRRFip1-iso1 pouvaient intervenir dans son activation de la voie Wnt. En effet, puisque LRRFip1-iso1 interagit avec USP9X, il est donc susceptible d'être ubiquitiné. De plus, l'analyse bioinformatique réalisée par Bernard Offmann (Université de Nantes) suggérait plusieurs sites d'ubiquitylation et de phosphorylation dans la région I62-S98 (Figure 33). Cette analyse prédisait également que la phosphorylation sur la thréonine T97 était la plus susceptible d'être modifiée par la mutation p.R94G.



**Figure 33 : Séquence en acides aminés de LRRFip1-iso1 de I62 à S98.**

Les deux principaux sites d'ubiquitylation prédits par une analyse bioinformatique dans la région désordonnée de LRRFip1-iso1 sont indiqués en bleu et les principales sérines et thréonine susceptibles d'être phosphorylées sont indiquées en rouge. La mutation p.R94G est entourée en vert.

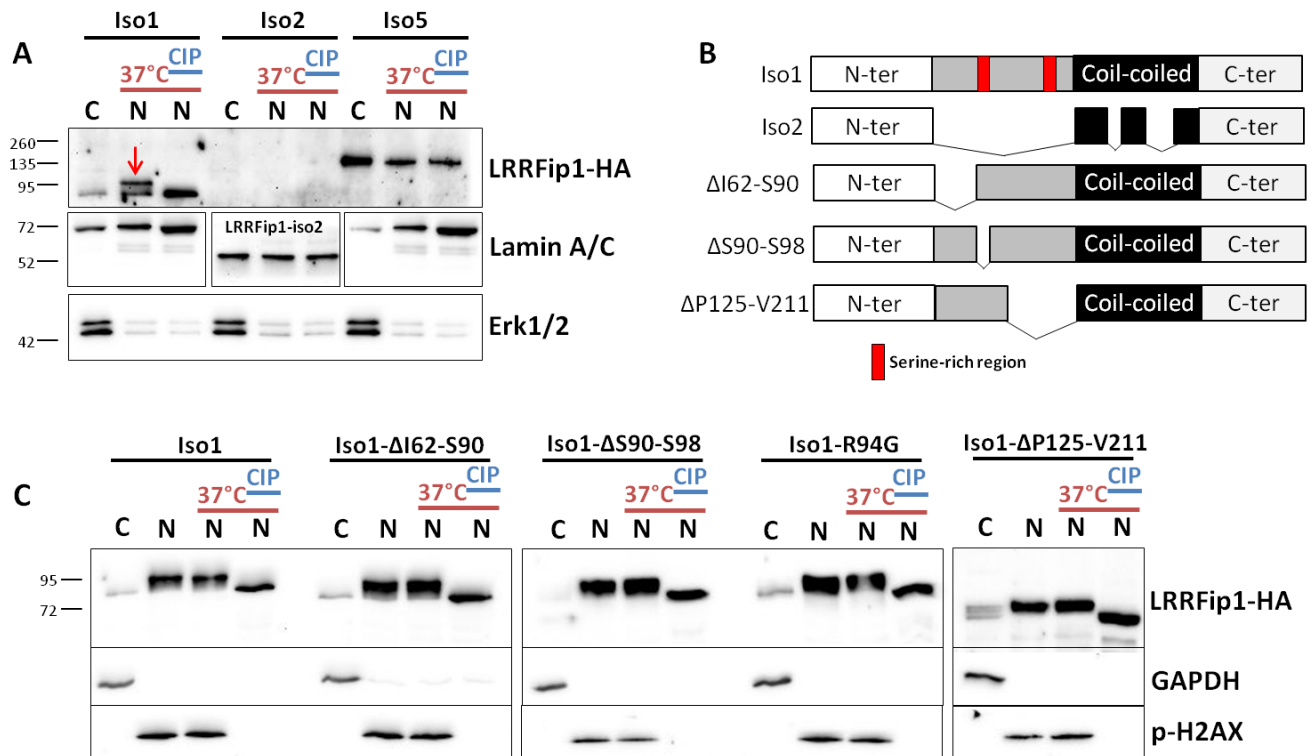
L'observation attentive de la plupart des Western Blot de LRRFip1-iso1 présentés dans ce mémoire révèle généralement la présence de deux bandes séparées de quelques kDa de différence. Ce profil est compatible avec des différences de PM attendues pour une (des) phosphorylation(s). Pour le vérifier, des HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1, iso2 et iso5, lysées et incubées avec une phosphatase (CIP) pendant 1h à 37°C. La Figure 34A montre que le profil des bandes correspondant à LRRFip1-iso2 et iso5 est le même avec ou sans traitement avec la CIP, suggérant qu'ils ne semblent pas subir de phosphorylations post-traductionnelles. En revanche, deux bandes distinctes (indiquées par une flèche rouge sur la Figure 34A) sont clairement visibles pour LRRFip1-iso1 dans le noyau et la plus haute disparaît après le traitement avec la CIP, suggérant que LRRFip1-iso1 est phosphorylé. De plus, compte tenu de l'homologie de séquence entre les Iso1 et 2 (Figure 34B), ce résultat suggère que c'est la région « non structurée » (acides aminés 52 à 256) qui est phosphorylée.

Afin de déterminer plus précisément quel domaine de la protéine était susceptible d'être phosphorylé, les mutants  $\Delta$ S90-S98 et  $\Delta$ P125-V211 ont été analysés (Figure 34B). La Figure 34C révèle que les deux mutants restent sensibles à la CIP suggérant que les deux domaines S90-S98 et P125-V211, sont susceptibles d'être phosphorylés. De plus, le profil de phosphorylation pour le mutant  $\Delta$ I62-S90 (qui diminue l'activation de la voie Wnt de 80%)



n'est pas significativement différent de celui de l'iso1 WT, suggérant que la phosphorylation de LRRFip1-iso1 n'est pas importante pour l'activation de la voie Wnt canonique (N=3). Le profil du mutant R94G n'est pas non plus différent de celui de l'iso1 WT.

La thréonine T97 dont la phosphorylation est la plus susceptible d'être modifiée par la mutation p.R94G a également été mutée en alanine ou en acide aspartique pour respectivement supprimer ou mimer la phosphorylation en apportant une charge négative. Les deux plasmides ont été transfectés dans des HEK 293 puis un test d'activation à la Luciférase a été réalisé, ne montrant pas de différence significative dans l'activation de la voie Wnt canonique par LRRFip1-iso1. Ces résultats suggèrent que la mutation p.R94G n'a pas d'effet sur la phosphorylation de la thréonine 97, cependant les autres sérines/thréonines dans la région I62-S98 devront être également testées.

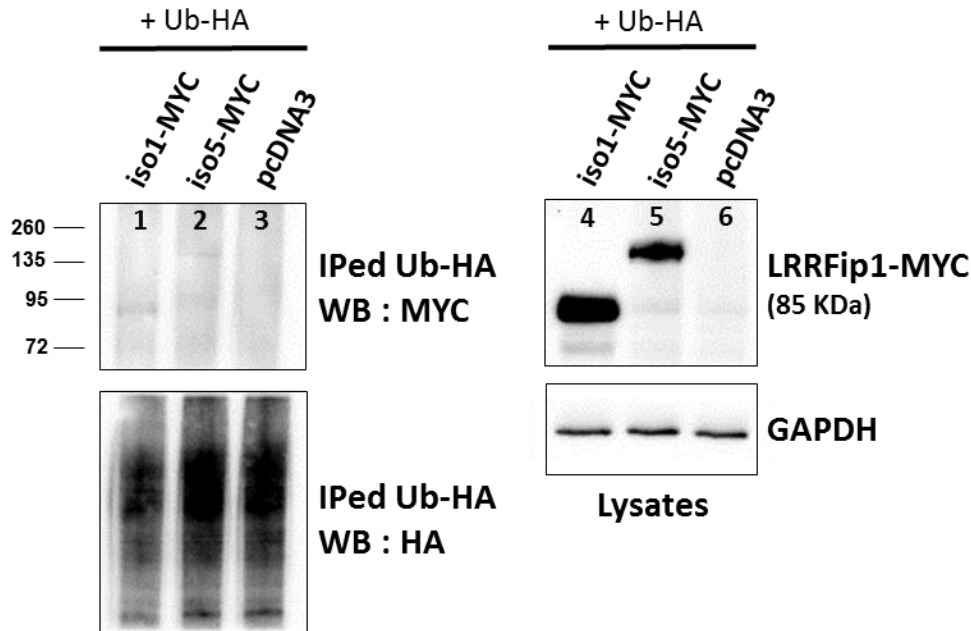


**Figure 34 : Phosphorylation de LRRFip1.**

Des lysats de HEK 293 transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou mutants ont été incubés avec l'enzyme Alcaline Phosphatase CIP pendant 1h à 37°C puis déposés sur un gel. A) Niveau de phosphorylation pour LRRFip1-iso1, 2 et 5. B) Schéma représentant les deux régions riches en sérines de LRRFip1-iso1. C) Niveau de phosphorylation des mutants. C = Cytoplasme ; N = Noyau. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.



J'ai également voulu déterminer si LRRFip1-iso1 pouvait être ubiquitiné, puisqu'il interagit avec USP9X. Une immunoprécipitation a donc été réalisée sur des HEK 293 co-transfectées avec l'ubiquitine-HA et LRRFip1-MYC. La Figure 35 montre que LRRFip1-iso1 (piste 1) et LRRFip1-iso5 (piste 2) ne sont pas immunoprécipités (très faible signal qui s'apparente à du bruit de fond) suggérant que LRRFip1 n'est pas ubiquitiné.



**Figure 35 : Ubiquitination de LRRFip1-iso1.**

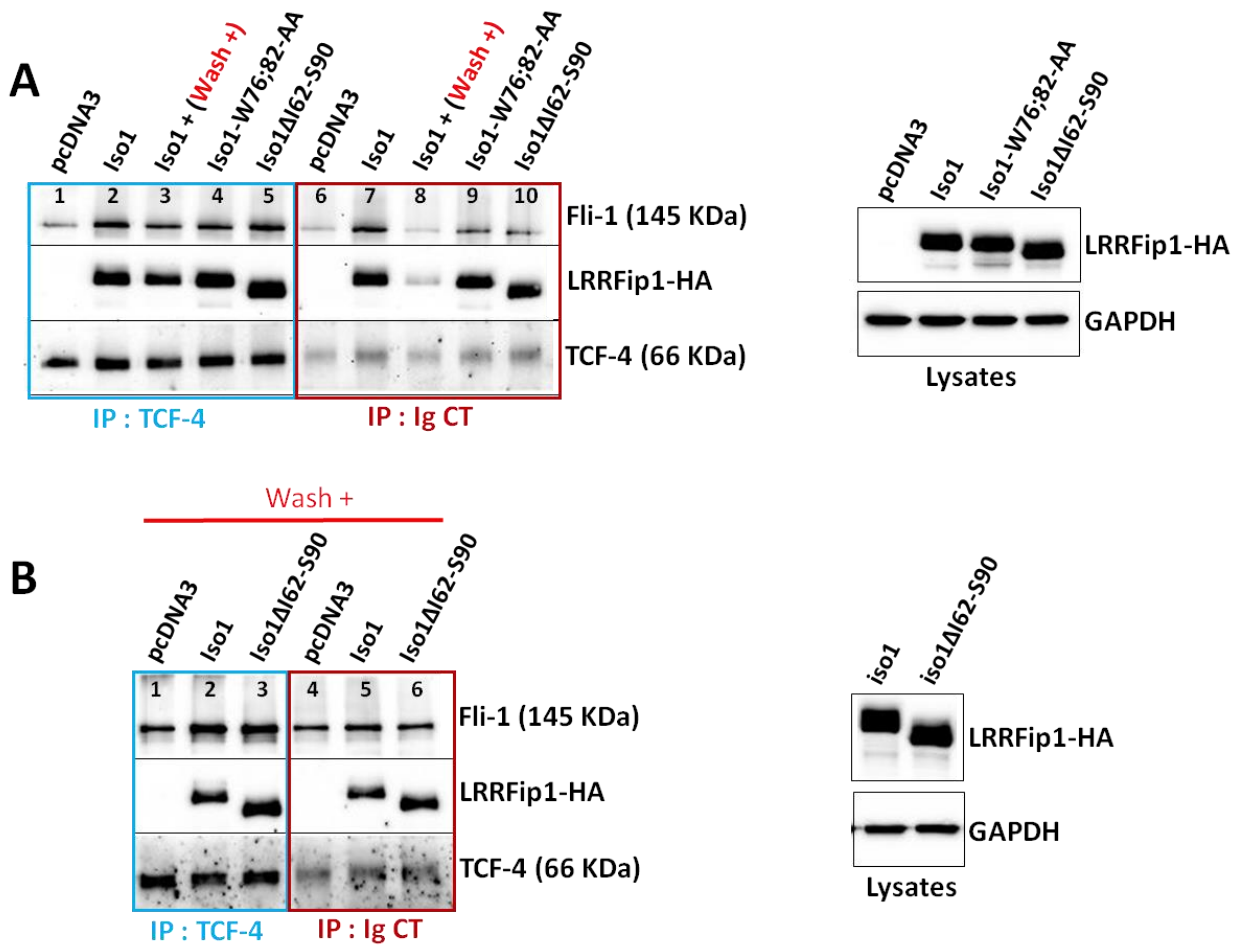
Une co-transfection a été réalisée dans des HEK 293 avec l'ubiquitine-HA et LRRFip1-iso1 ou iso5 tagués MYC ou pcDNA3 en contrôle négatif. L'ubiquitine-HA a été immunoprécipitée et LRRFip1-MYC révélé. Le « smear » dans les pistes 1, 2 et 3 correspond à la révélation de toutes les protéines ubiquitinées. Le poids moléculaire est indiqué en kDa.

## 2. Identification des protéines nucléaires

### a. Étude de l'interaction entre LRRFip1 et TCF-4 par co-immunoprécipitation

La forte activation de la voie Wnt canonique par LRRFip1-iso1 suggère qu'il pourrait être un (co)facteur de transcription qui peut se lier directement aux facteurs de transcription TCF/LEF de la voie Wnt canonique. Pour tester cette hypothèse, une immunoprécipitation de TCF-4 a été réalisée sur des lysats de HEK 293 transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou les mutants W76;82-AA et ΔI62-S90 qui n'activent plus la voie Wnt. Une IP contrôle avec une immunoglobuline de souris a également été réalisée pour chaque condition afin de s'assurer de la spécificité de l'expérience. A chaque fois, les signaux correspondant à LRRFip1-HA et TCF-4 ont été révélés (Figure 36A). Fli-1 pour lequel il a été montré qu'il pouvait former un

complexe nucléaire avec LRRFip1-iso5 et interagir avec les co-facteurs de transcription p300 et GRIP-1 est aussi co-immunoprécipité avec TCF4 (Lee et Stallcup, 2006). Cependant, même si la Figure 36A montre que LRRFip1-iso1, TCF-4 et Fli-1 sont bien immunoprécipitées dans toutes les conditions testées (pistes 2 à 5), elles le sont également dans l'IP contrôle. Afin d'augmenter la stringence et éliminer les interactions non spécifiques, un lavage différent avec 2 X 100mM et 2 X 500mM de NaCl (au lieu de 4 X 100mM de NaCl) a été réalisé pour une condition de l'IP (pistes 3 et 8), et on peut remarquer que la spécificité est alors bien meilleure puisque LRRFip1 et Fli-1 ne sont plus immunoprécipités dans cette condition.



**Figure 36 : Interaction de TCF-4 avec LRRFip1-iso1.**

LRRFip1-iso1 WT ou mutants W76;82-AA et ΔI62-S90 ont été transfectés dans des HEK 293 et le TCF-4 endogène a été immunoprécipité. Une immunoglobuline de souris a été utilisée en contrôle négatif de l'IP. Les IP ont été lavés quatre fois en NaCl 100mM avant élution. A) La condition **Wash +** représente deux lavages à 100mM de NaCl et 2 lavages à 500mM de NaCl afin d'augmenter la force ionique et diminuer les interactions aspécifiques. B) Ces IP ont toutes été réalisées en condition **Wash +**. L'expression de LRRFip1-iso1 dans les lysats a été vérifiée à chaque fois.

Cette expérience a été reproduite avec ces conditions de rinçage dans la Figure 36B qui montre qu'à nouveau, LRRFip1 et Fli-1 sont immunoprécipités dans l'IP contrôle (pistes 5-6). Plusieurs conditions supplémentaires de rinçages ont été testées mais sans succès. Ces expériences n'ont malheureusement pas permis de mettre en évidence de façon spécifique une interaction entre TCF-4 et LRRFip1-iso1.

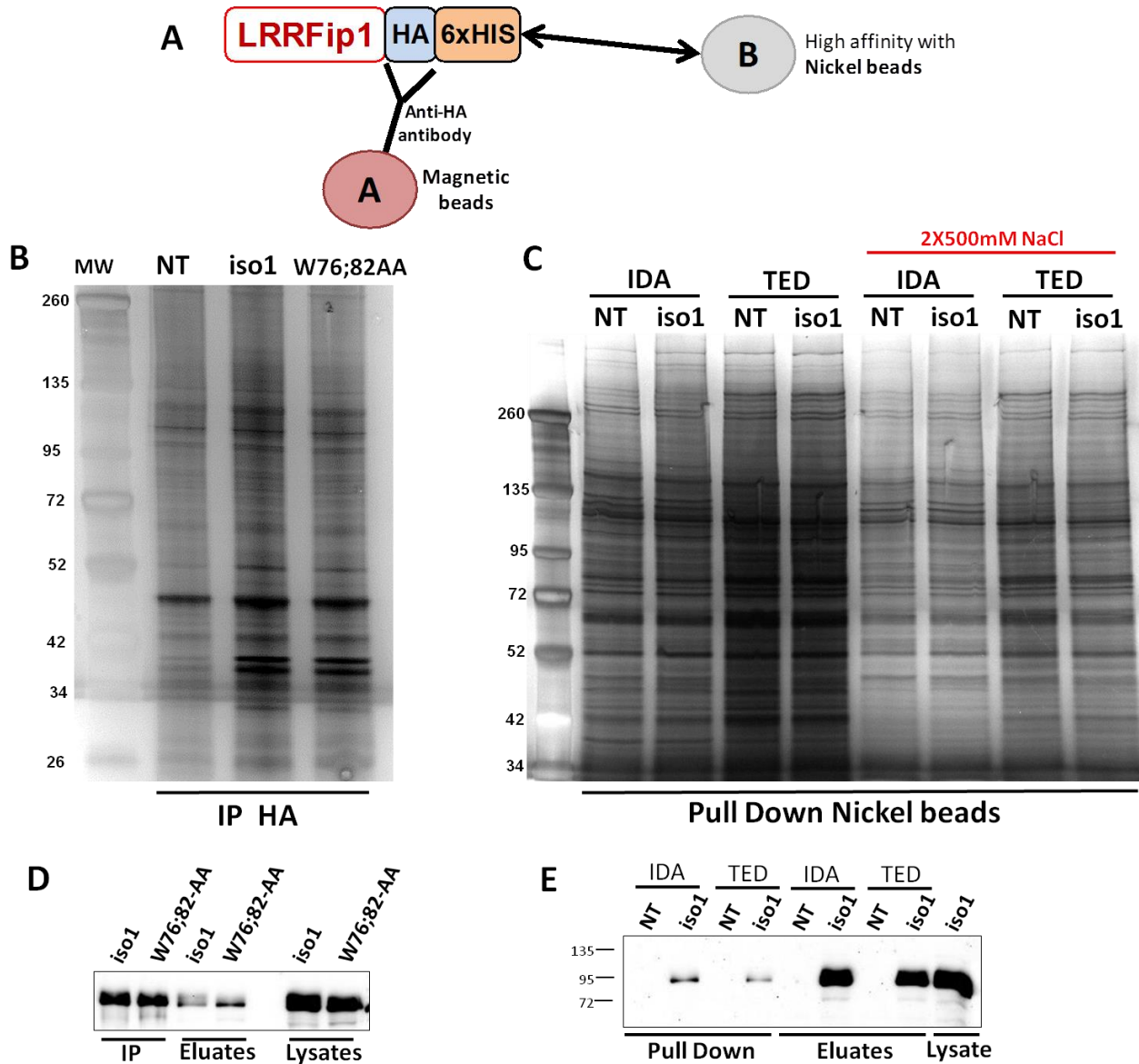
b. Tentative d'identification des protéines nucléaires par Spectrométrie de Masse

La première Spectrométrie de masse a été réalisée au début du projet, alors que nous n'avions pas encore tous les éléments concernant la forte activation de la voie Wnt canonique par LRRFip1-iso1 et sa localisation préférentiellement nucléaire. L'expérience a donc été réalisée suivant un protocole classique de lyse cellulaire en NP-40 avec une étape de centrifugation des lysats. La fraction cytoplasmique est prélevée et l'immunoprécipitation de LRRFip1 dans cette fraction est donc à priori enrichie en protéines cytoplasmiques puisque la chromatine ainsi que la majorité des protéines nucléaires restent dans le culot (voir protocole V.5). Il était donc intéressant de refaire une Spectrométrie de Masse cette fois sur une fraction nucléaire enrichie.

Nous avons choisi de réaliser cette expérience sur des HEK 293 non transfectées (contrôle), transfectées avec LRRFip1-iso1 WT et avec le mutant W76;82-AA puisque ce mutant a l'effet inhibiteur le plus drastique sur l'activation de la voie Wnt. Par conséquent il était plus probable de voir une différence d'interaction plus importante par rapport à la condition WT. Ces cellules ont été lysées puis fractionnées afin d'isoler la fraction nucléaire (voir protocole V.2) sur laquelle une IP avec des billes magnétiques cross-linkées avec un anticorps anti-HA a été réalisée.

Comme précédemment, la condition imposée par la plateforme *EDyP* au CEA à Grenoble pour réaliser la Spectrométrie de Masse était de pouvoir identifier distinctement une bande pouvant correspondre à LRRFip1-iso1 sur un gel d'acrylamide coloré au Bleu de Coomassie ou au Nitrate d'Argent. La Figure 37B montre que le bruit de fond était trop important pour distinguer des bandes différentielles entre les conditions transfectées et contrôle, malgré l'immunoprécipitation correcte de LRRFip1-iso1 en Western Blot (Figure 37D). La quantité de protéines immunoprécipitées ainsi que la force ionique des rinçages des IP ont été modifiées, sans succès.

Afin de s'affranchir du bruit de fond probablement apporté par les billes magnétiques anti-HA, une deuxième approche utilisant des plasmides LRRFip1-iso1 WT et W76;82-AA tagés 6xHis en C-terminal a été testée. Ces plasmides ont été transfectés dans des HEK 293 et un pull-down avec des billes de silice couplées à des ions  $\text{Ni}^{2+}$  a été réalisé. Deux types de billes comprenant deux chélateurs des ions  $\text{Ni}^{2+}$  différents ont été utilisés : l'acide iminodiacétique (IDA) et le tris-carboxyméthyl éthylènediamine (TED). La Figure 37C montre qu'à nouveau, avec les deux types de billes, il est difficile de distinguer des bandes différentielles entre la condition contrôle et la condition transfectée, même en condition de rinçages plus stringents (2 X 500mM de NaCl). De plus, la Figure 37E montre que l'efficacité du pull-down est très faible puisque la majorité de LRRFip1-iso1 est présente dans le surnageant des billes (fraction qui contient ce qui n'a pas été capté par les billes). Ces expériences n'ont malheureusement pas permis d'obtenir des conditions adéquates pour réaliser la Spectrométrie de Masse sur un lysat nucléaire de HEK 293 transfectées avec LRRFip1-iso1.

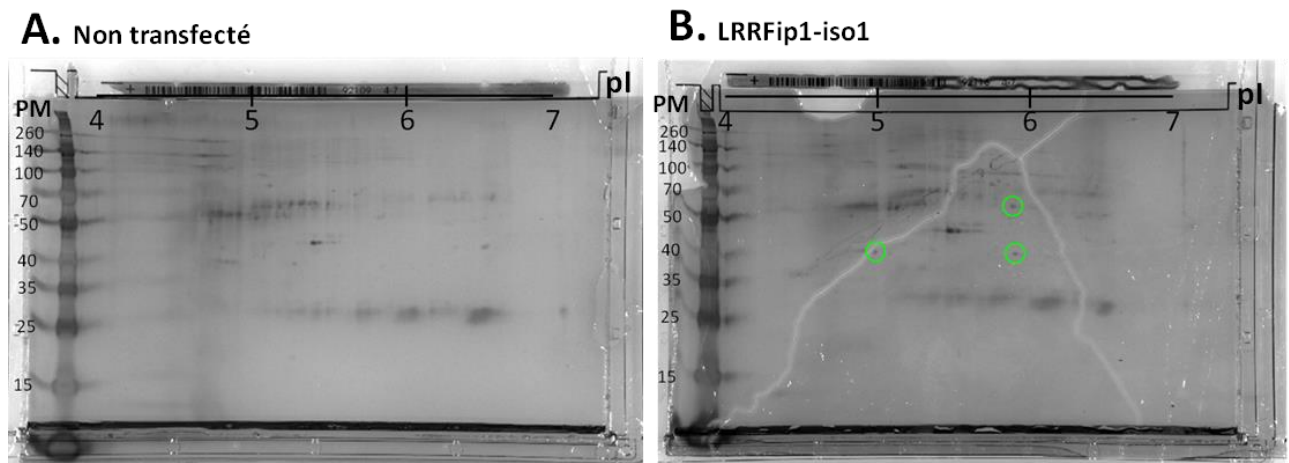


**Figure 37 : Image de gels colorés au Nitrate d'Argent sur lesquels a été séparé par électrophorèse l'immunoprécipitat de LRRFip1-iso1 WT et mutant W76;82-AA.**

A) Deux approches ont été réalisées afin d'isoler LRRFip1-iso1 WT ou mutant dans le but de réaliser une Spectrométrie de Masse. LRRFip1-iso1 tagué HA ou 6xHis a été transfecté dans des HEK 293. Les cellules ont été lysées et fractionnées, et soit une IP HA (B) ou un pull-down avec des billes de Nickel (C) a été réalisé sur la fraction nucléaire. Pour le pull-down, des colonnes avec deux types de résine différents (IDA et TED) ont été testées, et des rinçages supplémentaires ont été réalisés dans deux conditions (2 X 500mM de NaCl). L'efficacité d'IP et du pull-down a été vérifiée ensuite par Western Blot (D et E).

c. Autres approches pour identifier le complexe nucléaire : 2D et ChIP

Afin de déterminer les protéines partenaires de LRRFip1-iso1, une approche d'électrophorèse en 2 dimensions (2D) a également été réalisée. LRRFip1-iso1 a été transfecté dans des HEK 293 puis immunoprécipité dans la fraction nucléaire grâce à l'anticorps anti-HA. Une immunoprécipitation HA sur des cellules non transfectées sert de contrôle négatif. Les immunoprécipitats ont ensuite été séparés selon leur point isoélectrique sur un strip puis selon leur poids moléculaire sur un gel d'électrophorèse. Les gels ont été colorés au Bleu colloïdal et aucun spot différentiel n'était alors visible entre les conditions non transfectée et transfectée avec LRRFip1-iso1. Le gel a ensuite été recoloré au Nitrate d'argent et des spots différentiels étaient alors visibles (Figure 38). Malheureusement, ces résultats n'ont pas été reproductibles sur deux autres expériences. De plus, il semble curieusement qu'il n'y ait pas de spot visible pouvant correspondre à LRRFip1-iso1 dans la condition transfectée (PM : 75-80 kDa ; pI : 5,65).



**Figure 38 : Image de gels d'électrophorèse en 2D colorés au Nitrate d'Argent.**

Des HEK 293 ont été transfectées ou non avec LRRFip1-iso1, puis lysées, fractionnées et une immunoprécipitation HA a été réalisée sur la fraction nucléaire. Les protéines ont migré suivant leur point isoélectrique (pI) puis leur poids moléculaire sur un gel d'électrophorèse. Le gel a été coloré au Nitrate d'argent, et les spots entourés en verts semblent spécifiques de la condition transfectée avec LRRFip1.

Une approche de ChIP a donc été envisagée pour déterminer les protéines ainsi que les séquences des promoteurs avec lesquels LRRFip1 pourraient interagir. L'expérience a été réalisée à Marseille en collaboration avec l'équipe de Stéphane Zaffran. Des VICs aortiques de rat ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 et le mutant W76;82-AA puis une immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA ChIP-grade a été réalisée sur la fraction nucléaire (voir protocole V.7). L'ADN précipité a ensuite été purifié, repris dans de l'eau

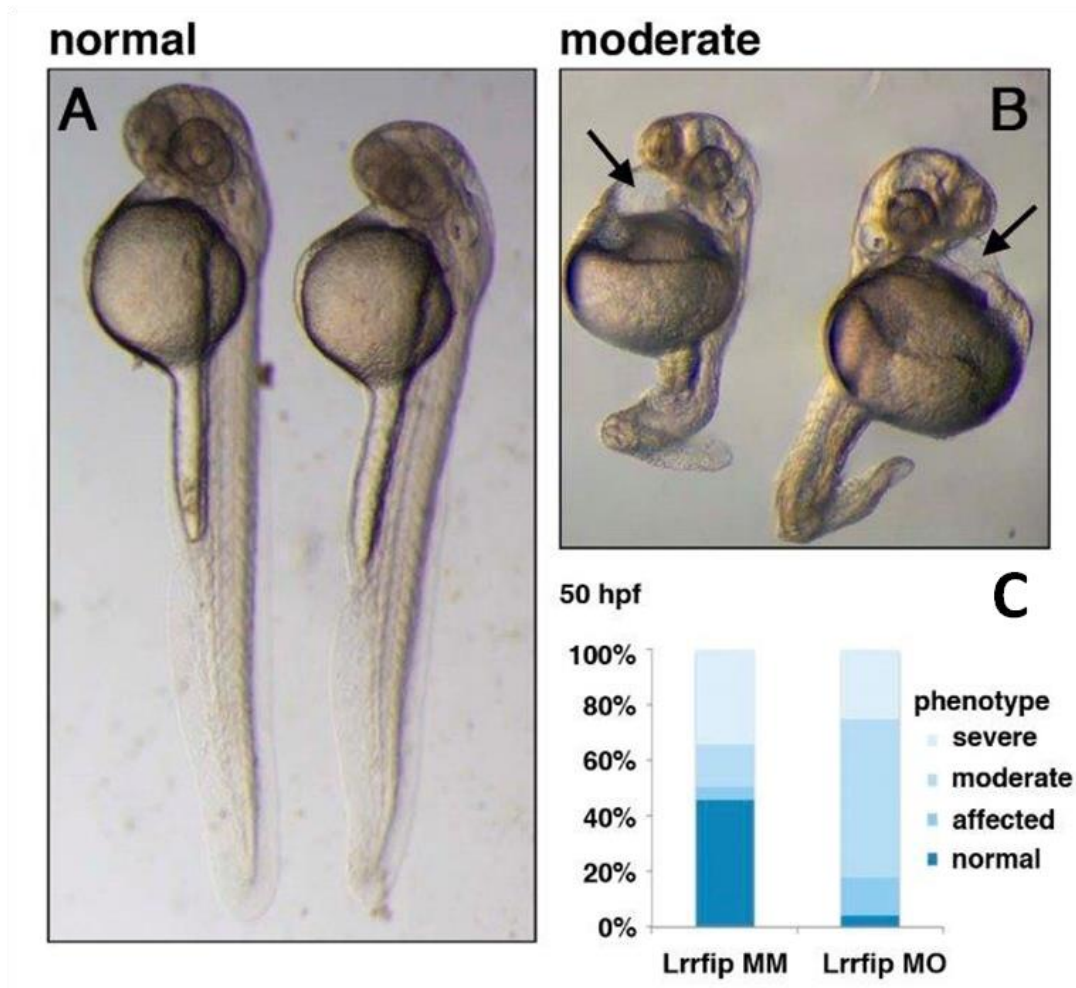
stérile et mesuré au Nanodrop. Malheureusement, l'ADN était en quantité beaucoup trop faible par rapport à celles requises pour la réalisation du ChIP par l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Strasbourg. L'expérience a été refaite une nouvelle fois et le même résultat a été obtenu.

## VI. Modèle animal : le Zebrafish

Un KO de LRRFip1-iso1 dans le *zebrafish* a été développé afin d'identifier son rôle dans le développement des valves et tester l'effet de la mutation p.R94G.

Ces expériences ont été réalisées par l'équipe de J.L. De la Pompa (Madrid). Des embryons de *zebrafish* ont été injectés au stade 1 ou 2 cellules avec un morpholino contrôle ou un morpholino réprimant l'expression de l'orthologue de LRRFip1-iso1. La Figure 39 révèle que les embryons de *zebrafish* injectés avec le morpholino anti-LRRFip1 montre un problème au niveau de développement de la queue, un défaut de rotation et un œdème du cœur (indiqué par les flèches noires) par rapport à ceux injectés avec le morpholino contrôle. Ces problèmes de développement de l'axe dorso-ventral et de rotation du cœur chez le *zebrafish* sont assez caractéristiques d'un défaut de la voie Wnt (Hurlstone et al., 2003).





**Figure 39 : Effet du KO de LRRFip1-iso1 chez le Zebrafish.**

Des embryons de *zebrafish* au stade 1 ou 2 cellules ont été injectés avec A) un morpholino contrôle (MM = Mismatch Morpholino) ou B) un morpholino réprimant l'expression de l'orthologue de LRRFip1-iso1 (MO). Les flèches noires indiquent l'œdème du cœur observé chez ces embryons. La proportion des différents phénotypes observés, de normal à sévère, est représentée en C).



## ***Discussion Projet 1 – Étude de l'implication du gène LRRFIP1 dans le développement valvulaire***

Dans un premier projet, j'ai obtenu des résultats originaux sur une isoforme peu étudiée de LRRFip1 (LRRFip1-iso1) qui l'identifie comme un (co)facteur de transcription de la voie Wnt canonique de part 1) sa localisation nucléaire, 2) sa forte activation des promoteurs TCF/LEF, 3) son interaction avec la  $\beta$ -caténine, 4) son activation/répression de plusieurs cibles transcriptionnelles de la voie Wnt.

### **I. Pertinence du modèle cellulaire**

La plupart des expériences de ma thèse ont été réalisées sur une lignée de cellules immortalisées, les HEK 293. Ces cellules sont couramment utilisées en laboratoire et ont l'avantage d'être facilement cultivables en routine, amplifiables, et transfectables (elles montrent un taux de transfection d'environ 50 à 60%). Ces cellules ont donc été utilisées pour les expériences de biochimie (Immunoprécipitation, Western Blot, TOP Flash) qui nécessitent une quantité de cellules importante et une expression satisfaisante de la protéine transfectée. En revanche, les HEK 293 ne représentent pas un modèle *in vitro* valable des cellules interstitielles valvulaires et donc des processus physiopathologiques impliqués dans le PVM. Nous avons donc choisi de vérifier l'activation de la voie Wnt canonique par LRRFip1-iso1 dans un modèle cellulaire plus pertinent : des cultures primaires de cellules interstitielles de valves (VICs) de rat. Le rat nous a semblé le modèle le plus adapté puisque les valves de rat sont en effet plus faciles à disséquer que les valves de souris qui sont beaucoup plus petites et fragiles. De même, la culture de VICs humaines (issues par exemple de valve mitrale de patient après une chirurgie) est difficilement envisageable puisque les valves éventuellement disponibles le sont lors de leur remplacement par une prothèse dans des cas pathologiques terminaux. Les VICs de rat sont un modèle bien plus pertinent que les HEK 293 mais présentent plusieurs désavantages :

1) il est assez difficile d'obtenir une grande quantité de cellules, d'une part car il nous fallait « pooler » plusieurs valves de rat (au moins 4 feuillets pour obtenir un puit de 35 mm confluent en une semaine) et notamment car les cellules cessent de proliférer à des passages

précoces. Afin de régler ce problème, des cultures de VICs de poulet ou de cochon auraient pu être envisagées.

2) L'expression de l' $\alpha$ -SMA, un marqueur de différenciation des VICs en myofibroblastes, a été évaluée par Western Blot dès le 3<sup>ème</sup> passage des cellules et est déjà très forte, ce qui suggère que le phénotype des VICs est très rapidement modifié au cours des passages, rendant plus difficile la reproductibilité des expériences. Plusieurs conditions de culture ont été testées telles que la culture directement sur plastique rigide *versus* sur une matrice de collagène à 2 kPa (support plus mou), mais cette condition n'améliorait pas significativement la pousse des cellules ainsi que la différenciation en myofibroblastes.

3) L'expression de l'orthologue chez le rat de LRRFip1-iso1 a été testée dans des VICs de rat adulte par PCR et qPCR et ces expériences ont révélé que cette isoforme était très faiblement exprimée dans ce type cellulaire. Par conséquent, il n'était pas possible de réaliser des expériences d'extinction de l'expression de LRRFip1, seule la surexpression de LRRFip1-iso1 humaine était envisageable.

4) Comme toute culture primaire, les VICs de rat sont difficilement transfectables. En effet, plusieurs transfectants classiques tels que la *Lipofectamine 2000* ou la *GeneCellin* ont été testés et ont montré un très mauvais taux de transfection (environ 5%). Nous avons donc utilisé un système de nucléofection (permettant grâce à des impulsions électriques de faire entrer l'ADN dans la cellule) *Amaxa™ 4D-Nucleofector™ Basic Protocol for Primary Mammalian Fibroblasts* (Lonza) qui augmente le taux de transfection jusqu'à 20-30% des cellules. Une alternative à la transfection est l'infection des cellules par des virus, qui garantit une très bonne efficacité de transfection (de 80 à 100% pour les cultures primaires). Malheureusement, la fabrication de ces virus est assez coûteuse et longue (environ 2 à 3 mois). Il existe néanmoins deux alternatives à la transfection de lignées cellulaires ou de cultures primaires que nous aurions pu développer : 1) L'utilisation de cellules souches urinaires (USC) obtenues à partir de patients. Au laboratoire, l'équipe de K. Si-Tayeb peut redériver ces cellules en cellules souches pluripotentes induites (IPS). 2) ces cellules IPS peuvent être redérivées en VICs humaines par l'équipe de M. Pucéat (Marseille) (*communication personnelle*). Ces cellules ont l'avantage de constituer un modèle plus pertinent au regard de l'étude de la physiopathologie des valves et qui exprime la mutation de façon endogène mais qui demande une grande expertise pour être développé.

## II. Hypothèses physiopathologiques du rôle de LRRFIP1 dans la voie Wnt et le développement des valves

Dans cette étude, nous avons montré que LRRFip1-iso1 active fortement la voie Wnt canonique. Ces données sont en accord avec celles publiées sur LRRFip1-iso5 qui avait déjà été identifiée comme un activateur de la voie Wnt canonique, mais je n'ai pas montré d'activation de la voie Wnt significative par LRRFip1-iso5 par rapport au contrôle dans mes résultats. Cependant, cela peut être expliqué par les différences de conditions de transfection entre nos expériences et celles des précédentes publications. En effet, la 1<sup>ère</sup> étude montre grâce à un test d'activation à la luciférase dans des HEK 293 que LRRFip1-iso5 active significativement la voie Wnt (X2.5 par rapport au contrôle) mais une grande quantité de plasmide est transfectée : 2 µg de plasmide LRRFip1-iso5 contre 0,25 µg dans nos conditions (Ohtsuka et al., 2011). Dans la 2<sup>ème</sup> étude, la co-transfection de FLAP1 (l'homologue murin de LRRFip1-iso5) et de la β-caténine augmente l'activation de la voie Wnt, mais la transfection de FLAP1 n'est jamais testée seule (Lee et Stallcup, 2006). De même, la localisation nucléaire de LRRFip1-iso5 dans le papier de Rikiyama et al., 2003 est peu convaincante (les signaux sont faibles et les marqueurs de qualité des fractions cytoplasmique et nucléaire ne sont pas montrés).

Malheureusement, le mécanisme par lequel LRRFip1-iso1 active la voie Wnt reste flou. En diminuant l'expression de la β-caténine avec un siRNA, j'ai montré qu'elle était absolument indispensable à l'activation de la voie Wnt par LRRFip1-iso1. En revanche, je n'ai pas pu mettre en évidence de changements d'expression et de localisation de la β-caténine dans le modèle de HEK 293 qui ne semble pas être un bon modèle d'étude de la voie Wnt. En effet, la β-caténine est toujours localisée dans le noyau (Figure 29) quelles que soient les conditions de culture : cellules non traitées, privation en SFV pendant 24h/48h ou activation de la voie Wnt avec Wnt3a. De plus, des qPCR sur des HEK 293 n'ont pas permis de mettre en évidence d'augmentation de l'expression des cibles de la voie Wnt (TCF7, LEF1 et Cycline D1) entre une condition non traitée ou traitée avec du LiCl à 10 mM. Ceci étant, l'activation de la réponse Top Flash à LRRFip1-iso1 a néanmoins été confirmée dans des cellules 3T3. Un modèle plus pertinent de culture primaire de VICs de rat a aussi été testé, mais là encore les qPCR n'ont pas montré d'effet du LiCl sur les principales cibles testées, hormis l'Axine-2 dont l'expression était doublée.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que 1) certaines lignées cellulaires sous-expriment des protéines de la voie Wnt en particulier les facteurs de transcription TCF/LEF, rendant ces cellules peu sensibles aux traitements chimiques tels que Wnt3a ou le LiCl (Jamieson et al., 2016). 2) L'activation de la transcription des gènes cibles de la voie Wnt est un processus très dynamique qui requiert la translocation dans le noyau d'une quantité très faible de  $\beta$ -caténine, qui n'est alors pas toujours visible en Western Blot ou en immunomarquage. A l'inverse, la  $\beta$ -caténine nucléaire n'induit pas toujours une augmentation de la transcription des gènes cibles, et est la conséquence de la sous-expression des protéines impliquées dans son ubiquitination et sa dégradation (Misztal et al., 2011). 3) Nos cellules ont été activées avec 10 mM de LiCl, mais certains papiers montrant une translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine utilisent des doses plus élevées, de 20 à 40 mM de LiCl (Jamieson et al., 2011; Van Gassen et al., 2000).

Au regard de l'importance de la voie de signalisation Wnt canonique dans l'établissement des progéniteurs cardiaques, l'EMT et la maturation des valves, LRRFip1-iso1 pourrait être impliqué lors du développement des valves de par : 1) son expression à des stades précoces de l'embryogénèse dans les valves 2) sa localisation nucléaire 3) son activation des promoteurs reconnus par TCF/LEF. De plus, puisque LRRFip1-iso1 ne semble pas modifier l'expression/localisation ou la phosphorylation/ubiquitination de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme, il est plus probable d'envisager un rôle nucléaire de LRRFip1-iso1 en tant que stabilisateur du complexe de transcription TCF/LEF. L'identification et la caractérisation par bioinformatique de la région de LRRFip1-iso1 importante pour l'activation Wnt permet de supposer qu'elle nécessite l'interaction avec une ou plusieurs protéines. En effet, il s'agit d'un domaine qui ne possède pas de structure secondaire/tertiaire et qui est susceptible de se structurer en présence d'un partenaire protéique. L'identification de nouveaux interactants de LRRFip1-iso1 dans le noyau cellulaire par des tentatives d'immunoprécipitation, de 2D, de spectrométrie de masse et de CHIP s'est malheureusement avérée peu concluante. En revanche, les expériences d'immunoprécipitation réalisées avec LRRFip1-iso1 WT ou mutant W76;82-AA n'ont dévoilé aucune modification de ses interactions avec Fli-1, Dvl-1, USP9X ou la  $\beta$ -caténine. Ces résultats suggèrent que la région identifiée recrute un acteur essentiel au complexe de transcription mais qui n'est pas Fli-1 ni la  $\beta$ -caténine.

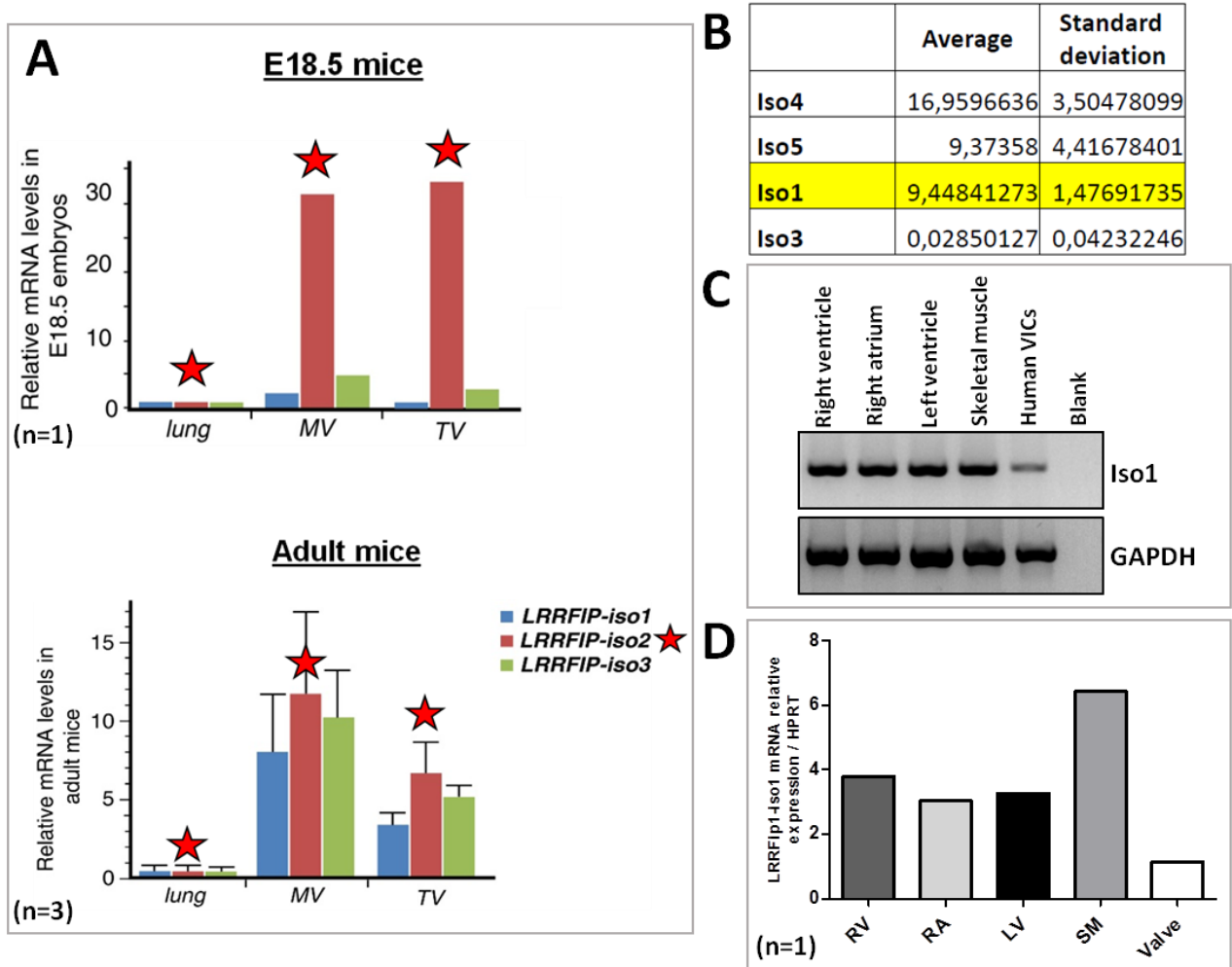


Les tryptophanes en position 76 et 82 dans LRRFip1-iso1 sont également conservés dans LRRFip2-iso1, ce qui suggère que ces deux protéines pourraient activer la voie Wnt *via* les mêmes mécanismes. De plus LRRFIP2 est exprimé dans le cœur et le muscle squelettique, interagit avec Fli-1 et Dvl-3 et active la voie Wnt canonique dans l'embryon de xénope, provoquant ainsi l'expression de gènes cibles de la voie Wnt impliqués dans le développement de l'axe dorso-ventral tels que *Siamois* et *Xnr3* (Fong et de Couet, 1999, Liu et al., 2005). Ceci laisse penser que LRRFip2-Iso1 et LRRFip1-iso1 pourraient jouer un rôle coopératif dans le développement et le maintien de l'homéostasie du cœur, des valves et/ou du muscle.

### III. LRRFIP1 : un rôle physiologique dans les valves et/ou dans le myocarde ?

Plusieurs expériences tendent à montrer que LRRFIP1-iso1 est exprimé dans les valves cardiaques mitrales humaines et murines à des stades précoces de l'embryogénèse. En effet, des qPCR réalisées par l'équipe de S. Zaffran (Marseille) sur des échantillons de valves de souris à E18.5 montrent de façon intéressante une forte expression de LRRFip1-iso2, l'homologue murin de LRRFip1-iso1 humain, dans les valves tricuspide et mitrale (Figure 41A). Cette expression revient au même niveau que celle des autres isoformes chez les souris à l'âge adulte. Une analyse en RNA-seq, réalisée au CRG (Barcelone) sur 9 échantillons de valve mitrale adulte (8 de patients atteints de PVM + 1 valve contrôle commerciale), avait également montré que LRRFip1-iso1 y était exprimé (Figure 41B).

Néanmoins, comme montré dans le papier, l'expression de LRRFip1-iso1 révélée par PCR dans un panel de tissus humains est majoritaire dans le cœur et dans le muscle. L'étude de Wei et al. publiée en 2015 confirme l'expression de LRRFip1-iso2 murine dans le muscle et son importance dans la différenciation des myoblastes. Nous avons donc voulu déterminer l'expression relative de LRRFip1-iso1 humaine dans la valve *versus* dans le muscle (myocarde et muscle squelettique). Des PCR et qPCR ont été réalisées sur des échantillons de valve, cavités cardiaques, muscle squelettique paravertébral et VICs issues de cellules souches pluripotentes induites humaines développées par l'équipe de M. Pucéat (Marseille). Les figures Figure 41C et D montrent que l'expression relative de LRRFip1-iso1 dans la valve est la plus faible. En effet, LRRFip1-iso1 est exprimé environ 3 fois plus dans le cœur mais surtout 7 fois plus dans le muscle squelettique que dans la valve.



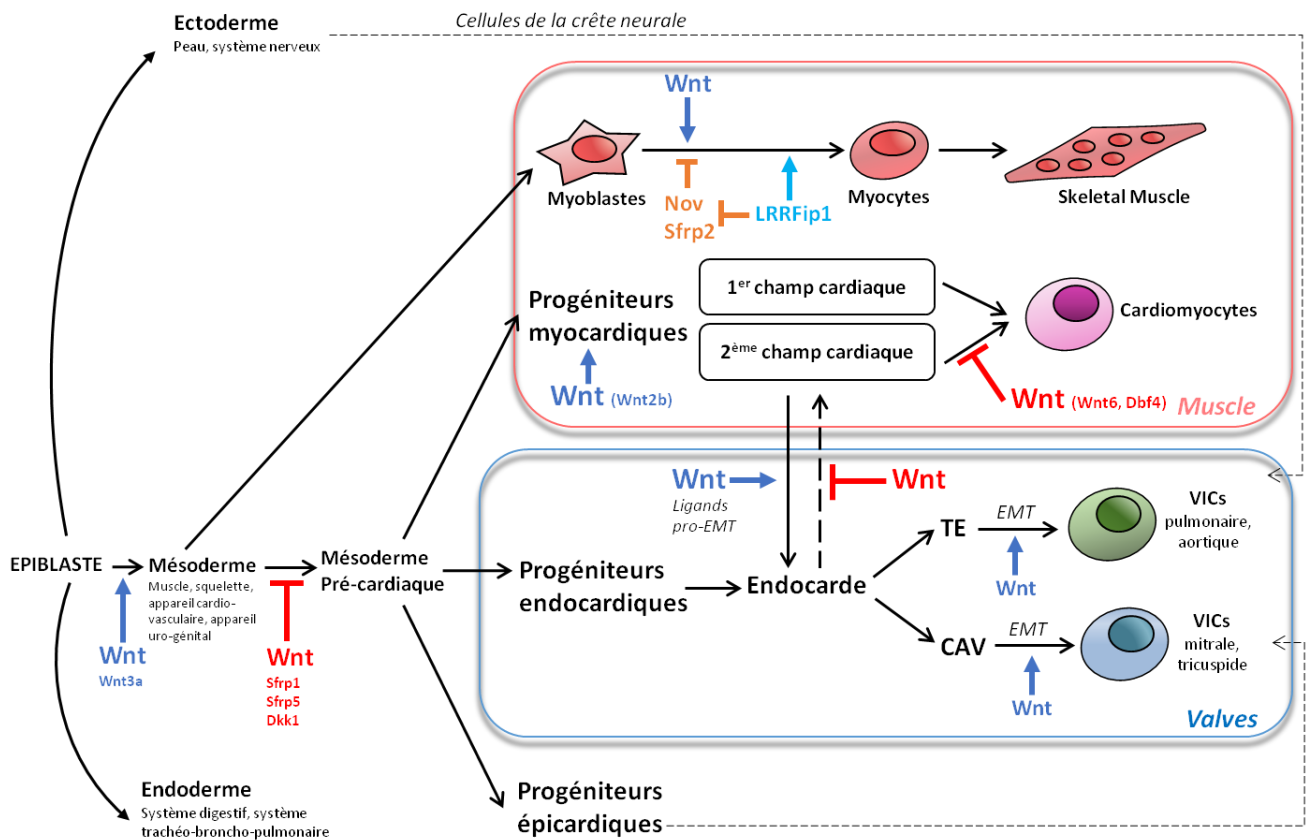
**Figure 41 : Expression de LRRFip1-iso1 dans les valves humaines et murines.**

A) Etude de l'expression des trois isoformes de LRRFip1 murines dans des ADNc de poumon, de valve mitrale (MV) et de valve tricuspide (TV) chez des souris à E18.5 et adultes. L'étoile rouge indique LRRFip1-iso2, l'homologue murine de LRRFip1-iso1. B) Données d'expression de LRRFip1 humain en RNAseq réalisé au CRG (Barcelone) sur des échantillons de valves mitrales humaines. C) et D) Expression en PCR et en qPCR de LRRFip1-iso1 humaine dans du ventricule droit (RV), atrium droit (RA), ventricule gauche (LV), muscle squelettique paravertébral (SM) obtenus à partir de biopsies et dans des ADNc de valve mitrale commerciaux.

Ces données posent deux questions :

1) LRRFip1-iso1 est-il vraiment exprimé dans les valves ? En effet, puisque l'expression de LRRFip1-iso1 semble plus forte dans le muscle squelettique et cardiaque que dans les valves, on peut imaginer que la moindre contamination des échantillons de valve par du myocarde lors du prélèvement puisse fausser les résultats.

2) Peut-on s'attendre à un rôle musculaire et/ou valvulaire de LRRFip1-iso1 ? LRRFip1-iso1 est exprimé dans les valves, mais encore plus fortement (X4) dans le myocarde. Plusieurs études révèlent le rôle extrêmement critique de la voie Wnt canonique lors de la spécification des cellules en futurs cardiomyocytes ou cellules valvulaires (Figure 42). En effet, une étude récente propose un modèle selon lequel la voie Wnt réprimerait la différenciation des progéniteurs myocardiques en muscle mature, tandis qu'elle créerait au contraire un environnement propice à la sécrétion de molécules capables d'induire l'EMT (Bosada et al., 2016). Ce mécanisme permettrait de maintenir un pool restreint de cellules indifférenciées susceptibles de subir l'EMT.



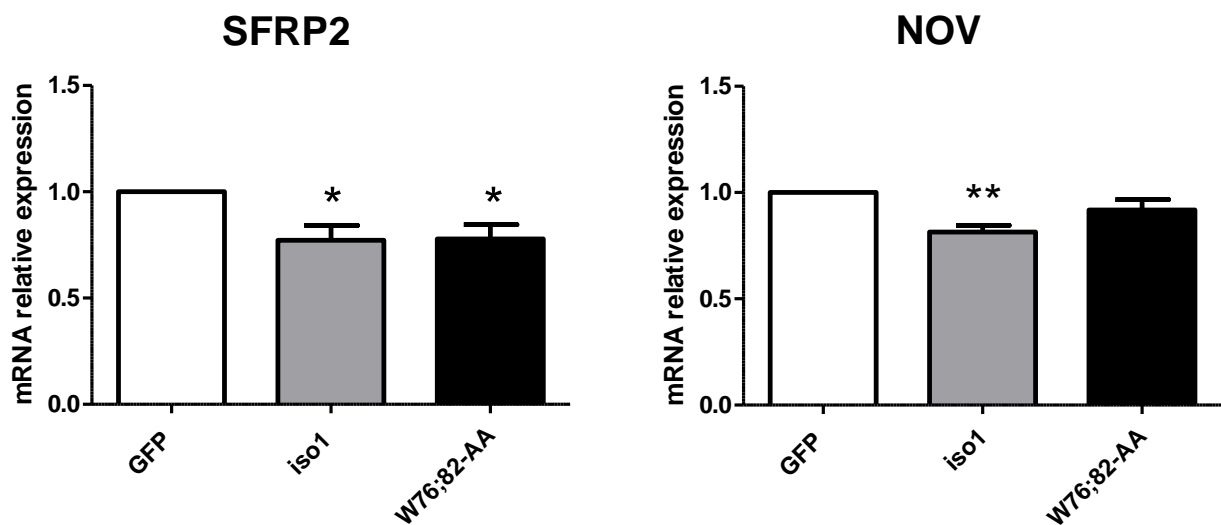
**Figure 42 : Rôle de la voie Wnt dans le développement des valves et du muscle.**

La voie Wnt a un rôle biphasique dans le développement du coeur et du muscle. En effet, elle stimule la formation du mésoderme, l'EMT des cellules endocardiques et la prolifération des progéniteurs cardiaques, tandis qu'elle réprime la différenciation du mésoderme pré-cardiaque et la différenciation terminale des cardiomyocytes. Chez la souris, Nov et Sfrp2 répriment la différenciation des myoblastes tandis que LRRFip1-iso2 (homologue murin de LRRFip1-iso1) réprime l'expression de Nov et Sfrp2. D'après (Gessert et Kühl, 2010; Laflamme et Murry, 2011; Wei et al., 2015).



On peut donc supposer qu'un défaut de l'activité de la voie Wnt régulée par LRRFip1-iso1 tôt lors de la spécification des cellules pourrait mener à l'apparition de valvulopathies/cardiomyopathies congénitales. De plus, des dysfonctionnements de la voie Wnt dans le myocarde (infarctus, inflammation, infection) pourraient également mener à plus long terme au développement d'une valvulopathie.

Enfin, l'hypothèse du rôle de LRRFip1-iso1 dans le développement et l'homéostasie du muscle squelettique ne doit pas être oubliée, puisque son expression y est majoritaire (X7) par rapport aux valves. De façon intéressante, une étude montre que dans un modèle de myoblastes de souris C2C12, un KO de LRRFip1-iso2 provoque une augmentation de l'expression de *NOV* et *SFRP2*, connus pour être des répresseurs de la différenciation musculaire (Wei et al., 2015) mais également des gènes impliqués dans le développement cardiaque et valvulaire (Heath et al., 2008; Schmeckpeper et al., 2015). Nous avons donc voulu vérifier si la surexpression de LRRFip1-iso1 dans nos VICs de rat pouvait être à l'origine de ce même effet. La Figure 43 montre que LRRFip1-iso1 réprime significativement l'expression de *SFRP2* et de *NOV*.



**Figure 43 : Effet de LRRFip1-iso1 sur l'expression de *SFRP2* et *NOV*.**

Une PCR quantitative a été réalisée sur des ARNm de VICs de rat transfectées avec de la GFP (contrôle), LRRFip1-iso1 WT et le mutant W76;82-AA. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été réalisé (N>3 ; p<0.05).

Ces résultats suggèrent que dans un même type cellulaire, LRRFip1-iso1 peut être à la fois un activateur (*TCF-7*) et un répresseur (*SFRP2* et *NOV*) de la transcription. LRRFip1-iso1 est exprimé dans le coeur à des stades précoces de l'embryogénèse, mais il pourrait être

intéressant de déterminer son expression spécifique dans le myocarde et l'endocarde puisqu'il existe un cross-talk important entre ces deux tissus lors du développement des valves. Si *TCF7*, *SFRP2* et *NOV* sont impliqués dans le développement cardiaque et valvulaire, on peut présumer que l'effet (activation ou répression de la transcription) de LRRFip1-iso1 pourrait dépendre du type cellulaire dans lequel il est exprimé et être biphasique au cours du développement.

Plusieurs études ont montré l'implication de la voie Wnt canonique dans la myogenèse et l'homéostasie du muscle. Ainsi, de nombreuses protéines de la voie Wnt (*Sfrp2*, *Wnt5a*, *Wnt11*, *etc.*) sont exprimées lors de la différenciation des myoblastes (Anakwe et al., 2003). La voie Wnt agit comme un « interrupteur » moléculaire entre la prolifération et la différenciation des myoblastes notamment *via* *Wnt3a* et *Wnt4* (Tanaka et al., 2011). La  $\beta$ -caténine est quant à elle indispensable à la régénération du muscle squelettique (Rudolf et al., 2015). Par un test d'activation à la luciférase réalisé dans des C2C12 transfectées avec LRRFip1-iso1 humaine, nous avons vérifié que LRRFip1-iso1 activait également la voie Wnt canonique dans un modèle cellulaire se rapprochant plus du muscle (N=1). Ces résultats laissent à envisager que LRRFip1-iso1, de part 1) sa capacité à activer la voie Wnt 2) sa capacité à réprimer *SFRP2* et *NOV* 3) son expression à des stades précoces du développement, pourrait avoir un rôle dans la spécification/régénération des cellules musculaires.

Cependant, les patients de la famille présentant la mutation p.R94G dans *LRRFIP1* ne présentent à priori pas de troubles musculo-squelettiques ni de problèmes cardiaques autre qu'un PVM.

#### IV. Effets du stress mécanique

Le stress mécanique est un acteur important du développement et de l'homéostasie des valves cardiaques, et plusieurs études ont montré l'importance du stress mécanique lors de la valvulogénèse, de l'activation des VICs et du remodelage de la MEC (Butcher et Markwald, 2007; Sacks et al., 2010). De plus, la voie de signalisation Wnt est particulièrement concernée de par le rôle bivalent de la  $\beta$ -caténine en tant que senseur des signaux extracellulaires (*via* son interaction avec les cadhérines à la membrane cellulaire) et en tant qu'effecteur transcriptionnel dans le noyau. En effet, les cadhérines régulent la voie Wnt canonique en modulant l'activation des récepteurs Wnt, la dégradation de la  $\beta$ -caténine et sa translocation nucléaire (McCrea et al., 2015).

Il serait intéressant de déterminer le rôle de LRRFip1-iso1 dans les processus de migration et d'adhésion cellulaire. En effet, plusieurs études ont montré le rôle de LRRFip1-iso5 dans la régulation du cytosquelette d'actine notamment car il interagit avec LARG qui est une GEF de RhoA (Ariake et al., 2012), et avec Fli-1 qui régule l'activité des formines DAAM1 et mDia1 (Higashi et al., 2010). Je n'ai pas réussi à mettre en évidence une co-immunoprécipitation de LRRFip1-iso1 et LARG, et l'effet de la surexpression de LRRFip1-iso1 sur l'adhésion, l'étalement et la prolifération cellulaire a été testé dans des HEK 293 grâce au système xCELLigence® (Roche). Une seule expérience n'a pas permis de mettre en évidence un effet de LRRFip1-iso1 WT ou R94G sur ces paramètres. Il serait également intéressant de déterminer l'impact du stress mécanique sur l'activation de la voie Wnt par LRRFip1-iso1. Pour cela, un système de Flexcell FX-4000™ (Flexcell International Corporation) est disponible au laboratoire et permet d'appliquer un étirement mécanique cyclique aux cellules en culture sur une membrane de silicone. Ce système est cependant encore à mettre au point car l'étirement n'est pas homogène sur toute la surface de la membrane ce qui induit un problème de reproductibilité des expériences.

De manière intéressante, plusieurs gènes de la voie Wnt dont *SFRP2* ainsi que le gène *NOV* voient leur expression modifiée dans un contexte de développement squelettique et leur régulation est donc sensible au stress mécanique (Krupska et al., 2015; Rolfe et al., 2014).

## V. Effets de la mutation p.R94G

Dans cette étude, je n'ai pas pu mettre en évidence d'effet significatif du mutant p.R94G. Néanmoins une tendance de perte d'activité a été constatée dans les tests TopFlash et sur l'expression de TCF-7 dans des VICs (Figure 21 et Figure 22 respectivement).

Plusieurs explications sont possibles :

1) **Pertinence du modèle cellulaire** : la majorité des expériences ont été réalisées dans un modèle de HEK 293, une lignée immortalisée. Ce modèle n'est pas le plus pertinent pour la pathologie étudiée comme décrit dans la partie I de la discussion. Comme je l'ai discuté plus haut, le type cellulaire (endocarde, VICs, myocyte), le moment où la mutation peut avoir un effet pathogène et l'impact du stress mécanique sur son expression restent à être élucidés.

2) **Relation génotype-phénotype dans la famille MOR** : tous les patients atteints de PVM dans la famille MOR à l'origine de la découverte de la mutation p.R94G, sauf le propositus, présentent un léger prolapsus de la valve sans insuffisance mitrale, ce qui suggère un effet relativement modéré de la mutation p.R94G et qui n'a pas à ce jour été mis en évidence dans nos conditions expérimentales. Il est également possible que la diminution non significative (20-30%) provoquée par la mutation p.R94G tant sur l'activation de la voie Wnt par TOP Flash que sur l'augmentation de l'expression de TCF-7 par qPCR (Figure 21 et Figure 22) soit suffisante, dans le contexte du développement des valves qui est un processus très finement régulé, pour induire l'apparition d'un PVM à plus long terme.

3) **Approche génétique** : La complexité de l'étude de l'origine génétique du PVM dans la famille MOR provient (comme décrit dans la partie III des résultats du projet 1) de l'existence d'une « double entrée » du fait que deux soeurs atteintes de PVM de la famille (II:4 et II:8) ont épousé deux frères également atteints de PVM d'une autre famille (II:5 et II:9), mais également de l'existence d'un variant d'intérêt dans un autre gène partagé par plusieurs membres de la famille du patient II:5 et qui pourrait également contribuer en partie au développement du PVM. Néanmoins, ce variant n'est pas présent chez l'ensemble des patients atteints de PVM ce qui suggère l'existence d'un ou plusieurs autre(s) déterminant(s) génétique(s) associé(s) à la pathologie.

Parmi les sept variants identifiés par le séquençage d'exome, aucun ne ségrégait de façon parfaite avec le PVM au sein de la famille (présence d'au moins une phénocopie pour tous les variants), et le variant p.R94G dans le gène *LRRFIP1* était le plus susceptible d'être associé au PVM (voir partie III des résultats du projet 1). Mais l'hypothèse d'un autre déterminant génétique responsable du PVM dans cette famille n'est pas à exclure. En effet, le patient III:18 (voir Figure 19) était considéré comme atteint mais depuis ce patient a été revu et son phénotype a été modifié en douteux. Il est donc important de reconsidérer le variant dans le gène *ENPP3* (Ectonucléotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3), exclu au début de l'étude car il présentait une phénocopie chez ce patient. Les autres variants pourraient également contribuer au phénotype puisque *COL6A3* code pour l'une des 3 chaînes  $\alpha$  du collagène de type VI, un composant des MEC exprimé dans la valve, et *MCF2L2* également appelé *ARHGEF22* code pour une protéine activatrice des petites GTPases, faisant écho à *ARHGAP24* et *DOCK1* également suspectés d'être associés au PVM et qui régulent l'activité des GTPases RhoA et Rac.

## PROJET 2 -

Étude de l'implication du gène *PTPRF*

dans le Prolapsus Valvulaire Mitral

**Projet 2 : Étude de l'implication du gène *PTPRF* dans le Prolapsus  
Valvulaire Mitral (PVM)**

- 1) Caractérisation d'une nouvelle isoforme de *PTPRF*
- 2) Étude de l'implication de la mutation I328M dans le PVM

J'ai eu l'occasion pendant ma thèse de débiter un second projet pour lequel j'ai dû caractériser le rôle et la fonction d'une nouvelle isoforme de *PTPRF* qui code pour le récepteur LAR, un récepteur tyrosine-phosphatase. En effet, la mutation *PTPRF*-I328M a été identifiée chez plusieurs individus d'une famille où plusieurs membres sont atteints par un PVM.

Mon travail a permis de montrer que l'isoforme concernée par la mutation I328M est une forme tronquée de *PTPRF* (short-*PTPRF*) qui est exprimée dans les valves humaines ainsi que dans de nombreux types cellulaires. La protéine est à la fois membranaire et cytoplasmique, et elle interagit avec les Héparane Sulfate Protéoglycans (HSPGs), des molécules présentes dans les MEC et qui jouent un rôle de plateforme pour de nombreuses voies de signalisation (Wnt, TGF- $\beta$ , EGF). La mutation I328M ne modifie pas l'expression, la localisation, l'interaction avec les HSPGs ni la stabilité de la protéine.

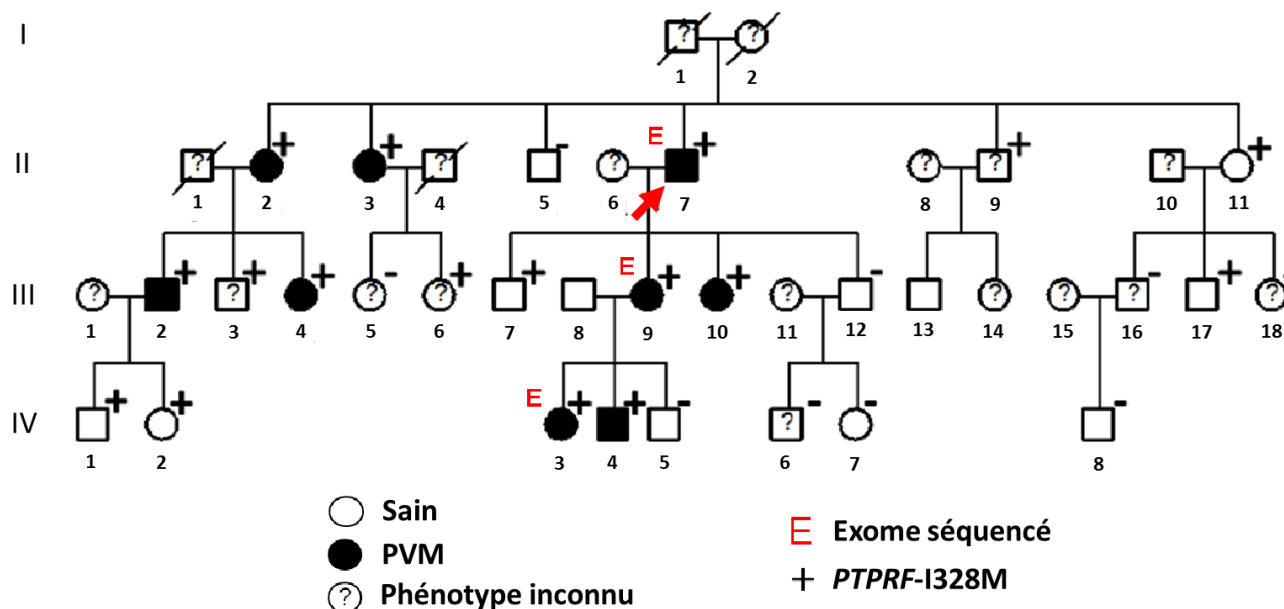
Ces données préliminaires nous permettent de supposer un rôle de *PTPRF* dans la valvulogénèse et l'homéostasie des valves. Le rôle de short-*PTPRF* ainsi que l'effet de la mutation I328M devront être déterminés en particulier dans le remodelage du cytosquelette, la signalisation des cytokines (EGF, TGF- $\beta$ ) et l'interaction avec la matrice extracellulaire.

## Introduction Projet 2 - Étude de l'implication du gène *PTPRF* dans le PVM

### I. Identification du variant p.I328M dans le gène *PTPRF*

#### 1. Description de la famille

Le recrutement de la famille LAP (Figure 44) a débuté suite à la nécessité d'une intervention chirurgicale pour un patient (II:7, indiqué par une flèche rouge) qui présentait un PVM de type Barlow avec des distensions de cordages, un anneau mitral dilaté et un excès tissulaire des valvules mitrales avec des remaniements fibro-myxoïdes.



**Figure 44 : Arbre généalogique de la famille LAP et représentation du phénotype PVM**

La famille étudiée comporte 9 membres atteints par un PVM. Parmi eux, trois séquençages d'exome ont permis d'identifier la mutation I328M sur le gène *PTPRF*. La mutation est présente chez tous les patients affectés par la pathologie mais est également retrouvée chez 5 individus sains (non-pénétrants).

En tout, 9 patients de cette famille sont atteints par un PVM. Les données phénotypiques des patients atteints sont indiquées dans le Tableau 4. Ces patients présentent un PVM de type Barlow avec des prolapsus plus marqués pour les valvules postérieures (moyenne -4,93 mm) que pour les valvules antérieures (moyenne -2,79 mm).

Individu	Age	PVM	Prolapsus V. ant (mm)	Prolapsus V. post (mm)
II:2	75	Atteint	-	-9,3
II:3	73	Atteint	-1,3	-4
II:7	79	Atteint	Intervention chirurgicale 63 ans	
III:4	48	Atteint	0	-2,7
III:9	47	Atteint	-7	-10,6
III:10	52	Atteint	-3,1	-3,8
III:2	46	Atteint	-2	-2
V:3	15	Atteint	-2,1	-3,6
V:4	24	Atteint	-1,2	-3,4

**Tableau 4 : Données phénotypiques des patients atteints de PVM de la famille LAP.**

Les mesures de prolapsus des valvules mitrales, antérieure (V. Ant) et postérieure (V. Post) sont reportées en millimètres. Les mesures négatives correspondent aux mesures au-dessus du plan de l'anneau.

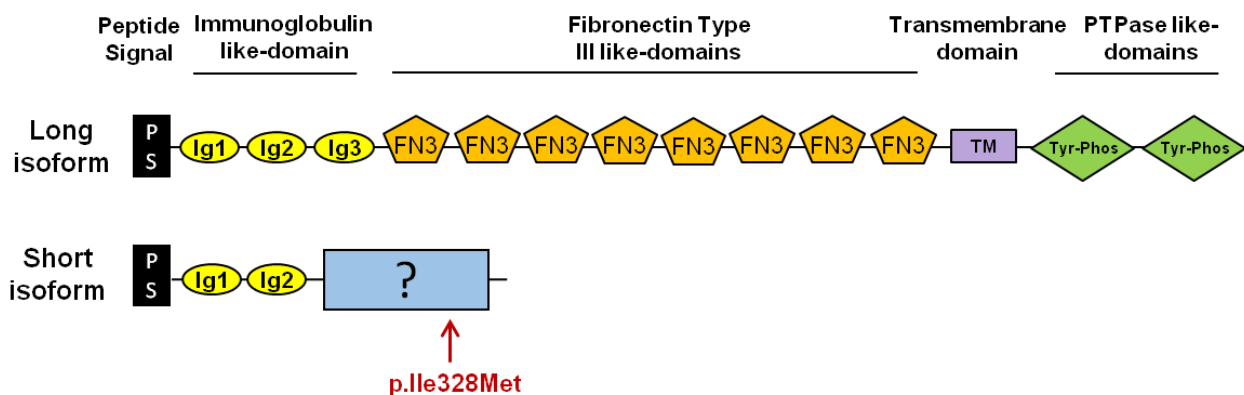
L'analyse des données de séquençage d'exome a permis d'identifier un seul variant commun chez 3 patients (indiqués par un E rouge). Ce variant est situé sur le chromosome 1 et correspond à une isoforme prédite du gène *PTPRF* (ENST00000437607). Il induit la substitution d'une Isoleucine en Méthionine en position 328 de la protéine (p.Ile328Met). Ce variant est rare (fréquence < 0.1%) et l'analyse de sa co-ségrégation avec le PVM a été réalisée sur l'ensemble de la famille par séquençage capillaire. Le variant est présent chez tous les patients atteints de la famille (9/9) ainsi que chez 5 des 10 individus sains de la famille. Sur ces cinq individus, trois sont jeunes (IV:2=15, IV:1=19, III:17=36) ce qui suggère que la pathologie ne s'est pas encore développée.

## 2. Structure des gène/protéine *PTPRF*

Le gène *PTPRF* code pour deux isoformes prédites chez l'homme, une isoforme longue et une isoforme courte (Figure 45). L'isoforme longue est le récepteur Leucocyte common Antigen-Related (LAR) qui fait partie de la famille des récepteurs à la structure très conservée des Récepteurs Protéines Tyrosine Phosphatase (RPTPs). Le récepteur LAR comprend un peptide signal impliqué dans sa maturation en N-terminal, une région extracellulaire composée de 3 domaines Immunoglobulin-like et de 8 domaines Fibronectin-like de type III, une région intracellulaire composée de deux domaines Protéine Tyrosine Phosphatase (PTP) D1 et D2 (respectivement le plus proximal et le plus distal) et un segment transmembranaire (Pulido et al., 1995). L'isoforme courte possède également le peptide signal, les deux premiers domaines Ig-like et un nouveau domaine (en bleu sur la Figure 45) qui n'a pas été caractérisé. Seule l'isoforme courte peut être ciblée par la mutation p.I328M.



L'expression tissulaire, la localisation cellulaire et les fonctions de cette isoforme courte n'ont jamais été décrites auparavant.

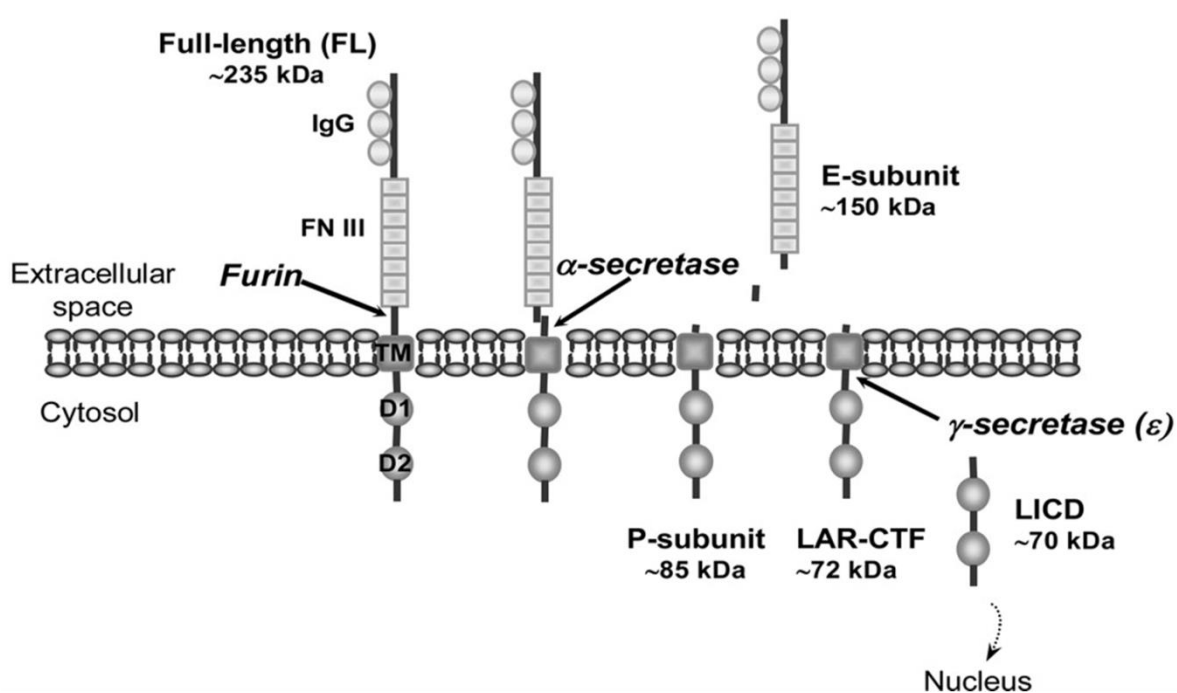


**Figure 45 : Représentation schématique de la protéine PTPRF (isoformes courte et longue).**

L'isoforme longue de PTPRF (LAR) est constituée d'un peptide signal, de trois domaines Ig-like suivis par huit domaines Fibronectine-like, un domaine transmembranaire et deux domaines à l'activité tyrosine-phosphatase. L'isoforme courte possède un domaine (en bleu) fonctionnel inconnu. La mutation p.I328M ne cible que l'isoforme courte de PTPRF.

Cinq classes de récepteurs RPTP ont été établies sur la structure de leurs domaines extracellulaires. La classe des RPTPs de type IIb comprend LAR mais également RPTP-sigma et RPTP-delta respectivement codés par les gènes PTPRS et PTPRD. Ces récepteurs font partie des Cell Adhesion-like Molecules (CAMs) qui comprend la superfamille des Immunoglobulines, les cadhérines, les intégrines et les sélectines (Beltran et al., 2003).

Le récepteur LAR subit un processing particulier (Figure 46). Il est initialement exprimé à la membrane comme une pré-protéine d'environ 200 kDa qui est ensuite clivée par une endoprotéase (enzyme Furine) en un fragment extracellulaire (sous-unité E) de 150 kDa et un fragment à l'activité phosphatase (sous-unité P) de 85 kDa qui restent liés de façon non covalente (Streuli et al., 1992). Un autre clivage par une  $\alpha$ -sécrétase va ensuite aboutir au relargage du fragment extracellulaire d'environ 150 kDa, et un clivage par une  $\gamma$ -sécrétase va relarguer un fragment intracellulaire d'environ 70 kDa (Haapasalo et al., 2007).



**Figure 46 : Maturation du récepteur LAR**

La pré-protéine va être clivée par une enzyme Furine qui va libérer un fragment extracellulaire de 150 kDa (sous-unité E) et un fragment intracellulaire de 85 kDa (sous-unité P) liés de façon non covalente. Un 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> clivages respectivement par une  $\alpha$ -sécrétase et une  $\gamma$ -sécrétase vont libérer les fragments extra- et intracellulaires. Il a été décrit que le fragment LICD de 70 kDa peut activer la transcription de gènes. (d'après Haapasalo et al., 2007).

La régulation de l'activité de ces récepteurs est encore méconnue, mais il a été montré que deux récepteurs RPTP $\alpha$  chez la souris pouvait se dimériser *via* leurs domaines D1 et ainsi inhiber leur activité tyrosine phosphatase (Bilwes et al., 1996). De même, plusieurs études ont démontré le rôle régulateur de l'activité PTP du domaine D1 par le domaine D2. En effet, une analyse en double hybride a montré que le domaine D2 du récepteur RPTP $\delta$  pouvait interagir avec le domaine D1 de RPTP et diminuer de moitié son activité catalytique (Wallace et al., 1998).

### 3. Rôles du récepteur LAR

LAR étant une tyrosine phosphatase et la phosphorylation des résidus tyrosine des protéines étant le médiateur de nombreuses voies de signalisation, il n'est pas étonnant qu'il soit impliqué dans la migration, prolifération et différenciation des cellules.

#### a. Rôle dans le développement du système nerveux

Le rôle du récepteur LAR dans la croissance et le guidage des neurones a été solidement établi par de nombreuses études, et a été mis en évidence pour la première fois chez la drosophile. En effet, Dlar est exprimé exclusivement dans les axones en développement, et les embryons mutants pour Dlar montrent un dysfonctionnement du développement neuronal puisque certains motoneurons ne réussissent pas à atteindre leur zone cible (Krueger et al., 1996). Le même mécanisme a été observé pour les neurones des photorécepteurs dans la rétine également chez la drosophile (Clandinin et al., 2001). Chez les mammifères, une souris KO pour LAR montre une diminution de la taille des neurones cholinergiques dans le télencéphale basal et une diminution de l'innervation globale de l'hippocampe (Yeo et al., 1997). Ce rôle de LAR dans le développement des neurones fait intervenir trois ligands majeurs (Figure 47) :

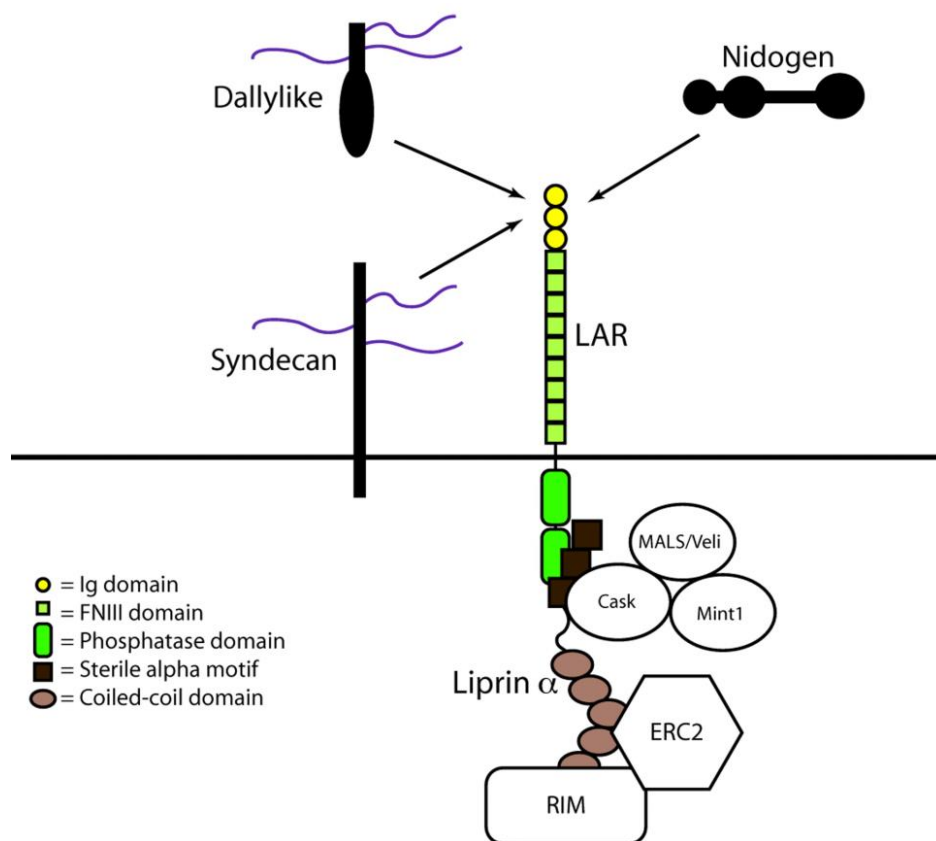
1) Les héparanes sulfates protéoglycans (HSPGs) : chez la drosophile, les molécules Syndecan (Sdc) et Dallylike (Dlp) sont impliquées dans le développement et la plasticité synaptique. Ces deux HSPGs interagissent avec Dlar via son domaine Ig-like, l'activité de Sdc est dépendante de la présence de Dlar tandis que la surexpression de Dlp inhibe l'activité de Dlar (Johnson et al., 2006). LAR jouerait alors un rôle de régulateur de la formation synaptique puisque Sdc provoque la croissance des connexions synaptiques entre neurones tandis que Dlp l'inhibe et participe à l'assemblage de la zone active de la synapse (zone du neurone pré-synaptique où a lieu l'exocytose des neurotransmetteurs, ce sont des zones riches en protéines du cytosquelette, d'échafaudage, impliquées dans l'exocytose, etc.) (Stryker et Johnson, 2007). Il a également été montré que LAR interagit avec les Chondroïtin Sulfate Proteoglycans (CSPGs) qui régulent négativement la croissance axonale (Fisher et al., 2011).

2) Les protéines Liprine- $\alpha$  : LAR interagit *via* son domaine PTPase intracellulaire D2 avec la protéine LAR-interacting Protein 1 (LIP-1), une phosphosérine contenant de nombreux domaines coiled-coil impliqués dans les interactions protéine-protéine. LAR et

LIP-1 sont co-localisées au niveau des points focaux d'adhésion, mais il semble que LIP-1 ne soit pas un substrat de LAR puisqu'elle est phosphorylée sur les sérines (Pulido et al., 1995; Serra-Pagès et al., 1995). L'interaction entre LAR et la Liprine- $\alpha$  est également conservée chez la drosophile, et leur rôle complémentaire dans la formation des synapses a été démontré puisque des drosophiles mutées pour la Dliprine- $\alpha$  ou pour Dlar présentent le même phénotype, une réduction de la taille et de la complexité (nombre de boutons et de branches synaptiques) de la jonction neuromusculaire (Kaufmann et al., 2002).

3) Le complexe Laminine-nidogène : L'exon 13 dans le domaine FnIII numéro 5 de LAR peut être alternativement épissé et sa présence est majoritaire dans les neurones (O'Grady et al., 1994). Le nidogène, une glycoprotéine sulfatée présente dans les MEC et régulant de nombreux mécanismes cellulaires (migration, prolifération, différenciation) a été identifié comme un interactant de ce domaine 5 FnIII de LAR, et LAR inhibe l'étalement cellulaire médié par le complexe laminine-nidogène (O'Grady et al., 1998). Chez le ver *C. elegans*, il a été suggéré que le nidogène (Nid-1) tout comme la liprine- $\alpha$  (Syd-2) pourrait participer au recrutement de PTP-3, l'orthologue de LAR chez le ver, au niveau des synapses en formation, suggérant que ces trois protéines participent à l'organisation spatiale de la synapse (Ackley, 2005).

Le rôle de LAR dans le développement du système nerveux évoque des possibilités thérapeutiques quant à la régénération des neurones notamment dans le cas des maladies neurodégénératives. Outre ce rôle essentiel, LAR a également montré un rôle indispensable dans la formation des glandes mammaires (Schaapveld et al., 1997) et le développement des systèmes urétéral et craniofacial (Uetani et al., 2009).



**Figure 47 : Implication de LAR et ses partenaires dans la morphogénèse de la zone active synaptique.**

Les HSPGs (Syndecan et Dallylike) et le nidogène interagissent avec LAR via le premier domaine Ig-like. La liprine- $\alpha$  interagit avec le complexe de trois protéines d'échafaudage MALS/Veli-Cask-Mint1 qui régule le pool de vésicules synaptiques libres avant la fusion avec la membrane plasmique de la cellule post-synaptique. ERC2 recrute la liprine- $\alpha$  et RIM au niveau des zones pré-synaptiques (d'après Stryker et Johnson, 2007).

#### b. Rôle dans la régulation des adhésions cellulaires et du cytosquelette d'actine

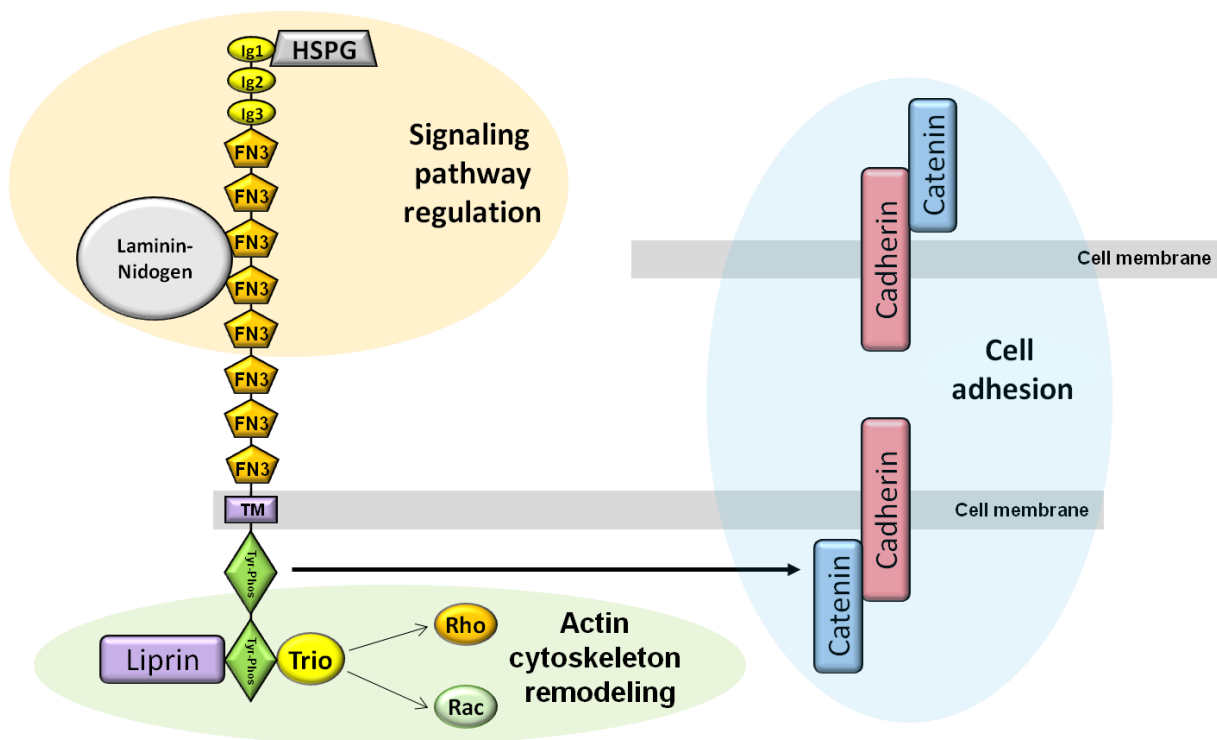
Les travaux de Muller et al. ont montré que LAR est co-localisé avec les jonctions adhérentes et interagit directement avec la  $\beta$ -caténine et la plakoglobine (via sa partie C-terminale) mais pas avec l' $\alpha$ -caténine et la E-cadhérine (Müller et al., 1999). LAR diminue la migration cellulaire car il déphosphoryle la  $\beta$ -caténine ce qui augmente son interaction avec les cadhérines. Il est également colocalisé au niveau des points focaux d'adhésion avec LIP-1 mais également avec la protéine p130Cas, une molécule de signalisation de la voie des intégrines. LAR régule la survie cellulaire et peut activer la voie des caspases et induire l'apoptose *via* la déphosphorylation de p130Cas (Weng et al., 1999). LAR interagit également avec Trio, une protéine contenant deux domaines GEF spécifiques soit de Rac soit de Rho, et un domaine sérine/thréonine kinase (Debant et al., 1996).

Curieusement, bien qu'il ait été montré que LAR diminue la formation de tumeurs métastatiques chez une souris nude (Müller et al., 1999) ce qui corrobore avec l'inhibition de la migration cellulaire, une surexpression de LAR est observée dans les cancers du sein (Yang et al., 1999) et de la thyroïde (Konishi et al., 2003). Des études supplémentaires devront être menées afin de déterminer si l'expression de LAR est un facteur de bon ou mauvais pronostic dans ces types de cancers.

### c. Rôle dans la signalisation cellulaire

LAR régule plusieurs voies de signalisation, notamment les voies de l'EGF/FGF, la voie Wnt et la voie de l'insuline.

En effet, LAR inhibe la signalisation de l'EGF et du FGF en inhibant spécifiquement la phosphorylation de p130Cas dans des cellules stimulées à l'EGF et des protéines FRS2 et p180 dans des cellules stimulées au FGF, et par conséquent inhibe également leur association avec la protéine adaptatrice GRB2 (Wang et al., 2000). Curieusement, une réduction de l'activation des MAPK est seulement observée dans les cellules stimulées au FGF. Une autre étude a montré que l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase qui clive et libère le fragment intracellulaire (70 kDa) lors du « processing » de LAR régule son interaction avec la  $\beta$ -caténine (Haapasalo et al., 2007). Il est également décrit que ce fragment peut être transloqué dans le noyau cellulaire et inhiber la transcription de la cycline D1, une des cibles de la voie Wnt. De plus, LAR peut interagir directement avec le récepteur à l'insuline et régule négativement sa signalisation (Ahmad et Goldstein, 1997). Aussi, LAR est surexprimé chez les humains obèses et insulino-résistants (Ahmad et al., 1995), et le rôle de LAR a été vérifié chez une souris surexprimant LAR dans le muscle qui montre des taux d'insuline circulant 2.5 fois plus élevés que la normale et une diminution de moitié de la capacité à stocker le glucose (Zabolotny et al., 2001).



**Figure 48 : Récapitulatif des principaux rôles cellulaires de LAR.**

1) LAR interagit avec les HSPGs et le nidogène et régule ainsi la signalisation cellulaire 2) LAR permet l'assemblage des jonctions cellule-cellule en interagissant avec la caténine 3) LAR peut réguler le remodelage du cytosquelette d'actine via Trio.





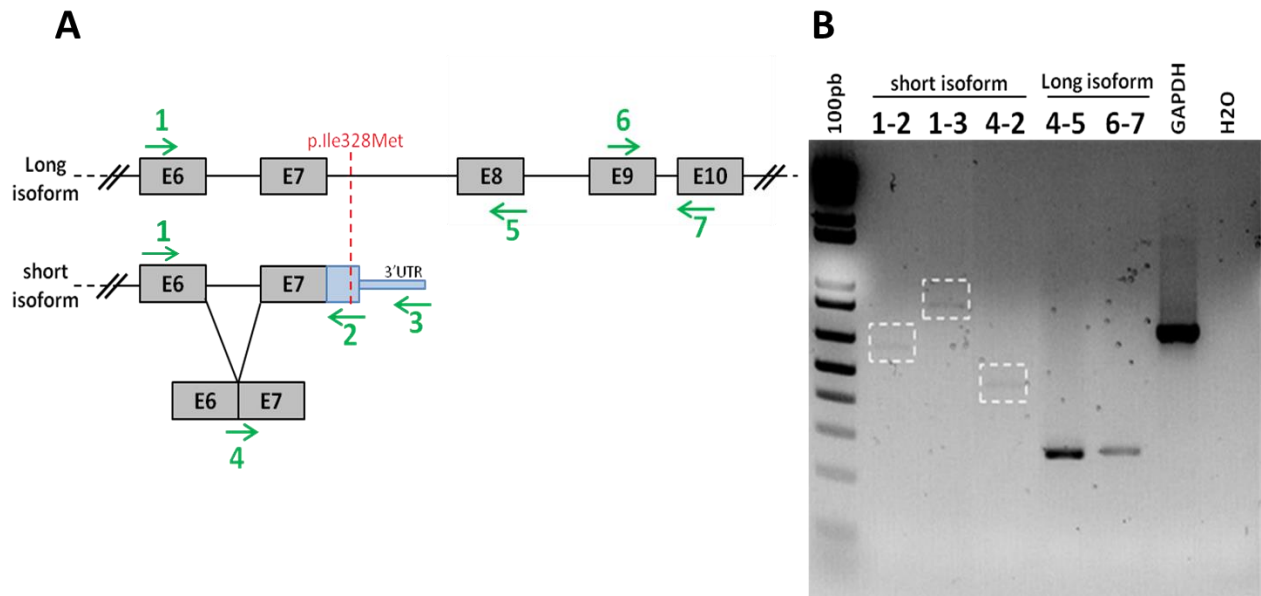
## Résultats Projet 2 - Étude de l'implication du gène *PTPRF* dans le PVM

### I. Expression et localisation de short-PTPRF (sPTPRF)

#### 1. Expression tissulaire et cellulaire de sPTPRF

Le premier aspect du projet consistait à vérifier l'expression de l'isoforme de *PTPRF* ciblée par la mutation p.I328M. En effet, l'existence de cette isoforme était seulement prédite dans plusieurs bases de données de transcrits (ExAC, GenBank, ENSEMBL, *etc.*), mais l'expression, la localisation cellulaire et les rôles de sPTPRF n'ont pas encore été caractérisés.

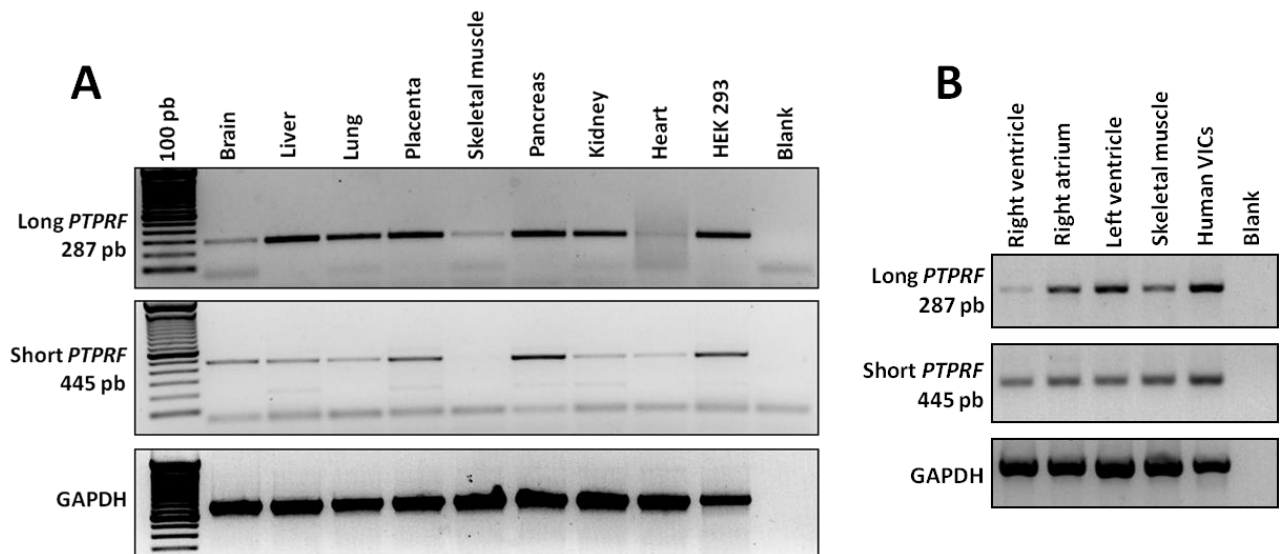
Plusieurs couples de primers spécifiques des isoformes courte et longue de *PTPRF* ont été conçus afin de déterminer leur expression tissulaire par RT-PCR (Figure 49A). La Figure 49B montre que les isoformes courte et longue de *PTPRF* sont exprimées dans un échantillon d'ARNm de valve mitrale saine.



**Figure 49 : Expression de *PTPRF* dans la valve mitrale.**

A) Représentation schématique des isoformes longue et courte de *PTPRF* pour lesquelles des couples de primers spécifiques ont été désignés (flèches vertes numérotées). B) L'évaluation de l'expression des deux isoformes de *PTPRF* a été réalisée avec de l'ARNm de valve mitrale saine amplifié par RT-PCR puis déposé sur un gel d'agarose. Les encadrés blancs correspondent aux fragments de taille attendue spécifiques de l'isoforme courte de *PTPRF*.

L'expression de *sPTPRF* a également été évaluée dans un panel de tissus humains. Seulement deux couples de primers spécifiques des isoformes longue et courte de *PTPRF* ont été utilisés, respectivement 6-7 et 4-2 sur la Figure 49A. La Figure 50A montre que les isoformes longue et courte de *PTPRF* sont exprimées quasiment dans tous les tissus testés. Seul le muscle squelettique du panel ne montre pas d'expression de *short-PTPRF*, mais cette expression a été vérifiée dans un échantillon d'ARNm préparé à partir d'une biopsie de muscle paravertébral humain, et la Figure 50B montre bien un signal positif pour *short-PTPRF*. Les deux isoformes de *PTPRF* sont également exprimées dans les cavités cardiaques mais aussi dans un échantillon d'ARNm de VICs dérivées de cellules souches pluripotentes induites humaines développées par Michel Pucéat (Marseille). Ces résultats suggèrent que les deux isoformes de *PTPRF* sont ubiquitaires et bien exprimées dans les valves humaines.



**Figure 50 : Expression de *PTPRF* dans les tissus humains.**

L'expression des isoformes longue et courte de *PTPRF* a été évaluée respectivement grâce aux couples de primers 6-7 et 4-2 (voir Figure 49A) dans A) un panel de tissus humains provenant de chez Clontech et un échantillon d'ARNm de HEK 293 B) des échantillons d'ARNm cardiaques, de muscle squelettique paravertébral et de VICs dérivées de hiPSC par M. Pucéat (Marseille).

## 2. Expression et localisation cellulaire de sPTPRF

Au début du projet, l'absence d'anticorps spécifique pour détecter la forme endogène de sPTPRF nous a contraints à utiliser une forme taguée de la protéine afin de faciliter les expériences de biochimie. En effet, un anticorps reconnaissant les domaines Ig1 et Ig2 était disponible mais reconnaissait également la forme longue (LAR) de PTPRF (Figure 51A). Des plasmides codant pour sPTPRF tagué MYC en N-terminal ou tagué HA en C-terminal ont été d'abord utilisés, mais des problèmes de détection en Western Blot récurrents nous ont amené à insérer un tag HA en position 231 de la protéine, après le domaine Ig2.

Nous avons vérifié que le tag HA n'induisait pas de modification d'expression de la protéine en utilisant les anticorps anti-LAR et anti-HA, et le rôle du peptide signal (PS) a également été analysé.

Des HEK 293 ont été transfectées avec sPTPRF tagué et non tagué HA avec ou sans PS. Les cellules ont été lysées dans un tampon hypotonique puis un isolement des fractions cytoplasmique et membranaire a été réalisé (voir protocole V.3). La Figure 52 présente l'expression de sPTPRF dans ces deux fractions, après révélation avec un anticorps anti-HA et anti-LAR. Le profil observé en LAR montre plus ou moins 5 bandes distinctes (dont les PM sont indiqués sur la Figure 52) à 49, 37, 32, 26 et 23 kDa :

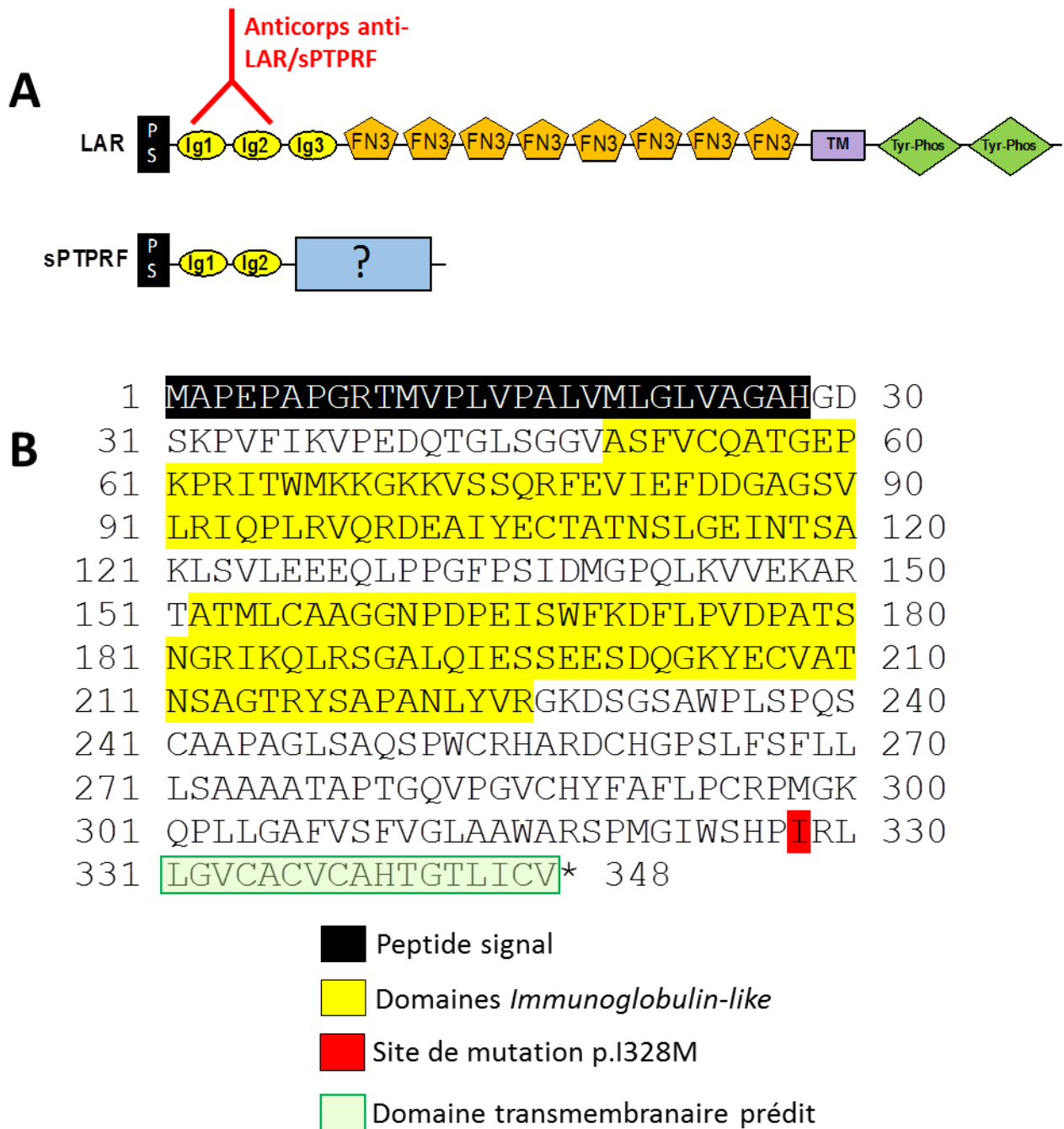
1) La bande à 37 kDa est au PM attendu de sPTPRF. C'est la seule bande qui soit détectée par l'anti-HA dans les fractions cytoplasmique et membranaire (pistes 5 et 17). Elle est aussi détectée avec une intensité plus faible par l'anti-LAR (pistes 11 et 23). Il faut noter que sans PS, l'expression de sPTPRF est beaucoup plus faible (pistes 6 et 18 en HA et pistes 12, 22, 24 en LAR), ce qui suggère que le PS joue un rôle dans la stabilité ou l'efficacité de traduction de la protéine. Notons aussi un petit « shift » pour la bande à 37 kDa entre sPTPRF non tagué et tagué HA révélés avec l'anticorps anti-LAR (pistes 9 *versus* 11 et pistes 21 *versus* 23, indiqué par les flèches rouges) et qui doit correspondre à l'ajout des 10aa du tag HA. Le tag HA positionné en position 231 ne semble donc pas altérer l'expression de sPTPRF puisque le profil des bandes détectées par l'anticorps anti-LAR est le même avec ou sans tag HA (pistes 9 et 11).

2) Les autres bandes sont toutes spécifiquement détectées par l'anti-LAR. Les bandes à 23 et 26 kDa sont seulement reconnues par l'anticorps anti-LAR dans la fraction membranaire et en présence du PS (pistes 21 et 23). Ceci suggère que 1) le PS est indispensable au « processing » de la protéine et que le clivage n'est efficace que quand sPTPRF est adressé à la membrane du RE 2) Ces formes sont vraisemblablement clivées avant le tag HA (probablement dans le domaine Ig2) puisqu'elles ne sont pas reconnues par l'anti-HA. Les fragments de 23 et 26 kDa restent liés à la membrane vraisemblablement *via* le PS.

3) La bande à 32 kDa est, elle aussi, seulement révélée par l'anticorps anti-LAR. C'est donc vraisemblablement une forme tronquée entre l'Ig2 et le tag-HA. On la retrouve dans les fractions cytoplasmiques (pistes 9 et 11) uniquement pour les constructions portant le PS et dans les fractions membranaires qu'elles portent, ou pas, le PS (pistes 21 à 23). Le PM (32 kDa) de cette bande est plus difficilement interprétable puisqu'il correspond au PM de sPTPRF « entier » moins le PS alors qu'elle n'est pas révélée par l'anti-HA. On peut imaginer que 1) sPTPRF est clivé avant le tag HA et que le produit de ce clivage donne pour une raison inconnue une protéine de PM plus importante que celui attendu ( $\approx 26$  kDa) ou 2) Le clivage du PS provoque un mauvais repliement d'une partie des protéines surexprimées où l'épitope du tag HA n'est plus reconnu par l'anticorps.

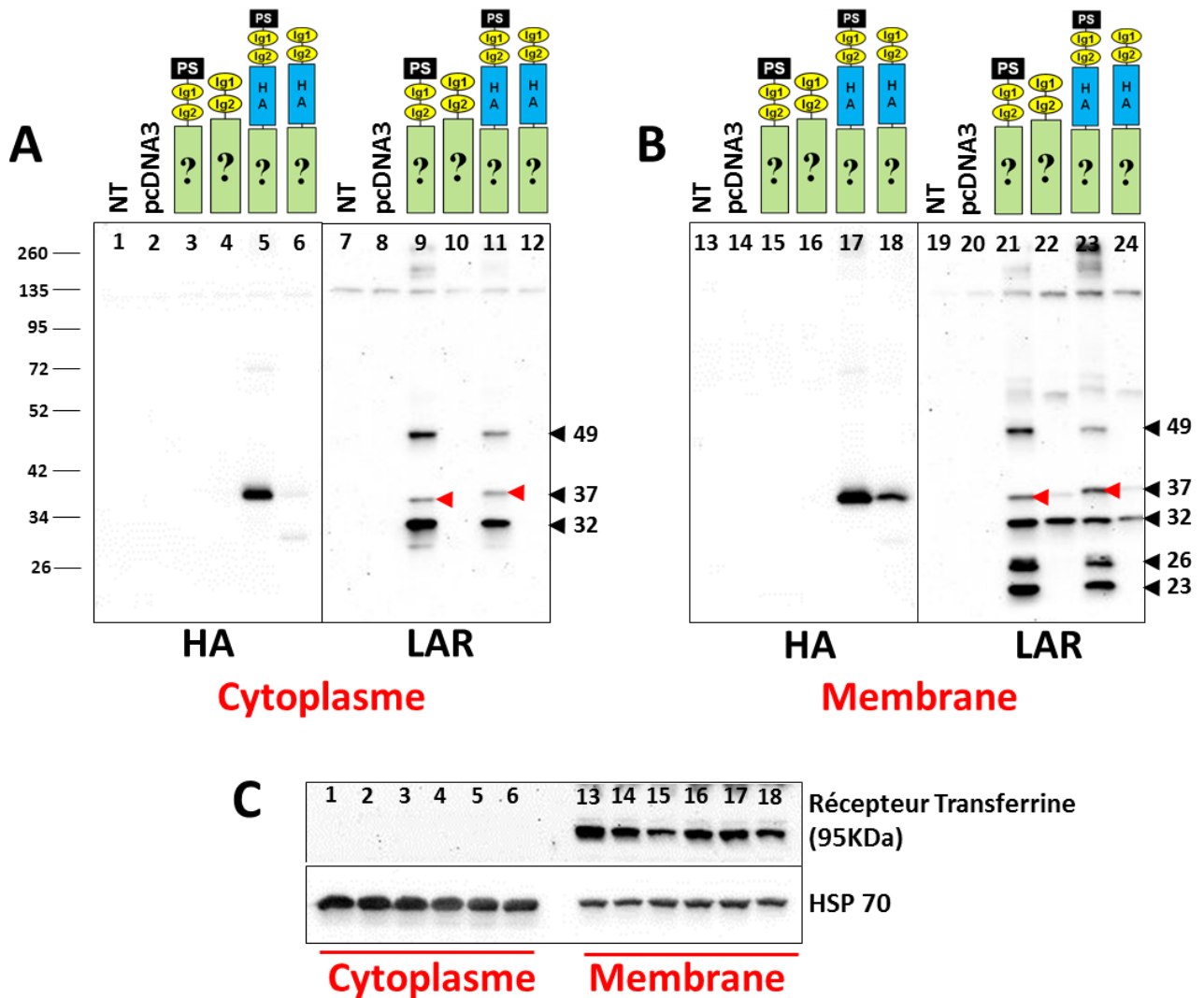
4) La nature de la bande à 49 kDa reste elle aussi à être élucidée. Elle peut correspondre à une modification post-traductionnelle de la protéine ou à des agrégats de produit de clivage ( $26$  kDa +  $23$  kDa =  $49$  kDa).

Ces résultats suggèrent donc que 1) sPTPRF est exprimé à la fois dans le cytoplasme et dans les membranes cellulaires 2) le tag HA en position 231 n'altère pas l'expression et la localisation de sPTPRF et 3) le peptide signal est important pour l'expression, le repliement et la maturation de la protéine à la membrane.



**Figure 51 : Séquence protéique de sPTPRF.**

A) Un anticorps anti-LAR ciblant les deux premiers domaines Ig-like a été utilisé pour reconnaître la forme endogène de sPTPRF. B) Séquence protéique de sPTPRF dans laquelle les différents domaines sont représentés respectivement en noir, jaune et rouge et vert : le peptide signal, les domaines Immunoglobulin-like 1 et 2 qui sont communs au récepteur LAR, le site de mutation p.I328M et le domaine transmembranaire identifié par prédiction de structure.

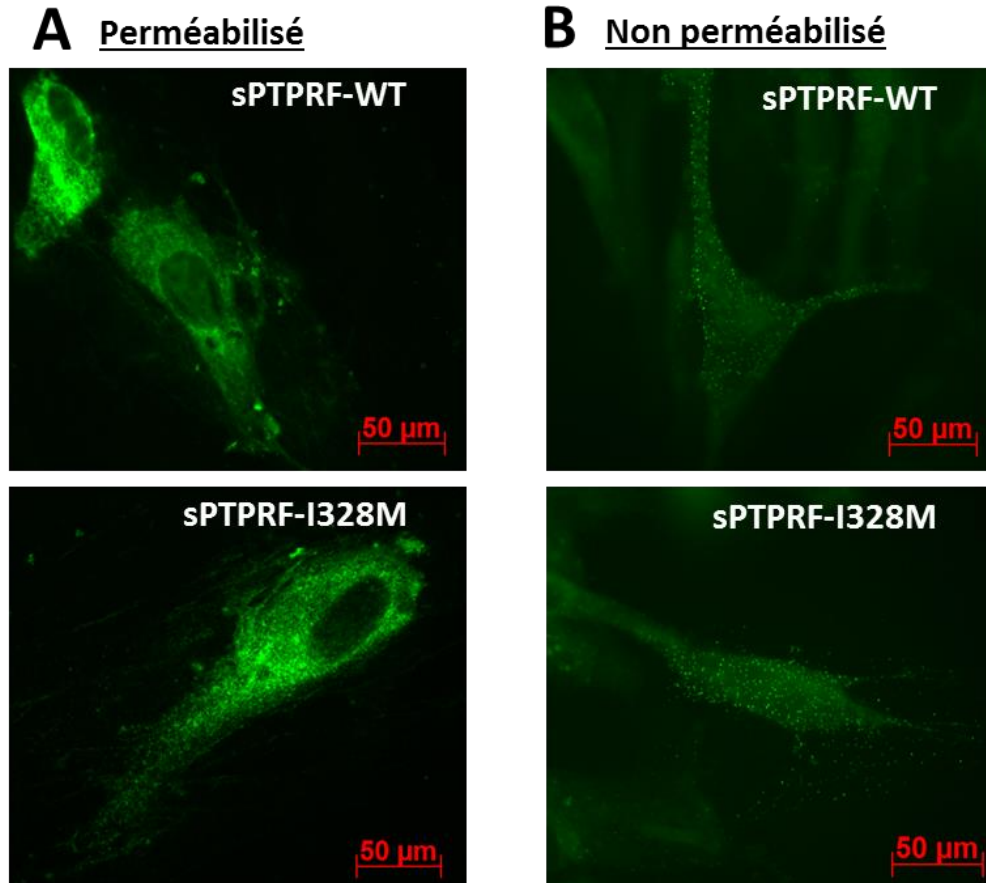


**Figure 52 : Expression et localisation cellulaire de sPTPRF par Western Blot.**

Des HEK 293 ont été transfectées avec sPTPRF tagué et non tagué HA avec ou sans peptide signal. Les cellules ont été lysées puis fractionnées, et la localisation de sPTPRF a été observée dans le cytoplasme (A) et la membrane (B). Les flèches rouges correspondent à un « shift » visible pour la bande à 37 kDa entre sPTPRF tagué et non tagué HA. La qualité des fractions respectivement cytoplasmique et membranaire a été vérifiée grâce à l'expression de HSP70 et du récepteur à la transferrine (C). Les PM sont indiqués en kDa.

La localisation de sPTPRF a ensuite été confirmée par immunomarquage dans des MRC5 qui sont des cellules de type fibroblastique de poumon fœtal. Les MRC5 ont été transfectées avec sPTPRF WT ou le mutant I328M tagués MYC, puis incubées avec un anticorps anti-MYC après fixation dans du PFA 4% et perméabilisation dans du Triton X100 à 0.1% (Figure 53A) ou avant la fixation au PFA 4% et sans perméabilisation (Figure 53B). Cette expérience suggère que sPTPRF est localisé principalement dans le cytoplasme en marquage intracellulaire (Figure 53A), et que sPTPRF est également exprimé à la membrane

puisque'on peut clairement distinguer un marquage punctiforme à l'extérieur de la cellule (Figure 53B). Ces résultats confirment ceux obtenus en Western Blot et suggèrent que sPTPRF est localisé à la fois dans le cytoplasme et à la membrane cellulaire, et ne montrent pas de différence significative de localisation pour sPTPRF WT *versus* I328M.



**Figure 53 : Localisation cellulaire de sPTPRF par immunomarquage.**

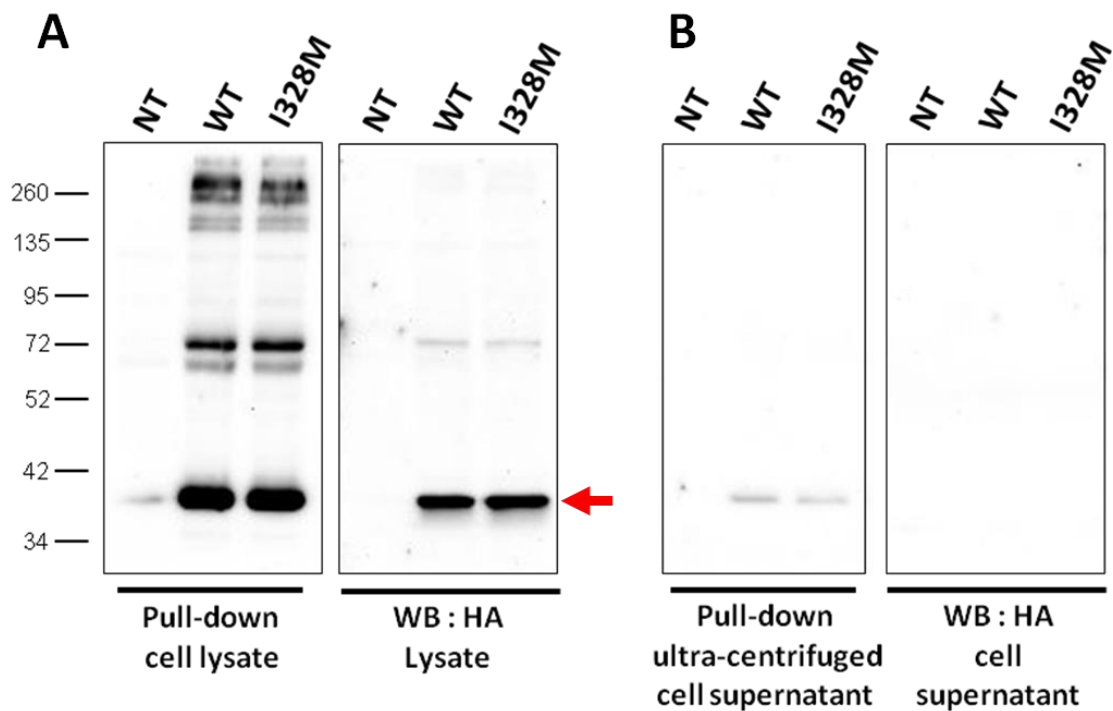
Des cellules MRC5 ont été transfectées avec sPTPRF WT ou I328M tagués MYC en N-terminal puis A) fixées dans du PFA 4% et perméabilisées avec du Triton-X100 à 0.1% puis incubées avec un anticorps anti-MYC ou B) incubées avec un anticorps anti-MYC puis fixées dans du PFA 4%. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire Alexa 488 et observées au microscope à fluorescence.

## II. Fonctions cellulaires de sPTPRF

### 1. Interaction de sPTPRF avec les Héparane Sulfate Protéoglycans (HSPGs)

Puisqu'il a été montré que LAR interagit avec les HSPGs via son domaine Ig1 (Johnson et al., 2006), une expérience de pull-down avec des billes d'héparine-agarose a été réalisée sur un lysat de HEK 293 transfectées avec sPTPRF tagué HA en position 231 pour

vérifier si l'interaction avec les HSPGs était également possible pour sPTPRF. La Figure 54A montre qu'une bande correspondant à sPTPRF WT et I328M est détectée à 37 kDa dans le pull-down sur le lysat cellulaire. Plusieurs bandes dont la nature n'a pas été établie sont également détectées au-dessus de 37 kDa et ne sont pas présentes dans les lysats. La Figure 54B montre une faible trace à 37 kDa dans les pull-down réalisés sur les milieux de culture des cellules (probablement due à la contamination par des cellules en suspension malgré l'ultracentrifugation des milieux, voir protocole V.6.b) ce qui suggère que sPTPRF n'est pas sécrété dans les milieux de culture. Ces données montrent que sPTPRF peut interagir avec les HSPGs. La nature des bandes au-dessus de 37 kDa devra être établie, mais ces bandes pourraient correspondre soit à des oligomères de sPTPRF, soit à des complexes protéiques non dénaturés en SDS.



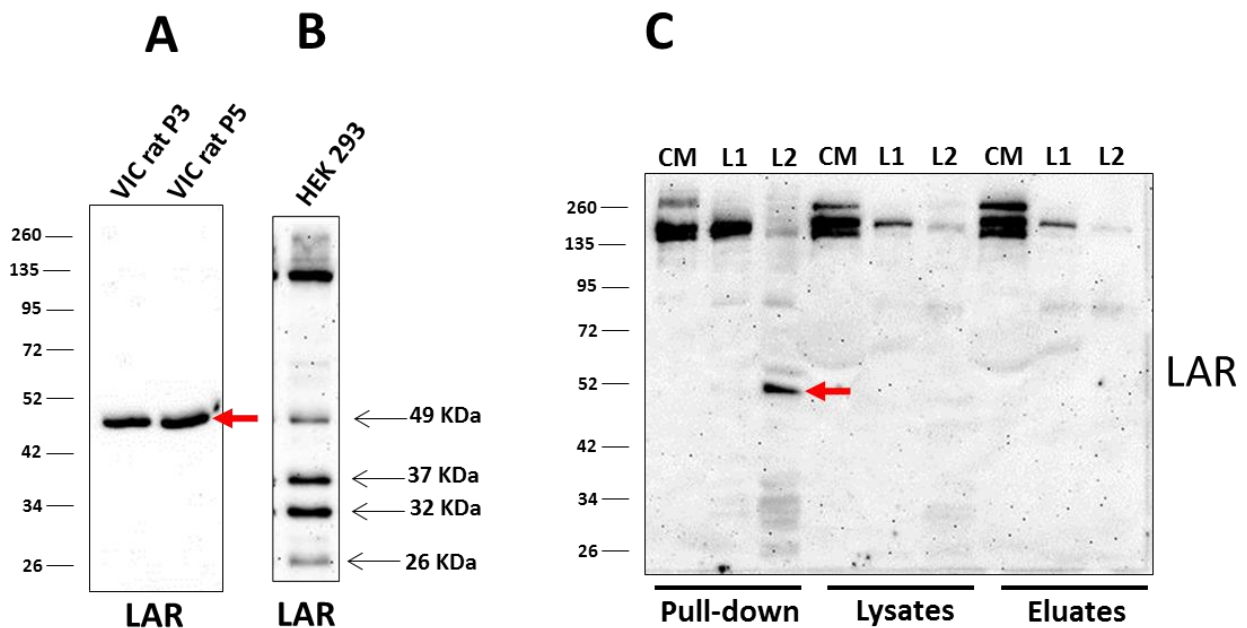
**Figure 54 : Interaction de sPTPRF avec les HSPGs.**

Des HEK 293 ont été transfectées avec sPTPRF WT ou mutant I328M puis lysées et un pull-down a été réalisé avec des billes d'héparine-agarose sur A) le lysat des HEK 293 ou B) le milieu de culture des HEK 293. L'expression de la protéine dans les lysats et milieux de culture a été vérifiée. La flèche rouge indique la bande à 37 kDa qui est le PM attendu de sPTPRF.



## 2. Expression protéique de sPTPRF dans les VICs de rat

Afin de pouvoir étudier les effets de sPTPRF dans un modèle plus pertinent que les HEK 293, nous devons vérifier si sPTPRF était exprimé dans des cultures primaires de VICs de rat. Pour cela, l'anticorps anti-LAR a été utilisé sur des lysats de VICs de rat afin de vérifier si on pouvait y détecter une forme endogène de sPTPRF. La Figure 55A montre distinctement une bande détectée à 49 kDa (indiquée par une flèche rouge), visible également sur un lysat de HEK 293 révélé avec l'anticorps anti-LAR (Figure 55B). Afin de déterminer si cette bande pouvait correspondre à une forme de sPTPRF endogène, un pull-down avec des billes héparine-agarose a été réalisé sur des lysats de VICs et est présenté dans la Figure 55C. Le pull-down a été réalisé sur un lysat congelé et un lysat frais issus de deux cultures de VICs différentes ainsi que sur un milieu de culture. On peut voir qu'une seule bande à environ 49 kDa est détectée dans le pull-down sur le lysat frais de VICs (indiqué par une flèche rouge). Ces résultats suggèrent que sPTPRF peut être exprimée chez le rat, mais ne permettent cependant pas de mettre en évidence la nature de cette bande détectée à 49 kDa dans les lysats de VICs de rat. Les bandes de haut PM dans les milieux de culture peuvent faire partie de complexes protéiques mal dénaturés provenant du sérum ou des MEC.



**Figure 55 : Expression de sPTPRF et interaction avec les HSPGs dans les VICs de rat.**

A) Western Blot sur deux lysats (passages de cellules différents) de VICs de rat et révélation avec l'anticorps anti-LAR. B) Rappel du profil des bandes obtenues avec l'anticorps anti-LAR sur un lysat de HEK 293. C) Pull-down avec des billes héparine-agarose sur CM : milieu de culture de VICs ; L1 : lysat congelé de VICs ; L2 : lysat frais de VICs. Les lysats 1 et 2 proviennent de cultures primaires provenant de deux rats différents. Le milieu de culture provient des cellules correspondant au L2.

### 3. Résultat préliminaire : effet de sPTPRF sur la signalisation de l'EGF

Une étude a montré que le récepteur LAR régule plusieurs voies de signalisation dont la voie de l'EGF notamment en inhibant la phosphorylation de p130Cas, une molécule de signalisation de la voie des intégrines, et en diminuant sa liaison avec la protéine adaptatrice GRB2 (Wang et al., 2000). Nous avons voulu tester si la voie de signalisation Ras, impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire, pouvait être modifiée par la surexpression de sPTPRF, et lors des expériences de séparation des fractions cytoplasmique et membranaire, les protéines ERK et phospho-ERK qui sont les effecteurs de la voie Ras ont été révélées. La Figure 56 montre que curieusement, la forme phosphorylée de ERK est très majoritairement située à la membrane plasmique. En revanche, aucune différence majeure d'expression de ERK et phospho-ERK entre la condition pcDNA3 et la condition transfectée avec sPTPRF n'est observable. L'expression de ERK en présence de sPTPRF devra être vérifiée en cas d'activation de la voie avec de l'EGF.

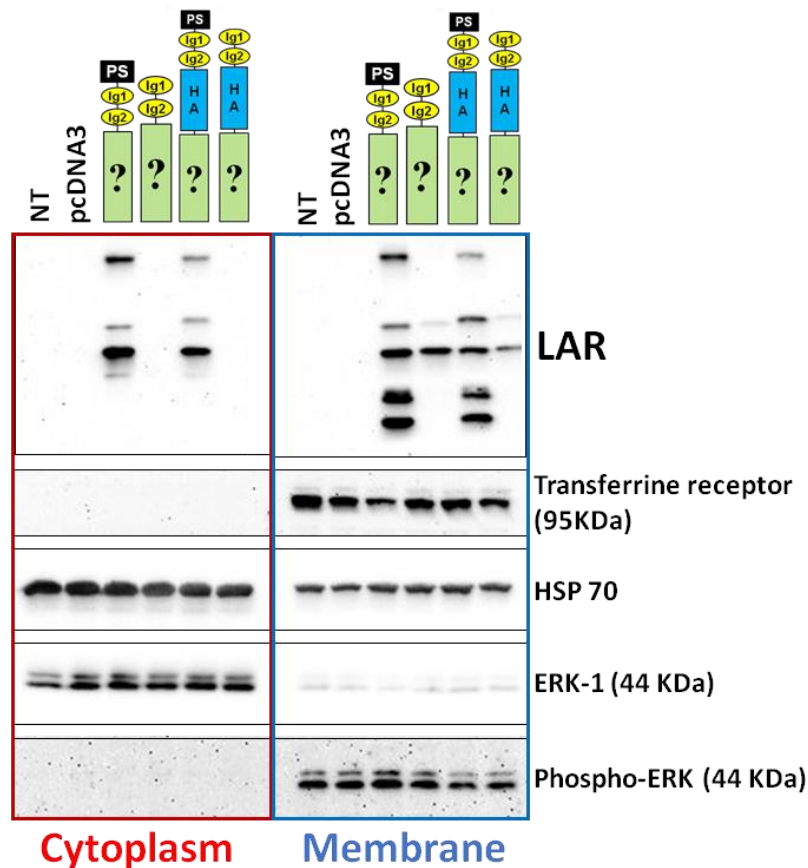


Figure 56 : Effet de sPTPRF sur l'expression de ERK et phospho-ERK.

Des HEK 293 ont été transfectées avec sPTPRF tagué et non tagué HA avec ou sans peptide signal. Les cellules ont été lysées puis fractionnées, et l'expression de ERK et phospho-ERK a été révélé par Western Blot. La qualité des fractions respectivement cytoplasmique et membranaire a été vérifiée grâce à l'expression de HSP70 et du récepteur à la transferrine.

#### 4. Résultat préliminaire : effet de sPTPRF sur la signalisation de Wnt

Puisqu'il a été montré que le fragment intracellulaire de LAR (après son clivage par la  $\gamma$ -sécrétase) pouvait rejoindre le noyau cellulaire et réprimer la transcription de la cycline D1 (Haapasalo et al., 2007), nous avons voulu vérifier si sPTPRF avait un effet sur des cibles de la voie Wnt. Pour cela, une extraction d'ARNm a été réalisée sur des VICs de rat transfectées avec pcDNA3 (contrôle), sPTPRF WT et I328M, puis une analyse de la transcription des gènes Cycline D1,  $\beta$ -caténine, TCF-7 et Axine-2 a été réalisée sur ces échantillons. La Figure 57 montre que sPTPRF WT ainsi que le mutant I328M n'induisent pas de modification significative du niveau de transcription de ces gènes cibles (N=1). Ce résultat devra être confirmé par la suite.

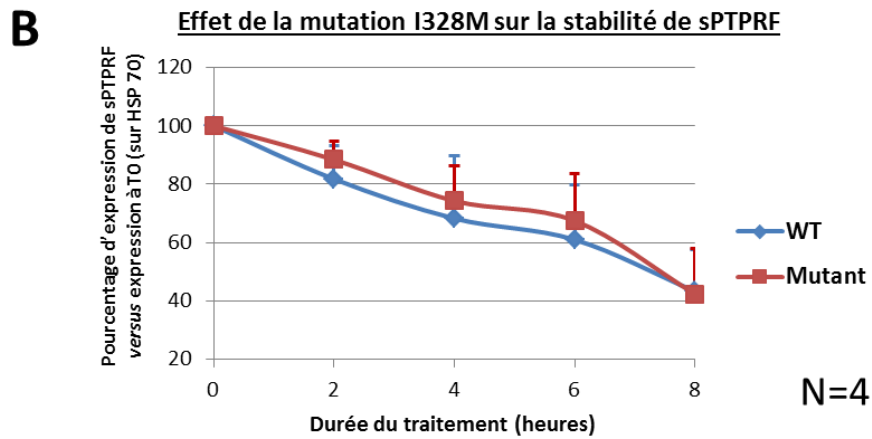
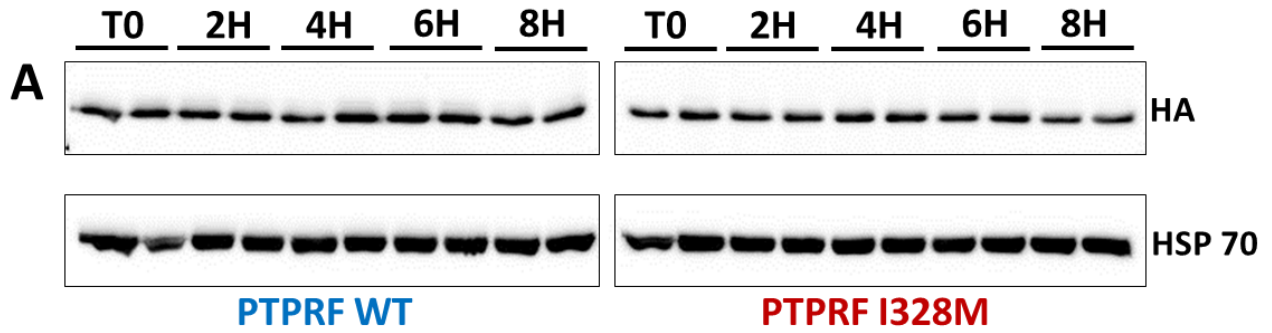
	Cycline D1	$\beta$ -caténine	TCF-7	Axine 2
pcDNA3	1,00	1,00	1,00	1,00
PTPRF WT	0,95	0,91	0,82	0,69
PTPRF I328M	0,94	0,87	0,78	0,83

**Figure 57 : Effet de sPTPRF sur des cibles de la voie Wnt.**

Des VICs de rat ont été transfectées avec pcDNA3 (contrôle), PTPRF WT et I328M, puis une extraction de l'ARNm et une rétrotranscription en ADNc a été réalisée. Une qPCR a permis de déterminer le niveau de transcription des gènes Cycline D1,  $\beta$ -caténine, TCF-7 et Axine-2 entre chaque condition. Ce tableau présente les valeurs de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (rapporté sur celui du pcDNA3 pour chaque gène), et n'est le résultat que d'une seule expérience.

#### 5. Effet de la mutation p.I328M sur la stabilité de la protéine

La mutation p.I328M ne semble pas modifier l'expression de sPTPRF (voir Figure 54), néanmoins son effet sur la stabilité de la protéine a été vérifié. Pour cela, des HEK 293 ont été transfectées avec sPTPRF tagué HA WT ou I328M et traitées avec du cycloheximide, qui permet de bloquer la néo-synthèse des protéines, pendant 2, 4, 6 ou 8 heures puis lysées, et l'expression de sPTPRF a été vérifiée par Western Blot. La Figure 58, qui montre le résultat d'un Western Blot (A) et la synthèse de 4 expériences distinctes (B), suggère que la mutation p.I328M ne modifie pas significativement la stabilité de sPTPRF.



**Figure 58 : Effet de la mutation p.I328M sur la stabilité de sPTPRF.**

Des HEK 293 ont été transfectées avec sPTPRF-HA WT ou I328M, traitées 48H après avec du cycloheximide (de 0 à 8H) puis lysées et l'expression de la protéine a été vérifiée en Western Blot (A). L'expérience a été réalisée en duplicat pour chaque temps de traitement et l'expression de sPTPRF a été normalisée sur celle de la protéine HSP 70. Le graphique représente la synthèse de 4 expériences (B).

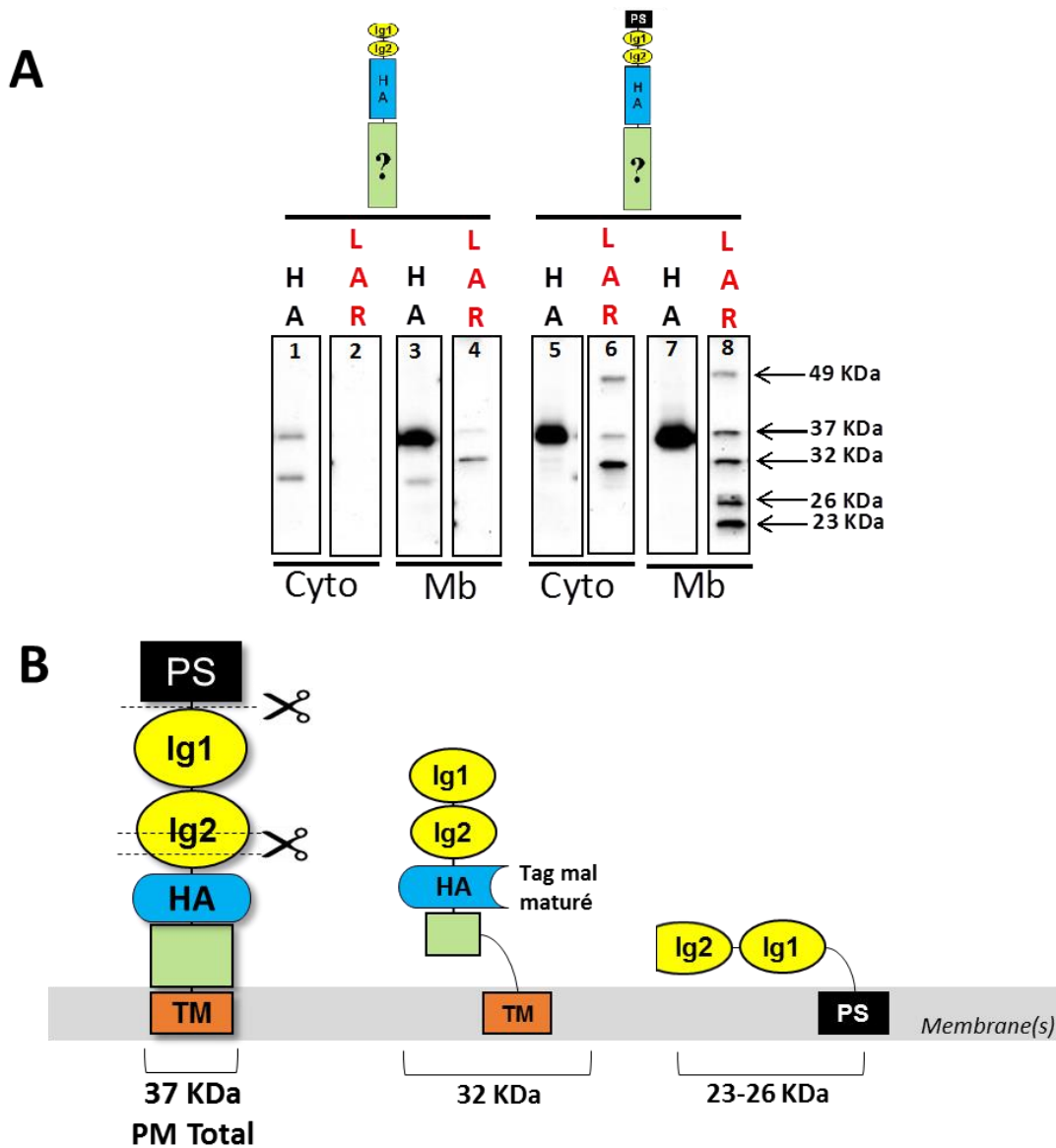
## ***Discussion Projet 2 – Étude de l'implication du gène PTPRF dans le PVM***

### **I. Problèmes liés au développement des outils moléculaires**

La création des formes taguées de sPTPRF a été fastidieuse puisque les tags MYC en N-terminal et HA en C-terminal ont provoqué des problèmes de détection de la protéine. Seule la protéine taguée HA en position 231 (juste après le domaine Ig2) ne semble pas voir sa localisation ou son expression modifiées par rapport à la protéine non taguée. sPTPRF semble subir une maturation particulière comme l'atteste les nombreuses bandes détectées en Western Blot, tout comme le récepteur LAR. En effet, LAR est clivé par la Furine en un fragment extracellulaire de 150 kDa (sous-unité E) et un fragment intracellulaire de 85 kDa (sous-unité P) liés de façon non covalente. Un 2<sup>ème</sup> et un 3<sup>ème</sup> clivages respectivement par une  $\alpha$ -sécrétase et une  $\gamma$ -sécrétase libèrent ensuite les fragments extra- et intracellulaires (Haapasalo et al., 2007).

La Figure 59A récapitule le profil des bandes détectées par l'anticorps anti-LAR et anti-HA dans les fractions cytoplasmiques et membranaires isolées à partir de HEK 293 transfectées avec sPTPRF-HA avec ou sans peptide signal. Le profil membranaire de sPTPRF détecté avec l'anticorps anti-LAR montre au moins 5 bandes à 49, 37, 32, 26 et 23 kDa (piste 8). La bande à 49 kDa pourrait correspondre à une modification post-traductionnelle de sPTPRF, dont la nature n'a pas été établie. Des essais de digestion des lysats protéiques avec la N-glycosidase F (Roche) n'ont pas montré de modification de la bande à 49 kDa. Cette modification pourrait également correspondre à une sumoylation (shift de 12 kDa). Les bandes à 23 et 26 kDa sont probablement des produits de clivage de la protéine dans le domaine Ig2 (avant le tag puisqu'elles ne sont pas reconnues par l'anti-HA) et qui restent accrochés à la membrane, peut-être *via* le PS (Figure 59B). La bande à 32 kDa reste la plus difficile à interpréter puisqu'elle n'est pas détectée par le tag HA. Or il est curieux qu'elle soit à un si haut PM puisqu'un clivage avant ou après le tag induirait une bande de plus petit PM. Il semblerait plutôt pour une raison inconnue (peut-être à cause du clivage du PS) qu'elle soit le résultat d'un défaut de maturation du tag.

Dans mon modèle expérimental, j'ai montré que le PS est indispensable à l'expression efficace de la protéine (pistes 1 à 4). Curieusement, une précédente étude utilisant un modèle de réexpression cellulaire pour étudier le rôle du récepteur LAR utilise un plasmide avec une délétion des 28 premiers acides aminés correspondant au peptide signal (Ko et al., 2015). Cette manipulation n'est jamais expliquée dans la discussion bien que le peptide signal, destiné à être inséré dans la membrane du RE et composé majoritairement d'acides aminés hydrophobes, est connu pour affecter l'adressage d'une protéine à un compartiment cellulaire, son insertion dans la membrane ainsi que son clivage (Hegde et Bernstein, 2006).



**Figure 59 : Hypothèse pour la maturation de sPTPRF.**

A) Récapitulatif du profil des bandes pour sPTPRF tagué HA en 231 avec ou sans peptide signal retrouvé dans les fractions cytoplasmiques et membranaires isolées à partir de HEK 293. B) Mécanisme proposé pour expliquer le profil des bandes obtenus. Au moins 3 sites de clivage en N-terminal de la protéine induisent les bandes à 32, 26 et 23 kDa visibles sur un gel d'acrylamide.

Les expériences de fractionnement par Western Blot et d'immunofluorescence suggèrent que la forme totale de sPTPRF ( $\approx 37$  kDa) est exprimée à la fois dans le cytoplasme et dans la membrane. L'expression de sPTPRF à la membrane plasmique suggère sa fonction de récepteur, cependant aucun domaine tyrosine-phosphatase n'est prédit dans sa structure.

## II. Hypothèses physiopathologiques du rôle de PTPRF dans la signalisation du développement des valves

A présent que l'expression de sPTPRF a été caractérisée et que les outils moléculaires ont été mis en place, de nombreuses hypothèses sont à tester. En effet, l'isoforme longue de PTPRF, LAR, intervient dans de nombreuses voies de signalisation en lien direct avec le développement et l'homéostasie des valves :

1) Nous avons vérifié que sPTPRF, comme LAR, pouvait interagir avec les HSPGs. Ces molécules qui sont des polysaccharides associés à des protéines sont présents à la surface des cellules et dans les MEC, et sont indispensables à de nombreuses voies de signalisation. En effet, des mutants chez la drosophile pour les enzymes responsables de la biosynthèse des chaînes d'héparane sulfate ou pour les protéines associées à ces chaînes montrent des défauts dans les voies de signalisation Wnt, TGF- $\beta$  et FGF (Lin, 2004; Perrimon et Bernfield, 2000), qui sont impliquées dans le développement des valves (voir introduction partie I.3). Les résultats préliminaires indiquent que sPTPRF n'induit pas l'expression de cibles de la voie Wnt telles que l'Axine, la Cycline D1, TCF-7 et la  $\beta$ -caténine en condition basale, l'expérience devra ainsi être reproduite en condition stimulée avec Wnt3a ou du LiCl. L'effet direct des HSPGs dans la valvulogénèse a été mis en évidence car ils interagissent avec les HB-EGF, des facteurs de croissance qui activent directement les récepteurs EGFR/ErbB1 et ErbB4 et qui sont exprimés par l'endocarde lors du remodelage des valves (Iwamoto et al., 2003). Un modèle de souris surexprimant un HB-EGF muté pour le site de liaison aux HSPGs présente une hypertrophie des valves et une hyperprolifération des cellules mésenchymateuses. Ces données suggèrent que l'interaction entre les HSPGs et les HB-EGF dans la valve en formation est indispensable pour l'inhibition de la prolifération des cellules lors des étapes de maturation (Iwamoto et al., 2010). De par son interaction avec les HSPGs, il est possible d'envisager un rôle de sPTPRF dans la signalisation des HB-EGF. En revanche, la mutation

p.I328M ne modifie pas l'interaction avec les HSPGs dans nos conditions d'expérimentation, et ce résultat devra être confirmé en cas de stimulation des cellules avec de l'HB-EGF.

2) Le rôle de sPTPRF dans les processus de migration, d'adhésion et de prolifération cellulaires, nécessaires à l'EMT et au remodelage des valves, devra également être étudié. En effet, LAR diminue la migration cellulaire (Müller et al., 1999), participe aux jonctions adhérentes (Weng et al., 1999) et interagit avec Trio, une GEF de Rho et Rac (Debant et al., 1996). L'effet de sPTPRF ainsi que de la mutation p.I328M sur la régulation du cytosquelette d'actine devra être déterminé, et quelques pistes sont à envisager. Par exemple, LAR inhibe la phosphorylation de FRS2, un effecteur intracellulaire requis pour l'activation des voies Ras/MAPK et PI3K/Akt (Wang et al., 2000) et impliqué dans le développement des valves (Zhang et al., 2008). De plus, LAR interagit avec Trio, une GEF de RhoA et Rac, et plusieurs études montrent l'importance de ces petites GTPases dans la physiopathologie de la valve mitrale (Duval et al., 2014; Gould et al., 2016).

3) Le rôle de sPTPRF sur l'activité de LAR devra également être investigué. En effet, deux récepteurs RPTP $\alpha$  peuvent se dimériser et auto-inhiber leur activité catalytique (Jiang et al., 1999; Majeti et al., 1998). L'interaction entre sPTPRF et LAR a été testée par immunoprécipitation mais n'a pas été concluante, l'expression endogène de LAR dans les HEK 293 n'est peut-être pas suffisante. D'autres alternatives sont possibles et devront être testées aussi (immunoprécipitation de LAR et révélation de sPTPRF-HA, surexpression de LAR et sPTPRF-HA, *etc.*). L'effet de sPTPRF et de la mutation p.I328M sur l'activité tyrosine-phosphatase de LAR devra être testé.

sPTPRF est vraisemblablement exprimé dans les valves cardiaques adultes, mais contrairement à *LRRFIP1*, nous n'avons pas de données sur l'expression de *PTPRF* à des stades précoces de l'embryogénèse. On peut supposer que sPTPRF, via son interaction avec les HSPGs et la modulation de l'état du cytosquelette d'actine, puisse jouer un rôle dans l'EMT et dans la régulation de la prolifération des cellules mésenchymateuses lors de la maturation des valves. Cette fonction pourrait être perturbée par la mutation p.I328M. En effet, les patients de la famille dans laquelle a été détectée la mutation dans le gène *PTPRF* présentent des feuillets de la valve mitrale plus épais et plus long (PVM de type Barlow). Il est possible qu'un effet perte de fonction de la mutation p.I328M puisse mener à une augmentation de la



migration/prolifération cellulaire lors de l'EMT et/ou du remodelage avec pour conséquence un épaissement des feuillets de la valve mitrale.

### III. Modèles d'étude

Les premières expériences de biochimie (transfection des plasmides, expression et localisation de sPTPRF) ont été réalisées dans une lignée de HEK 293. L'utilisation d'un modèle cellulaire plus pertinent vis à vis de la physiopathologie des valves est à présent indispensable afin de tester les différentes hypothèses énoncées précédemment (rôle de sPTPRF sur l'activation Wnt, prolifération, migration et adhésion cellulaires). La surexpression de sPTPRF tagué HA dans des VICs de rat est une option mais comporte plusieurs désavantages tels que le taux de transfection parfois faible et la mortalité cellulaire induite par la transfection. Malheureusement, si la forme longue de *PTPRF*, LAR, est bien exprimée chez la souris et le rat, aucune isoforme pouvant correspondre à la forme courte de *PTPRF* n'est prédite chez ces modèles. Ce point rend impossible les études d'extinction de l'expression de sPTPRF (siRNA) ou le développement d'un modèle murin de knock-out pour sPTPRF. Pourtant, une protéine est clairement détectée à  $\approx 49$  kDa dans un lysat de VICs de rat révélé avec l'anticorps anti-LAR. Sa nature devra être établie par un séquençage et une analyse en Spectrométrie de Masse.



# DISCUSSION GÉNÉRALE -

Les pathologies cardiovasculaires sont la cause de mortalité majeure dans les pays développés. Le Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM) affecte 2,5 % de la population générale et, s'il est souvent asymptomatique, peut également être associé dans les cas les plus sévères à des insuffisances et arrêts cardiaques, des arythmies, des endocardites voire au décès des patients. Si cette pathologie a longtemps été uniquement perçue comme une maladie dégénérative liée au vieillissement des patients ou la conséquence de mauvaises habitudes comportementales (tabagisme, sédentarité, alimentation trop riche en lipides/glucides, *etc.*), la découverte de formes congénitales de PVM change la donne sur la compréhension des causes du PVM. La mécanistique du développement du PVM est mal comprise rendant inexistants les traitements médicamenteux qui pourraient retarder la chirurgie. Le but est ici non seulement d'identifier des voies de signalisation et les potentielles cibles afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du PVM mais également de faciliter le dépistage et d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

L'identification de facteurs génétiques responsables du développement de PVM est devenue nécessaire, et ceci est maintenant réalisable grâce à 1) L'amélioration des techniques d'imagerie médicale permettant de dépister plus facilement des familles entières atteintes par des formes non syndromiques de PVM 2) Le développement de stratégies d'identification des variants rares telles que des études d'association de type génome entier (GWAS) sur des cas isolés, des analyses de liaison couplées à du séquençage d'exome haut débit (technologies Illumina™, Haloplex™) sur des cas familiaux ou l'analyse du transcriptome par RNA-seq.

Cependant, peu de gènes ont été identifiés comme responsables d'une forme familiale non syndromique de PVM : le gène *FLNA* en 2007 et plus récemment le gène *DCHS1* en 2015 (Durst et al., 2015; Kyndt et al., 2007). Depuis, plusieurs gènes candidats ont été identifiés comme *LMCD1* et *TNSI*, respectivement impliqués dans la régulation de la transcription génique et dans l'organisation du cytosquelette d'actine, grâce à une GWAS sur une grande cohorte de patients (Dina et al., 2015b). Plusieurs mutations retrouvées dans des familles atteintes de PVM ont également permis d'identifier des gènes potentiellement causaux. Parmi ceux-là, *LRRFIP1* et *PTPRF* ont fait l'objet d'étude de ma thèse. Ces gènes sont tous les deux impliqués dans des voies de signalisation en lien avec le développement et l'homéostasie des valves : la voie Wnt canonique et les voies de réponse au stress mécanique. Récemment au laboratoire, une analyse génétique sur une cohorte de 273 patients atteints de PVM recrutés par les centres hospitaliers de Nantes, Rennes et Angers a permis de détecter

plusieurs variants rares dans des gènes qui, de façon intéressante, appartiennent à l'une ou l'autre de ces voies de signalisation :

- 1) Pour les voies de signalisation impliquées dans la régulation transcriptionnelle des gènes (Wnt, TGF- $\beta$ ), plusieurs variants ont été détectés dans le gène *APC*, qui code pour une protéine de dégradation de la  $\beta$ -caténine, et dans le gène *USP15* qui code pour une déubiquitineuse et participe à la stabilisation des protéines Smad de la voie du TGF- $\beta$  (Inui et al., 2011). Des tests statistiques d'enrichissement en variants rares (Burden Test) utilisés afin de comparer la proportion de patients atteints de PVM (273 patient de la cohorte) et d'individus contrôles (881) ont également permis de détecter plusieurs gènes impliqués dans la voie de signalisation Wnt canonique tels que *USP9X* et *GLIS1* (Vadnais et al., 2014) comme potentiellement associés au PVM.
- 2) Les gènes *FLNA* et *ARHGAP24* qui ont déjà été impliqués dans le développement du PVM interviennent dans le remodelage du cytosquelette d'actine et en particulier dans la régulation de l'activité des protéines RhoA et Rac. Plus récemment, des variants dans le gène *DOCK1* ont été retrouvés dans la cohorte de 273 patients atteints de PVM. Ce gène code pour la protéine Dock180 qui catalyse les échanges de GDP en GTP en activant spécifiquement Rac1 (Brugnera et al., 2002).

Des études fonctionnelles devront être réalisées afin de vérifier l'implication de ces nouveaux gènes candidats (*APC*, *USP15*, *USP9X*, *GLIS1*, *DOCK1*, etc.) dans le PVM.

Mon travail de thèse a consisté à étudier l'effet du variant Arg94Gly dans le gène *LRRFIP1* détecté chez une famille atteinte de PVM, mais n'a malheureusement pas permis de démontrer un effet physiopathologique de cette mutation dans les modèles expérimentaux que j'ai développés.

Un second projet a consisté à développer les outils moléculaires nécessaires à l'étude du variant Ile328Met dans le gène *PTPRF* retrouvé dans une autre famille atteinte de PVM. L'expression et la localisation tissulaire/cellulaire de l'isoforme courte de *PTPRF* ciblée par la mutation, sPTPRF, ont été caractérisées, et des études fonctionnelles devront être réalisées afin de vérifier son implication dans le PVM.

La difficulté de déterminer des gènes majeurs dans les formes non syndromiques de PVM provient du fait que 1) la plupart de ces PVM sont asymptomatiques, rendant difficile le dépistage des patients 2) il est important de prendre en compte le caractère polygénique de la pathologie. En effet, l'hypothèse de variants génétiques fréquents qui pourraient induire la maladie rend l'étude des susceptibilités au PVM encore plus complexe.

Le choix des modèles animaux transgéniques est également crucial pour l'étude du PVM. En effet, le développement des valves est un processus très finement régulé dans le temps par de nombreuses voies de signalisation. Les gènes susceptibles d'être associés au PVM soit 1) sont impliqués dans l'homéostasie des valves (réponse au stress mécanique) ou 2) sont impliqués très tôt lors du développement et leur(s) fonction(s) sont probablement régulées (par) ou régulent d'autres voies de signalisation, comme c'est peut-être le cas pour *LRRFIP1*. Le knock-out chez le rongeur, qui consiste à supprimer l'expression de la protéine, est un modèle assez « grossier » qui ne permet non seulement pas de déterminer de façon subtile l'effet de la protéine au cours du développement, mais qui abolit tous les éventuels « cross-talks » dans lesquels la protéine peut être impliquée. Le KO de la *FLNA* chez la souris est d'ailleurs létal.

Pour ce type d'étude, l'approche de knock-in conditionnel (c'est-à-dire l'expression de la forme mutée de la protéine à un moment donné du développement embryonnaire) semble être le modèle le plus adapté pour appréhender au mieux les effets des mutations au cours du développement.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES -

## I. Culture Cellulaire

### 1. Les cellules HEK 293

Les cellules humaines embryonnaires de rein (HEK 293) poussent à 37°C dans un milieu DMEM complet High Glucose Pyruvate auquel est ajouté 10% de sérum de veau fœtal inactivé, 1% de L-glutamine et 1% d'un mélange d'antibiotiques pénicilline et streptomycine (P/S). Les cellules sont repiquées deux fois par semaine lorsqu'elles sont à confluence. Elles sont rincées avec du PBS puis décollées à l'aide de la Trypsine à 37°C. Elles sont ensuite centrifugées à 500g, resuspendues dans du milieu et réensemencées dans une boîte de culture à la densité voulue.

### 2. Les cultures primaires de VICs de rat

Les VICs ont été isolées à partir des valves mitrales de rats mâles Sprague-Dawley (SPD) âgés de 7 semaines. Les animaux sont endormis par inhalation d'un gaz anesthésique, l'isoflurane 5%. Une injection intra-péritonéale d'héparine est ensuite pratiquée. Après le sacrifice des animaux par dislocation vertébrale, le cœur est prélevé par thoracotomie et disséqué sous loupe binoculaire dans une solution de PBS 1% P/S. L'apex est sectionné, une incision au niveau du septum interventriculaire est réalisée en remontant jusqu'à l'aorte. Une fois la valve mitrale visible, les cordages tendineux sont sectionnés et le feuillet valvulaire antérieur est découpé le long de l'anneau mitral. L'opération est répétée pour le feuillet postérieur. Les feuillets valvulaires sont conservés à 4°C en PBS 1% P/S avant l'isolement.

Les valves sont ensuite rincées dans du PBS 1% P/S puis incubées à 37°C toute la nuit dans une solution de DMEM 1% P/S contenant de la Collagénase de type II (200 U/mL). Le lendemain, 3 cycles de centrifugation/lavage sont pratiqués. Lors du dernier cycle, le culot obtenu est repris dans 4 mL de DMEM complet et ensemencé dans un puits de 9,6 cm<sup>2</sup>. 24h plus tard, le milieu est changé pour éliminer les débris cellulaires, cellules non adhérentes et fragments de tissu valvulaire non dissociés. Les cellules obtenues sont ensuite observées régulièrement pour contrôler leur morphologie ainsi que leur croissance/prolifération. Les cellules sont cultivées en DMEM complet.



## II. Transfection et traitements cellulaires

### 1. Transfection des lignées

Les cellules sontensemencées à 60-70% de confluence (environ 500 000 pour des HEK293 et 250 000 pour des MRC5 par puits de 35 mm de diamètre). Pour les expériences de biochimie (Western Blot, immunoprécipitation), les cellules ont été transfectées avec 3  $\mu$ L de *Lipoféctamine* (Invitrogene) complexés à 3  $\mu$ g d'ADN plasmidique par puits de 35mm de diamètre. Après 30 min de complexation dans 500  $\mu$ L de milieu Opti-MEM (Gibco) à température ambiante, le milieu des cellules est retiré et le mélange de transfection déposé sur les cellules et complété avec 250  $\mu$ L de milieu Opti-MEM. Après 7h d'incubation à 37°C, 2 mL de milieu complet est ajouté dans les puits. Les cellules sont utilisables 24h à 48h après la transfection.

Pour les expériences de biologie cellulaire (TOP Flash, immunofluorescence), un transfectant moins toxique que la lipofectamine a été utilisé. Les cellules ont été transfectées avec 8  $\mu$ L de *GeneCellin* (BioCellChallenge) pour 2  $\mu$ g d'ADN par puits de 35mm. Les complexes sont formés pendant 15 min dans de l'Opti-MEM puis déposés sur les cellules au goutte-à-goutte. Les cellules sont utilisables 24h à 48h après la transfection.

Les siRNA (100 pmoles/puits de 35 mm de diamètre) sont transfectés de la même façon avec 8  $\mu$ L de *RiboCellin* (BioCellChallenge) et les cellules sont utilisables 48h après.

### 2. Transfection des cultures primaires (VICs)

Les transfectants classiques (lipides cationiques) ne sont malheureusement pas efficaces pour transfecter les cultures primaires. Le kit de nucléofection *Amaxa 4D* (Lonza) a été utilisé. 500 000 cellules préalablement isolées (par puits de 35 mm) sont resuspendues dans 20  $\mu$ L de solution P3 du kit, puis 0,5  $\mu$ g de plasmide est ajouté. Le mélange de transfection est déposé dans le puit de barrette du kit et transfecté avec l'appareil Amaxa 4D en utilisant le programme EO-114. Le mélange de transfection est laissé 5 min à température ambiante (augmente le taux de transfection de 5 à 10%) et est repris dans du milieu complet puisensemencé dans un puits 35 mm.

### 3. Traitements chimiques utilisés

Le tableau ci-dessous répertorie les différents traitements cellulaires utilisés :

Nom	Utilisation	Référence	Fournisseur	Concentration
Fibronectine	"coating"	FC010	Millipore	20 µg/mL
Lipofectamine 2000	transfection	11668019	ThermoFisher	
GeneCellin	transfection	GC1000	BioCell Challenge	
Solution P3	transfection	V4XP-3032	Lonza	
Chlorure de lithium	activation Wnt	105679	Merck	10 mM
Wnt3a	activation Wnt	Surnageant de cellules Wnt3a		
TGF-β1	activation TGF-β	130-095- 067	Miltenyi Biotec	2 ng/mL
Alcaline phosphatase (CIP)	déphosphorylation	M0290L	Biolabs	1 U/µL de lysat
Cycloheximide	Inhibition synthèse protéique	C7698	Sigma	100 µg/mL
siRNA Contrôle	extinction protéique	SR-CL000- 005	Eurogentec	100 pmoles/puits (35mm)
siRNA anti-CTNNB1	extinction protéique	AM51331	Ambion	100 pmoles/puits (35mm)
siRNA anti-USP9X	extinction protéique	E-006099- 00	Dharmacon	100 pmoles/puits (35mm)
siRNA anti-LRRFip1- iso1	extinction protéique	5338692	Eurogentec	100 pmoles/puits (35mm)
siRNA anti-LRRFip1- iso1-2-3-4-5 (total)	extinction protéique	5064156	Eurogentec	100 pmoles/puits (35mm)

**Tableau 5 : Liste des traitements chimiques utilisés.**

## 4. Anticorps utilisés

Nom	Référence	Fournisseur	Western Blot	Immunomarquage
HA	11867423001	Roche	1/2000 <sup>ème</sup>	
MYC	05-724	Millipore	1/1000 <sup>ème</sup>	1/1500 <sup>ème</sup>
$\beta$ -caténine active	8814S	Cell Signaling	1/500 <sup>ème</sup>	1/400 <sup>ème</sup>
$\beta$ -caténine totale	C2206	Sigma	1/3000 <sup>ème</sup>	
USP9X	Ab99343	Abcam	1/500 <sup>ème</sup>	
GAPDH	sc-32233	Santa Cruz	1/10 000 <sup>ème</sup>	
ERK-1	sc-93	Santa Cruz	1/500 <sup>ème</sup>	
Phospho-ERK	9106S	Cell Signaling	1/500 <sup>ème</sup>	
GCF2	612160	BD Biosciences	1/500 <sup>ème</sup>	
Dishevelled-1	sc-8025	Santa Cruz	1/500 <sup>ème</sup>	
Flightless-1	sc-21716	Santa Cruz	1/500 <sup>ème</sup>	
Lamin A/C	sc-20681	Santa Cruz	1/1000 <sup>ème</sup>	
P300	sc-584	Santa Cruz	1/500 <sup>ème</sup>	
Ig souris (ctrl)	sc-2025	Santa Cruz		
TCF-4	05-511	Millipore	1/200 <sup>ème</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>
HA-ChIP	ab9110	Abcam		
LAR	610351	BD Biosciences	1/500 <sup>ème</sup>	
HA (billes)	88836	ThermoFisher		
Alexa Fluor® 488 anti-mouse	A11001	ThermoFisher (Invitrogen)		1/1000 <sup>ème</sup>
Alexa Fluor® 568 anti-rabbit	A11011	ThermoFisher (Invitrogen)		1/1000 <sup>ème</sup>

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés.

### III. Techniques de Biologie Moléculaire

#### 1. Obtention des plasmides

Les séquences codant pour toutes les isoformes de LRRFip1 et pour sPTPRF dans un vecteur pUC57 ont été commandées (GeneScript) puis sous-clonées dans un vecteur d'expression eucaryote pcDNA3. Les tags HA et/ou MYC ont été introduits par mutagenèse dirigée.

#### 2. Mutagenèse dirigée

La technique de mutagenèse dirigée a permis de réaliser des délétions ou substitutions ponctuelles de nucléotides dans les plasmides. Les mutations ont été introduites par PCR grâce au kit *Q5® site-directed mutagenesis* (Biolabs). Le produit de PCR a été transformé dans 50 µL de bactéries compétentes *NEB® 5-alpha Competent E. coli* par un choc thermique à 42°C, puis les bactéries ont été reprises dans 250 µL de milieu SOC. Le mélange de transformation a été incubé à 37°C sous agitation pendant 1h pour permettre l'expression du gène de résistance à l'ampicilline présent dans le plasmide, puis a été étalé sur des boîtes d'agarose à 100 µg/mL d'ampicilline. Les clones formés sur la boîte après une nuit d'incubation à 37°C dans une étuve sont alors cultivés dans 5 mL de LB supplémenté par de l'ampicilline à 100 µg/mL une nuit sous agitation à 37°C. Les bactéries ont été culottées par centrifugation puis une extraction d'ADN a été réalisée grâce au kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey Nagel). La séquence d'ADN a été vérifiée par séquençage capillaire.

#### 3. PCR

Les PCR ont permis de détecter l'expression tissulaire de *LRRFIP1* et *PTPRF* dans plusieurs ADNc de tissus humains issus du kit *Human MTC™ Panel I* (Clontech). Elles ont été réalisées avec 10 ng d'ADNc et un mix provenant du kit *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen) composé des primers forward et reverse à 0,5 µM final (voir Tableau 7), du Buffer 10X, des dNTPs à 0,2 mM, du MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM, et 1 U de Taq Polymérase. Les cycles ont été lancés par l'appareil *Thermocycleur 9700* (HTDS) dans les conditions spécifiées dans le Tableau 8.

Gène amplifié	Forward	Reverse
LRRFip1-iso1	CGTAAGGAGTGAACGGGATG	GTCTGTCCCGTTTTCCAAGA
LRRFip1-iso2	GGGAGATCGACTGTTTGAGC	CCGTTTCATCAACCAGCTTTT
LRRFip1-iso3	AGATTCAGGATGTAGAAGGCAAA	TCACCAGCAGGGAATACCTC
LRRFip1-iso4	GCAGCAGAAGGAGGAAGACA	AGTCCTTGATTTCCCTGATGG
LRRFip1-iso5	GGCAGCAGAAGGAGGTAGAA	CCACTTCACTGGCTCTTCCTA
Long-PTPRF	ATGGGCAGTCAAGGACAATC	TCTGCACCATGGCAGGAC
Short-PTPRF	GCTGCGTTCAGGTGCCTTGC	TGCACACACACATGCACATA
GAPDH	TTCATTGACCTCAACTACATGGT	CTCAGTGTAGCCCAGGATGCCCTT

**Tableau 7 : Séquences des primers utilisés pour les PCR d'expression de LRRFIP1 et PTPRF.**

Initialisation	94°C / 3min
Cycles TD 65-55°C (10X)	94°C / 30 sec
	<b>65&gt;55°C / 30 sec</b>
	72°C / 1 min
Cycles PCR 55°C (25X)	94°C / 30 sec
	55°C / 30 sec
	72°C / 1 min
Elongation finale	72°C / 10 min
Fin	4°C / ∞

**Tableau 8 : Conditions utilisées pour les PCR d'expression de LRRFIP1 et PTPRF.**

#### 4. PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR) a permis de mesurer le niveau de transcription des gènes cibles de la voie Wnt canonique. L'ARN a été extrait des VICs transfectées avec LRRFip1 ou PTPRF grâce au kit *NucleoSpin® RNA* (Macherey Nagel) et rétrotranscrits en ADNc grâce au kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Les qPCR ont été réalisées en duplicatas en plaque 384 puits avec 5 ng d'échantillon d'ADN et un mix composé des primers forward et reverse à 500 pM et de *Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems) dans un volume final de 15 µL par puits. Les cycles ont été lancés par l'appareil *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) dans les conditions spécifiées dans le Tableau 9, puis les données ont été analysées grâce au logiciel SDS 2.3.

Standard Thermal Cycling Conditions			
Initial Steps		PCR (Each of 40 cycles)	
AmpErase® UNG Activation	AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Activation	Melt	Anneal/Extend
HOLD	HOLD	CYCLE	
2 min @ 50 °C	10 min @ 95 °C	15 sec @ 95 °C	1 min @ 60 °C

**Tableau 9 : Conditions utilisées pour les qPCR sur les VICs.**

Le tableau ci-dessous répertorie les séquences des primers up et down utilisés pour les qPCR.

Gène amplifié	Forward	Reverse
Cycline D1	AGTTGCTGCAAATGGAAGT	TGGAGAGGAAGTGTTTCGATG
$\beta$ -caténine	ACACAACCTTTCCACCATCGAGA	TAGCAGGAGATTATGCAGCGTGGT
TCF-7	GCCAAATACTATGAACTTGCCC	TGCTTTTCCCTCTTCCTCTTC
Axine 2	CCTGGCTTCAGAAGATCACA	TCAGCATCCTCCTGTATGGA
SFRP2	ACACCTTGGGAGCTTCCT C	AGCAGCGACCACCTCCT GCC
Décorine	CGGTGGCAAATACCCGGATTA	AATGGTCCAGCCCAAGAGAC
CCN3 (Nov)	CAACAACGAGACTGGCATT	TCAAACCTTCTCTCCATTGCG
Smad 7	CTCCAGATACCCGATGGATT	GGTTTCATCGGAGGAAGGTA
HPRT	CTGATGACACAAACATGATTCAA	CCAGACAAGTTTGTTGTTGGA
TBP	ACCCACAACTCTTCATTC	GGGTCATAGGAGTCATTGGTG

**Tableau 10 : Séquences des primers utilisés pour les qPCR sur les VICs.**

## IV. Techniques de Biologie Cellulaire

### 1. Immunofluorescence

Les fibroblastes sont ensemencés à 60 000 cellules par puits (plaque 24 puits) sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre coatées avec de la fibronectine à 20 µg/mL puis transfectées avec la GeneCellin 24h après. Le jour suivant la transfection, les cellules sont fixées en paraformaldéhyde à 4% pendant 5 min puis perméabilisées avec de l'éthanol absolu pendant 30 min à température ambiante. Les lamelles de verre sont ensuite retirées des puits et déposées sur une chambre humide où elles sont incubées avec l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C puis avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante. Les anticorps sont dilués dans du PBS et de la BSA à 2%. Enfin, les cellules sont incubées avec du DAPI au 1/1000<sup>ème</sup> pendant 25 min à température ambiante, puis incluse en *Pro Long Gold* (ThermoFisher). Trois rinçages rapides en PBS (avec calcium et magnésium avant la fixation des cellules) sont effectués entre chaque étape d'incubation. Les lames sont observées 48h après la fixation avec un microscope à fluorescence (Zeiss).

### 2. Test d'activité de la Luciférase (TOP Flash)

Les HEK 293 sont ensemencées à 125 000 cellules par puits (plaque 24 puits) puis transfectées 24h après avec 0,5 µg final de plasmide = 0,25 µg de plasmide LRRFip1 + 0,25 µg de plasmide TOP Flash codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur comportant une répétition X8 des motifs de liaison pour les facteurs de transcription TCF/LEF. Les cellules sont lysées 48h après la transfection avec 100 µL de tampon *Passive Lysis Buffer 5X* (Promega) par puits. Les lysats sont vortexés pendant 5 sec pour terminer la lyse puis centrifugés à 11 000 g pendant 3 min. Le surnageant est prélevé dont 20 µL sont déposés dans une plaque 96 puits *Nunc™ MicroWell™* blanche auxquels sont ajoutés 50 µL de *Luciferase Assay Reagent* (Promega). La luminescence est mesurée grâce à l'appareil *Victor X3* (Perkin Elmer) et l'activation de la voie Wnt est alors proportionnelle au dosage de la luciférine.

## V. Techniques de Biochimie

### 1. Western Blot

Pour les expériences de Western blot, les cellules sont lysées à 4°C dans un milieu contenant 100 mM de NaCl, 50 mM de Tris HCl à pH 7,5, 50 mM de NaF, 1% de NP-40, un cocktail commercial d'inhibiteurs de protéases à 1X (Roche) et du PMSF à 1 mM final, puis centrifugées 10 min à 21 000 g à 4°C et le surnageant est récupéré. Un dosage protéique est réalisé avec le kit de détection *Pierce BCA Protein Assay* de Thermo Scientific. Les échantillons sont ensuite dénaturés 5 min à 95°C dans du Laemmli contenant 10% de SDS, 50% de glycérol, du Tris pH6,8 et une pointe de bleu de bromophénol auquel du dithiothréitol (DTT) à 10mM final est ajouté, séparés sur un gel d'électrophorèse puis transférés du gel sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est rincée dans de l'eau milliQ puis incubée avec du rouge ponceau afin de voir si la migration et le transfert se sont bien déroulés. Puis la membrane est saturée avec du TBS-T (Tris base 30 mM, NaCl 120 mM à pH 7,5 et Tween 20 à 0,1%) lait 5% et incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T lait toute la nuit à 4°C sous agitation. La membrane est ensuite rincée, incubée avec l'anticorps secondaire (couplé à l'enzyme Horseradish peroxydase, HRP) dilué au 1/10 000<sup>ème</sup> à température ambiante et sous agitation pendant 1h, et de nouveau rincée. Pour finir, on ajoute sur la membrane le substrat de la HRP qui va émettre de la lumière qui sera détectée grâce à la caméra de l'appareil *ImageQuant RT ECL* (GE Healthcare).

### 2. Isolement des fractions nucléaires

Les cellules sont lysées à 4°C dans un tampon composé de 50 mM de NaCl, 50 mM de Tris HCl à pH 7,5, 50 mM de NaF, un cocktail commercial d'inhibiteur de protéase à 1X (Roche) et du PMSF à 1 mM final. Le lysat est broyé à l'aide d'un potter dans la glace, puis est centrifugé à 2500 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant qui est la fraction cytoplasmique est récupéré. Le culot est lavé deux fois dans du tampon de lyse, puis centrifugé une dernière fois à 2500 g pendant 15 min à 4°C. Le culot est repris dans du tampon de lyse auquel est ajouté du NP 40 à 1% et du NaCl QSP 100 mM final. L'échantillon est soniqué pendant 3 min (10 cycles 10 sec pulse ; 10 sec pause). Les fractions sont aliquotées et congelées.



### 3. Isolement des fractions membranaires

Les cellules sont décollées à 4°C dans du PBS puis centrifugées à 500 g pendant 10 min à RT. Le culot cellulaire est lavé dans du PBS puis centrifugé à nouveau. Le culot est lysé dans un tampon composé de 20 mM de Tris HCl pH 7,4, 50 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de ED(G)TA et 1mM de DTT auquel est ajouté des antiprotéases et du PMSF. L'échantillon est soniqué sur glace pendant 1-2 min (5 sec pulse ; 10 sec pause), puis centrifugé à 5000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et ultracentrifugé à 80 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant qui est la fraction cytoplasmique est récupéré, et le culot membranaire est lavé deux fois dans le tampon de lyse puis ultracentrifugé à 80 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot est repris dans le tampon de lyse, puis cette suspension membranaire est passée 20 fois à travers une aiguille 25G à l'aide d'une seringue de 1 mL afin de former des vésicules. Les fractions sont aliquotées et congelées à -80°C.

### 4. Immunoprécipitation

Avant de réaliser l'immunoprécipitation, l'anticorps est « cross-linké » sur des billes magnétiques. L'ensemble du protocole est réalisé à température ambiante. 12,5 µL par condition de billes magnétiques *Dynabeads* (Invitrogene) sont rincées deux fois en PBS puis incubées avec 3 µg d'anticorps dans du PBS pendant 30 min sous agitation. Les billes sont rincées trois fois avec du PBS Tween-20 0,1% puis deux fois avec de la triéthanolamine 0,2 M à pH 8,2 et sont ensuite incubées avec du Diméthyle Pimélimidate (DMP) à 20 mM dilué dans de la triéthanolamine 0,2 M à pH 8,2 pendant 30 min sous agitation. Les billes sont incubées avec du Tris à 50 mM à pH 7,5 pendant 15 min sous agitation, puis rincées deux fois en PBS, une fois en citrate à 0.1 M pH 3,1 puis en Na-phosphate à 0.1 M pH 8,1, et deux fois en PBS. Les billes sont incubées avec du PBS et du Sodium Déoxycholate (NaDOC) à 0,5% pendant 15 min sous agitation, puis rincées deux fois avec du PBS Tween 0,1% et resuspendues dans du PBS Tween 0,1% auquel est ajouté de l'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>) à 0,02 %. Les billes cross-linkées peuvent ainsi être conservées à 4°C.

Les cellules HEK 293 sont transfectées et lysées comme décrit précédemment. 500 µg à 1 mg de protéines totales du lysat sont incubées pendant 2h à 4°C avec 12,5 µL de billes cross-linkées avec l'anticorps préalablement rincées deux fois avec du tampon de lyse. Ensuite, les billes sont lavées trois fois dans du tampon de lyse et éluées 10 min à 95°C dans du Laemmli 1X sans DTT. L'immunoprécipitat est séparé des billes puis dénaturé en présence de 10 mM final de DTT et peut être ensuite déposé sur un gel d'électrophorèse.

## 5. Immunoprécipitation de LRRFip1-iso1-HA pour la Spectrométrie de Masse

Des HEK 293 ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 WT ou R94G tagués HA, puis lysées en 1% de NP-40, 100 mM de NaCl, 50 mM de NaF, 50 mM de Tris pH 7.5. Des cellules non transfectées servent de contrôle. Une quantité de 6 mg de protéines pour chaque condition a été incubée avec 60 µl de billes magnétiques *anti-HA magnetic beads* (Pierce) pendant 2h à 4°C. Les billes ont ensuite été lavées 2X avec (1mL) 100 mM de NaCl, 1% de NP-40, 50 mM de NaF, 50 mM de Tris pH 7.5 et 2X avec (1mL) 100 mM + 500 mM NaCl, 1% de NP-40, 50 mM de NaF, 50 mM de Tris pH 7.5 = 100 NaCl, 100+500 NaCl, 100 NaCl, 100+500 NaCl. Les billes ont été éluées dans 100 µL de Laemmli 1X à 95°C pendant 10min. 10 mM de DTT ont été ajoutés juste avant la dénaturation des protéines pendant 5 min à 95°C. Afin de vérifier l'immunoprécipitation de LRRFip1-iso1, un aliquote (20 µL) de l'immunoprécipitation a été séparé par électrophorèse sur un gel d'acrylamide *Criterion XT Bis-Tris 4-12%* (Bio-Rad), puis coloré au Nitrate d'argent grâce au kit *SilverQuest™ Silver staining* (Thermo Fisher Scientific). Le reste a été envoyé à la plateforme de spectrométrie de masse *EDyP-Service* (Grenoble).

## 6. Séparation par affinité - Pull-down

### a. Pull-down de LRRFip1-iso1-6XHis (billes de nickel)

Les plasmides LRRFip1-iso1 WT et W76;82-AA tagués HA ont été modifiés par mutagenèse dirigée pour introduire un tag 6XHis en C-terminal de la protéine (après le tag HA). Des HEK 293 ont été transfectées avec ces plasmides, lysées 48h après avec 50 mM de NaCl, 50 mM de NaF, 20 mM d'HEPES à pH 8,0 puis la fraction nucléaire a été isolée comme décrit dans la partie V.2. Des HEK 293 non transfectées servent de contrôle. Une quantité de 200 µg d'extrait nucléaire a été incubée avec de la DNase (Qiagen) pendant 1h à 37 °C, puis toute la nuit avec 20 µl de billes *Protino Ni-IDA* ou *Ni-TED* (Macherey Nagel) et 10 mM d'Imidazole. Les billes ont été rincées le lendemain avec 4X (500µL) 100 mM de NaCl, 1% de NP-40, 50 mM de NaF et 20 mM de HEPES pH 8,0 (avec ou sans 2X 500 mM de NaCl). Les billes ont été éluées dans 30 µL de tampon de lyse auxquels est ajouté 250 mM d'Imidazole. Du Laemmli 1X et 10 mM de DTT ont été ajoutés juste avant la dénaturation pendant 5 min à 95°C. Le produit d'immunoprécipitation a été mis à migrer sur un gel

d'acrylamide *Criterion XT Bis-Tris 4-12%* (Bio-Rad) par électrophorèse, puis coloré au Nitrate d'argent grâce au kit *SilverQuest™ Silver staining* (Thermo Fisher Scientific).

#### b. Pull-down de sPTPRF (billes d'héparine-agarose)

Des HEK 293 ont été transfectées avec sPTPRF WT et I328M pendant 48h puis le milieu de culture (1 mL) des cellules est prélevé et ultracentrifugé à 80 000 g pendant 15 min. Les cellules sont lysées de façon classique en NP-40 (voir protocole V.1). 1 mL de milieu de culture et 500 µg de protéines totales du lysat ont été incubés avec 30 µL de billes Héparine-Agarose (Sigma-Aldrich) pendant 4h à 4°C sous agitation. Les billes ont été rincées 3 fois avec du tampon de lyse sur des colonnes *Receiver columns 20 µm* (Macherey Nagel) puis éluées avec 50 µL de Laemmli 1X chaud pendant 10 min à température ambiante. 10 mM de DTT ont été ajoutés juste avant la dénaturation des protéines pendant 5 min à 95°C et leur dépôt sur gel d'acrylamide.

## 7. ChIP-Seq

Le ChIP-Seq permet de déterminer les interactions entre protéines et ADN. Des AVICs ont été transfectées avec LRRFip1-iso1 WT et mutant W76;82-AA grâce au kit *Amaya™ Basic Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Fibroblasts* avec le programme B16. Les cellules ont été décollées 48h après la transfection en PBS + antiprotéases, puis fixées dans une solution composée de 100 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 0,5 mM d'EGTA, 50 mM de Tris pH 8 et 11% de formaldéhyde pendant 10 min à RT puis 40 min à 4°C. La réaction de cross-linking est ensuite arrêtée avec de la Glycine à 125 mM final pendant 5 min à RT. Les cellules sont centrifugées à 2500 g, rincées dans du PBS + antiprotéases, puis lysées en 0,5% de NP-40, 85 mM de KCl et 5 mM de PIPES à pH 8 + antiprotéases. Les noyaux sont dissociés avec un potter, centrifugés à 2500 g pendant 5 min puis lavés dans du tampon de lyse sans NP-40. Ils sont ensuite lysés en 1% de SDS, 10 mM d'EDTA, en Tris 50 mM à pH 8 dans du PBS + antiprotéases (100 µL). La chromatine est soniquée de manière à obtenir des fragments de 500 -1000 pb (10 cycles de sonication 1 minute ON-0,5 minutes OFF ; haute intensité). L'extrait soniqué est centrifugé à 20 000 g pendant 5 min de manière à retirer le matériel insoluble, puis la qualité de l'ADN est contrôlée en déposant un aliquote du surnageant sur gel. En contrôle de l'expérience « Input », 30 µL de surnageant sont conservés à cette étape. Le surnageant (ainsi que l'Input) est dilué 10 fois dans du tampon de ChIP composé de 16,7 mM de Tris pH 8, 167 mM de NaCl, 0,01% de SDS, 1% de Triton 100X, 1,2

mM d'EDTA + antiprotéases de façon à obtenir un volume de 2 mL par condition. 30  $\mu$ L de billes *anti-HA magnetic beads* (Pierce) par condition sont ajoutées et incubées toute la nuit sous agitation à 4°C.

Les billes sont rincées 5 fois à température ambiante pendant 5 min dans 1) 150 mM de NaCl, du SDS 0,1%, du Triton 100X 1% dans du TE 2X. 2) 500 mM de NaCl, du SDS 0,1%, du Triton 100X 1% dans du TE 2X. 3) 0,25 M de LiCl, 1% de NP-40, 1% de DOC dans du TE 1X. 4) et 5) TE 1X. Les complexes immuns sont élués dans 250  $\mu$ L de tampon avec 1% de SDS et 0,1 M de NaHCO<sub>3</sub> et incubés pendant 15 min sous agitation. Les billes sont récupérées avec un aimant et le surnageant est prélevé. L'éluotion est renouvelée et les éluâts sont combinés (500  $\mu$ L final). Un tube contrôle est préparé contenant 30  $\mu$ L d'input + 470  $\mu$ L de tampon d'éluotion. Du NaCl à une concentration finale de 200 mM est ajouté aux 500  $\mu$ L d'éluât qui sont ensuite incubés pendant 4h à 65°C sous agitation dans le but d'inhiber la réaction de cross-link. 4  $\mu$ L de Protéinase K (à 10 mg/ml), 10  $\mu$ L d'EDTA 0,5 M et 20  $\mu$ L de Tris-HCl 1M à pH 7 sont ajoutés aux éluâts, qui sont ensuite incubés 1h à 45°C sous agitation. L'ADN est précipité par ajout de 250  $\mu$ L de phénol et 250  $\mu$ L de chloroforme aux échantillons qui sont ensuite homogénéisés et centrifugés à 20 000 g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse est prélevée auquel est ajoutée 500  $\mu$ L de chloroforme, puis homogénéisée et centrifugée à 20 000 g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse est prélevée de nouveau (environ 500  $\mu$ L) auquel on ajoute 2 volumes d'éthanol absolu, 0,2 volumes d'acétate d'ammonium 10 M et 1,5  $\mu$ L de glycogène. Les échantillons sont placés à -20°C sur la nuit.

Le lendemain, ils sont centrifugés à 20 000 g pendant 15 min à 4°C puis le culot est lavé avec de l'éthanol à 70% et centrifugé de nouveau pendant 5 min à 20 000 g. Le culot est séché puis repris dans 20  $\mu$ L d'eau. La densité optique peut-être mesurée au Nanodrop et les échantillons conservés à -20°C.

## VI. Statistiques

Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme avec les erreurs standards (SEM) et les étoiles indiquent le degré de significativité ( $p < 0.05$  au minimum). Pour toutes les représentations graphiques, les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Le test statistique de Kruskal-Wallis (analyse de variance à une voie non paramétrique) a été utilisé grâce aux logiciels *R* et *GraphPad Prism*.

# ANNEXES -

### Annexe 1 : Interactants de LRRFip1-iso1 détectés par Spectrométrie de Masse.

Les ratios R94G/WT, R94G/NT et WT/NT correspondent aux nombres de peptides retrouvés dans chacune des trois conditions (non transfectée, transfectée avec LRRFip1-iso1 WT ou R94G). Les protéines surlignées en jaune correspondent aux interactants spécifiques de LRRFip1-iso1 (non retrouvé dans la condition NT et nombre important de peptides retrouvés dans la condition transfectée). Celles surlignées en gris correspondent soit à des protéines retrouvées dans la condition NT, soit à une très faible couverture des peptides = contaminants retrouvés dans la majorité des Spectrométrie de Masse. (NT : Non transfecté).

Nom	Numéro Uniprot	RATIOS : (nbre peptides)	ISO-R94G	ISO-R94G	ISO-WT
			ISO-WT	NT	NT
IGH1M_MOUSE	P01869		1,07447	1,37415	1,27891
#C#P00761			1,43860	2,27778	1,58333
K2C1_HUMAN	P04264		0,97059	1,03125	1,06250
B4DPC0_HUMAN	B4DPC0		1,01786	ISO-R94G only	ISO-WT only
FLII_HUMAN	Q13045		1,07547	ISO-R94G only	ISO-WT only
K1C16_HUMAN	P08779		1,87500	3,21429	1,71429
K1C10_HUMAN	P13645		1,29412	1,37500	1,06250
K22E_HUMAN	P35908		1,17647	1,33333	1,13333
HSP71_HUMAN	P08107		1,08108	1,60000	1,48000
K1C14_HUMAN	P02533		1,40741	2,11111	1,50000
RO52_HUMAN	P19474		0,91892	1,21429	1,32143
K2C6B_HUMAN	P04259		ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
LRRF1_HUMAN	Q32MZ4		0,64000	ISO-R94G only	ISO-WT only
K2C6A_HUMAN	P02538		2,06667	2,81818	1,36364
J3KS54_HUMAN	J3KS54		1,08000	ISO-R94G only	ISO-WT only
K2C5_HUMAN	P13647		1,44444	2,00000	1,38462
K1C9_HUMAN	P35527		1,08333	1,44444	1,33333
K1C17_HUMAN	Q04695		1,91667	ISO-R94G only	ISO-WT only
TBB4B_HUMAN	P68371		1,04545	1,43750	1,37500
HSP7C_HUMAN	P11142		1,15789	1,57143	1,35714
TBB5_HUMAN	P07437		0,73077	1,35714	1,85714
DDX41_HUMAN	Q9UJV9		1,11765	0,82609	0,73913
TBB2B_HUMAN	Q9BVA1		0,72000	1,80000	2,50000
ACTB_HUMAN	P60709		0,73913	1,30769	1,76923
K2C1B_HUMAN	Q72794		3,20000	2,66667	0,83333
#C#P13646-1			ISO-R94G only	1,15385	0,00000
ACTG_HUMAN	P63261		0,71429	1,50000	2,10000
K1C19_HUMAN	P08727		2,40000	3,00000	1,25000
PCM1_HUMAN	Q15154		0,64706	ISO-R94G only	ISO-WT only
TBA1A_HUMAN	Q71U36		0,78571	1,57143	2,00000
TBA1B_HUMAN	P68363		0,78571	1,37500	1,75000
DESP_HUMAN	P15924		1,28571	4,50000	3,50000
PUF60_HUMAN	Q9UHX1		1,00000	1,50000	1,50000
PCBP1_HUMAN	Q15365		0,81818	1,12500	1,37500

#C#P02662		0,72727	1,00000	1,37500
PLAK_HUMAN	P14923	2,00000	2,66667	1,33333
#C#P02769		1,75000	1,40000	0,80000
USP9X_HUMAN	Q93008	0,70000	ISO-R94G only	ISO-WT only
TBB6_HUMAN	Q9BUF5	0,63636	1,75000	2,75000
E9PQ56_HUMAN	E9PQ56	1,16667	1,75000	1,50000
RS3_HUMAN	P23396	0,87500	1,16667	1,33333
GRP78_HUMAN	P11021	0,87500	1,16667	1,33333
RL38_HUMAN	P63173	1,40000	1,40000	1,00000
EF1A1_HUMAN	P68104	1,75000	1,40000	0,80000
Q2NKY5_HUMAN	Q2NKY5	0,66667	ISO-R94G only	ISO-WT only
LRRF2_HUMAN	Q9Y608	0,75000	ISO-R94G only	ISO-WT only
PGAM5_HUMAN	Q96HS1	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
ADT3_HUMAN	P12236	0,85714	2,00000	2,33333
ADT2_HUMAN	P05141	1,00000	1,50000	1,50000
RFIP5_HUMAN	Q9BXF6	2,00000	1,50000	0,75000
FILA2_HUMAN	Q5D862	2,00000	1,20000	0,60000
DJB11_HUMAN	Q9UBS4	3,00000	1,50000	0,50000
#C#Q8BGZ7		ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
KPRP_HUMAN	Q5T749	5,00000	5,00000	1,00000
A0N4V7_HUMAN	A0N4V7	0,71429	2,50000	3,50000
PCBP2_HUMAN	Q15366	0,83333	1,66667	2,00000
HS90A_HUMAN	P07900	1,66667	2,50000	1,50000
RL23_HUMAN	P62829	0,83333	1,00000	1,20000
M2OM_HUMAN	Q02978	1,66667	1,66667	1,00000
TMCC3_HUMAN	Q9ULS5	1,00000	0,62500	0,62500
K1C24_HUMAN	Q2M215	4,00000	4,00000	1,00000
K1C18_HUMAN	P05783	2,00000	2,00000	1,00000
#C#P02754		2,00000	0,80000	0,40000
TRI27_HUMAN	P14373	2,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
RBM39_HUMAN	Q14498	2,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
HNRPM_HUMAN	P52272	0,66667	4,00000	6,00000
RS20_HUMAN	P60866	1,00000	2,00000	2,00000
DSG1_HUMAN	Q02413	1,00000	2,00000	2,00000
BCAR1_HUMAN	P56945	0,50000	1,00000	2,00000
VIME_HUMAN	P08670	0,57143	1,00000	1,75000
QCR2_HUMAN	P22695	1,00000	1,33333	1,33333
RS23_HUMAN	P62266	1,00000	1,00000	1,00000
GRP75_HUMAN	P38646	0,80000	0,66667	0,83333
MMTA2_HUMAN	Q9BU76	1,33333	1,00000	0,75000
H4_HUMAN	P62805	1,33333	1,00000	0,75000
WDR83_HUMAN	Q9BRX9	2,00000	1,33333	0,66667
ALBU_HUMAN	P02768	4,00000	1,33333	0,33333
KRT36_HUMAN	O76013	3,00000	3,00000	1,00000
K2C80_HUMAN	Q6KB66	3,00000	3,00000	1,00000
K2C78_HUMAN	Q8N1N4	3,00000	3,00000	1,00000

K1H1_HUMAN	Q15323	3,00000	3,00000	1,00000
#C#P02663		3,00000	1,00000	0,33333
TMOD3_HUMAN	Q9NYL9	0,60000	ISO-R94G only	ISO-WT only
TMOD1_HUMAN	P28289	0,60000	ISO-R94G only	ISO-WT only
RLA0L_HUMAN	Q8NHW5	1,50000	ISO-R94G only	ISO-WT only
HNRPF_HUMAN	P52597	1,50000	ISO-R94G only	ISO-WT only
GBLP_HUMAN	P63244	3,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
LDHB_HUMAN	P07195	ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
RL12_HUMAN	P30050	1,00000	3,00000	3,00000
EFTU_HUMAN	P49411	1,00000	3,00000	3,00000
CH60_HUMAN	P10809	1,00000	3,00000	3,00000
TRY1_HUMAN	P07477	1,50000	3,00000	2,00000
HNRH1_HUMAN	P31943	0,75000	1,50000	2,00000
RSSA_HUMAN	P08865	1,00000	1,50000	1,50000
BUB3_HUMAN	O43684	3,00000	3,00000	1,00000
DDX3X_HUMAN	O00571	0,75000	0,75000	1,00000
RS14_HUMAN	P62263	0,75000	0,50000	0,66667
#C#P62894		1,00000	2,00000	2,00000
#C#P02666		1,00000	1,00000	1,00000
#C#P02668		1,00000	0,66667	0,66667
KT33B_HUMAN	Q14525	2,00000	1,00000	0,50000
P53_HUMAN	P04637	0,50000	ISO-R94G only	ISO-WT only
ATD3A_HUMAN	Q9NVI7	0,66667	ISO-R94G only	ISO-WT only
RT22_HUMAN	P82650	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
PYR1_HUMAN	P27708	2,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
PKP1_HUMAN	Q13835	2,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
NO40_HUMAN	Q9NP64	2,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
CEP72_HUMAN	Q9P209	2,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
SNX1_HUMAN	Q13596	ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
RPB1_HUMAN	P24928	ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
RIOK2_HUMAN	Q9BVS4	ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
LDHA_HUMAN	P00338	ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
FLNA_HUMAN	P21333	ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
CATA_HUMAN	P04040	ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
SPF45_HUMAN	Q96I25	0,40000	2,00000	5,00000
NOSIP_HUMAN	Q9Y314	0,66667	2,00000	3,00000
DHX35_HUMAN	Q9H5Z1	0,66667	2,00000	3,00000
BCAR3_HUMAN	O75815	0,66667	2,00000	3,00000
RL11_HUMAN	P62913	0,66667	1,00000	1,50000
PIMT_HUMAN	P22061	0,33333	0,50000	1,50000
S10A8_HUMAN	P05109	2,00000	2,00000	1,00000
IF4A1_HUMAN	P60842	2,00000	2,00000	1,00000
PRC1_HUMAN	O43663	1,00000	1,00000	1,00000
PARP1_HUMAN	P09874	1,00000	1,00000	1,00000
LC7L2_HUMAN	Q9Y383	1,00000	1,00000	1,00000
HORN_HUMAN	Q86YZ3	1,00000	1,00000	1,00000



RS18_HUMAN	P62269	1,00000	0,66667	0,66667
RUXF_HUMAN	P62306	2,00000	1,00000	0,50000
LYSC_HUMAN	P61626	2,00000	1,00000	0,50000
MGN2_HUMAN	Q96A72	ISO-R94G only	2,00000	0,00000
CASPE_HUMAN	P31944	ISO-R94G only	2,00000	0,00000
#C#Q2UVX4		ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
#C#P01966		ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
#C#ENSEMBL:ENSBTAP00000014147		ISO-R94G only	1,00000	0,00000
KRT86_HUMAN	O43790	ISO-R94G only	0,14286	0,00000
RS17L_HUMAN	P0CW22	0,33333	ISO-R94G only	ISO-WT only
RAD50_HUMAN	Q92878	0,50000	ISO-R94G only	ISO-WT only
PABP4_HUMAN	Q13310	0,50000	ISO-R94G only	ISO-WT only
IMB1_HUMAN	Q14974	0,50000	ISO-R94G only	ISO-WT only
DNJB6_HUMAN	O75190	0,50000	ISO-R94G only	ISO-WT only
TPGS1_HUMAN	Q6ZTW0	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
TGM3_HUMAN	Q08188	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
TFR1_HUMAN	P02786	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
SYFA_HUMAN	Q9Y285	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
SSBP_HUMAN	Q04837	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
SPB12_HUMAN	Q96P63	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
SMAD2_HUMAN	Q15796	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
SEC13_HUMAN	P55735	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
RS28_HUMAN	P62857	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
RS26L_HUMAN	Q5JNZ5	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
RL30_HUMAN	P62888	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
Q9NP29_HUMAN	Q9NP29	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
Q5CZ94_HUMAN	Q5CZ94	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
PSMD3_HUMAN	O43242	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
PRS7_HUMAN	P35998	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
PRDX4_HUMAN	Q13162	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
POF1B_HUMAN	Q8WVV4	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
P5CR3_HUMAN	Q53H96	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
NUP93_HUMAN	Q8N1F7	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
NU205_HUMAN	Q92621	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
MIB1_HUMAN	Q86YT6	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
MCA3_HUMAN	O43324	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
LMO7_HUMAN	Q8WWI1	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
LOR5A1_HUMAN	LOR5A1	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
KC1E_HUMAN	P49674	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
HIG1A_HUMAN	Q9Y241	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
GNA12_HUMAN	Q03113	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
FA83B_HUMAN	Q5T0W9	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
ENOA_HUMAN	P06733	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
CP080_HUMAN	Q9Y6A4	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
CD11A_HUMAN	Q9UQ88	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
CAZA2_HUMAN	P47755	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only

ARG1_HUMAN	P05089	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
ARF1_HUMAN	P84077	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
ADIP_HUMAN	Q9Y2D8	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
1433E_HUMAN	P62258	1,00000	ISO-R94G only	ISO-WT only
XP32_HUMAN	Q5T750		ISO-R94G only	ISO-R94G only
WDR43_HUMAN	Q15061		ISO-R94G only	ISO-R94G only
WDR12_HUMAN	Q9GZL7		ISO-R94G only	ISO-R94G only
VPS35_HUMAN	Q96QK1		ISO-R94G only	ISO-R94G only
UBR5_HUMAN	O95071		ISO-R94G only	ISO-R94G only
TMM33_HUMAN	P57088		ISO-R94G only	ISO-R94G only
TIF1B_HUMAN	Q13263		ISO-R94G only	ISO-R94G only
TCPG_HUMAN	P49368		ISO-R94G only	ISO-R94G only
TCPE_HUMAN	P48643		ISO-R94G only	ISO-R94G only
SYMC_HUMAN	P56192		ISO-R94G only	ISO-R94G only
SPR1B_HUMAN	P22528		ISO-R94G only	ISO-R94G only
SF3B3_HUMAN	Q15393		ISO-R94G only	ISO-R94G only
S10A9_HUMAN	P06702		ISO-R94G only	ISO-R94G only
RUVB2_HUMAN	Q9Y230		ISO-R94G only	ISO-R94G only
RUSD3_HUMAN	Q6P087		ISO-R94G only	ISO-R94G only
RS19_HUMAN	P39019		ISO-R94G only	ISO-R94G only
RLA2_HUMAN	P05387		ISO-R94G only	ISO-R94G only
RBM25_HUMAN	P49756		ISO-R94G only	ISO-R94G only
RANB9_HUMAN	Q96S59		ISO-R94G only	ISO-R94G only
Q6ZTY5_HUMAN	Q6ZTY5		ISO-R94G only	ISO-R94G only
PXDC1_HUMAN	Q5TGL8		ISO-R94G only	ISO-R94G only
PROF1_HUMAN	P07737		ISO-R94G only	ISO-R94G only
PPIL2_HUMAN	Q13356		ISO-R94G only	ISO-R94G only
PELO_HUMAN	Q9BRX2		ISO-R94G only	ISO-R94G only
NEUL_HUMAN	Q9BYT8		ISO-R94G only	ISO-R94G only
MCM5_HUMAN	P33992		ISO-R94G only	ISO-R94G only
M0QYQ9_HUMAN	M0QYQ9		ISO-R94G only	ISO-R94G only
LEG7_HUMAN	P47929		ISO-R94G only	ISO-R94G only
KPYM_HUMAN	P14618		ISO-R94G only	ISO-R94G only
HSPB1_HUMAN	P04792		ISO-R94G only	ISO-R94G only
HDAC1_HUMAN	Q13547		ISO-R94G only	ISO-R94G only
GSDMA_HUMAN	Q96QA5		ISO-R94G only	ISO-R94G only
ELOV4_HUMAN	Q9GZR5		ISO-R94G only	ISO-R94G only
DSC1_HUMAN	Q08554		ISO-R94G only	ISO-R94G only
DDX1_HUMAN	Q92499		ISO-R94G only	ISO-R94G only
DDB1_HUMAN	Q16531		ISO-R94G only	ISO-R94G only
BIG2_HUMAN	Q9Y6D5		ISO-R94G only	ISO-R94G only
BOAZS5_HUMAN	BOAZS5		ISO-R94G only	ISO-R94G only
ATPB_HUMAN	P06576		ISO-R94G only	ISO-R94G only
ARAF_HUMAN	P10398		ISO-R94G only	ISO-R94G only
AGK_HUMAN	Q53H12		ISO-R94G only	ISO-R94G only
A2MG_HUMAN	P01023		ISO-R94G only	ISO-R94G only

2ABA_HUMAN	P63151	ISO-R94G only	ISO-R94G only	NaN
RS5_HUMAN	P46782	0,25000	1,00000	4,00000
TCPQ_HUMAN	P50990	0,50000	1,00000	2,00000
RUVB1_HUMAN	Q9Y265	0,50000	1,00000	2,00000
RL40_HUMAN	P62987	0,50000	1,00000	2,00000
MATR3_HUMAN	P43243	0,50000	1,00000	2,00000
IF4A3_HUMAN	P38919	0,50000	1,00000	2,00000
HNRPC_HUMAN	P07910	0,50000	1,00000	2,00000
CX056_HUMAN	Q9H5V9	0,50000	1,00000	2,00000
CMC2_HUMAN	Q9UJS0	0,25000	0,50000	2,00000
TCPA_HUMAN	P17987	0,33333	0,50000	1,50000
SDF2L_HUMAN	Q9HCN8	1,00000	1,00000	1,00000
S10AE_HUMAN	Q9HCY8	1,00000	1,00000	1,00000
RS29_HUMAN	P62273	1,00000	1,00000	1,00000
RL7_HUMAN	P18124	1,00000	1,00000	1,00000
RL27A_HUMAN	P46776	1,00000	1,00000	1,00000
PDCD4_HUMAN	Q53EL6	1,00000	1,00000	1,00000
MCM3_HUMAN	P25205	1,00000	1,00000	1,00000
LUC7L_HUMAN	Q9NQ29	1,00000	1,00000	1,00000
LMNA_HUMAN	P02545	1,00000	1,00000	1,00000
KV203_HUMAN	P01616	1,00000	1,00000	1,00000
DNJA2_HUMAN	O60884	1,00000	1,00000	1,00000
DNJA1_HUMAN	P31689	1,00000	1,00000	1,00000
CAAP1_HUMAN	Q9H8G2	1,00000	1,00000	1,00000
AT1A1_HUMAN	P05023	1,00000	1,00000	1,00000
1433Z_HUMAN	P63104	1,00000	1,00000	1,00000
KV113_HUMAN	P01605	0,50000	0,50000	1,00000
H2B1C_HUMAN	P62807	0,50000	0,50000	1,00000
ATPA_HUMAN	P25705	0,50000	0,50000	1,00000
BOLA2_HUMAN	Q9H3K6	1,00000	0,50000	0,50000
ATPG_HUMAN	P36542	1,00000	0,50000	0,50000
TGM1_HUMAN	P22735	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
SPR2A_HUMAN	P35326	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
RS25_HUMAN	P62851	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
Q9Y509_HUMAN	Q9Y509	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
LRC47_HUMAN	Q8N1G4	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
L2GL1_HUMAN	Q15334	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
AT2A2_HUMAN	P16615	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
ANXA2_HUMAN	P07355	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
A2NJV5_HUMAN	A2NJV5	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
A2J1N6_HUMAN	A2J1N6	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
2AAA_HUMAN	P30153	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
1433T_HUMAN	P27348	ISO-R94G only	1,00000	0,00000
#C#Q9QWL7		ISO-WT only	NT only	2,50000
K2C8_HUMAN	P05787	ISO-WT only	NT only	0,66667
K2C4_HUMAN	P19013	ISO-WT only	NT only	0,25000

KR132_HUMAN	Q52LG2	NaN	NT only	0,00000
#C#Q1RMN8		NaN	NT only	0,00000
#C#Q1RMK2		NaN	NT only	0,00000
KR111_HUMAN	Q8IUC1	NaN	NT only	0,00000
KRT84_HUMAN	Q9NSB2	NaN	NT only	0,00000
#C#P08730-1		NaN	NT only	0,00000
TAF2_HUMAN	Q6P1X5	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
RT27_HUMAN	Q92552	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
PABP1_HUMAN	P11940	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
MAEA_HUMAN	Q7L5Y9	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
ARMC8_HUMAN	Q8IUR7	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
3MG_HUMAN	P29372	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
UBP34_HUMAN	Q70CQ2	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
U5S1_HUMAN	Q15029	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
TOM20_HUMAN	Q15388	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
TECR_HUMAN	Q9NZ01	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
TCPZ_HUMAN	P40227	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
TBR1_HUMAN	Q16650	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
STK33_HUMAN	Q9BYT3	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
SRP09_HUMAN	P49458	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
SNX9_HUMAN	Q9Y5X1	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
SK2L2_HUMAN	P42285	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
SF3A3_HUMAN	Q12874	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
SBSN_HUMAN	Q6UWP8	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
RUXE_HUMAN	P62304	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
RT29_HUMAN	P51398	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
RL17_HUMAN	P18621	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
PSD11_HUMAN	O00231	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
PSB6_HUMAN	P28072	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
PSA7L_HUMAN	Q8TAA3	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
MTR1L_HUMAN	Q13585	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
MPCP_HUMAN	Q00325	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
METK2_HUMAN	P31153	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
MET13_HUMAN	Q8N6R0	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
LC7L3_HUMAN	O95232	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
IRS4_HUMAN	O14654	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
HNRPK_HUMAN	P61978	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
HAUS4_HUMAN	Q9H6D7	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
GTR1_HUMAN	P11166	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
GP125_HUMAN	Q8IWK6	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
G3P_HUMAN	P04406	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
DDX17_HUMAN	Q92841	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
CROL3_HUMAN	H7BZ55	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
CO3_HUMAN	P01024	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
CHERP_HUMAN	Q8IWX8	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
C1TM_HUMAN	Q6UB35	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only

BAG2_HUMAN	O95816	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
AZI1_HUMAN	Q9UPN4	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
AIFM1_HUMAN	O95831	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
1433G_HUMAN	P61981	ISO-WT only	NaN	ISO-WT only
RS16_HUMAN	P62249	ISO-WT only	NT only	2,00000
TIM50_HUMAN	Q3ZCQ8	ISO-WT only	NT only	1,00000
TAF8_HUMAN	Q7Z7C8	ISO-WT only	NT only	1,00000
S30BP_HUMAN	Q9UHR5	ISO-WT only	NT only	1,00000
RS9_HUMAN	P46781	ISO-WT only	NT only	1,00000
RS13_HUMAN	P62277	ISO-WT only	NT only	1,00000
RL10_HUMAN	P27635	ISO-WT only	NT only	1,00000
RBM8A_HUMAN	Q9Y5S9	ISO-WT only	NT only	1,00000
PP2AA_HUMAN	P67775	ISO-WT only	NT only	1,00000
NTPCR_HUMAN	Q9BSD7	ISO-WT only	NT only	1,00000
GALK1_HUMAN	P51570	ISO-WT only	NT only	1,00000
CI114_HUMAN	Q5T280	ISO-WT only	NT only	1,00000
RCC2_HUMAN	Q9P258	ISO-WT only	NT only	1,00000
RS8_HUMAN	P62241	ISO-WT only	NT only	0,66667
RL19_HUMAN	P84098	ISO-WT only	NT only	0,50000
H31T_HUMAN	Q16695	ISO-WT only	NT only	0,50000
USMG5_HUMAN	Q96IX5	NaN	NT only	0,00000
TM109_HUMAN	Q9BVC6	NaN	NT only	0,00000
SHIP1_HUMAN	Q92835	NaN	NT only	0,00000
SERA_HUMAN	O43175	NaN	NT only	0,00000
RYK_HUMAN	P34925	NaN	NT only	0,00000
RL13_HUMAN	P26373	NaN	NT only	0,00000
P78328_HUMAN	P78328	NaN	NT only	0,00000
NOL11_HUMAN	Q9H8H0	NaN	NT only	0,00000
NLE1_HUMAN	Q9NVX2	NaN	NT only	0,00000
NH2L1_HUMAN	P55769	NaN	NT only	0,00000
ML12A_HUMAN	P19105	NaN	NT only	0,00000
ENOB_HUMAN	P13929	NaN	NT only	0,00000
RL24_HUMAN	P83731	NaN	NT only	0,00000
IFRD1_HUMAN	O00458	NaN	NT only	0,00000

**Annexe 2 : Article : MVP-Associated Filamin A Mutations Affect FlnA-PTPN12 (PTP-PEST) Interactions.**

J'ai eu l'occasion pendant ma thèse de participer à l'étude des effets des mutations de la *FLNA* associées au PVM (G288R, P637Q et H743P ) sur son interaction avec PTPN12 (PTP-PEST), une tyrosine phosphatase précédemment identifiée par double-hybride. Mon travail sur ce projet (biologie moléculaire et vérification des co-immunoprécipitations) a donné lieu à une publication en 2<sup>ème</sup> auteur dans *Journal of Cardiovascular Development and Disease*.

## Article

**MVP-Associated Filamin A Mutations Affect FlnA-PTPN12 (PTP-PEST) Interactions****Damien Duval**<sup>1</sup>, **Pauline Labbé**<sup>1</sup>, **Léa Bureau**<sup>1</sup>, **Thierry Le Tourneau**<sup>1</sup>, **Russell A. Norris**<sup>2</sup>, **Roger R. Markwald**<sup>2</sup>, **Robert Levine**<sup>3</sup>, **Jean-Jacques Schott**<sup>1</sup>, **Jean Mérot**<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut du thorax, Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291, 8 Quai Moncousu, Nantes F-44007, France; E-Mails: damien.duval@etu.univ-nantes.fr (D.D.); pauline.labbe@etu.univ-nantes.fr (P.L.); bureau.lea@gmail.com (L.B.); thletourneau@yahoo.fr (T.L.T.); jjschott@univ-nantes.fr (J.-J.S.)

<sup>2</sup> Department of Cell Biology and Anatomy, Medical University of South Carolina, Charleston, SC 29425, USA; E-Mails: norrisra@musc.edu (R.A.N.); markwald@musc.edu (R.R.M.)

<sup>3</sup> Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114-2696 USA; E-Mail: rlevine@partners.org

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jean.merot@univ-nantes.fr; Tel.: +33-2-28-08-01-64; Fax: +33-2-28-08-01-30.

Academic Editor: Cheryl L. Maslen

*Received: 18 May 2015 / Accepted: 3 September 2015 / Published: 8 September 2015*

---

**Abstract:** Although the genetic basis of mitral valve prolapse (MVP) has now been clearly established, the molecular and cellular mechanisms involved in the pathological processes associated to a specific mutation often remain to be determined. The *FLNA* gene (encoding Filamin A; FlnA) was the first gene associated to non-syndromic X-linked myxomatous valvular dystrophy, but the impacts of the mutations on its function remain un-elucidated. Here, using the first repeats (1–8) of FlnA as a bait in a yeast two-hybrid screen, we identified the tyrosine phosphatase PTPN12 (PTP-PEST) as a specific binding partner of this region of FlnA protein. In addition, using yeast two-hybrid trap assay pull down and co-immunoprecipitation experiments, we showed that the MVP-associated FlnA mutations (G288R, P637Q, H743P) abolished FlnA/PTPN12 interactions. PTPN12 is a key regulator of signaling pathways involved in cell-extracellular matrix (ECM) crosstalk, cellular responses to mechanical stress that involve integrins, focal adhesion transduction pathways, and actin cytoskeleton dynamics. Interestingly, we showed that the FlnA mutations impair

the activation status of two PTPN12 substrates, the focal adhesion associated kinase Src, and the RhoA specific activating protein p190RhoGAP. Together, these data point to PTPN12/FlnA interaction and its weakening by FlnA mutations as a mechanism potentially involved in the physiopathology of FlnA-associated MVP.

**Keywords:** Filamin-A; PTPN12; mitral valve prolapse; p190RhoGAP; Src

---

## 1. Introduction

The mitral valve prolapse (MVP), the most common form of cardiac disease, involves approximately 2%–3% of the population and remains one of the major causes of valve surgery. In parallel to syndromic forms, the familial inheritance of non-syndromic MVP has now been clearly established [1]. Indeed, the syndromic forms of MVP have been linked to several genes such as *FBNI* (Fibrillin-1) in Marfan syndrome [2], *TGFBRs* (TGF $\beta$  receptors) in Loeys-Dietz syndrome [3], *COL-1* (Collagen-1) in Ehlers-Danlos syndrome [4], while the *FLNA* (Filamin A) gene was associated to non-syndromic X-linked myxomatous valvular dystrophy (XMVD) [5,6]. However, although recent studies have unraveled the molecular, cellular, and physiopathological processes in few syndromic MVPs, including Marfan syndrome, and lead to potential therapeutic treatments for better healthcare of these patients [7,8], the deleterious mechanisms at work in FlnA-associated MVP remain to be elucidated.

In the late 1990s we mapped X-linked myxomatous valvular dystrophy to chromosome Xq28 gene locus in a large French family and identified in 2007, in all affected members, a first mutation encoding p.Pro637Gln residue substitution (P637Q) in the *FLNA* gene [5,6]. In addition, three other FlnA mutations encoding two residue substitutions, p.Gly288Arg (G288R), p.Val711Asp (V711D), and a 1944-bp genomic deletion were subsequently identified in four other families around the world. Although FlnA mutations have been associated to important and various congenital developmental diseases, including periventricular heterotopy (PVH) [9], Melnick-Needles syndrome (MNS) [10], and otopalatodigital syndrome (OPD), it is important to note that the patients bearing MVP-associated FlnA mutations only suffer from valvular affections, suggesting similar but specific mechanisms are at work for these MVP-associated FlnA-mutations. As a matter of fact, common clinical traits were shared in the different families, including early onset of poly-valvular defects sometimes detectable in newborns, typical features of myxomatous disease with marked thickening of the mitral valve (thickness was superior to 4 mm), and alterations of the sub-valvular apparatus. Interestingly, we also detected similar defects in targeted FlnA knockout mice model which exhibited abnormal valvular development and hyperplastic mitral valves, strongly suggesting that the MVP FlnA mutations we identified are loss of function mutations [11,12].

Filamin A (FlnA) is the first actin filament cross-linking protein identified in non-muscle cells. It organizes actin filaments in orthogonal networks to stabilize the cellular actin cortex, and many previous studies defined central roles for FlnA in mechano-protection, cell adhesion, spreading, and migration [13-17]. The FlnA protein consists 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 [15]. Over 90 FlnA interacting protein partners have now been identified attesting



to the implication of FlnA in the regulation of many signaling cascades involving actin cytoskeleton regulation. Interestingly, only few of these binding partners were shown to interact with the first N-terminal Igl repeats region of FlnA (Igl-1–8) that are targeted by the MVP-associated FlnA mutations suggesting the pathological effects of the latter may arise from interactions with new, yet unknown, binding partners [18,19].

To identify binding partners specifically interacting with the FlnA region targeted by the MVP mutations we performed a yeast two-hybrid screen of a cDNA library using the FlnA Igl repeats 1–8 region as a bait (Figure 1A). This screen identified a key regulator of cellular cytoskeleton and cell-extracellular matrix interaction signaling pathway, the tyrosine phosphatase non-receptor type PTPN12/PTP-PEST, as a binding partner of FlnA-1–8 repeats [20-22]. Furthermore, using yeast two-hybrid, pull-down and co-immunoprecipitation assays, we showed that FlnA-G288R and P637Q mutations and a recently-identified mutation p.His743Pro (H743P) affect FlnA/PTPN12 interactions, supporting a potential role of altered FlnA/PTPN12 interactions in the physio-pathological mechanisms of FlnA-associated MVP.

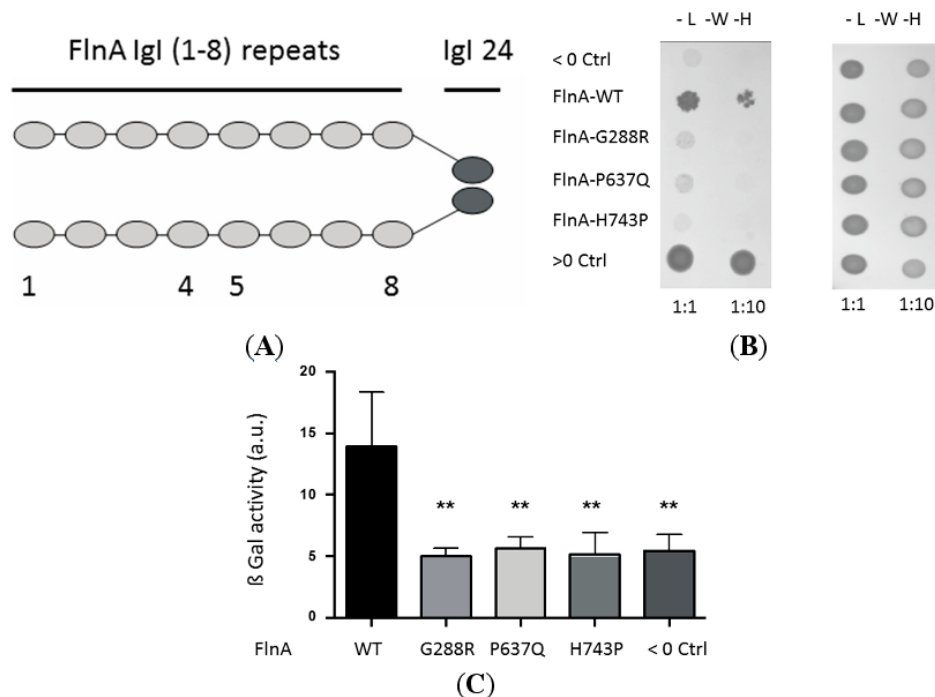
## **2. Experimental Section**

### *2.1. cDNAs, Mutagenesis, and Reagents*

The cDNA encoding FlnA Igl repeats 1–8 fused to its Hinge 2 domain and its 24th Igl repeat (FlnA-1–8,24, see Figure 1A), was a kind gift of Dr F. Nakamura [15]. Human PTPN12 cDNA was obtained from Source Bioscience (Nottingham, UK) and C-terminally EGFP tagged FlnA from Dr D. Calderwood (Yale University, New Haven, CT, USA). pPC97, pPC86 vectors and the pPC97-CT7 (encoding the *GAL4* DNA binding domain fused to the C-terminal tail of mGluR7a glutamate receptor *GAL4*-BD-CT7), and pPC86-PICK1 (encoding *GAL4*-AD-PICK1 fusion) constructs used as positive controls in interaction assay were a kind gift of Dr H. Boudin (INSERM U913, Nantes, France) [23]. The construct encoding GST-RhoQ63L was a kind gift of Dr C. Guilluy (INSERM U1087, Nantes, France). All the mutations described below were made using PCR-based mutagenesis kits (Quickchange kit from Agilent Tech, Les Ulis, France). 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, Merck Millipore, Milsheom, France), Clontech (anti-EGFP, 1:1000, Saint-Germain-en-Laye, France), Roche (anti-HA, 1:1000), BD Bioscience (p190RhoGAP, 1:500, Le Pont de Claix, France), and Cell Signaling (Src and phospho-Src-Y416, 1:500 both, Merck Millipore).

### *2.2. Cell Culture and Transfection*

The maintenance and the production of melanoma cells stably transfected with wild-type and mutant FlnAs were previously described in [24]. Hek293 cells were cultured in DMEM, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and L-glutamine. The cells were transfected using Lipofectamine (Invitrogen, Illkirch, France) or Genecellin (BiocellChallenge, Toulon, France) according to the manufacturers' specifications.



**Figure 1.** Effects of Filamin A mutations on FlnA/PTPN12 interaction. Yeast two-hybrid assay. **(A)** Schematic cartoon of the bait used in the two-hybrid library screening and interaction assay of FlnA mutations. The bait consists in the first eight Igl repeats fused to the second hinge and the 24th repeat of FlnA; **(B)** the left-hand image shows yeasts co-transfected with *GAL4*-AD-PTPN12 and, from top to bottom lane, *GAL4*-BD-CT7 (negative control; Neg Ctrl), *GAL4*-BD-FlnA-WT, G288R, P637Q or H743P or co-transfected with *GAL4*-AD-PICK1 and *GAL4*-BD-CT7 (positive control, Pos Ctrl) growing on histidine-free medium (interaction assay) or histidine-supplemented plates (growth assay, right-hand image). Two dilutions of 1:1 and 1:10 were spotted; **(C)** quantification of FlnA/PTPN12 interaction in  $\beta$  galactosidase assay. Results are presented in arbitrary units (au). \*\* indicates significant differences ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) vs. FlnA-WT.

### 2.3. Migration Assays: Wound Healing 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 (Nanterre, France) equipped for time-lapse video microscopy. Wound closure was monitored for 24–28 h on three fields per well and the data are presented as % of closure of FlnA-WT cells' monolayer wound closure at  $t = 24$  h. Snapshots of migrating cells presenting trailing tails were extracted from these experiments.

### 2.4. Yeast Two-Hybrid Library Screening

Yeast two-hybrid screening was performed by Hybrigenics (Hybrigenics Services, Paris, France). The coding sequence of FlnA-1–8,24 was PCR-amplified and cloned into pB27 as a C-terminal fusion

to LexA (*N*-LexA-FlnA-1–8,24-C). The construct was checked by sequencing the entire insert and used as a bait to screen a random-primed human placenta cDNA library constructed into pP6. pB27 and pP6 derive from the original pBTM116 and pGADGH plasmids, respectively. 79.4 million clones (eight-fold the complexity of the library) were screened using a mating approach with YHGX13 (Y187 *ade2-101*: *loxP*-kanMX-*loxP*, *mat $\alpha$* ) and L40 $\Delta$ Gal4 (*mat $\alpha$* ) yeast strains as previously described in [25]. 129 His<sup>+</sup> colonies were selected on a medium lacking tryptophan, leucine, and histidine. The prey fragments of the positive clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions. The resulting sequences were used to identify the corresponding interacting proteins in the GenBank database (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using a fully automated procedure. A confidence score (PBS, for Predicted Biological Score) was attributed to each interaction as previously described in [26]. The PBS relies on two different levels of analysis. Firstly, a local score takes into account the redundancy and independency of prey fragments, as well as the distribution of reading frames and stop codons in overlapping fragments. Secondly, a global score which takes into account the interactions found in all of the screens performed at Hybrigenics using the same library. This global score represents the probability of an interaction being nonspecific.

### 2.5. Yeast Two-Hybrid Interaction Assays

WT-FlnA-1–8,24 cDNA and those encoding G288R, H743P, and P637Q mutations (G288R, H743P, P637Q-FlnA-1–8,24, respectively) were PCR amplified and cloned in frame (5'-SalI, NotI-3') with the DNA binding domain of *GAL4* in the pPC97 derived vector containing *LEU2* selection reporter (*GAL4*-BD-FlnA). The cDNA encoding the T587-N753 peptide region of PTPN12 identified in the library screen was PCR amplified and cloned in frame (5'-SalI, NotI-3') with the activation domain of *GAL4* in the pPC86 vector containing *TRP1* selection reporter (*GAL4*-AD-PTPN12). The yeast reporter strain PJ69-4A was used and sequentially transfected with recombinant pPC97 and pPC86 plasmids using the lithium acetate method. Cells were patched onto selective (leucine; tryptophan and histidine-deprived L<sup>-</sup>W<sup>-</sup>H<sup>-</sup>) plates that were incubated at 30 °C for 2–6 days. Standard colorimetric  $\beta$ -galactosidase assays performed on liquid cultures were used to verify and quantify the strength of the interaction between the different binding partners tested.

### 2.6. Co-Immunoprecipitation and Immunoblotting

Hek293 cells transfected with C-terminally EGFP-tagged FlnA-WT or FlnA-P637Q 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, Boulogne-Billancourt, France), 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, Illkirch, France) for 1 h at 4 °C. The immunoprecipitates were washed four times with NETF buffer, separated by SDS-PAGE, and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Transblot, Marnes-la-Coquette, France). Immunoblots were probed with appropriate antibodies and revealed using an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare, Buc, France). Chemiluminescence signals were quantified using an Imager system (Roche Diagnostic, Boulogne-Billancourt, France) and the data normalized with respect to GAPDH.

### 2.7. Pulldown Experiments

The cDNA fragment encoding the peptide region of hum-PTPN12 (Pro600-Asp709) was PCR amplified and cloned in PGEX-6P1 vector to produce GST-PTPN12 fusion protein. The GST-PTPN12 and GST-PTPN12- $\Delta$ Pro in which the proline-rich region (674-PPPLPERTP-682) of PTPN12 was deleted, were produced in BL21 *Escherichia coli* (*E. Coli*) and purified using glutathione agarose 4B beads (Macherey-Nagel, Hoerd, France) as previously described in [24]. The GST-fusion proteins (30  $\mu$ g) were incubated for 1 h at 4 °C with 500  $\mu$ g of cleared cellular lysates prepared from melanoma cells stably transfected with FlnA-WT or FlnA-P637Q 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>, and 1 $\times$  protease inhibitor cocktail (Roche). The beads were washed four times with cell lysis buffer and bound proteins separated by SDS-PAGE. Bound FlnAs were detected by immunoblotting using an anti-FlnA antibody. A similar protocol using GST-RhoA-Q63L and anti-p190RhoGAP antibody was performed to test p190RhoGAP activation status.

## 3. Results

### 3.1. A Yeast Two-Hybrid Library Screen Identified PTPN12 as A FlnA Binding Partner

Based on (1) the observation that all MVP-associated FlnA mutations target the same N-terminal region of the protein namely: the Igl-1 (G288R), Igl-4 (P637Q), Igl-5 (V711D and H743P), and Igl-6–7 ( $\Delta$ 761-943); (2) the fact that FlnA-associated MVP patients shared very similar clinical features; (3) the notion that the dimerization of FlnA polypeptides determines its association with specific binding partners [27]; and (4) the impossibility to use the full-length FlnA because of its size, we chose to use the first eight repeats of FlnA fused to its dimerization domain (24th Igl) as a bait to screen a human placental cDNA library in a LexA-based yeast two-hybrid assay (Figure 1A). 79.4 million clones (eight-fold the complexity of the library) were screened and HIS-positive clones isolated on leucine-, tryptophan-, and histidine-free selection medium. The sequencing of one of the positive clones identified the region (residue 587–753) of the tyrosine phosphatase PTPN12/PTP-PEST. Interestingly, this domain of PTPN12 encodes a proline-rich motif that was shown to participate to FlnA/PTPN12 interaction, suggesting the Igl repeat 1–8 region of FlnA constitute its yet unknown interaction domain with PTPN12 [28]. We then tested the impact of the FlnA-MVP mutations on FlnA/PTPN12 interactions.

### 3.2. MVP-Associated FlnA Mutations Impede its Interactions with PTPN12

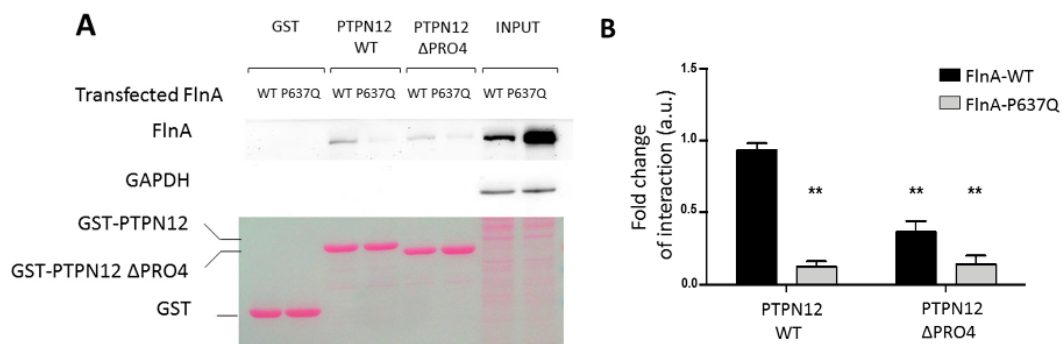
#### 3.2.1. Yeast Two-Hybrid Assay

To confirm the FlnA/PTPN12 interaction we observed using the LexA-based two-hybrid system, and to test the effects of the mutations on this interaction, we used another yeast two-hybrid assay based on the *GAL4* transcription factor. As illustrated on Figure 1, the yeasts co-expressing *GAL4*-AD-PTPN12 and *GAL4*-BD-FlnA-WT grew on the selective L<sup>-</sup>W<sup>-</sup>H<sup>-</sup> plates (Figure 1B, second lane) although less rapidly than those co-transfected with the two strongly-interacting partners used as a positive control, *GAL4*-AD-Pick1 and *GAL4*-BD-CT7 (Figure 1B, bottom lane). These data confirmed the direct PTPN12/FlnA interaction and showed it could also be detected using this interaction trap assay. We then

tested the effects of the MVP-FlnA mutations. Interestingly, neither FlnA-G288R, P637Q, H743P, nor CT7 (used as a negative control, top lane) enabled growth of PTPN12-expressing yeasts in the L<sup>-</sup>W<sup>-</sup>H<sup>-</sup> selection medium (Figure 1B). Importantly, all the yeasts grew equally well when the medium was supplemented with histidine, excluding potential toxicity biases due to exogenous protein overexpression (Figure 1B, right-hand image). The loss of interaction was quantified using  $\beta$ -galactosidase assay performed on liquid culture. As shown on Figure 1C, the FlnA mutations leveled down the galactosidase activity, which represents the PTPN12/FlnA-WT binding strength, to that measured with the negative control (CT7), suggesting a complete loss of interaction with PTPN12.

### 3.2.2. Pulldown and Co-Immunoprecipitation Assays

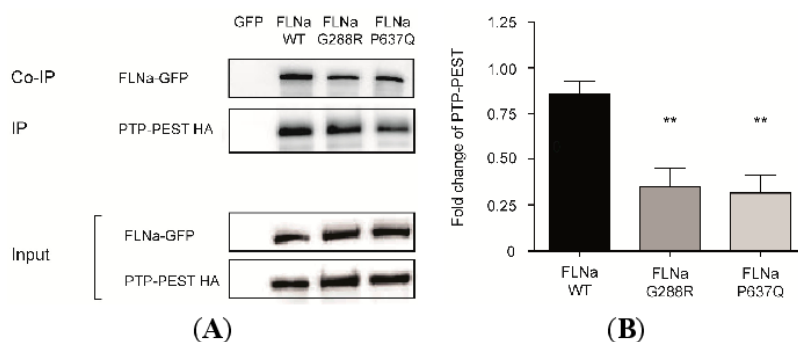
FlnA/PTPN12 interactions were then challenged in a pulldown assay using the interaction domain of PTPN12 fused to GST protein and melanoma cell lines stably expressing FlnA-WT and FlnA-P637Q [24]. In this assay (Figure 2), FlnA-WT was specifically retained on GST-PTPN12 (Figure 2, lane three) but not by GST or the mutant GST-PTPN12 construct in which the proline-rich domain (674-PPPLPERTP-682) of PTPN12 previously shown to participate to PTPN12-FlnA interactions (GST-PTPN12- $\Delta$ Pro), was deleted (Figure 2 lanes one and five, respectively). Importantly, FlnA-P637Q did not interact with any of these GST constructs (Figure 2) even when larger amount of FlnA-P637Q was loaded on the beads (see input signals). Quantification revealed over 75% reduction of the FlnA-P637Q pulled down with respect to FlnA-WT (histogram on Figure 2).



**Figure 2.** Effects of Filamin A mutations on FlnA/PTPN12 interaction. A) Pull-down assay. Equal amounts of GST, GST-PTPN12 or GST-PTPN12- $\Delta$ Pro (lower image Red Ponceau coloration) were incubated with lysates of cells expressing FlnA-WT or FlnA-P637Q. Despite much larger expression of P637Q mutant in this experiment (input lanes), only FlnA-WT was readily detectable in GST-PTPN12 pull-down (lanes three and five). Deletion of the proline-rich domain of PTPN12 abolished PTPN12/FlnA interaction. Note the absence of detectable GAPDH contamination in the pull-down assays, which attests to low background and absence of unspecific binding in these experiments. B) Quantification from four similar experiments. \*\* indicates significant differences in the amount of retained FlnAs vs. FlnA-WT using GST-PTPN12 ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ).

The interactions were then tested in a cellular context. Full-length HA-tagged PTPN12 was co-transfected with GFP-tagged-FlnA-WT, G288R or P637Q in Hek293 cells. As shown in Figure 3,

both mutations significantly reduced by more than 60% ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) the FlnA co-immunoprecipitated with HA-PTPN12 using anti-HA antibody.



**Figure 3.** Effects of Filamin A mutations on FlnA/PTPN12. **(A)** Co-immunoprecipitation assay. HA-tagged PTPN12 (HA-PTPN12) was co-transfected with GFP or GFP-tagged-FlnAs in Hek293 cells and immunoprecipitated using anti-HA antibody (IP). G288R and P637Q mutations significantly reduced the amount of FlnA co-IPed with PTPN12 (Co-IP) (lanes 3,4 upper blot). **(B)** Quantification of four similar experiments. \*\* indicates significant differences in the amount of co-immunoprecipitated FlnAs vs. FlnA-WT ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ).

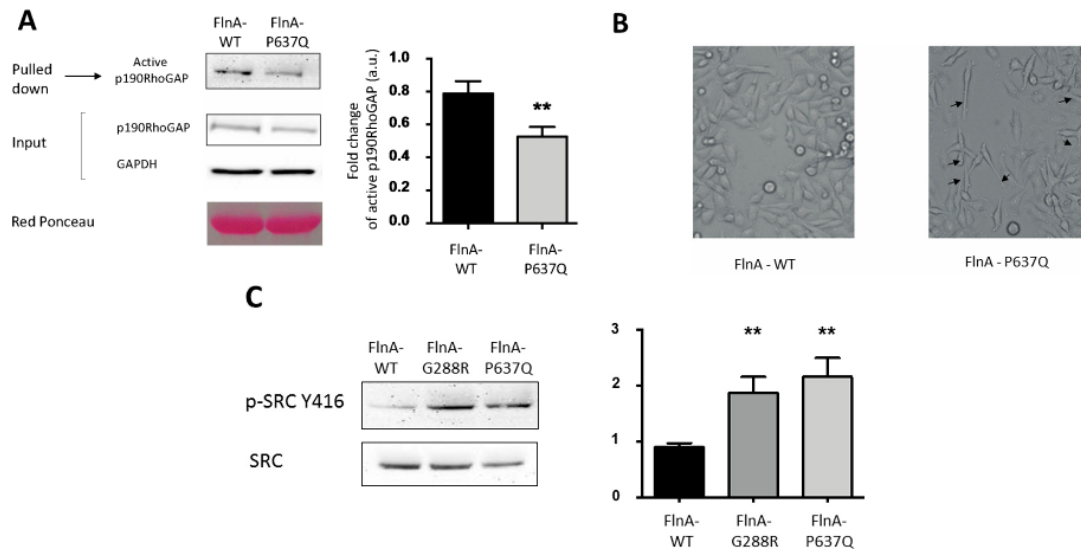
Together, these data are consistent with a model according to which FlnA repeats domain 1–8 constitute a structural element that interacts with the proline-rich region of PTPN12, and that the mutations G288R, P637Q, and potentially H743P, affect this molecular interface. We then analyzed the effects of FlnA mutations on the phosphorylation status of PTPN12 target substrates potentially affected in the physiopathological context of MVP.

### 3.3. PTPN12-FlnA Interactions Participate to p190RhoGAP and Src Regulation

In our previous studies we showed that the MVP-FlnA mutations tilt the RhoA/Rac1 GTPases balance toward increased RhoA activity and impede the cellular adhesion and migration capacities [24]. On the other hand, PTPN12 is known to regulate the tyrosine phosphorylation status and the activity of key actors of the RhoA GTPase pathway, extracellular matrix/cell interaction, cell adhesion, and migration signaling pathways, including the RhoA GTPase activating protein p190RhoGAP and the Src family kinase [20,29]. We, thus, investigated the impact of the FlnA mutations on these two actors. p190RhoGAP activity was tested in a set of pulldown experiments using the GST fused to activated RhoA as a bait (GST-RhoA-Q63L) to specifically isolate active RhoA-GAP regulators, including p190RhoGAP [30]. As shown in Figure 4A, and consistent with an increased cellular RhoA activity [24], a significantly lower amount of p190RhoGAP (40% decrease  $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) was isolated in FlnA-P637Q cells compared to FlnA-WT cells. On the other hand, the close inspection of cell morphologies during migration corroborated these results and suggested that FlnA-PTPN12 interaction might participate to PTPN12 targeting to specific subcellular domains. Indeed, as shown in Figure 4B, P637Q (and FlnA-G288R not shown) cells exhibited persistent and long trailing tails compared to FlnA-WT cells. Puzzling enough, this feature was reminiscent of the observation made by Sastry and colleagues according to which PTPN12 knock down fibroblasts also “develop long, thin tails in the rear” [29]. One can speculate



that altered FlnA-PTPN12 interaction impairs PTPN12 targeting to the trailing tails of migrating cells and that locally impair p190RhoGAP tyrosine status, RhoA activity, and focal adhesion retraction.



**Figure 4.** FlnA mutations increase p190RhoGAP activation and Src phosphorylation. **(A)** Active RhoA activating proteins were pulled down using GST-RhoA-Q63L constructs from melanoma cells expressing FlnA-WT or P637Q and the amount of p190RhoGAP retained, quantified by Western blotting. The upper blot shows less p190RhoGAP was retained from FlnA-P637Q cells. \*\* indicates significant differences in the amount of retained p190RhoGAP in FlnA-P637Q vs. FlnA-WT cells ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ); **(B)** phase contrast images of migrating FlnA-WT and P637Q transfected melanoma cells. Note the long and persistent trailing tails observed in FlnA-P637Q cells (arrow heads); and **(C)** phosphorylation of tyrosine Y416 of Src (phospho-Src-Y416) was significantly increased in FlnA-G288R and P637Q transfected cells vs. FlnA-WT cells. \*\* indicates significant differences vs. FlnA-WT ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ).

Phosphorylated tyrosine (Y416) of Src, which participates in focal adhesion maturation and signaling, is another known target of PTPN12 [31]. We, thus, analyzed Src phosphorylation status in mutant FlnA-expressing cells. As shown on Figure 4C, phosphorylated Src-Y416 levels detected in FlnA-G288R and P637Q cells using pSrc-Y416 antibody almost doubled compared to FlnA-WT expressing cells ( $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ).

#### 4. Discussion

The tyrosine phosphatase PTPN12/PTP-PEST was previously shown to interact with FlnA through one of its proline-rich domains but the counterpart binding domain on FlnA remained undefined [28]. Here, we have uncovered that the first eight repeats of FlnA constitute a binding site for PTPN12/PTP-PEST and showed that the FlnA mutations associated to mitral valve prolapse that specifically target this region disrupt PTPN12/FlnA interaction.

PTPN12 is a ubiquitously-expressed phosphatase which has been implicated in immune response and vascular development in part because of its roles in cell-ECM interaction, cell migration, and small GTPases signaling pathways. Considering the large crossover of these pathways with those in which FlnA also participates, it is inciting to speculate that the disruption of their interaction could have a role in the development of MVP in FlnA mutation carriers. The fact that the three mutations tested here all knock down FlnA/PTPN12 interaction suggests, in addition, that similar molecular and cellular mechanisms are at work in the pathology. This is also consistent with the strong homogeneity of the physio-pathological traits observed in the patients, including the poly-valvular damages, the echographic features of the mitral valve prolapse, the early onset of the disease, and the absence of any other symptom. Additionally, not surprising and consistent with the shared, but specific, phenotype, all the mutations target the same narrow region (Igl-1–8 repeats) localized between the two actin binding domains of FlnA [15].

Previous studies identified Ras GTPase, SyK tyrosine kinase, PKC epsilon, and vimentin as binding partners of FlnA N-terminal Igl domains [18,19,32]. However, we did not detect these binding partners in our experiments (not shown). On the other hand, we showed that FlnA-WT does interact with PTPN12, whereas FlnA-G288R, P637Q, and H743P mutations knocked down the PTPN12/FlnA interactions in our two-hybrid assay. In addition, we confirmed this loss of interaction for FlnA-P637Q in both GST pulldown assay and co-immunoprecipitation experiments. The detailed molecular mechanisms of FlnA/PTPN12 interaction remain to be unveiled, but yeast two-hybrid assays strongly suggest a direct interaction between the two partners. Obviously, because of the large crossover in the signaling pathways in which both FlnA and PTPN12 participate they also probably interact through long-range indirect interactions, in large signaling protein complexes. As far as “direct” interaction is concerned, it is tempting to speculate that it specifically involves the N-terminal region of FlnA. Indeed, on one hand, sequence-based classification of FlnA repeats indicated the Igl-4 (targeted by P637Q), and Igl-1 and 5 (targeted by G288R, V711D, and H743P mutations, respectively) belong to distinct repeat subgroups containing other repeats (e.g., subclass C contains Igl repeats one, two, three, and five, while subclass A contains Igl-4 in addition to Igl-9, 12, 17, 19, 21, 23) suggesting PTPN12 may bind other FlnA domains [33]. On the other hand, recent studies showed Igl-3–5 repeats constitute a peculiar three-domain interaction module whose structure is most probably impeded by the mutations. Glycine-288 (G288) is located in Igl-1 at the end of the first  $\beta$ -strand (the A strand) and is the first residue of a GPG motif that makes a helical turn in most Filamin Igl domains (e.g., Igl-16, 18, and 21). Interestingly, in three Filamin Igl domains where this motif is missing, the A-strand is not folded with the rest of the domain [34]. Thus, it is possible that the G288R mutation changes the conformation of Igl-1. Proline-637 (P637) and V711 are residues that point towards the hydrophobic core of Igl-4 and Igl-5, respectively. Substitution of these aliphatic residues with charged side chains in the P637Q and V711D mutations may change the stability of individual domains and also affect the function of the closely-interacting Igl-3–5 triplet [35,36]. Together, these clues suggest FlnA Igl-1–8 constitute a peculiar interaction domain on Filamin A and the major binding site of PTPN12. Future studies will be necessary to ascertain this hypothesis and determine whether the mutations affect the structure and/or mechanosensitivity of this interaction module.

PTP-PEST is a cytosolic ubiquitous protein tyrosine phosphatase (PTP) that contains, in addition to its catalytic domain, several protein-protein interaction domains that allow it to interface with several



signaling pathways. Among others, PTP-PEST was shown to be recruited to the EFG receptor signaling complex [20]. However, previous studies essentially pointed to PTPN12 as a key regulator of cellular motility and cytoskeleton dynamics involved in immunity [21], cancer [20], and development [37]. PTPN12 invalidation is embryologically lethal in mice due to important vascular defects and un-successful liver formation [37]. In fact, PTPN12 is not required for endothelial cell differentiation and proliferation, nor the regulation of endothelial permeability, but is required for integrin-mediated adhesion and migration of endothelial cells [38]. This is in agreement with previous studies showing that PTPN12 substrates include the focal adhesion associated proteins Src kinase, p130Cas, and paxillin, as well as small GTPase regulators [22,29,39]. Importantly, FlnA is known to also be intimately associated with focal adhesion signaling pathway regulation and, indeed, we showed previously that MVP-FlnA mutations deregulate Rho/Rac1 balance and affect cellular spreading and migration resulting from an increased RhoA activity [24]. This is consistent with the lower activity of p190RhoGAP we detected in FlnA-P637Q-expressing cells in the present study. On the other hand, we also noticed that migrating mutant FlnA-expressing cells exhibited long trailing tails typically observed in PTPN12-depleted cells where p190RhoGAP activity is increased [29]. To reconcile these apparent discrepancies, one can speculate that FlnA/PTPN12 interaction participate to the targeting of PTPN12 to specific membrane domains and, thus, to the polarized GTPase regulation in migrating cells, as was recently demonstrated for the PTPN12/ $\beta$ 8 integrin complex [22]. Consistent with this idea, such targeting properties to specific membrane domains were already ascribed to FlnA for one of its binding partner; FilGAP [40].

Interestingly, and coherent with the remarkable restriction of the FlnA mutations' associated defects to cardiac valves that are submitted to intense hemodynamic stresses, the mechanical stress may also modulate PTPN12/FlnA mutation. In fact, the local tension applied to the actin cytoskeleton was shown to modulate FlnA affinity for its binding partners FilGAP and  $\beta$ 7 integrin [41,42]. Whether the mechanical stress also impacts the structure, the binding interface of Igl repeats (1–8) and FlnA/PTPN12 interactions remains to be elucidated [35,36].

## **5. Conclusions**

In conclusion, we have identified here PTPN12 as a specific binding partner of the FlnA domain targeted by the MVP-associated FlnA mutations and showed the later impede FlnA/PTPN12 interaction. The key role of PTPN12 in the regulation of focal adhesion, ECM/cell crosstalk and cellular mechanical stress response signaling pathway make PTPN12 an interesting candidate involved in the physiological processes of FlnA-associated MVP.

## **Acknowledgments**

We thank Steven Nedellec and Philippe Hulin for their technical expertise and assistance in the time lapse experiments that were performed at the core microscopic facility MicroPICell SFR Bonamy in Nantes. This work was funded by The Foundation Leducq, Transatlantic Mitral Network (grant 07CVD04, Paris, France), Clinical Research Hospital Program (PHRC) from the French Ministry of Health (PHRC-I RC12-0143 in 2012), the Fédération Française de Cardiologie, Grant R11065NN/RAK1193NNA (TLT, JM) and the Fondation Coeur et Recherche (FCR PVM-Fed, Paris, France). The Tourneau is supported by Inserm (Inserm Translational Research Program 2012–2016). 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).

### Author Contributions

J.J.S. and J.M. conceived and designed the experiments; D.D., P.L., L.B., T.L.T. performed the experiments, D.D, P.L., L.B., T.L.T., R.A.N., R.R.M., R.L., J.J.S. and J.M. analyzed the data; J.M. wrote the paper.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Delling, F.N.; Rong, J.; Larson, M.G.; Lehman, B.; Osypiuk, E.; Stantchev, P.; Slaugenhaupt, S.A.; Benjamin, E.J.; Levine, R.A.; Vasan, R.S. Familial clustering of mitral valve prolapse in the community. *Circulation* **2015**, *131*, 263–268.
2. Lee, B.; Godfrey, M.; Vitale, E.; Hori, H.; Mattei, M.G.; Sarfarazi, M.; Tsipouras, P.; Ramirez, F.; Hollister, D.W. Linkage of marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature* **1991**, *352*, 330–334.
3. Singh, K.K.; Rommel, K.; Mishra, A.; Karck, M.; Haverich, A.; Schmidtke, J.; Arslan-Kirchner, M. TGFBR1 and TGFBR2 mutations in patients with features of marfan syndrome and loeys-dietz syndrome. *Hum. Mutat.* **2006**, *27*, 770–777.
4. Malfait, F.; Coucke, P.; Symoens, S.; Loeys, B.; Nuytinck, L.; De Paepe, A. The molecular basis of classic ehlers-danlos syndrome: A comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients. *Hum. Mutat.* **2005**, *25*, 28–37.
5. 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.* Mutations in the gene encoding filamin a as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation* **2007**, *115*, 40–49.
6. 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.* Mapping of X-linked myxomatous valvular dystrophy to chromosome xq28. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *62*, 627–632.
7. Holm, T.M.; Habashi, J.P.; Doyle, J.J.; Bedja, D.; Chen, Y.; van Erp, C.; Lindsay, M.E.; Kim, D.; Schoenhoff, F.; Cohn, R.D.; *et al.* Noncanonical TGF $\beta$  signaling contributes to aortic aneurysm progression in marfan syndrome mice. *Science* **2011**, *332*, 358–361.
8. Lacro, R.V.; Dietz, H.C.; Sleeper, L.A.; Yetman, A.T.; Bradley, T.J.; Colan, S.D.; Pearson, G.D.; Selamet Tierney, E.S.; Levine, J.C.; Atz, A.M.; *et al.* Atenolol versus losartan in children and young adults with marfan's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2061–2071.

9. Robertson, S.P.; Jenkins, Z.A.; Morgan, T.; Ades, L.; Aftimos, S.; Boute, O.; Fiskerstrand, T.; Garcia-Minaur, S.; Grix, A.; Green, A.; *et al.* Frontometaphyseal dysplasia: Mutations in *flna* and phenotypic diversity. *Am. J. Med. Genet. A* **2006**, *140*, 1726–1736.
10. Sheen, V.L.; Dixon, P.H.; Fox, J.W.; Hong, S.E.; Kinton, L.; Sisodiya, S.M.; Duncan, J.S.; Dubeau, F.; Scheffer, I.E.; Schachter, S.C.; *et al.* Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 1775–1783.
11. Norris, R.A.; Moreno-Rodriguez, R.; Wessels, A.; Merot, J.; Bruneval, P.; Chester, A.H.; Yacoub, M.H.; Hagege, A.; Slangenaupt, S.A.; Aikawa, E.; *et al.* Expression of the familial cardiac valvular dystrophy gene, filamin-a, during heart morphogenesis. *Dev. Dyn.* **2010**, *239*, 2118–2127.
12. Sauls, K.; de Vlaming, A.; Harris, B.S.; Williams, K.; Wessels, A.; Levine, R.A.; Slangenaupt, S.A.; Goodwin, R.L.; Pavone, L.M.; Merot, J.; *et al.* Developmental basis for filamin-a-associated myxomatous mitral valve disease. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *96*, 109–119.
13. Stossel, T.P.; Condeelis, J.; Cooley, L.; Hartwig, J.H.; Noegel, A.; Schleicher, M.; Shapiro, S.S. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2001**, *2*, 138–145.
14. Feng, Y.; Walsh, C.A. The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat. Cell. Biol.* **2004**, *6*, 1034–1038.
15. Nakamura, F.; Osborn, T.M.; Hartemink, C.A.; Hartwig, J.H.; Stossel, T.P. Structural basis of filamin a functions. *J. Cell. Biol.* **2007**, *179*, 1011–1025.
16. Nakamura, F.; Stossel, T.P.; Hartwig, J.H. The filamins: Organizers of cell structure and function. *Cell. Adh. Migr.* **2011**, *5*, 160–169.
17. Zhou, A.X.; Hartwig, J.H.; Akyurek, L.M. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell. Biol.* **2010**, *20*, 113–123.
18. Gawecka, J.E.; Griffiths, G.S.; Ek-Rylander, B.; Ramos, J.W.; Matter, M.L. R-ras regulates migration through an interaction with filamin a in melanoma cells. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11269.
19. Kim, H.; Nakamura, F.; Lee, W.; Hong, C.; Perez-Sala, D.; McCulloch, C.A. Regulation of cell adhesion to collagen via  $\beta 1$  integrins is dependent on interactions of filamin a with vimentin and protein kinase c epsilon. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 1829–1844.
20. Zheng, Y.; Lu, Z. Regulation of tumor cell migration by protein tyrosine phosphatase (PTP)-proline-, glutamate-, serine-, and threonine-rich sequence (PEST). *Chin. J. Cancer* **2013**, *32*, 75–83.
21. Rhee, I.; Zhong, M.C.; Reizis, B.; Cheong, C.; Veillette, A. Control of dendritic cell migration, t cell-dependent immunity, and autoimmunity by protein tyrosine phosphatase ptpn12 expressed in dendritic cells. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 888–899.
22. Lee, H.S.; Cheerathodi, M.; Chaki, S.P.; Reyes, S.B.; Zheng, Y.; Lu, Z.; DerMardirossian, C.; Lacy-Hulbert, A.; Rivera, G.M.; McCarty, J.H. Ptp-pest and  $\beta 8$  integrin control spatiotemporal patterns of rhogdi1 activation in migrating cells. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 1401–1413.
23. Boudin, H.; Doan, A.; Xia, J.; Shigemoto, R.; Huganir, R.L.; Worley, P.; Craig, A.M. Presynaptic clustering of *mglur7a* requires the pick1 pdz domain binding site. *Neuron* **2000**, *28*, 485–497.
24. 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.* Valvular dystrophy associated filamin a mutations reveal a new role of its first repeats in small-gtpase regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 234–244.

25. Fromont-Racine, M.; Rain, J.C.; Legrain, P. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genet.* **1997**, *16*, 277–282.
26. Formstecher, E.; Aresta, S.; Collura, V.; Hamburger, A.; Meil, A.; Trehin, A.; Reverdy, C.; Betin, V.; Maire, S.; Brun, C.; *et al.* Protein interaction mapping: A drosophila case study. *Genome Res.* **2005**, *15*, 376–384.
27. Nakamura, F.; Heikkinen, O.; Pentikainen, O.T.; Osborn, T.M.; Kasza, K.E.; Weitz, D.A.; Kupiainen, O.; Permi, P.; Kilpelainen, I.; Ylanne, J.; *et al.* Molecular basis of filamin a-filgap interaction and its impairment in congenital disorders associated with filamin a mutations. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4928.
28. Playford, M.P.; Lyons, P.D.; Sastry, S.K.; Schaller, M.D. Identification of a filamin docking site on ptp-pest. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 34104–34112.
29. Sastry, S.K.; Rajfur, Z.; Liu, B.P.; Cote, J.F.; Tremblay, M.L.; Burrige, K. Ptp-pest couples membrane protrusion and tail retraction via VAV2 and p190RhoGAP. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 11627–11636.
30. Guilluy, C.; Dubash, A.D.; Garcia-Mata, R. Analysis of rhoa and rho gef activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 2050–2060.
31. Zheng, Y.; Yang, W.; Xia, Y.; Hawke, D.; Liu, D.X.; Lu, Z. Ras-induced and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 phosphorylation-dependent isomerization of protein tyrosine phosphatase (ptp)-pest by pin1 promotes fak dephosphorylation by ptp-pest. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 4258–4269.
32. Falet, H.; Pollitt, A. Y.; Begonja, A.J.; Weber, S.E.; Duerschmied, D.; Wagner, D.D.; Watson, S.P.; Hartwig, J.H. A novel interaction between flna and syk regulates platelet itam-mediated receptor signaling and function. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 1967–1979.
33. Ithychanda, S.S.; Hsu, D.; Li, H.; Yan, L.; Liu, D.D.; Das, M.; Plow, E.F.; Qin, J. Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: Implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 35113–35121.
34. Heikkinen, O.K.; Ruskamo, S.; Konarev, P.V.; Svergun, D.I.; Iivanainen, T.; Heikkinen, S.M.; Permi, P.; Koskela, H.; Kilpelainen, I.; Ylanne, J. Atomic structures of two novel immunoglobulin-like domain pairs in the actin cross-linking protein filamin. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25450–25458.
35. Sethi, R.; Ylanne, J. Small-angle x-ray scattering reveals compact domain-domain interactions in the N-terminal region of filamin c. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107457.
36. Sethi, R.; Seppala, J.; Tossavainen, H.; Ylilauhi, M.; Ruskamo, S.; Pentikainen, O.T.; Pentikainen, U.; Permi, P.; Ylanne, J. A novel structural unit in the N-terminal region of filamins. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 8588–8598.
37. Sirois, J.; Cote, J.F.; Charest, A.; Uetani, N.; Bourdeau, A.; Duncan, S.A.; Daniels, E.; Tremblay, M.L. Essential function of ptp-pest during mouse embryonic vascularization, mesenchyme formation, neurogenesis and early liver development. *Mech. Dev.* **2006**, *123*, 869–880.
38. Souza, C.M.; Davidson, D.; Rhee, I.; Gratton, J.P.; Davis, E.C.; Veillette, A. The phosphatase ptp-pest/ptpn12 regulates endothelial cell migration and adhesion, but not permeability, and controls vascular development and embryonic viability. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 43180–43190.

39. Angers-Loustau, A.; Cote, J.F.; Charest, A.; Dowbenko, D.; Spencer, S.; Lasky, L.A.; Tremblay, M.L. Protein tyrosine phosphatase-pest regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **1999**, *144*, 1019–1031.
40. Ohta, Y.; Hartwig, J.H.; Stossel, T.P. Filgap, a rho- and rock-regulated gap for rac binds filamin a to control actin remodelling. *Nat. Cell. Biol.* **2006**, *8*, 803–814.
41. Ehrlicher, A.J.; Nakamura, F.; Hartwig, J.H.; Weitz, D.A.; Stossel, T.P. Mechanical strain in actin networks regulates filgap and integrin binding to filamin A. *Nature* **2011**, *478*, 260–263.
42. Razinia, Z.; Makela, T.; Ylanne, J.; Calderwood, D.A. Filamins in mechanosensing and signaling. *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, *41*, 227–246.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# BIBLIOGRAPHIE -

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997a). Beta-Catenin Is a Target for the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *The EMBO Journal*, *16*(13), 3797–804. <http://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3797>
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997b). Beta-Catenin Is a Target for the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *The EMBO Journal*, *16*(13), 3797–804. <http://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3797>
- Ackley, B. D. (2005). The Two Isoforms of the *Caenorhabditis elegans* Leukocyte-Common Antigen Related Receptor Tyrosine Phosphatase PTP-3 Function Independently in Axon Guidance and Synapse Formation. *Journal of Neuroscience*, *25*(33), 7517–7528. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2010-05.2005>
- Ahmad, F., Considine, R. V., & Goldstein, B. J. (1995). Increased abundance of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR accounts for the elevated insulin receptor dephosphorylating activity in adipose tissue of obese human subjects. *Journal of Clinical Investigation*, *95*(6), 2806–2812. <http://doi.org/10.1172/JCI117985>
- Ahmad, F., & Goldstein, B. J. (1997). Functional association between the insulin receptor and the transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR in intact cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(1), 448–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995282>
- Akhurst, R. J., Lehnert, S. a, Faissner, a, & Duffie, E. (1990). TGF beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *108*(4), 645–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1696875>
- Alfieri, C. M., Cheek, J., Chakraborty, S., & Yutzey, K. E. (2010). Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction. *Developmental Biology*, *338*(2), 127–135. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.11.030>
- Anakwe, K., Robson, L., Hadley, J., Buxton, P., Church, V., Allen, S., ... Francis-West, P. (2003). Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development*, *130*(15), 3503–3514. <http://doi.org/10.1242/dev.00538>
- Arakawa, R., Bagashev, A., Song, L., Maurer, K., & Sullivan, K. E. (2010). Characterization of LRRFIP1. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *88*(6), 899–906. <http://doi.org/10.1139/o10-014>
- Arce, L., Pate, K. T., & Waterman, M. L. (2009). Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC Cancer*, *9*, 159. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-9-159>
- Ariake, K., Ohtsuka, H., Motoi, F., Douchi, D., Oikawa, M., Rikiyama, T., ... Unno, M. (2012). GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation. *Cancer Letters*, *325*(1), 99–107. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.012>
- Armstrong, E. J., & Bischoff, J. (2010). Heart Valve Development, *95*(5), 459–470. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000141146.95728.da.Heart>
- Attisano, L., & Wrana, J. L. (2013). Signal integration in TGF- $\beta$ , WNT, and Hippo pathways. *F1000prime Reports*, *5*(June), 17. <http://doi.org/10.12703/P5-17>
- Azhar, M., Runyan, R. B., Gard, C., Sanford, L. P., Miller, M. L., Andringa, A., ... Doetschman, T. (2009). Ligand-specific function of transforming growth factor beta in epithelial-mesenchymal transition in heart development. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *238*(2), 431–442. <http://doi.org/10.1002/dvdy.21854>
- Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., & Basler, K. (2006). Wntless, a Conserved Membrane Protein Dedicated to the Secretion of Wnt Proteins from Signaling Cells. *Cell*, *125*(3), 509–522. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.049>



- Beals, C. R., Clipstone, N. A., Ho, S. N., & Crabtree, G. R. (1997). Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes and Development*, *11*(7), 824–834. <http://doi.org/10.1101/gad.11.7.824>
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., & Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/382638a0>
- Beltran, P. J., & Bixby, J. L. (2003). Receptor protein tyrosine phosphatases as mediators of cellular adhesion. *Front Biosci*, *8*, d87-99. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12456340](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12456340)
- Beppu, H., Malhotra, R., Beppu, Y., Lepore, J. J., Parmacek, M. S., Bloch, K. D., ... Kaartinen, V. (2005). BMP type II receptor regulates positioning of outflow tract and remodeling of atrioventricular cushion during cardiogenesis. *Developmental Biology*, *301*(1), 276–286. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.07.035>
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., ... Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/382225a0>
- Bilwes, a M., den Hertog, J., Hunter, T., & Noel, J. P. (1996). Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/382555a0>
- Blevins, T. L., Carroll, J. L., Raza, A. M., & Grande-Allen, K. J. (2006). Phenotypic characterization of isolated valvular interstitial cell subpopulations. *The Journal of Heart Valve Disease*, *15*(6), 815–22. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/17152790>
- Bosada, F. M., Devasthali, V., Jones, K. A., & Stankunas, K. (2016). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling enables developmental transitions during valvulogenesis. *Development*, (February), 1041–1054. <http://doi.org/10.1242/dev.130575>
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J. M., Cisneros, E., & Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of Cell Science*, *121*(Pt 6), 737–46. <http://doi.org/10.1242/jcs.026096>
- Boyer, A. S., Ayerinkas, I. I., Vincent, E. B., McKinney, L. A., Weeks, D. L., & Runyan, R. B. (1999). TGFbeta2 and TGFbeta3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Developmental Biology*, *208*(2), 530–45. <http://doi.org/10.1006/dbio.1999.9211>
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S. F., Tosello-Trampont, A.-C., ... Ravichandran, K. S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nature Cell Biology*, *4*(8), 574–582. <http://doi.org/10.1038/ncb824>
- Bryan T. MacDonald; Keiko Tamai and Xi He. (2010a). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Biology*, *17*(1), 9–26. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016.Wnt/>
- Bryan T. MacDonald; Keiko Tamai and Xi He. (2010b). Wnt beta-catenin signaling components, mechanisms, and diseases. *Developmental Biology*, *17*(1), 9–26. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016.Wnt/>
- Butcher, J. T., & Markwald, R. R. (2007). Valvulogenesis: the moving target. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *362*(1484), 1489–1503. <http://doi.org/10.1098/rstb.2007.2130>
- Butcher, J. T., Tressel, S., Johnson, T., Turner, D., Sorescu, G., Jo, H., & Nerem, R. M. (2006). Transcriptional profiles of valvular and vascular endothelial cells reveal phenotypic differences: Influence of shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and*

- Vascular Biology*, 26(1), 69–77. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000196624.70507.0d>
- Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF / LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 4(11), 1–22. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>
- Cai, X., Nomura-Kitabayashi, A., Cai, W., Yan, J., Christoffels, V. M., & Cai, C. L. (2011). Myocardial Tbx20 regulates early atrioventricular canal formation and endocardial epithelial-mesenchymal transition via Bmp2. *Developmental Biology*, 360(2), 381–390. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.09.023>
- Cai, X., Zhang, W., Hu, J., Zhang, L., Sultana, N., Wu, B., ... Cai, C.-L. (2013). Tbx20 acts upstream of Wnt signaling to regulate endocardial cushion formation and valve remodeling during mouse cardiogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 140(15), 3176–87. <http://doi.org/10.1242/dev.092502>
- Cai, Y., Jin, J., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Sorokina, I., Parmely, T. J., ... Conaway, J. W. (2003). Identification of New Subunits of the Multiprotein Mammalian TRRAP/TIP60-containing Histone Acetyltransferase Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 42733–42736. <http://doi.org/10.1074/jbc.C300389200>
- Caira, F. C., Stock, S. R., Gleason, T. G., McGee, E. C., Huang, J., Bonow, R. O., ... Rajamannan, N. M. (2006). Human Degenerative Valve Disease Is Associated With Up-Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 Receptor-Mediated Bone Formation. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8), 1707–1712. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.02.040>
- Cambier, L., Plate, M., Sucov, H. M., & Pashmforoush, M. (2014). Nkx2-5 regulates cardiac growth through modulation of Wnt signaling by R-spondin3. *Development (Cambridge, England)*, 141(15), 2959–71. <http://doi.org/10.1242/dev.103416>
- Camenisch, T. D., Molin, D. G. M., Person, A., Runyan, R. B., Gittenberger-de Groot, A. C., McDonald, J. A., & Klewer, S. E. (2002). Temporal and distinct TGFbeta ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis. *Developmental Biology*, 248(1), 170–81. <http://doi.org/10.1006/dbio.2002.0731>
- Camenisch, T. D., Schroeder, J. a, Bradley, J., Klewer, S. E., & McDonald, J. a. (2002). Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors. *Nature Medicine*, 8(8), 850–5. <http://doi.org/10.1038/nm742>
- Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. Lou, Calabro, A., ... McDonald, J. A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *Journal of Clinical Investigation*, 106(3), 349–360. <http://doi.org/10.1172/JCI10272>
- Carrera, I., Janody, F., Leeds, N., Duvéau, F., & Treisman, J. E. (2008). Pygopus activates Wingless target gene transcription through the mediator complex subunits Med12 and Med13. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18), 6644–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0709749105>
- Cavallo, R. a, Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. a, Clevers, H., ... Bejsovec, a. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, 395(6702), 604–608. <http://doi.org/10.1038/26982>
- Chang, A. C. Y., Fu, Y., Garside, V. C., Niessen, K., Chang, L., Fuller, M., ... Karsan, A. (2011). Notch Initiates the Endothelial-to-Mesenchymal Transition in the Atrioventricular Canal through Autocrine Activation of Soluble Guanylyl Cyclase. *Developmental Cell*, 21(2), 288–300. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.022>
- Chang, C. P., Neilson, J. R., Bayle, J. H., Gestwicki, J. E., Kuo, A., Stankunas, K., ... Crabtree, G. R. (2004). A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell*, 118(5), 649–663.

- <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.010>
- Chen, B., Bronson, R. T., Klamann, L. D., Hampton, T. G., Wang, J. F., Green, P. J., ... Neel, B. G. (2000). Mice mutant for *Egfr* and *Shp2* have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nature Genetics*, *24*(3), 296–299. <http://doi.org/10.1038/73528>
- Chen, J., Luo, Q., Yuan, Y., Huang, X., Cai, W., Li, C., ... Li, B. (2010). Pygo2 associates with MLL2 histone methyltransferase and GCN5 histone acetyltransferase complexes to augment Wnt target gene expression and breast cancer stem-like cell expansion. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(24), 5621–35. <http://doi.org/10.1128/MCB.00465-10>
- Chen, V. C., Stull, R., Joo, D., Cheng, X., & Keller, G. (2008). Notch signaling respecifies the hemangioblast to a cardiac fate. *Nature Biotechnology*, *26*(10), 1169–1178. <http://doi.org/10.1038/nbt.1497>
- Choe, N., Kwon, J. S., Kim, J. R., Eom, G. H., Kim, Y., Nam, K. Il, ... Kook, H. (2013). The microRNA miR-132 targets *Lrrfip1* to block vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Atherosclerosis*, *229*(2), 348–355. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.009>
- Clandinin, T. R., Lee, C. H., Herman, T., Lee, R. C., Yang, A. Y., Ovasapyan, S., & Zipursky, S. L. (2001). *Drosophila* LAR regulates R1-R6 and R7 target specificity in the visual system. *Neuron*, *32*(2), 237–248. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00474-3](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00474-3)
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*, *149*(6), 1192–1205. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Cong, F., & Varmus, H. (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 2882–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0307344101>
- Cselenyi, C. S., Jernigan, K. K., Tahinci, E., Thorne, C. A., Lee, L. A., & Lee, E. (2008). LRP6 Transduces a Canonical Wnt Signal Independently of Axin Degradation by Inhibiting GSK3's Phosphorylation of  $\beta$ -Catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(23), 8032–8037. <http://doi.org/10.1073/pnas.0803025105>
- Dai, P., Jeong, S. Y., Yu, Y., Leng, T., Wu, W., Xie, L., & Chen, X. (2009). Modulation of TLR signaling by multiple MyD88-interacting partners including leucine-rich repeat Fli-1-interacting proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *182*(6), 3450–60. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0802260>
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S. M., Yeo, M., Good, V. M., Thompson, V., ... Pearl, L. H. (2003). Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  to the axin-APC scaffold complex. *The EMBO Journal*, *22*(3), 494–501. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg068>
- Dal-Bianco, J. P., Aikawa, E., Bischoff, J., Guerrero, J. L., Handschumacher, M. D., Sullivan, S., ... Carpentier, A. (2009). Active adaptation of the tethered mitral valve: Insights into a compensatory mechanism for functional mitral regurgitation. *Circulation*, *120*(4), 334–342. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.846782>
- Daly, A. C., Randall, R. A., & Hill, C. S. (2008). Transforming growth factor  $\beta$ -induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(22), 6889–902. <http://doi.org/10.1128/MCB.01192-08>
- Daniels, D. L., & Weis, W. I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, *12*(4), 364–371. <http://doi.org/10.1038/nsmb912>
- De Lange, F. J., Moorman, A. F. M., Anderson, R. H., Männer, J., Soufan, A. T., De Gier-De Vries, C., ... Christoffels, V. M. (2004). Lineage and morphogenetic analysis of the

- cardiac valves. *Circulation Research*, 95(6), 645–654. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000141429.13560.cb>
- de Lau, W., Barker, N., Low, T. Y., Koo, B.-K., Li, V. S. W., Teunissen, H., ... Clevers, H. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 476(7360), 293–297. <http://doi.org/10.1038/nature10337>
- Debant, A., Serra-Pagès, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S. H., & Streuli, M. (1996). The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5466–5471. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5466>
- Dietz, H. C., Cutting, G. R., Pyeritz, R. E., Maslen, C. L., Sakai, L. Y., Corson, G. M., ... Curristin, S. M. (1991). Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/352337a0>
- Dina, C., Bouatia-Naji, N., Tucker, N., Delling, F. N., Toomer, K., Durst, R., ... Jeunemaitre, X. (2015a). Genetic association analyses highlight biological pathways underlying mitral valve prolapse. *Nature Genetics*, 47(10), 1206–11. <http://doi.org/10.1038/ng.3383>
- Dina, C., Bouatia-Naji, N., Tucker, N., Delling, F. N., Toomer, K., Durst, R., ... Jeunemaitre, X. (2015b). Genetic association analyses highlight biological pathways underlying mitral valve prolapse. *Nature Genetics*, 47(10), 1206–11. <http://doi.org/10.1038/ng.3383>
- Dor, Y., Camenisch, T. D., Itin, A., Fishman, G. I., McDonald, J. A., Carmeliet, P., & Keshet, E. (2001). A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects. *Development*, 128, 1531–1538.
- Douchi, D., Ohtsuka, H., Ariake, K., Masuda, K., Kawasaki, S., Kawaguchi, K., ... Unno, M. (2015). Silencing of LRRFIP1 reverses the epithelial-mesenchymal transition via inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Cancer Letters*, 365(1), 132–140. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.05.023>
- Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., ... Piccolo, S. (2009). FAM/USP9x, a Deubiquitinating Enzyme Essential for TGF-beta Signaling, Controls Smad4 Monoubiquitination. *Cell*, 136(1), 123–135. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.051>
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., ... Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179–183. <http://doi.org/10.1038/nature10137>
- Durst, R., Sauls, K., Peal, D. S., DeVlaming, A., Toomer, K., Leyne, M., ... Slauchaupt, S. a. (2015). Mutations in DCHS1 cause mitral valve prolapse. *Nature*, 525(7567), 109–113. <http://doi.org/10.1038/nature14670>
- Duval, D., Labbé, P., Bureau, L., Tourneau, T. Le, Norris, R. A., Markwald, R. R., ... Mérot, J. (2015). MVP-Associated Filamin A Mutations Affect FlnA-PTPN12 (PTP-PEST) Interactions, 2(3), 233–247. <http://doi.org/10.3390/jcdd2030233.MVP-Associated>
- Duval, D., Lardeux, A., Le Tourneau, T., Norris, R. A., Markwald, R. R., Sauzeau, V., ... Merot, J. (2014). Valvular dystrophy associated filamin A mutations reveal a new role of its first repeats in small-GTPase regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(2), 324–334. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.022>
- Eden, S., Constancia, M., Hashimshony, T., Dean, W., Goldstein, B., Johnson, A. C., ... Cedar, H. (2001). An upstream repressor element plays a role in Igf2 imprinting. *EMBO Journal*, 20(13), 3518–3525. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.13.3518>
- Epstein, J. a, Li, J., Lang, D., Chen, F., Brown, C. B., Jin, F., ... Lo, C. W. (2000). Migration of cardiac neural crest cells in *Spotch* embryos. *Development (Cambridge, England)*, 127(9), 1869–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751175>

- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9(6), 669–676. <http://doi.org/10.1038/nm0603-669>
- Filip, D. a, Radu, a, & Simionescu, M. (1986). Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells. *Circulation Research*, 59(3), 310–320. <http://doi.org/10.1161/01.RES.59.3.310>
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., & Gessler, M. (2004). The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes and Development*, 18(8), 901–911. <http://doi.org/10.1101/gad.291004>
- Fischer, A., Steidl, C., Wagner, T. U., Lang, E., Jakob, P. M., Friedl, P., ... Gessler, M. (2007). Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. *Circulation Research*, 100(6), 856–863. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000260913.95642.3b>
- Fisher, D., Xing, B., Dill, J., Li, H., Hoang, H. H., Zhao, Z., ... Li, S. (2011). Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(40), 14051–66. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1737-11.2011>
- Fong, K. S., & de Couet, H. G. (1999). Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system. *Genomics*, 58(2), 146–57. <http://doi.org/10.1006/geno.1999.5817>
- Freed, L. A., Benjamin, E. J., Levy, D., Larson, M. G., Evans, J. C., Fuller, D. L., ... Levine, R. A. (2002). Mitral valve prolapse in the general population: The benign nature of echocardiographic features in the Framingham Heart Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(7), 1298–1304. [http://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)02161-7](http://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)02161-7)
- Fukumoto, S., Hsieh, C. M., Maemura, K., Layne, M. D., Yet, S. F., Lee, K. H., ... Lee, M. E. (2001). Akt Participation in the Wnt Signaling Pathway through Dishevelled. *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17479–17483. <http://doi.org/10.1074/jbc.C000880200>
- Galvin, K. M., Donovan, M. J., Lynch, C. a, Meyer, R. I., Paul, R. J., Lorenz, J. N., ... Huszar, D. (2000). A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nature Genetics*, 24(february), 171–174. <http://doi.org/10.1038/72835>
- Gan, X. Q., Wang, J. Y., Xi, Y., Wu, Z. L., Li, Y. P., & Li, L. (2008). Nuclear Dvl, c-Jun,  $\beta$ -catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of  $\beta$ -catenin-TCF interaction. *Journal of Cell Biology*, 180(6), 1087–1100. <http://doi.org/10.1083/jcb.200710050>
- Garg, V., Muth, A. N., Ransom, J. F., Schluterman, M. K., Barnes, R., King, I. N., ... Srivastava, D. (2005). Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*, 437(7056), 270–274. <http://doi.org/10.1038/nature03940>
- Garside, V. C., Chang, A. C., Karsan, A., & Hoodless, P. A. (2013). Co-ordinating Notch, BMP, and TGF-beta signaling during heart valve development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(16), 2899–2917. <http://doi.org/10.1007/s00018-012-1197-9>
- Gessert, S., & Kühl, M. (2010). The multiple phases and faces of Wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circulation Research*, 107(2), 186–199. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.221531>
- Giarré, M., Semënov, M. V., & Brown, a M. (1998). Wnt signaling stabilizes the dual-function protein beta-catenin in diverse cell types. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 857, 43–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917831>
- Gitler, A. D., Lu, M. M., Jiang, Y. Q., Epstein, J. A., & Gruber, P. J. (2003). Molecular Markers of Cardiac Endocardial Cushion Development. *Developmental Dynamics*, 228(4), 643–650. <http://doi.org/10.1002/dvdy.10418>

- Gitler, A. D., Zhu, Y., Ismat, F. a, Lu, M. M., Yamauchi, Y., Parada, L. F., & Epstein, J. a. (2003). Nf1 has an essential role in endothelial cells. *Nature Genetics*, 33(1), 75–79. <http://doi.org/10.1038/ng1059>
- Gould, R. A., Yalcin, H. C., Mackay, J. L., Sauls, K., Norris, R., Kumar, S., & Butcher, J. T. (2016). Cyclic Mechanical Loading Is Essential for Rac1-Mediated Elongation and Remodeling of the Embryonic Mitral Valve. *Current Biology*, 26(1), 27–37. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.033>
- Grant, S. F. a, Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., ... Stefansson, K. (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, 38(3), 320–323. <http://doi.org/10.1038/ng1732>
- Grau, J. B., Pirelli, L., Yu, P.-J., Galloway, a C., & Ostrer, H. (2007). The genetics of mitral valve prolapse. *Clinical Genetics*, 72(4), 288–295. <http://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00865.x>
- Grohmann, A., Tanneberger, K., Alzner, A., Schneikert, J., & Behrens, J. (2007). AMER1 regulates the distribution of the tumor suppressor APC between microtubules and the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 21), 3738–3747. <http://doi.org/10.1242/jcs.011320>
- Gubern, C., Cam??s, S., Hurtado, O., Rodr??guez, R., Romera, V. G., Sobrado, M., ... Castellanos, M. (2014). Characterization of Gcf2/Lrrfip1 in experimental cerebral ischemia and its role as a modulator of Akt, mTOR and ??-catenin signaling pathways. *Neuroscience*, 268, 48–65. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.051>
- Gustafsson, B. I., Hauso, O., Drozdov, I., Kidd, M., & Modlin, I. M. (2008). Carcinoid heart disease. *International Journal of Cardiology*. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.02.019>
- Haapasalo, A., Doo, Y. K., Carey, B. W., Turunen, M. K., Pettingell, W. H., & Kovacs, D. M. (2007). Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage regulates association of Leukocyte-common Antigen-related (LAR) receptor tyrosine phosphatase with beta-catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 9063–9072. <http://doi.org/10.1074/jbc.M611324200>
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.-Y., Grinnell, B. W., ... Chen, Y. (1997). Smad7 is required for the development and function of the heart. *Cell*, 89(7), 1165–1173. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80303-7](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80303-7)
- Heath, E., Tahri, D., Andermarcher, E., Schofield, P., Fleming, S., & Boulter, C. A. (2008). Abnormal skeletal and cardiac development, cardiomyopathy, muscle atrophy and cataracts in mice with a targeted disruption of the Nov (Ccn3) gene. *BMC Developmental Biology*, 8, 18. <http://doi.org/10.1186/1471-213X-8-18>
- Hecht, a, Vleminckx, K., Stemmler, M. P., van Roy, F., & Kemler, R. (2000). The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *The EMBO Journal*, 19(8), 1839–1850. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1839>
- Hegde, R. S., & Bernstein, H. D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends in Biochemical Sciences*. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.08.004>
- Henderson, B. R., & Fagotto, F. (2002). The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Reports*, 3(9), 834–9. <http://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf181>
- Hendriksen, J., Fagotto, F., Van Der Velde, H., Van Schie, M., Noordermeer, J., & Fornerod, M. (2005). RanBP3 enhances nuclear export of active beta-catenin independently of CRM1. *Journal of Cell Biology*, 171(5), 785–797. <http://doi.org/10.1083/jcb.200502141>
- Heuberger, J., & Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), 1–26. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a002915>
- Higashi, T., Ikeda, T., Murakami, T., Shirakawa, R., Kawato, M., Okawa, K., ... Horiuchi, H. (2010). Flightless-I (Fli-I) regulates the actin assembly activity of diaphanous-related

- formins (DRFs) Daam1 and mDial1 in cooperation with active Rho GTPase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), 16231–16238. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.079236>
- High, F. A., Lu, M. M., Pear, W. S., Loomes, K. M., Kaestner, K. H., & Epstein, J. A. (2008). Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(6), 1955–1959. <http://doi.org/10.1073/pnas.0709663105>
- Hikasa, H., Ezan, J., Itoh, K., Li, X., Klymkowsky, M. W., & Sokol, S. Y. (2010). Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification. *Developmental Cell*, 19(4), 521–532. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.005>
- Hinton, R. B., & Yutzey, K. E. (2011). Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annual Review of Physiology*, 73(1), 29–46. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142145>
- Hovanes, K., Li, T. W., Munguia, J. E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., ... Waterman, M. L. (2001). Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nature Genetics*, 28(1), 53–57. <http://doi.org/10.1038/ng0501-53>
- Huang, S.-M. a, Mishina, Y. M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G. a, ... Cong, F. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*, 461(7264), 614–620. <http://doi.org/10.1038/nature08356>
- Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., & Birchmeier, W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *The Journal of Cell Biology*, 148(3), 567–78. <http://doi.org/10.1083/jcb.148.3.567>
- Hurlstone, A. F. L., Haramis, A. P. G., Wienholds, E., Begthel, H., Korving, J., Van Eeden, F., ... Clevers, H. (2003). The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature*, 425(6958), 633–637. <http://doi.org/10.1038/nature02030>. Published
- Ilan, N., Mahooti, S., Rimm, D. L., & Madri, J. a. (1999). PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *Journal of Cell Science*, 112 Pt 18, 3005–3014.
- Inui, M., Manfrin, A., Mamidi, A., Martello, G., Morsut, L., Soligo, S., ... Piccolo, S. (2011). USP15 is a deubiquitylating enzyme for receptor-activated SMADs. *Nature Cell Biology*, 13(11), 1368–1375. <http://doi.org/10.1038/ncb2346>
- Iwamoto, R., Mine, N., Kawaguchi, T., Minami, S., Saeki, K., & Mekada, E. (2010). HB-EGF function in cardiac valve development requires interaction with heparan sulfate proteoglycans. *Development (Cambridge, England)*, 137(13), 2205–2214. <http://doi.org/10.1242/dev.048926>
- Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., ... Mekada, E. (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3221–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0537588100>
- Jackson, L. F., Qiu, T. H., Sunnarborg, S. W., Chang, A., Zhang, C., Patterson, C., & Lee, D. C. (2003). Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO Journal*, 22(11), 2704–2716. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg264>
- Jamieson, C., Mills, K. M., Lui, C., Semaan, C., Molloy, M. P., Sharma, M., ... Henderson, B. R. (2016). Characterization of a beta-catenin nuclear localization defect in MCF-7 breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 341(2), 196–206. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.020>
- Jamieson, C., Sharma, M., & Henderson, B. R. (2011). Regulation of beta-catenin nuclear dynamics by GSK-3 $\beta$  involves a LEF-1 positive feedback loop. *Traffic*, 12(8), 983–999. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01207.x>

- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., & Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), 1172–83. <http://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1172>
- Jian, B., Narula, N., Li, Q. Y., Mohler, E. R., & Levy, R. J. (2003). Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Annals of Thoracic Surgery*, 75(2), 457–465. [http://doi.org/10.1016/S0003-4975\(02\)04312-6](http://doi.org/10.1016/S0003-4975(02)04312-6)
- Jiang, G., den Hertog, J., Su, J., Noel, J., Sap, J., & Hunter, T. (1999). Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-alpha. *Nature*, 401(6753), 606–10. <http://doi.org/10.1038/44170>
- Jiao, K., Langworthy, M., Batts, L., Brown, C. B., Moses, H. L., & Baldwin, H. S. (2006). Tgfbeta signaling is required for atrioventricular cushion mesenchyme remodeling during in vivo cardiac development. *Development (Cambridge, England)*, 133(22), 4585–4593. <http://doi.org/10.1242/dev.02597>
- Johnson, K. G., Tenney, A. P., Ghose, A., Duckworth, A. M., Higashi, M. E., Parfitt, K., ... Van Vactor, D. (2006). The HSPGs Syndecan and dallylike bind the receptor phosphatase LAR and exert distinct effects on synaptic development. *Neuron*, 49(4), 517–531. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.026>
- Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., & Groffen, J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genetics*, 11, 415–421. <http://doi.org/10.1038/ng1295-415>
- Kaufmann, N., DeProto, J., Ranjan, R., Wan, H., & Van Vactor, D. (2002). Drosophila liprin-alpha and the receptor phosphatase Dlar control synapse morphogenesis. *Neuron*, 34(1), 27–38. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00643-8](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00643-8)
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., Wu, W., ... Wu, W. (2004). {R-Spondin2} Is a Secreted Activator of {Wnt/β-Catenin} Signaling and Is Required for Xenopus Myogenesis, 7(4), 525–534. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.019>
- Kennell, J. a, O'Leary, E. E., Gummow, B. M., Hammer, G. D., & MacDougald, O. A. (2003). T-cell factor 4N (TCF-4N), a novel isoform of mouse TCF-4, synergizes with beta-catenin to coactivate C/EBPalpha and steroidogenic factor 1 transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, 23(15), 5366–75. <http://doi.org/10.1128/MCB.23.15.5366>
- Khachigian, L. M., Santiago, F. S., Rafty, L. A., Chan, O. L., Delbridge, G. J., Bobik, A., ... Johnson, A. C. (1999). GC factor 2 represses platelet-derived growth factor A-chain gene transcription and is itself induced by arterial injury. *Circulation Research*, 84(11), 1258–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364563>
- Kim, J. S., Crooks, H., Dracheva, T., Nishanian, T. G., Singh, B., Jen, J., & Waldman, T. (2002). Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res*, 62(10), 2744–2748. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12019147](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12019147)
- Kim, L., Kim do, K., Yang, W. I., Shin, D. H., Jung, I. M., Park, H. K., & 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(1), 41–48. <http://doi.org/10.3346/jkms.2008.23.1.41>
- Kinzler, K., Nilbert, M., Su, L., Vogelstein, B., Bryan, T., Levy, D., ... Et, A. (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253(5020), 661–665.



- <http://doi.org/10.1126/science.1651562>
- Ko, J. S., Pramanik, G., Um, J. W., Shim, J. S., Lee, D., Kim, K. H., ... Ko, J. (2015). PTP $\sigma$  functions as a presynaptic receptor for the glypican-4/LRRTM4 complex and is essential for excitatory synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(6), 1874–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.1410138112>
- Konishi, N., Tsujikawa, K., Yamamoto, H., Ishida, E., Nakamura, M., Shimada, K., ... Noguchi, S. (2003). Overexpression of leucocyte common antigen (LAR) P-subunit in thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer*, *88*, 1223–1228. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600876>
- Kopecki, Z., O'Neill, G. M., Arkell, R. M., & Cowin, A. J. (2011). Regulation of focal adhesions by flightless i involves inhibition of paxillin phosphorylation via a Rac1-dependent pathway. *The Journal of Investigative Dermatology*, *131*(7), 1450–9. <http://doi.org/10.1038/jid.2011.69>
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., ... Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science*, *275*(5307), 1784–1787. <http://doi.org/10.1126/science.275.5307.1784>
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., ... Basler, K. (2002). Wnt/Wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell*, *109*(1), 47–60. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00679-7](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00679-7)
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., ... Gridley, T. (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes and Development*, *14*(11), 1343–1352. <http://doi.org/10.1101/gad.14.11.1343>
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Sundberg, J. P., Beatus, P., Lendahl, U., ... Gridley, T. (2003). Characterization of Notch3-Deficient Mice: Normal Embryonic Development and Absence of Genetic Interactions with a Notch1 Mutation. *Genesis*, *37*(3), 139–143. <http://doi.org/10.1002/gene.10241>
- Krueger, N. X., Van Vactor, D., Wan, H. I., Gelbart, W. M., Goodman, C. S., & Saito, H. (1996). The transmembrane tyrosine phosphatase DLAR controls motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell*, *84*(4), 611–622. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81036-3](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81036-3)
- Krupska, I., Bruford, E. A., & Chaqour, B. (2015). Eyeing the Cyr61/CTGF/NOV (CCN) group of genes in development and diseases: highlights of their structural likenesses and functional dissimilarities. *Human Genomics*, *9*(1), 1–13. <http://doi.org/10.1186/s40246-015-0046-y>
- Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., Schmidt, H. a, ... Holstein, T. W. (2005). Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature*, *433*(7022), 156–60. <http://doi.org/10.1038/nature03158>
- Kyndt, F., Gueffet, J. P., Probst, V., Jaafar, P., Legendre, A., Le Bouffant, F., ... Schott, J. J. (2007). Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation*, *115*(1), 40–49. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.622621>
- Kyndt, F., Le, S. S., Jaafar, P., Gueffet, J. P., Legendre, A., Trochu, J. N., ... Probst, V. (2007). [Genetic aspects of valvulopathies]. *Arch.Mal Coeur Vaiss.*, *100*(12), 1013–1020.
- Lacerda, C. M. R., MacLea, H. B., Kisiday, J. D., & Orton, E. C. (2012). Static and cyclic tensile strain induce myxomatous effector proteins and serotonin in canine mitral valves. *Journal of Veterinary Cardiology*, *14*(1), 223–230. <http://doi.org/10.1016/j.jvc.2011.12.002>
- Laflamme, M. a, & Murry, C. E. (2011). Heart regeneration. *Nature*, *473*(7347), 326–335.

- <http://doi.org/10.1038/nature10147>
- Latif, N., Sarathchandra, P., Taylor, P. M., Antoniw, J., Brand, N., & Yacoub, M. H. (2006). Characterization of molecules mediating cell-cell communication in human cardiac valve interstitial cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *45*(3), 255–264. <http://doi.org/10.1385/CBB:45:3:255>
- Lee, Y. H., & Saint-Jeannet, J. P. (2009). Characterization of molecular markers to assess cardiac cushions formation in xenopus. *Developmental Dynamics*, *238*(12), 3257–3265. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22148>
- Lee, Y. H., & Stallcup, M. R. (2006). Interplay of Fli-1 and FLAP1 for regulation of beta-catenin dependent transcription. *Nucleic Acids Research*, *34*(18), 5052–5059. <http://doi.org/10.1093/nar/gkl652>
- Letterio, J. J., & Roberts, a B. (1996). Transforming growth factor-beta1-deficient mice: identification of isoform-specific activities in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, *59*(6), 769–774.
- Levine, R. A., Hagège, A. A., Judge, D. P., Padala, M., Dal-, J. P., Aikawa, E., ... Yacoub, M. H. (2016). Mitral valve disease—morphology and mechanisms\r, *12*(12), 689–710. <http://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.161>. Mitral
- Li, D. Y., Toland, A. E., Boak, B. B., Atkinson, D. L., Ensing, G. J., Morris, C. A., & Keating, M. T. (1997). Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis. *Human Molecular Genetics*, *6*(7), 1021–1028. <http://doi.org/10.1093/hmg/6.7.1021>
- Li, F. Q., Mofunanya, A., Harris, K., & Takemaru, K. I. (2008). Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity. *Journal of Cell Biology*, *181*(7), 1141–1154. <http://doi.org/10.1083/jcb.200709091>
- Li, T. W.-H., Ting, J.-H. T., Yokoyama, N. N., Bernstein, A., van de Wetering, M., & Waterman, M. L. (2006). Wnt activation and alternative promoter repression of LEF1 in colon cancer. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(14), 5284–99. <http://doi.org/10.1128/MCB.00105-06>
- Li, V. S. W., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., ... Clevers, H. (2012). Wnt Signaling through Inhibition of  $\beta$ -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell*, *149*(6), 1245–1256. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.002>
- Liebner, S., Cattelino, A., Gallini, R., Rudini, N., Iurlaro, M., Piccolo, S., & Dejana, E. (2004). Beta-Catenin Is Required for Endothelial-Mesenchymal Transformation During Heart Cushion Development in the Mouse. *Journal of Cell Biology*, *166*(3), 359–367. <http://doi.org/10.1083/jcb.200403050>
- Lighthouse, J. K., Zhang, L., Hsieh, J. C., Rosenquist, T., & Holdener, B. C. (2011). MESD is essential for apical localization of megalin/LRP2 in the visceral endoderm. *Developmental Dynamics*, *240*(3), 577–588. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22477>
- Lin, C.-J., Lin, C.-Y., Chen, C.-H., Zhou, B., & Chang, C.-P. (2012). Partitioning the heart: mechanisms of cardiac septation and valve development. *Development*, *139*(18), 3277–99. <http://doi.org/10.1242/dev.063495>
- Lin, X. (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*, *131*(24), 6009–6021. <http://doi.org/10.1242/dev.01522>
- Liu, A. C., & Gotlieb, A. I. (2007). Characterization of cell motility in single heart valve interstitial cells in vitro. *Histology and Histopathology*, *22*(8), 873–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17503344>
- Liu, A. C., Joag, V. R., & Gotlieb, A. I. (2007). The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *The American Journal of Pathology*, *171*(5), 1407–18. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070251>

- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., ... He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108(6), 837–847. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00685-2](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00685-2)
- Liu, J., Bang, A. G., Kintner, C., Orth, A. P., Chanda, S. K., Ding, S., & Schultz, P. G. (2005). Identification of the Wnt signaling activator leucine-rich repeat in Flightless interaction protein 2 by a genome-wide functional analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(6), 1927–1932. <http://doi.org/10.1073/pnas.0409472102>
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R., & Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature Genetics*, 22(4), 361–365. <http://doi.org/10.1038/11932>
- Liu, Y. T., & Yin, H. L. (1998). Identification of the binding partners for flightless I, a novel protein bridging the leucine-rich repeat and the gelsolin superfamilies. *Journal of Biological Chemistry*, 273(14), 7920–7927. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.14.7920>
- Locke, J. M., Da Silva Xavier, G., Rutter, G. A., & Harries, L. W. (2011). An alternative polyadenylation signal in TCF7L2 generates isoforms that inhibit T cell factor/lymphoid-enhancer factor (TCF/LEF)-dependent target genes. *Diabetologia*, 54(12), 3078–3082. <http://doi.org/10.1007/s00125-011-2290-6>
- Loeys, B. L., Schwarze, U., Holm, T., Callewaert, B. L., Thomas, G. H., Pannu, H., ... Dietz, H. C. (2006). Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *The New England Journal of Medicine*, 355(8), 788–798. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa055695>
- Luna-Zurita, L., Prados, B., Grego-Bessa, J., Lux??n, G., Del Monte, G., Bengur??a, A., ... De La Pompa, J. L. (2010). Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3493–3507. <http://doi.org/10.1172/JCI42666>
- Luo, W., Peterson, A., Garcia, B. A., Coombs, G., Kofahl, B., Heinrich, R., ... Virshup, D. M. (2007). Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *The EMBO Journal*, 26(6), 1511–21. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601607>
- Lyu, J., Jho, E.-H., & Lu, W. (2011). Smek promotes histone deacetylation to suppress transcription of Wnt target gene brachyury in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Research*, 21(6), 911–21. <http://doi.org/10.1038/cr.2011.47>
- Ma, L., Lu, M.-F., Schwartz, R. J., & Martin, J. F. (2005). Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. *Development (Cambridge, England)*, 132(24), 5601–5611. <http://doi.org/10.1242/dev.02156>
- Majeti, R., Bilwes, a M., Noel, J. P., Hunter, T., & Weiss, a. (1998). Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science*, 279(5347), 88–91. <http://doi.org/10.1126/science.279.5347.88>
- Mallolas, J., Hurtado, O., Castellanos, M., Blanco, M., Sobrino, T., Serena, J., ... Dávalos, A. (2006). A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(3), 711–717. <http://doi.org/10.1084/jem.20051979>
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G. H., Flynn, C., ... Wu, D. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Molecular Cell*, 7(4), 801–809. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00224-6](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00224-6)
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., ... Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9182–7.

- <http://doi.org/10.1073/pnas.0500918102>
- McCrea, P. D., Maher, M. T., & Gottardi, C. J. (2015). Nuclear signaling from cadherin adhesion complexes. *Current Topics in Developmental Biology*, 112, 129–196. <http://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2014.11.018>
- McCright, B., Gao, X., Shen, L., Lozier, J., Lan, Y., Maguire, M., ... Gridley, T. (2001). Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development (Cambridge, England)*, 128(4), 491–502. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.7.1.427>
- McCulley, D. J., Kang, J. O., Martin, J. F., & Black, B. L. (2008). BMP4 is required in the anterior heart field and its derivatives for endocardial cushion remodeling, outflow tract septation, and semilunar valve development. *Developmental Dynamics*, 237(11), 3200–3209. <http://doi.org/10.1002/dvdy.21743>
- McMahon, A. P., & Moon, R. T. (1989). Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell*, 58(6), 1075–1084. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90506-0](http://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90506-0)
- Misztal, K., Wisniewska, M. B., Ambrozkiwicz, M., Nagalski, A., & Kuznicki, J. (2011). WNT protein-independent constitutive nuclear localization of beta-catenin protein and its low degradation rate in thalamic neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31781–31788. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.229666>
- Moesgaard, S. G., Olsen, L. H., Viuff, B. M., Baandrup, U., Pedersen, L. G., Thomsen, P. D., ... Harrison, A. P. (2007). Increased nitric oxide release and expression of endothelial and inducible nitric oxide synthases in mildly changed porcine mitral valve leaflets. *The Journal of Heart Valve Disease*, 16(1), 67–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17315385>
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., ... Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 86(3), 391–399. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80112-9](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80112-9)
- Moskowitz, I. P., Wang, J., Peterson, M. A., Pu, W. T., Mackinnon, A. C., Oxburgh, L., ... Seidman, C. E. (2011). Transcription factor genes Smad4 and Gata4 cooperatively regulate cardiac valve development. [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), 4006–11. <http://doi.org/10.1073/pnas.1019025108>
- Mozaffarian, D., Benjamin, E., Go, A., Arnet, D., Blaha, M., Cushman, M., ... Turner, M. (2015). Heart Disease and Stroke Statistics – At-a-Glance Heart Disease , Stroke and other Cardiovascular Diseases Heart Disease , Stroke and Cardiovascular Disease Risk Factors. <http://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000152>.
- Müller, T., Choidas, A., Reichmann, E., & Ullrich, A. (1999). Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J. Biol. Chem.*, 274(15), 10173–10183. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10173>
- Nakajima, Y., Yamagishi, T., Hokari, S., & Nakamura, H. (2000). Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: Roles of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  and bone morphogenetic protein (BMP). *Anatomical Record*. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(20000201\)258:2<119::AID-AR1>3.0.CO;2-U](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(20000201)258:2<119::AID-AR1>3.0.CO;2-U)
- Nguyen, J. B., & Modis, Y. (2013). Crystal structure of the dimeric coiled-coil domain of the cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1. *Journal of Structural Biology*, 181(1), 82–88. <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.10.006>
- Nusse, R., & Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor

- virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31(1), 99–109. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90409-3](http://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90409-3)
- Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795–801. <http://doi.org/10.1038/287795a0>
- O'Grady, P., Krueger, N. X., Streuli, M., & Saito, H. (1994). Genomic organization of the human LAR protein tyrosine phosphatase gene and alternative splicing in the extracellular fibronectin type-III domains. *Journal of Biological Chemistry*, 269(40), 25193–25199.
- O'Grady, P., Thai, T. C., & Saito, H. (1998). The laminin-nidogen complex is a ligand for a specific splice isoform of the transmembrane protein tyrosine phosphatase LAR. *Journal of Cell Biology*, 141(7), 1675–1684. <http://doi.org/10.1083/jcb.141.7.1675>
- Ohtsuka, H., Oikawa, M., Ariake, K., Rikiyama, T., Motoi, F., Katayose, Y., ... Johnson, A. C. (2011). GC-binding factor 2 interacts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 129(7), 1599–610. <http://doi.org/10.1002/ijc.25837>
- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3), 215–266. <http://doi.org/10.1002/wdev.176>
- Orton, E. C., Lacerda, C. M. R., & MacLea, H. B. (2012). Signaling pathways in mitral valve degeneration. *Journal of Veterinary Cardiology*, 14(1), 7–17. <http://doi.org/10.1016/j.jvc.2011.12.001>
- Osman, L., Yacoub, M. H., Latif, N., Amrani, M., & Chester, A. H. (2006). Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. *Circulation*, 114(SUPPL. 1). <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001115>
- Park, E. J., Ogden, L. A., Talbot, A., Evans, S., Cai, C.-L., Black, B. L., ... Moon, A. M. (2006). Required, tissue-specific roles for Fgf8 in outflow tract formation and remodeling. *Development (Cambridge, England)*, 133(12), 2419–33. <http://doi.org/10.1242/dev.02367>
- Park, J. Il, Kim, S. W., Lyons, J. P., Ji, H., Nguyen, T. T., Cho, K., ... McCrea, P. D. (2005). Kaiso/p120-Catenin and TCF/beta-Catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Developmental Cell*, 8(6), 843–854. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.04.010>
- Paruchuri, S., Yang, J., Aikawa, E., Melero-martin, J. M., Zia, A., Loukogeorgakis, S., ... Bischoff, J. (2010). Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to VEGF-A and TGFβ2. *October*, 99(8), 861–869. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000245188.41002.2c.Human>
- Perrimon, N., & Bernfield, M. (2000). Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature*, 404(6779), 725–728. <http://doi.org/10.1038/35008000>
- Perrimon, N., & Mahowald, A. P. (1987). Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 119(2), 587–600. [http://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90061-3](http://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90061-3)
- Person, A. D., Garriock, R. J., Krieg, P. A., Runyan, R. B., & Klewer, S. E. (2005). Frzb modulates Wnt-9a-mediated beta-catenin signaling during avian atrioventricular cardiac cushion development. *Developmental Biology*, 278(1), 35–48. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.10.013>
- Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J., & Skarnes, W. C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, 407(6803), 535–538. <http://doi.org/10.1038/35035124>
- Pulido, R., Serra-Pagès, C., Tang, M., & Streuli, M. (1995). The LAR/PTP delta/PTP sigma subfamily of transmembrane protein-tyrosine-phosphatases: multiple human LAR, PTP

- delta, and PTP sigma isoforms are expressed in a tissue-specific manner and associate with the LAR-interacting protein LIP.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25), 11686–11690. <http://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11686>
- Qyang, Y., Martin-Puig, S., Chiravuri, M., Chen, S., Xu, H., Bu, L., ... Chien, K. (2007). The Renewal and Differentiation of Isl1+ Cardiovascular Progenitors Are Controlled by a Wnt/beta-Catenin Pathway. *Cell Stem Cell*, 1(2), 165–179. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.018>
- Rajamannan, N. M., Subramaniam, M., Rickard, D., Stock, S. R., Donovan, J., Springett, M., ... Spelsberg, T. (2003). Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*, 107(17), 2181–2184. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000070591.21548.69>
- Reed, A. L., Yamazaki, H., Kaufman, J. D., Rubinstein, Y., Murphy, B., & Johnson, A. C. (1998). Molecular cloning and characterization of a transcription regulator with homology to GC-binding factor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21594–21602. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21594>
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843–850. <http://doi.org/10.1038/nature03319>
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., & Nusse, R. (1987). The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, 50(4), 649–657. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90038-9](http://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90038-9)
- Rikiyama, T., Curtis, J., Oikawa, M., Zimonjic, D. B., Popescu, N., Murphy, B. A., ... Johnson, A. C. (2003). GCF2: Expression and molecular analysis of repression. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1629(1–3), 15–25. [http://doi.org/10.1016/S0167-4781\(03\)00156-8](http://doi.org/10.1016/S0167-4781(03)00156-8)
- Rivera, M. N., Kim, W. J., Wells, J., Driscoll, D. R., Brannigan, B. W., Han, M., ... Haber, D. a. (2007). An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5812), 642–645. <http://doi.org/10.1126/science.1137509>
- Rodilla, V., Villanueva, A., Obrador-Hevia, A., Robert-Moreno, A., Fernández-Majada, V., Grilli, A., ... Espinosa, L. (2009). Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6315–20. <http://doi.org/10.1073/pnas.0813221106>
- Rolfe, R. A., Nowlan, N. C., Kenny, E. M., Cormican, P., Morris, D. W., Prendergast, P. J., ... Murphy, P. (2014). Identification of mechanosensitive genes during skeletal development: alteration of genes associated with cytoskeletal rearrangement and cell signalling pathways. *BMC Genomics*, 15(1), 48. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-48>
- Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., ... Clevers, H. (1999). Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5435), 1923–6. <http://doi.org/10.1126/science.285.5435.1923>
- Rothman, R. B., & Baumann, M. H. (2009). Serotonergic drugs and valvular heart disease. *Expert Opinion on Drug Safety*, 8(3), 317–29. <http://doi.org/10.1517/14740330902931524>
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S., Masiarz, F., ... Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*, 262(5140), 1731–1734. <http://doi.org/10.1126/science.8259518>
- Rudolf, A., Schirwis, E., Giordani, L., Parisi, A., Lepper, C., Taketo, M. M., & Le Grand, F. (2015). Beta-Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair.

- Cell Reports*, 15(6), 1277–1290. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.022>
- Runyan, R. B., & Markwald, R. R. (1983). Invasion of mesenchyme into three-dimensional collagen gels: a regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue. *Developmental Biology*, 95(1), 108–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6825921>
- Sacks, M. S., Merryman, W. D., & Schmidt, D. E. (2010). On the Biomechanics of Heart Valve. *Journal of Biomechanics*, 42(12), 1804–1824. <http://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.05.015>.ON
- Sakamoto, K., Yamaguchi, S., Ando, R., Miyawaki, A., Kabasawa, Y., Takagi, M., ... Katsube, K. I. (2002). The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 29399–29405. <http://doi.org/10.1074/jbc.M203727200>
- Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, a C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., ... Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 124, 2659–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3850286&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Savic, D., Ye, H., Aneas, I., Park, S. Y., Bell, G. I., & Nobrega, M. A. (2011). Alterations in TCF7L2 expression define its role as a key regulator of glucose metabolism. *Genome Research*, 21(9), 1417–1425. <http://doi.org/10.1101/gr.123745.111>
- Schaapveld, R. Q., Schepens, J. T., Robinson, G. W., Attema, J., Oerlemans, F. T., Fransen, J. A., ... Hendriks, W. J. (1997). Impaired mammary gland development and function in mice lacking LAR receptor-like tyrosine phosphatase activity. *Dev Biol*, 188(1), 134–146. [http://doi.org/S0012-1606\(97\)98630-9](http://doi.org/S0012-1606(97)98630-9) [pii]n10.1006/dbio.1997.8630
- Schmeckpeper, J., Verma, A., Yin, L., Beigi, F., Zhang, L., Payne, A., ... Mirotsov, M. (2015). Inhibition of Wnt6 by Sfrp2 regulates adult cardiac progenitor cell differentiation by differential modulation of Wnt pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 85, 215–225. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.06.003>
- Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P. J. G., Kikuchi, A., Higuchi, Y., & Bienz, M. (2007). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(6), 484–492. <http://doi.org/10.1038/nsmb1247>
- Semenov, M., Tamai, K., & He, X. (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 26770–26775. <http://doi.org/10.1074/jbc.M504308200>
- Semenov, M. V., Zhang, X., & He, X. (2008). DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21427–21432. <http://doi.org/10.1074/jbc.M800014200>
- Serra-Pagès, C., Kedersha, N. L., Fazikas, L., Medley, Q., Debant, a, & Streuli, M. (1995). The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. *The EMBO Journal*, 14(12), 2827–2838.
- Shimomura, Y., Agalliu, D., Vonica, A., Luria, V., Wajid, M., Baumer, A., ... Christiano, A. M. (2010). APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature*, 464(7291), 1043–7. <http://doi.org/10.1038/nature08875>
- Shitashige, M., Satow, R., Jigami, T., Aoki, K., Honda, K., Shibata, T., ... Yamada, T. (2010). Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Research*, 70(12), 5024–5033. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0306>

- Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C. A., & Jones, K. A. (2006). The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes and Development*, *20*(5), 586–600. <http://doi.org/10.1101/gad.1385806>
- Skowasch, D., Schrempf, S., Wernert, N., Steinmetz, M., Jabs, A., Tuleta, I., ... Bauriedel, G. (2005). Cells of primarily extravalvular origin in degenerative aortic valves and bioprostheses. *European Heart Journal*, *26*(23), 2576–2580. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi458>
- Song, L., Fessler, R., Mishina, Y., Jiao, K., & Baldwin, H. S. (2007). Essential functions of Alk3 during AV cushion morphogenesis in mouse embryonic hearts. *Developmental Biology*, *301*(1), 276–286. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.004>
- Sridurongrit, S., Larsson, J., Schwartz, R., Ruiz-Lozano, P., & Kaartinen, V. (2008). Signaling via the Tgf-beta type I receptor Alk5 in heart development. *Developmental Biology*, *322*(1), 208–18. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.038>
- Stankunas, K., Ma, G. K., Kuhnert, F. J., Kuo, C. J., & Chang, C. P. (2010). VEGF signaling has distinct spatiotemporal roles during heart valve development. *Developmental Biology*, *347*(2), 325–336. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.08.030>
- Starman, B. J., Eyre, D., Charbonneau, H., Harrylock, M., Weis, M. A., Weiss, L., ... Byers, P. H. (1989). Osteogenesis imperfecta. The position of substitution for glycine by cysteine in the triple helical domain of the Pro $\alpha$ 1(I) chains of type I collagen determines the clinical phenotype. *Journal of Clinical Investigation*, *84*(4), 1206–1214. <http://doi.org/10.1172/JCI114286>
- Stephens, E. H., Nguyen, T. C., Itoh, A., Ingels, N. B., Miller, D. C., & Grande-Allen, K. J. (2008). The effects of mitral regurgitation alone are sufficient for leaflet remodeling. *Circulation*, *118*(14 Suppl). <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757526>
- Streuli, M., Krueger, N. X., Ariniello, P. D., Tang, M., Munro, J. M., Blattler, W. A., ... Saito, H. (1992). Expression of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region, *1*(3), 897–907.
- Stryker, E., & Johnson, K. G. (2007). LAR, liprin alpha and the regulation of active zone morphogenesis. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 21), 3723–3728. <http://doi.org/10.1242/jcs.03491>
- Su, Y., Fu, C., Ishikawa, S., Stella, A., Kojima, M., Shitoh, K., ... Liu, B. (2008). APC Is Essential for Targeting Phosphorylated  $\beta$ -Catenin to the SCF $\beta$ -TrCP Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*, *32*(5), 652–661. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.023>
- Sugi, Y., Ito, N., Szebenyi, G., Myers, K., Fallon, J. F., Mikawa, T., & Markwald, R. R. (2003). Fibroblast growth factor (FGF)-4 can induce proliferation of cardiac cushion mesenchymal cells during early valve leaflet formation. *Developmental Biology*, *258*(2), 252–263. [http://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00099-X](http://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00099-X)
- Superti-Furga, A., Gugler, E., Gitzelmann, R., & Steinmann, B. (1988). Ehlers-Danlos syndrome type IV: A multi-exon deletion in one of the two COL3A1 alleles affecting structure, stability, and processing of type III procollagen. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(13), 6226–6232.
- Suriano, A., Sanford, A., & Kim, N. (2005). GCF2/LRRFIP1 represses tumor necrosis factor alpha expression. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(20), 9073–81. <http://doi.org/10.1128/MCB.25.20.9073>
- Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J. L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., ... De Robertis, E. M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, *143*(7), 1136–1148. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.034>
- Tago, K. I., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S. I., Murata, Y., ... Akiyama, T. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein.



- Genes and Development*, 14(14), 1741–1749. <http://doi.org/10.1101/gad.14.14.1741>
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., ... Takada, S. (2006). Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Developmental Cell*, 11(6), 791–801. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.003>
- Tan, X., Apte, U., Micsenyi, A., Kotsagrellos, E., Luo, J.-H., Ranganathan, S., ... Monga, S. P. S. (2005). Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. *Gastroenterology*, 129(1), 285–302. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1821080&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Tanaka, S., Terada, K., & Nohno, T. (2011). Canonical Wnt signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells. *Journal of Molecular Signaling*. <http://doi.org/10.1186/1750-2187-6-12>
- Tanneberger, K., Pfister, A. S., Brauburger, K., Schneikert, J., Hadjihannas, M. V., Kriz, V., ... Behrens, J. (2011). Amer1/WTX couples Wnt-induced formation of PtdIns(4,5)P2 to LRP6 phosphorylation. *The EMBO Journal*, 30(8), 1433–43. <http://doi.org/10.1038/emboj.2011.28>
- Taub, C. C., Stoler, J. M., Perez-Sanz, T., Chu, J., Isselbacher, E. M., Picard, M. H., & Weyman, A. E. (2009). Mitral valve prolapse in marfan syndrome: An old topic revisited. *Echocardiography*, 26(4), 357–364. <http://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2008.00825.x>
- Taya, S., Yamamoto, T., Kanai-Azuma, M., Wood, S. a, & Kaibuchi, K. (1999). The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes beta-catenin. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 4(12), 757–767. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00297.x>
- Tetsu, O., & McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398(6726), 422–426. <http://doi.org/10.1038/18884>
- Tian, Y., Yuan, L., Goss, A. M., Wang, T., Yang, J., Lepore, J. J., ... Morrisey, E. E. (2010). Characterization and In Vivo Pharmacological Rescue of a Wnt2-Gata6 Pathway Required for Cardiac Inflow Tract Development. *Developmental Cell*, 18(2), 275–287. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.008>
- Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertrán, E., Pérez-Pomares, J. M., Díez, J., ... De La Pompa, J. L. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes and Development*, 18(1), 99–115. <http://doi.org/10.1101/gad.276304>
- Todorovic, V., Finnegan, E., Freyer, L., Zilberberg, L., Ota, M., & Rifkin, D. B. (2011). Long form of latent TGF-beta binding protein 1 (Ltbp1L) regulates cardiac valve development. *Developmental Dynamics*, 240(1), 176–187. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22521>
- Uetani, N., Bertozzi, K., Chagnon, M. J., Hendriks, W., Tremblay, M. L., & Bouchard, M. (2009). Maturation of ureter-bladder connection in mice is controlled by LAR family receptor protein tyrosine phosphatases. *Journal of Clinical Investigation*, 119(4), 924–935. <http://doi.org/10.1172/JCI37196>
- Vadnais, C., Shooshtarizadeh, P., Rajadurai, C. V., Lesurf, R., Hulea, L., Davoudi, S., ... Nepveu, A. (2014). Autocrine Activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway by CUX1 and GLIS1 in Breast Cancers. *Biology Open*, 3(10), 937–46. <http://doi.org/10.1242/bio.20148193>
- Van Amerongen, R., Nawijn, M., Franca-Koh, J., Zevenhoven, J., Van Der Gulden, H., Jonkers, J., & Berns, A. (2005). Frat is dispensable for canonical Wnt signaling in mammals. *Genes and Development*, 19(4), 425–430. <http://doi.org/10.1101/gad.326705>
- van de Laar, I. M. B. H., Oldenburg, R. a, Pals, G., Roos-Hesselink, J. W., de Graaf, B. M., Verhagen, J. M. a, ... Bertoli-Avella, A. M. (2011). Mutations in SMAD3 cause a

- syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nature Genetics*, 43(2), 121–126. <http://doi.org/10.1038/ng.744>
- Van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., Van Beest, M., Van Es, J., Loureiro, J., ... Clevers, H. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*, 88(6), 789–799. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81925-X](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81925-X)
- van den Hoff, M. J., Moorman, A. F., Ruijter, J. M., Lamers, W. H., Bennington, R. W., Markwald, R. R., & Wessels, A. (1999). Myocardialization of the cardiac outflow tract. *Developmental Biology*, 212(2), 477–90. <http://doi.org/10.1006/dbio.1999.9366>
- Van Gassen, G., De Jonghe, C., Nishimura, M., Yu, G., Kuhn, S., St George-Hyslop, P., & Van Broeckhoven, C. (2000). Evidence that the beta-catenin nuclear translocation assay allows for measuring presenilin 1 dysfunction. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 6(7), 570–580.
- Wallace, M. J., Fladd, C., Batt, J., & Rotin, D. (1998). The Second Catalytic Domain of Protein Tyrosine Phosphatase d (PTPd) Binds to and Inhibits the First Catalytic Domain of PTPs. *Molecular and Cellular Biology*, 18(5), 2608–2616.
- Wang, J., Sridurongrit, S., Dudas, M., Thomas, P., Nagy, A., Schneider, M. D., ... Kaartinen, V. (2005). Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart. *Developmental Biology*, 286(1), 299–310. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.07.035>
- Wang, X., Weng, L. P., & Yu, Q. (2000). Specific inhibition of FGF-induced MAPK activation by the receptor-like protein tyrosine phosphatase LAR. *Oncogene*, 19(19), 2346–53. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1203558>
- Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O’Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., ... DiNardo, S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*, 407(6803), 527–530. <http://doi.org/10.1038/35035110>
- Wei, N., Cheng, Y., Wang, Z., Liu, Y., Luo, C., Liu, L., ... Feng, Y. (2015). SRSF10 Plays a Role in Myoblast Differentiation and Glucose Production via Regulation of Alternative Splicing. *Cell Reports*, 13(8), 1647–1657. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.038>
- Weng, L. P., Wang, X., & Yu, Q. (1999). Transmembrane tyrosine phosphatase LAR induces apoptosis by dephosphorylating and destabilizing p130(Cas). *Genes to Cells*, 4(3), 185–196. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00251.x>
- Wessels, A., van den Hoff, M. J. B., Adamo, R. F., Phelps, A. L., Lockhart, M. M., Sauls, K., ... Burch, J. B. E. (2012). Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart. *Developmental Biology*, 366(2), 111–124. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.04.020>
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., ... Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), 448–452. <http://doi.org/10.1038/nature01611> [pii]
- Wilson, S. A., Brown, E. C., Kingsman, A. J., & Kingsman, S. M. (1998). TRIP: A novel double stranded RNA binding protein which interacts with the leucine rich repeat of Flightless I. *Nucleic Acids Research*, 26(15), 3460–3467. <http://doi.org/10.1093/nar/26.15.3460>
- Wöhrle, S., Wallmen, B., & Hecht, A. (2007). Differential control of Wnt target genes involves epigenetic mechanisms and selective promoter occupancy by T-cell factors. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23), 8164–77. <http://doi.org/10.1128/MCB.00555-07>
- Wright, K. J., & Tjian, R. (2009). Wnt signaling targets ETO coactivation domain of TAF4/TFIID in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 106(1), 55–60. <http://doi.org/10.1073/pnas.0811914106>
- Wu, B., Crampton, S. P., & Hughes, C. C. W. (2007). Wnt Signaling Induces Matrix Metalloproteinase Expression and Regulates T Cell Transmigration. *Immunity*, 26(2), 227–239. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.12.007>
- Wu, X., Tu, X., Joeng, K. S., Hilton, M. J., Williams, D. A., & Long, F. (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell*, 133(2), 340–53. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.052>
- Xu, G. F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., ... White, R. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*, 62(3), 599–608. [http://doi.org/0092-8674\(90\)90024-9](http://doi.org/0092-8674(90)90024-9) [pii]
- Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P. M., Williams, J., Woods, C., ... Nathans, J. (2004). Vascular development in the retina and inner ear: Control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*, 116(6), 883–895. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00216-8](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00216-8)
- Yamagishi, T., Nakajima, Y., Miyazono, K., & Nakamura, H. (1999). Bone morphogenetic protein-2 acts synergistically with transforming growth factor-beta3 during endothelial-mesenchymal transformation in the developing chick heart. *J Cell Physiol*, 180(1), 35–45. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199907\)180:1<35::AID-JCP4>3.0.CO;2-R](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199907)180:1<35::AID-JCP4>3.0.CO;2-R)
- Yamamoto, A., Nagano, T., Takehara, S., Hibi, M., & Aizawa, S. (2005). Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell*, 120(2), 223–235. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.051>
- Yamashita, J. K., Takano, M., Hiraoka-Kanie, M., Shimazu, C., Peishi, Y., Yanagi, K., ... Nishikawa, S.-I. (2005). Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(11), 1534–1536. <http://doi.org/10.1096/fj.04-3540fje>
- Yang, P., An, H., Liu, X., Wen, M., Zheng, Y., Rui, Y., & Cao, X. (2010). The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nature Immunology*, 11(6), 487–494. <http://doi.org/10.1038/ni.1876>
- Yang, T., Zhang, J. S., Massa, S. M., Han, X., & Longo, F. M. (1999). Leukocyte common antigen-related tyrosine phosphatase receptor: Increased expression and neuronal-type splicing in breast cancer cells and tissue. *Molecular Carcinogenesis*, 25(2), 139–149. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2744\(199906\)25:2<139::AID-MC9>3.0.CO;2-T](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2744(199906)25:2<139::AID-MC9>3.0.CO;2-T)
- Yeo, T. T., Yang, T., Massa, S. M., Zhang, J. S., Honkaniemi, J., Butcher, L. L., & Longo, F. M. (1997). Deficient LAR expression decreases basal forebrain cholinergic neuronal size and hippocampal cholinergic innervation. *Journal of Neuroscience Research*, 47(3), 348–360. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19970201\)47:3<348::AID-JNR13>3.0.CO;2-Y](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19970201)47:3<348::AID-JNR13>3.0.CO;2-Y)
- Yoshioka, M., Yuasa, S., Matsumura, K., Kimura, K., Shiomi, T., Kimura, N., ... Fukuda, K. (2006). Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nature Medicine*, 12(10), 1151–9. <http://doi.org/10.1038/nm1476>
- Yu, S., Crawford, D., Tsuchihashi, T., Behrens, T. W., & Srivastava, D. (2011). The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Developmental Dynamics*, 240(2), 384–393. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22549>
- Zabolotny, J. M., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Kim, J. K., Pani, M. a, Boss, O., ... Neel, B. G. (2001). Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5187–5192. <http://doi.org/10.1073/pnas.071050398>

- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., ... He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, *438*(7069), 873–877. <http://doi.org/10.1038/nature04185>
- Zhang, J., Chang, J. Y. F., Huang, Y., Lin, X., Luo, Y., Schwartz, R. J., ... Wang, F. (2010). The FGF-BMP signaling axis regulates outflow tract valve primordium formation by promoting cushion neural crest cell differentiation. *Circulation Research*, *107*(10), 1209–1219. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.225318>
- Zhang, J., Lin, Y., Zhang, Y., Lan, Y., Lin, C., Moon, A. M., ... Wang, F. (2008). Frs2alpha-deficiency in cardiac progenitors disrupts a subset of FGF signals required for outflow tract morphogenesis. *Development*, *135*(21), 3611–3622. <http://doi.org/10.1242/dev.025361>
- Zhang, M., Wang, M., Tan, X., Li, T.-F., Zhang, Y. E., & Chen, D. (2010). Smad3 prevents beta-catenin degradation and facilitates beta-catenin nuclear translocation in chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(12), 8703–10. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.093526>
- Zhao, B., Zhao, B., Wei, X., Wei, X., Li, W., Li, W., ... Guan, K.-L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, *21*(21), 2747–2761. <http://doi.org/10.1101/gad.1602907.Hpo/Sav>
- Zhou, B., Liu, Y., Kahn, M., Ann, D. K., Han, A., Wang, H., ... Borok, Z. (2012). Interactions Between beta-Catenin and Transforming Growth Factor-beta Signaling Pathways Mediate Epithelial-Mesenchymal Transition and Are Dependent on the Transcriptional Co-activator cAMP-response Element-binding Protein (CREB)-binding Protein (CBP). *Journal of Biological Chemistry*, *287*(10), 7026–7038. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.276311>
- Zhou, Q., Li, L., Zhao, B., & Guan, K. (2015). The hippo pathway in heart development, regeneration, and diseases. *Circulation Research*, *116*(8), 1431–47. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303311>
- Zhu, W., Shiojima, I., Ito, Y., Li, Z., Ikeda, H., Yoshida, M., ... Komuro, I. (2008). IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature*, *454*(7202), 345–349. <http://doi.org/10.1038/nature07027>

## *Publications et communications*

### **Publication**

Duval, D\*, **Labbé, P**, Bureau, L, Le Tourneau, T, Norris, R A, Markwald, R R, ... Mérot, J. (2015). **MVP-Associated Filamin A Mutations Affect FlnA-PTPN12 (PTP-PEST) Interactions**, 2(3), 233–247. *J Cardiovasc Dev Dis*.

Duval D\*, Rimbert A\*, Jobbe-Duval A\*, Tucker N, Jamin N, Kyndt F, Lecointe S, Trujillano D, Donal E, Bruneval P, Corbineau H, Beaufreton C, R. Markwald R, A. Norris R, Slaugenhaupt S, Levine R, Hagège A, Cueff C, **Labbé P**, Ossowski S, Estivill X, Jeunemaitre X, Toquet C, Le Marec H, Probst V, Roussel JC, Redon R, Milan D, Le Tourneau T, Schott JJ, and Merot J. **Loss of function of ARHGAP24/FilGAP predisposes to FibroElastic Deficiency type of mitral valve prolapse** (in preparation).

**Labbé P\***, Faure E, Lecointe S, Le Scouarnec S, Kyndt F, Marrec M, Le Tourneau T, Offmann B, Duplaà C, Schott JJ, Zaffran S, Mérot J. **The alternatively spliced LRRFIP1 Isoform-1 is a key regulator of the Wnt/ $\beta$ -catenin Transcription Pathway**. (in preparation).

### **Poster**

*LRRFip1 and Wnt pathway involvement in Mitral Valve Prolapse*. "Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire" (G.R.R.C) meeting. April 2013, Strasbourg, France.

*Involvement of LRRFip1 gene and canonical Wnt pathway in Mitral Valve Prolapse*. "Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire" (G.R.R.C) meeting. April 2014, Toulouse, France.

*Involvement of the Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F gene PTPRF, a cell adhesion-like molecule, in Mitral Valve Prolapse*. Annual meeting of the Heart Valve Society. March 2016, New-York.

### **Oral**

*LRRFIP1 : a new gene involved in Mitral Valve Prolapse*. Inaugural Meeting of the Heart Valve Society. May 2015, Monaco, France.

*Involvement of the Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F gene PTPRF, a cell adhesion-like molecule, in Mitral Valve Prolapse*. "Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire" (G.R.R.C) meeting. April 2016, Dijon, France.



# Thèse de Doctorat

Pauline LABBÉ

## Mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le Prolapsus Valvulaire Mitral.

Rôles des gènes *LRRFIP1* et *PTPRF*

### Résumé

Le Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM) est une pathologie cardiaque fréquente (2.5% de la population générale) dont le seul traitement est la chirurgie valvulaire. Il existe des formes non syndromiques pour lesquelles l'implication de facteurs génétiques a été démontrée.

A partir d'analyses génétiques sur des familles atteintes de PVM, *LRRFIP1* et *PTPRF* ont été identifiés comme de nouveaux gènes potentiellement responsables de PVM. Les mutations (respectivement R94G et I328M) ciblent des isoformes de LRRFip1 (LRRFip1-iso1) et PTPRF (short-PTPRF) dont les rôles physiologiques ne sont pas encore connus.

Mon travail a consisté à étudier le rôle de ces deux protéines ainsi que l'effet des mutations dans des modèles de réexpression cellulaires. Nous avons identifié LRRFip1-iso1 comme un (co-)facteur de transcription de la voie de signalisation Wnt canonique de part 1) sa localisation nucléaire 2) sa forte activation des promoteurs TCF/LEF 3) son interaction avec le  $\beta$ -caténine 4) son activation/répression de plusieurs cibles transcriptionnelles importantes pour le développement du cœur et des valves. L'effet physiopathologique de la mutation R94G n'a néanmoins pas été mis en évidence dans nos modèles cellulaires.

Dans un second projet, j'ai caractérisé l'expression et la localisation subcellulaire d'une nouvelle isoforme de *PTPRF* qui est exprimée dans les valves humaines et interagit avec les Héparane Sulfate Protéoglycans (HSPGs) dont le rôle majeur a été montré dans le développement des valves.

Ce travail met en évidence un rôle potentiel de *LRRFIP1* et *PTPRF* dans le développement et/ou l'homéostasie des valves cardiaques.

### Mots clés

**Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM), LRRFIP1, PTPRF, Wnt, Facteur de Transcription, Récepteur Tyrosine-Phosphatase**

### Abstract

Mitral Valve Prolapse (MVP) is a common cardiac disease (2.5% of the general population) and is a major cause for valve surgery. MVP can be non syndromic form with a strong genetic background.

Genetic studies on families affected by PVM identified *LRRFIP1* and *PTPRF* as potential causing gene for MVP. Mutations (respectively R94G and I328M) target isoforms of LRRFip1 (LRRFip1-iso1) and PTPRF (short-PTPRF) whose functional roles are unknown.

My work consists in studying the roles of these two proteins and the effect of the mutations in cellular re-expression models.

We identified LRRFip1 as a transcription (co)factor of canonical Wnt signaling based on 1) its nuclear localization 2) its strong activation of TCF/LEF promoters 3) its interaction with  $\beta$ -catenin 4) its activation/repression of several transcriptional targets important for heart and valve development. However, the physiopathological effect of the R94G mutation was not underlying in our cellular models.

In a second project, I characterized the expression and sub-cellular location of a new isoform of *PTPRF* which is expressed in human valves and interacts with Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs) whose major role in valve development was demonstrated.

This work suggests the role of *LRRFIP1* and *PTPRF* in cardiac valve development and/or homeostasis.

### Key Words

**Mitral Valve Prolapse (MVP), LRRFIP1, PTPRF, Wnt, Transcription Factor, Protein Tyrosine Phosphatase**