



**HAL**  
open science

# L'inhibition de PDZRN3 est requise pour la maturation cardiomyocytaire post-natal et protège de l'insuffisance cardiaque

Mathieu Pernot

► **To cite this version:**

Mathieu Pernot. L'inhibition de PDZRN3 est requise pour la maturation cardiomyocytaire post-natal et protège de l'insuffisance cardiaque. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0841 . tel-02183844

**HAL Id: tel-02183844**

**<https://theses.hal.science/tel-02183844>**

Submitted on 15 Jul 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

**Ecole doctorale** : Science de la vie et de la Santé

**Option** : Biologie cellulaire et physiopathologie

*Par Mathieu PERNOT*

**L'INHIBITION DE PDZRN3 EST REQUISE POUR LA  
MATURATION CARDIOMYOCYTAIRE POST-NATAL  
ET PROTÈGE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE.**

**Sous la direction de : Laurent BARANDON**

**Soutenue le lundi 11 décembre 2017**

**Membres du jury**

Pr André VINCENNELLI, Lille .....Président

Pr Michel PUCEAT, Marseille.....Rapporteur

Pr Jean-Sebastien HULOT, Paris.....Rapporteur

Pr Pierre DOS SANTOS, Bordeaux.....Membre Invité

Pr Louis LABROUSSE, Bordeaux.....Membre Invité

## REMERCIEMENTS

Je remercie :

**Le Professeur André VINCENTELLI**, Président : Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je vous remercie d'apporter votre regard d'expert et de vous être rendu disponible pour juger ce travail. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

**Le Professeur Michel PUCEAT**, Rapporteur : Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Vos travaux de recherche dans le domaine de la thérapie cellulaire rendent votre avis sur ce travail essentiel. Soyez assuré de ma profonde estime et de ma profonde reconnaissance.

**Le Professeur Jean – Sébastien HULOT**, Rapporteur : Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de ce travail de thèse. Vos travaux de recherche et votre pratique clinique de cardiologue rendent votre avis essentiel. Soyez assuré de ma profonde estime et de ma profonde reconnaissance.

**Le Professeur Pierre DOS SANTOS**, Membre invité : Vous me faites l'honneur d'être examinateur de ce travail de thèse. Vous nous avez aidé dans la mise en place de ce projet. Soyez assuré de ma profonde estime et de ma profonde reconnaissance.

**Le Professeur Louis LABROUSSE**, Membre invité : Vous me faites l'honneur d'accepter d'être examinateur de cette thèse. Travailler à vos côtés est un véritable honneur. Vos encouragements et votre bienveillance ont été très précieux. Veuillez trouver dans ce manuscrit, l'expression de ma profonde estime et de ma profonde reconnaissance.

**Le Professeur Laurent BARANDON**, Directeur : Tu as eu la gentillesse de m'encadrer dans ce parcours de recherche. Tu m'as permis de mener ce travail et tu as été d'une aide précieuse. Pour tout cela un grand merci ! Trouve dans ce manuscrit, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie,

**Le Docteur Cécile DUPLAA :** Sans votre aide et vos compétences, ce travail n'aurez jamais vu le jour. Votre présence a été essentielle. Vos conseils et vos encouragements ont été précieux. Travailler à vos côtés est toujours très enrichissant. Veuillez trouver dans ce manuscrit, l'expression de ma reconnaissance.

**Le Professeur Thierry COUFFINHAL :** Vous m'avez accueilli dans votre unité INSERM avec gentillesse. Travailler à vos côtés fut une véritable chance et un honneur. Merci pour vos précieux conseils et nombreuses discussions sur cette aventure scientifique. Veuillez trouver dans ce manuscrit l'expression de ma profonde estime et de ma reconnaissance.

**Le Professeur Xavier ROQUES :** Travailler à vos côtés fut une véritable chance et un honneur. Vos précieux conseils nous guident encore tous les jours. Merci de m'avoir permis de pouvoir mener ce travail de recherche. Veuillez trouver dans ce manuscrit, l'expression de ma profonde reconnaissance.

**Les étudiants de Master 2, Laura CETRAN et Murielle HAN YEE YU,** d'avoir participé à ce travail de recherche. Merci de votre collaboration.

**L'ensemble de l'équipe de l'unité 1034 : Béatrice, Catherine, Sylvie, Myriam, Marie Ange, Pascale, Annabel, Jérôme, Christelle,** avec qui j'ai partagé des moments inoubliables et qui m'ont permis de mener à bien ce travail de recherche. Un grand merci à tous.

**Les précédents thésards, Raj, Claire, Nathalie, Marie-Lise** pour leurs conseils et leur gentillesse.

**A Alexandre,** merci pour ton aide « logistique » !

*A Joséphine, mon précieux trésor.*

*A Justine, merci de rendre ma vie si belle...*

*A mes parents, pour cette force que vous m'avez transmise.*

*A mes frères et sœur, pour leur compréhension malgré l'éloignement...*

*A ma belle famille, pour votre soutien indéfectible et « pour l'orthographe ».*

*A mes amis, merci pour ces moments d'évasion. Votre amitié m'est très chère.*

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>2</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>9</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>15</b>
<b>AVANT PROPOS</b> .....	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
<b>PARTIE I : CARDIOMYOPATHIES</b> .....	<b>21</b>
I / Classification des myocardiopathies .....	21
1 / Classification de l'Association Américaine de Cardiologie (AHA).....	21
2 / Classification de l'Association Européenne de Cardiologie (ESC).....	22
3/ Nouvelle classification des cardiomyopathies : « MOGE(S) ».....	23
4 / Classification des cardiomyopathies dans la littérature scientifique.....	28
II / Cardiospécificité : Système de jonction inter-cardiomyocytaire.....	29
1/ Disques intercalaires.....	31
1.1 – Les jonctions adhérentes : .....	32
1.2 – Les desmosomes : .....	33
1.3 – Les jonctions communicantes : .....	34
2/ Avancés dans « l'anatomie » des disques intercalaires.....	34
2.1 – Area composita.....	34
2.2 – La zone de transition (transitional junction).....	35
3/ Maturation du myocarde : Distribution spatio-temporelle des jonctions inter-cardiomyocytaires.....	36
3.1 – Maturation des jonctions adhérentes : .....	37
3.2 – Maturation des desmosomes.....	38
3.3 – Maturation des jonctions Gap .....	39
4/ Mécanismes moléculaires de la formation des disques intercalaires.....	39
5/ Régulation des jonctions Gap .....	42
5.1 Liaisons entre les jonctions adhérentes et les jonctions Gap.....	42
5.2 La protéine MAGUK : ZO-1 .....	44
<b>PARTIE II : SYSTEME WNT/FRIZZLED</b> .....	<b>45</b>
I / Les voies de signalisation Wnt/Fzd .....	46

1/ Voie Wnt Canonique .....	47
2/ Voies Wnt non canoniques.....	49
A/ La voie de la polarité cellulaire planaire (PCP).....	50
B/ La voie calcium dépendante .....	51
II / Les voies de signalisation Wnt/Fz en cardiologie.....	53
1/ Signalisation Wnt/ $\beta$ -catenine.....	53
2/ Interaction signalisation Wnt et signalisation des jonctions adhérentes.....	54
3/ Signalisation non canonique dite de Polarité Planaire.....	56
III / Pdzrn 3 et régulation de la signalisation PCP .....	58
IV / Rôles des ubiquitines ligases dans les cardiomyopathies.....	60
V / Projet de recherche : .....	63
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>64</b>
I / ANALYSE <i>IN VIVO</i> .....	64
1/ Modèle murin de sur-expression Pdzrn3 dans les cardiomyocytes.....	64
2/ Modèle de délétion conditionnelle de Pdzrn3 dans les cardiomyocytes.....	65
3/ Procédures chez l'animal .....	67
4 / Prélèvements humains .....	68
I / PROTOCOLES DÉTAILLÉS.....	69
1 / Analyse morphologique non invasive .....	69
1.1 Analyse échocardiographique .....	69
1.2 Analyse électrocardiographique.....	71
2 /Analyse histologique.....	72
2.1 Prélèvement et préparation des tissus .....	72
2.2 Coupe en Paraffine.....	72
2.3 Analyse en immunohistochimie.....	73
2.4 Analyse en immunofluorescence.....	74
3 / Analyse de l'expression des ARN m par RT-PCR quantitative.....	74
4 / Analyse protéique par Western-blot .....	75
5 / Immuno-précipitation des protéines .....	76
6 / Analyse des images .....	76
7 / Protocoles chirurgicaux.....	76
7.1 Protocole Angiotensine II .....	77
7.2 Protocole de constriction de l'aorte transverse (Transverse Aortic Constriction, TAC) .....	78
8 / Analyses statistiques .....	79
II / REACTIFS.....	80
1 / Liste des anticorps utilisés.....	80

2 / Listes des amorces utilisées.....	81
3 / Réactifs chimiques.....	82
4 / Equipements .....	83
<b>RESULTATS.....</b>	<b>84</b>
I / CARACTERISATION DE PDZRN3 DANS LES CARDIOMYOCYTES .....	85
II / MODELE MURIN DE SUR-EXPRESSION CONSTITUTIVE DE PDZRN3.....	86
1 / <i>Caractérisation phénotypique</i> .....	88
1.1 Mortalité et données échocardiographiques.....	88
1.2 Analyse électrocardiographique.....	89
1.3 Analyse morphologique ex-vivo .....	90
1.4 Analyse de la prolifération cellulaire.....	103
2 / <i>Analyse des souris Pdzrn3 OE, surexpression stoppée à J0 ou J7</i> .....	107
2.1 Analyse du protocole d'inhibition de la surexpression de Pdzrn3 dès la naissance.....	107
2.2 Analyse du protocole d'inhibition de la surexpression de Pdzrn3 à partir d'une semaine de vie post natale.....	108
2 / <i>Analyse moléculaire de la surexpression de PDZRN3</i> .....	110
III / MODELE MURIN DE DELETION CONDITIONNELLE DE PDZRN3 .....	112
1 / <i>Définition du modèle murin de délétion conditionnelle de Pdzrn3</i> .....	112
2 / <i>Caractérisation phénotypique</i> : .....	113
2.1 Mortalité et données échocardiographiques .....	113
2.2 Analyse par électrocardiogramme .....	114
2.3 Analyse morphologique : .....	114
3 / <i>Protocole d'induction d'une hypertrophie myocardique</i> .....	115
3.1 Protocole Angiotensine II .....	115
3.2 Protocole d'induction mécanique : Constriction de l'aorte transverse (TAC).....	120
IV / ANALYSE HISTOLOGIQUE ET MOLECULAIRE HUMAINE .....	122
1 / <i>Analyse en RT qPCR de myocardiopathies humaines</i> .....	122
2 / <i>Analyse histologique de myocardiopathies humaines</i> .....	123
V / ANALYSE DES MÉCANISMES MOLECULAIRES.....	126
1 / <i>AHNAK</i> .....	126
1.1 Interaction Pdzrn3 / Ahnak.....	126
1.2 Spécificité de l'interaction de PDZRN3 avec AHNAK.....	128
1.3 Dégradation d'Ahnak par Pdzrn3 via la voie du protéasome.....	128
1.4 Modulation d'AHNAK dans le protocole angiotensine II.....	130
2 / <i>Isoforme de Zo 1</i> .....	130
3/ <i>Pyk2</i> .....	132



<b>DISCUSSION .....</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....</b>	<b>140</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>141</b>

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : RECOMMANDATION DE BONNES PRATIQUES DES TESTS GENETIQUES DANS LE CADRE DES MYOCARDIOPATHIES D'APRES L'ESC.....	20
FIGURE 2 : CLASSIFICATION DES MYOCARDIOPATHIES PRIMITIVES SELON L'ASSOCIATION AMERICAINE DE CARDIOLOGIE (AHA) .....	21
FIGURE 3 : CLASSIFICATION DES CARDIOPATHIES SECONDAIRES SELON L'ASSOCIATION AMERICAINE DE CARDIOLOGIE (AHA) .....	22
FIGURE 4 : CLASSIFICATION MOGE(S) DES CARDIOMYOPATHIES .....	26
FIGURE 5 : UNE STRUCTURE SPECIALISEES : LE DISQUE INTERCALAIRE DES CARDIOMYOCYTES. A SCHEMA DE L'ORGANISATION SYNCITIALE DU MYOCARDE. LES CARDIOMYOCYTES SONT DES CELLULES ALLONGEES, COUPLEES ELECTRIQUEMENT ET MECANIQUEMENT DANS UN AXE LONGITUDINAL GRACE A UNE STRUCTURE SPECIALISEE ET INTRIQUEE, LES DISQUES INTERCALAIRES (DI). B : SCHEMA ZOOMANT SUR UN DISQUE INTERCALAIRE ET CES TROIS STRUCTURES SPECIALISEES : DESMOSOMES, LES JONCTIONS N-CADHERINE ET LES JONCTIONS GAP. LA LIGNE BLEUE CORRESPOND A LA MEMBRANE DES DISQUES INTERCALAIRES ALORS QUE LA DOUBLE LIGNE VERTE REPRESENTE LA MEMBRANE LATERALE DU SARCOLEMME DES CARDIOMYOCYTES (BALSE ET AL., 2012).....	31
FIGURE 6 : SCHEMA DES JONCTIONS ADHERENTES (VERMIJ ET AL., 2017) .....	33
FIGURE 7 : VOIE DE SIGNALISATION CANONIQUE DEPENDANTE DE LA $\beta$ CATENINE ; A, LORSQUE SFRP INHIBE LE LIGAND WNT OU LE RECEPTEUR FRIZZLED OU QUE DKK LIE LRP 5/6, LA VOIE DE SIGNALISATION WNT EST REPRIMEE. LE COMPLEXE DE DESTRUCTION (COMPOSE DE L' AXIN, APC, CK1A, GSK-3B AND B-CATENINE) EST ASSEMBLE. CK1A PHOSPHORYLE B-CATENINE SUR LA SERINE 45, CE QUI ENTRAINE LA PHOSPHORYLATION DES SERINES 33, 37 ET DE LA THREONINE 41 PAR GSK-3B. LES SITES DE PHOSPHORYLATION SONT RECONNUS PAR BTRCP (UNE E3-LIGASE) ET B-CATENINE EST UBIQUITINILEE ET CIBLEE PAR LE PROTEASOME POUR LA DEGRADER. LA TRANSCRIPTION DES CIBLES WNT EST REPRIMEE PAR HDAC ET GROUCHO PAR LIAISON DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION TCF/LEF. B, LORSQUE WNT INTERRAGIT AVEC SON RECEPTEUR FRIZZLED, LA VOIE CANONIQUE EST ACTIVEE. AXIN ET DVL-1 SONT RECRUTE A LA MEMBRANE ET LA B-CATENINE CYTOPLASMIQUE S'ACCUMULE. LA B-CATENINE NON-PHOSPHORYLEE TRANSLOQUE DANS LE NOYAU, OU ELLE LIE LE COMPLEXE TCF/LEF (DEPLAÇANT GROUCHO) ET ACTIVE LA TRANSCRIPTION DES GENES CIBLES. PARMIS LES GENES CIBLES QUI SONT ACTIVES, WISP-1 ACTIVE AKT. AKT PHOSPHORYLE GSK-3B SUR LA SERINE9, ENTRAINANT SON INHIBITION. ABBREVIATION: APC, ADENOMATOUS POLYPOSIS COLI; BTRCP, B-TRANSDUCIN REPEAT CONTAINING PROTEIN; CK1A, CASEIN KINASE 1A; CM, CELL MEMBRANE; GSK-3B, GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3B; DKK, DICKKOPF; DVL-1; DISHEVELLED-1; HDAC, HISTONE DEACETYLASE; NP, NUCLEAR PORE; SFRP, SECRETED FRIZZLED RELATED PROTEIN; TCF/LEF, T-CELL FACTOR/LYMPHOID ENHANCER-BINDING FACTOR; WISP-1, WNT1 INDUCIBLE SIGNALLING PATHWAY PROTEIN 1; TBP, TATA-BINDING PROTEIN.(DAWSON ET AL., 2013). .....	48
FIGURE 8 : VOIE NON CANONIQUE, $\beta$ - CATENINE – INDEPENDANTE ; A, LA VOIE DE POLARITE CELLULAIRE PLANAIRE (PCP) EST ACTIVEE PAR DES RECEPTEURS FZD INDEPENDANT DE LRP5/6. LORSQUE LE RECEPTEUR EST ACTIVE, DVL-1 TRANSDUIT LE SIGNAL VIA LES PETITES GTPASES. DAAM1 FORME UN COMPLEXE AVEC DVL-1, LEQUEL PERMET L'ACTIVATION DE RHO ET ROCK. UNE SECONDE BRANCHE EXISTE, INDEPENDANTE DE DAAM1, L'ACTIVATION DE DVL-1 STIMULE RAC1, LEQUEL REGULE JNK. B, LA VOIE Wnt/ $Ca^{2+}$ DEPENDANTE. L'ACTIVATION DU RECEPTEUR FZD RECRUTE DES PROTEINES G HETEROMERIQUE QUI ACTIVENT LA PHOSPHOLIPASE C (PLC), PERMETTANT LA	

PRODUCTION DE DAG ET INOSITOL TRIPHOSPHATE. DAG ACTIVE DIRECTEMENT LA PKC. IP3 AUGMENTE LA CONCENTRATION DE CALCIUM INTRACELLULAIRE, ACTIVANT DES ENZYMES SENSIBLES AU CA <sup>2+</sup> COMME CAMKII, CALCINEURINE AND PKC. ABBREVIATION: CAMKII, CA <sup>2+</sup> /CALMODULINE-DEPENDANTE PROTEINE KINASES II; DAAM-1, ACTIVATEUR DE LA MORPHOGENESE ASSOCIE A DISHEVELLED; FZD, FRIZZLED; JNK, C-JUN TERMINAL KINASE; PKC, PROTEINE KINASE C; PLC, PHOSPHOLIPASE C; ROCK, KINASE ASSOCIEE A RHO. (DAWSON ET AL., 2013).....	52
FIGURE 9 : LE SYSTEME UBIQUITINE-PROTEASOME. A. MODIFICATION POST TRADUCTIONNELLE DE PROTEINES CIBLE NECESSAIRE A LEUR DEGRADATION VIA LE PROTEASOME. L'ENZYME E1 ACTIVE L'UBIQUITINE LIBRE EN UTILISANT L'ENERGIE DE L'ATP POUR GENERER UNE LIAISON THIOESTER AVEC L'UBIQUITINE. L'UBIQUITINE ACTIVEE EST ALORS TRANSFERRE A L'ENZYME E2 QUI INTERRAGIT AVEC L'ENZYME E3. L'UBIQUITINE LIGASE TRANSFERT FINALLEMENT CETTE UBIQUITINE SUR UN RESIDU LYSINE DE LA PROTEINE CIBLE. UNE FOIS LA PREMIERE UBIQUITINATION REALISEE, CETTE UBIQUITINATION PERMET D'ACTIVER L'ADDITION D'AUTRES MOLECULES D'UBIQUITINE ENTRAINANT DES CHAINES DE POLY-UBIQUITINATION. B. L'UBIQUITINE A SEPT RESIDU LYSINES PERMETTANT LA POLYUBIQUITINATION (LYS6, LYS11, LYS27, LYS29, LYS33, LYS48, LYS63). LA FORMATION D'UNE POLY-UBIQUITINATION SUR LA LYS48 EST CONSIDEREE COMME LA POLY-UBIQUITINATION CANONIQUE ET ENTRAINE LA DEGRADATION DU SUBSTRAT PAR LE PROTEASOME. LA POLYUBIQUITINATION SUR LA LYS63 A ETE MONTREE COMME MODIFIANT L'ACTIVITE DE LA PROTEINE CIBLE (RELOCALISATION, TRANSLOCATION NUCLEAIRE...). DE FAÇON SIMILAIRE, LA MONO-UBIQUITINATION N'ENTRAINE PAS LA DEGRADATION DE LA PROTEINE CIBLE MAIS PEUT MODIFIER L'ACTIVITE DE CETTE PROTEINE (RELOCALISATION DANS UN AUTRE COMPARTIMENT CELLULAIRE, IMPLICATION DANS L'APOPTOSE, LA REGULATION DU CALCIUM...) (WILLIS ET AL., 2014). .....	61
FIGURE 10 : SCHEMA DE LA SUR-EXPRESSION DE PDZRN3 DANS LES CARDIOMYOCYTES. LES SOURIS CONTROLES SONT APPELES CONTROLE ET LES SOURIS PDZRN3 OE SONT GENETIQUEMENT MHC-TTA ; PDZRN3 - V5. ....	64
FIGURE 11 : SCHEMA DE LA DELETION DE PDZRN3 DANS LES CARDIOMYOCYTES. LES SOURIS CONTROLES SONT NOMMEES PDZRN3 <sup>F/F</sup> . LES SOURIS MCM - PDZRN3 <sup>F/F</sup> CORRESPONDENT AU SOURIS GENETIQUEMENT MHC-MERCREMER ; PDZRN3 <sup>F/F</sup> .....	66
FIGURE 12 : ANALYSE PAR RT QPCR DES ARNm DE PDZRN3 APRES INDUCTION DES SOURIS MCM - PDZRN3 <sup>F/F</sup> PAR LE TAMOXIFENE VS PDZRN3 <sup>F/F</sup> . .....	67
FIGURE 13 : ANALYSE EN RT-QPCR DE L'EXPRESSION DE PDZRN3 DANS LES CARDIOMYOCYTES MURINS. ....	85
FIGURE 14 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT DE L'EXPRESSION ENDOGENE DE PDZRN3 CHEZ LES SOURIS DE PHENOTYPE SAUVAGE (A 0.5, 4, 7, 14 JOURS DE VIE).....	85
FIGURE 15 : ANALYSE WESTERN BLOT PERMETTANT LA VISUALISATION DE LA SUREXPRESSION DE NOTRE TRANSGENE (AC ANTI V5 ET ANTI $\beta$ GALACTOSIDASE) .....	86
FIGURE 16 : ANALYSE CHRONOLOGIQUE PAR WESTERN BLOT DE L'EXPRESSION DU TRANSGENE DE PDZRN3, AC ANTI PDZRN3, ANTI-V5 ET A TUBULINE (COMPARATIF PAR RAPPORT AU NIVEAU D'EXPRESSION DE PDZRN3 CHEZ LES SOURIS DE PHENOTYPE SAUVAGE A LA NAISSANCE (0.5 JOUR), EVALUE A 0.5, 4, 7, 14 JOURS PUIS EN COMPARAISON AVEC LEUR CONTROLE A 3, 5, 7, 8 SEMAINES POST NATALES). ....	86
FIGURE 17 : EVALUATION DES RATIO D'EXPRESSION DE LA PROTEINE PDZRN3 PAR RAPPORT A L'EXPRESSION PHYSIOLOGIQUE DE CETTE PROTEINE LE JOUR DE LA NAISSANCE (0.5 JOURS) SUR LES DEUX PREMIERES SEMAINES ET 8 SEMAINES POST NATAL. ....	87

FIGURE 18 : COURBES DE KAPLAN MEYER, SURVIE DES SOURIS TRANSGENIQUES PDZRN3 OE VS CONTROLE (N=9 PAR GROUPE), TEST STATISTIQUE DE GEHAN-BRESLOW-WILCOXON $p < 0,0001$ .....	88
FIGURE 19 : ANALYSE DU SUIVI ECHOCARDIOGRAPHIQUE DES SOURIS SUREXPRESSANT NOTRE TRANSGENE (PDZRN3 OE) VS CONTROLE, SUIVI REALISE DE LA TROISIEME SEMAINE POST NATALE A LA 8° SEMAINE.....	88
FIGURE 20 : RAPPORT DE L'EPaisseur DE LA PAROI LATERALE VENTRICULAIRE GAUCHE SUR LE DIAMETRE INTERNE TELEDIASTOLIQUE DU VENTRICULE GAUCHE (H/Ri).....	89
FIGURE 21 : VARIATION DE LA DUREE DE L'ESPACE PR (CONDUCTION ATRIO-VENTRICULAIRE) SOURIS PDZRN3 OE (4) VS CTL (6).....	90
FIGURE 22 : A : COUPE HISTOLOGIQUE LONGITUDINALE COLOREE AU TRICHROME DE MASSON (CONTROLE VS PDZRN3 OE) ; B RATIO POIDS DU COEUR / POIDS SOURIS. AU MOMENT DU PRELEVEMENT, UNE CARDIOMEGALIE EST OBSERVEE AVEC UNE AUGMENTATION DE L'INDEX CARDIAQUE (RAPPORT DE LA TAILLE DU CŒUR PAR RAPPORT AU DIAMETRE DE LA CAGE THORACIQUE). PAR AILLEURS, UNE AUGMENTATION DU RATIO POIDS DU CŒUR SUR POIDS TOTAL DE LA SOURIS EST NOTEE DE MANIERE STATISTIQUEMENT SIGNIFICATIVE (5,89 +/- 0,65 ; 9,85 +/- 2,42 MG*G-1).....	91
FIGURE 23 : A : COUPES HISTOLOGIQUES TRANSVERSALES DE MYOCARDE MURIN COLOREES AU TRICHROME DE MASSON ET EVALUATION DU RAPPORT SURFACE INTERNE DU VENTRICULE GAUCHE SUR LE POIDS TOTAL.....	91
FIGURE 24 : ANALYSE HISTOLOGIQUE : EVALUATION DU RAPPORT DE L'EPaisseur DE LA PAROI LATERALE DU VENTRICULE GAUCHE (H) SUR LE DIAMETRE INTERNE DU VENTRICULE (Si) DANS LE GROUPE CONTROLE VS PDZRN3 OE ET RAPPORT DE LA SURFACE MYOCARDIQUE (SURFACE TOTALE DU CŒUR – SURFACE DE LA CAVITE INTERNE DU VENTRICULE GAUCHE) SUR LE POIDS TOTAL DE LA SOURIS.....	92
FIGURE 25 : COUPES HISTOLOGIQUES DE COEUR CONTROLE OU PDZRN3 OE COLORES SOIT AU TRICHROME DE MASSON (A GAUCHE) SOIT AU ROUGE SIRIUS, ECHELLE = 50µm. ....	92
FIGURE 26 : POURCENTAGE DE FIBROSE MYOCARDIQUE EN FONCTION DU GENOTYPE (A) ET DE SA TOPOGRAPHIE (B). ....	93
FIGURE 27 : IMMUNOHISTOCHEMIE POUR CD 45 (CTL VS PDZRN3 OE) ET QUANTIFICATION DU MARQUAGE CD 45 (CTL VS PDZRN3 OE).....	93
FIGURE 28 : COUPES HISTOLOGIQUES TRANSVERSALES DE COEUR IMMUNOMARQUEES PAR LE WGA COUPLE A UN FLUOROCHROME, ALEXA 488 (CONTROLE VS PDZRN3 OE), ECHELLE = 20 µm.....	94
FIGURE 29 : SURFACE DE SECTION TRANSVERSALE (A) ET PERIMETRE (B) CARDIOMYOCYTAIRE SUR COUPE TRANSVERSALE DE MYOCARDE (CTL VS PDZRN3 OE).....	95
FIGURE 30 : ANALYSE DE L'INDICE DE SPHERICITE CARDIOMYOCYTAIRE A 3 SEMAINES DE VIE POST NATALE (CONTROLE VS PDZRN3 OE).....	96
FIGURE 31 : ANALYSE DE L'INDICE DE SPHERICITE EN FONCTION DU TEMPS DE VIE POST NATAL DES CARDIOMYOCYTES ISSUS DE SOURIS SAUVAGES. * $p < 0,05$ . ....	96
FIGURE 32 : ANALYSE COMPARATIVE DE L'INDICE DE SPHERICITE ENTRE LES SOURIS CONTROLES ET LES SOURIS PDZRN3 OE EN FONCTION DU TEMPS DE VIE POST NATAL. * $p < 0,001$ .....	97
FIGURE 33 : (A) IMMUNOHISTOCHEMIE Cx43 (CTL VS PDZRN3 OE) ET (B) REPRESENTATION QUANTITATIVE DU MARQUAGE Cx 43 PAR RAPPORT A LA SURFACE TOTALE (CTL VS PDZRN3 OE).....	98
FIGURE 34 : COUPES HISTOLOGIQUES DE COEURS CONTROLES VS PDZRN3 OE A 1 ET 2 SEMAINES, MARQUAGE N CADHERINE ET β CATENINE.....	99
FIGURE 35 : IMMUNOHISTOCHEMIE ZO1 SUR DES COUPES TRANSVERSALES DE MYOCARDE DE SOURIS (CTL VS PDZRN3 OE), ECHELLE = 50 µm LEGENDE : = DISQUE INTERCALAIRE (DI), = NOYAU.....	100

FIGURE 36 : IMMUNOHISTOCHEMIE Cx 43 CHEZ LES SOURIS CONTROLES ET PdZRN3 OE A 4 JOURS, 12 JOURS ET 3 SEMAINES (ECHELLE = 50 $\mu$ M A GAUCHE, 20 $\mu$ M AU MILIEU ET A DROITE). B REPRESENTATION QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DE Cx 43 DANS LES GROUPES PdZRN3 OE VS CONTROLE AU COURS DU TEMPS (* P<0,05). 4 JOURS N=2, 12 JOURS N=4, 21 JOURS N=3, >5 SEMAINES (AVEC FeVG <45 %), N=5.....	101
FIGURE 37 : ANALYSE IMMUNOHISTOCHEMIQUE CHEZ LES SOURIS CONTROLES ET PdZRN3 OE A 4 JOURS, 12 JOURS ET 3 SEMAINES, ANTICORPS ANTI ZO-1 (ECHELLE = 20 $\mu$ M A GAUCHE ET AU MILIEU, 25 $\mu$ M A DROITE).....	102
FIGURE 38 : ANALYSE IMMUNOHISTOCHEMIQUE DE Cx 43 ET ZO-1 CHEZ DES SOURIS SAUVAGES C57BL/6 AU STADE EMBRYONNAIRE (15.5) ET A UN JOUR DE VIE POST NATAL (P1) (ECHELLE = 10 $\mu$ M A GAUCHE ET 20 $\mu$ M A DROITE) LEGENDES : = NOYAU.....	103
FIGURE 39 : QUANTIFICATION DU MARQUAGE AU BRDU (MARQUEUR DE PROLIFERATION) DES CARDIOMYOCYTES ISSUS DE SOURIS CONTROLES VS SOURIS PdZRN3 OE. ** P < 0,05 ; *** P < 0,001. ....	104
FIGURE 40 : ANALYSE EN RT QPCR DE L'EXPRESSION DE LA <i>CYCLINE D1</i> DANS DES COEURS DE SOURIS TRANSGENIQUES (PdZRN3 OE) PAR RAPPORT A LEUR CONTROLE (N=4 PAR GROUPE). ....	104
FIGURE 41 : ANALYSE EN RT QPCR DE L'EXPRESSION DE <i>C-MYC</i> DANS LE GROUPE DES SOURIS SUR-EXPRIMANT PdZRN3 VS LEUR CONTROLE (N=4, * = P < 0,05).....	105
FIGURE 42 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DE <i>GATA 4</i> PAR RT QPCR SUR DES SOURIS PdZRN3 OE VS CONTROLE (N=5 PAR GROUPE). ....	105
FIGURE 43 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DE <i>GATA 6</i> PAR RT QPCR SUR DES SOURIS PdZRN3 OE VS CONTROLE (N=5 PAR GROUPE, *P < 0,05).....	106
FIGURE 44 : ANALYSE PAR RT-QPCR DE L'EXPRESSION DE <i>MEIS1</i> DANS LE GROUPE PdZRN3 OE VS CONTROLE (N=4 PAR GROUPE, * P < 0,05).....	106
FIGURE 45 : SCHEMA DES PROTOCOLES D'INHIBITION DE LA SUREXPRESSION DE PdZRN3 DES LA NAISSANCE OU INITIE A UNE SEMAINE DE VIE POST NATALE. DANS CHAQUE PROTOCOLE UN GROUPE ETAIT FLECHE POUR L'ANALYSE HISTOLOGIQUE A 15 JOURS ET L'AUTRE POUR UN SUIVI ECHOCARDIOGRAPHIQUE SUR 10 SEMAINES.....	107
FIGURE 46 : ANALYSE HISTOLOGIQUE DES JONCTIONS GAP DES DISQUES INTERCALAIRES, MARQUAGE Cx 43 ET ZO-1 A 15 JOURS DE VIE POST NATAL CHEZ DES SOURIS SAUVAGES OU PdZRN3 OE TRAITES PAR LA DOXYCYCLINE DES LA NAISSANCE.....	108
FIGURE 47 : A : ANALYSE PAR WESTERN BLOT DE LA Cx 43 A 15 JOURS DE VIE POST NATAL DES SOURIS SAUVAGES VS PdZRN3 OE TRAITES PAR DOXYCYCLINE DES LA NAISSANCE ; B : SUIVI ECHOCARDIOGRAPHIQUE DES SOURIS DE CE PROTOCOLE PENDANT 10 SEMAINES, N = 6 PAR GROUPE.....	108
FIGURE 48 : ANALYSE HISTOLOGIQUE DES COEURS DE SOURIS SAUVAGES VS PdZRN3 OE TRAITES PAR DOXYCYCLINE A PARTIR D'UNE SEMAINE POST NATALE MARQUE PAR Cx 43 ET ZO-1.....	109
FIGURE 49 : A : ANALYSE PAR WESTERN BLOT DE LA Cx 43 CHEZ LES SOURIS PdZRN3 OE TRAITES PAR DOX A 7 JOURS VS CONTROLE ; B : SUIVI ECHOCARDIOGRAPHIQUE DES SOURIS DANS LE CADRE DE CE PROTOCOLE, * P<0,05, N = 5 PAR GROUPE. ....	109
FIGURE 50 : : A : ANALYSE MOLECULAIRE DES MODIFICATIONS PAR WESTERN BLOT DE $\beta$ CATENINE, PKCZ ET CJUN A UNE ET DEUX SEMAINES POST NATAL DE SOURIS PdZRN3 OE VS CONTROLE B : QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION PROTEIQUE DE Cx 43, PKCZ ET C-JUN, * P<0,05 ; ** P<0,01 ; *** P<0,001, A 1 SEMAINE, N=4 PAR GROUPE ET A 2 SEMAINES N=6 PAR GROUPE. ....	110

FIGURE 51 : ANALYSE PAR FRACTIONNEMENT CELLULAIRE DES SOURIS PDZRN3 OE VS CONTROLE A 15 JOURS DE VIE POST NATAL, ANALYSE DE ZO-1, V5, $\beta$ CATENINE, PKCZ, C-JUN, CX 43 ET A TUBULINE, N = 3 PAR GROUPE.....	111
FIGURE 52 : SCHEMA DE LA DELETION DE PDZRN3 DANS LES CARDIOMYOCYTES. LES SOURIS CONTROLES SONT NOTEEES PDZRN3 F/F ET LES SOURIS MCM - PDZRN3 F/F SONT LES SOURIS GENETIQUEMENT MHC-MERCREMER ; PDZRN3 F/F.	112
FIGURE 53 : ANALYSE ECHOCARDIOGRAPHIQUE DES SOURIS MCM - PDZRN3 F/F INDUITE A J0 VS CONTROLE.....	113
FIGURE 54 : ANALYSE ECHOCARDIOGRAPHIQUE SOURIS MCM PDZRN3 F/F INDUITES A J21 VS CONTROLE.....	114
FIGURE 55 : ANALYSE DES TRANSCRITS DE PDZRN3 PAR RT QPCR APRES 15 JOURS D'INDUCTION PAR LE TAMOXIFENE CHEZ DES SOURIS CONTROLES ET DES SOURIS PDZRN3 F/F (N=5 PAR GROUPE). ....	115
FIGURE 56 : RATIO D'EXPRESSION DU TRANSCRIT DE PDZRN3 EN FONCTION DE LA DUREE DU PROTOCOLE D'ANGIOTENSINE (* = P<0,05). ....	116
FIGURE 57 : SCHEMA DU PROTOCOLE D'INDUCTION D'UNE CARDIOMYOPATHIE HYPERTROPHIQUE PAR PERFUSION SOUS CUTANEE D'ANGIOTENSINE 2, REIMPLANTATION DES POMPES SOUS CUTANEE A 15 JOURS.....	116
FIGURE 58 : RATIO POIDS DU COEUR/ POIDS TOTAL APRES UN MOIS DE TRAITEMENT PAR ANGIOTENSINE 2 (* P<0,05) ...	117
FIGURE 59 : SUIVI ECHOCARDIOGRAPHIQUE DANS LE CADRE DU PROTOCOLE D'ANGIOTENSINE II, SOURIS MCM PDZRN3 F/F VS PDZRN3 F/F (**** P<0,0001), SHAM N=3 PAR GROUPE ET PDZRN3 F/F N=7, MCM- PDZRN3 F/F, N=11.	118
FIGURE 60 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DE PDZRN3 DANS LE CADRE DU PROTOCOLE D'ANGIOTENSINE II (*P<0,05).....	119
FIGURE 61 : ANALYSE DE L'INDICE DE SPHERICITE DANS LE CADRE DU PROTOCOLE D'ANGIOTENSINE II, SHAM N=3, PDZRN3 F/F N=3 ET MCM- PDZRN3 F/F, N=6, ****P < 0,0001. ....	120
FIGURE 62 : SCHEMA DU PROTOCOLE D'INDUCTION D'HYPERTROPHIE PAR CONSTRICTION DE L'AOORTE TRANSVERSE (TAC)	120
FIGURE 63 : ANALYSE POIDS DU COEUR SUR POIDS TOTAL DE LA SOURIS DANS LE CADRE D'UN PROTOCOLE TAC SOURIS DELETEES (MCM PDZRN3 F/F) VS CONTROLE (PDZRN3 F/F), * P<0,05.....	121
FIGURE 64 : ANALYSE DE LA CONTRACTILITE VENTRICULAIRE GAUCHE DANS LE CADRE DU PROTOCOLE DE CONSTRICTION DE L'AOORTE TRANSVERSE (TAC), **** P < 0,0001. ....	121
FIGURE 65 : ANALYSE PAR RT QPCR D'ECHANTILLONS HUMAINS, CARDIOMYOPATHIE HYPERTROPHIQUE (CMH) PHYSIOLOGIQUE OU ADAPTATIVE ; CARDIOMYOPATHIE DILATEE (CMD) ; CARDIOMYOPATHIE HYPERTROPHIQUE (CMH) PATHOLOGIQUE, N=5 DANS LE GROUPE CONTROLE ET 6 DANS LES 2 AUTRES, * P < 0,05. ....	123
FIGURE 66 : COUPES HISTOLOGIQUES DE CARDIOMYOPATHIES HUMAINES MARQUEES PAR CX 43 ET ZO - 1.....	124
FIGURE 67 : ANALYSE DE L'AIRE DES CARDIOMYOCYTES SUR DES COUPES TRANSVERSALES DE MYOCARDE HUMAIN : CARDIOMYOPATHIE ADAPTATIVE (CMH « PHYSIOLOGIQUE » (N=3)) ; CARDIOMYOPATHIE DILATEE (CMD (N=6)) ; CARDIOMYOPATHIE HYPERTROPHIQUE PATHOLOGIQUE (CMH PATHOLOGIQUE (N=4), ** P < 0,01 ; **** P < 0,0001). ....	125
FIGURE 68 : ANALYSE DE L'INDICE DE SPHERICITE DANS LES MYOCARDIOPATHIES HUMAINES : CARDIOMYOPATHIE ADAPTATIVE (CMH « PHYSIOLOGIQUE » (N=3)) ; CARDIOMYOPATHIE DILATEE (CMD (N=6)) ; CARDIOMYOPATHIE HYPERTROPHIQUE PATHOLOGIQUE (CMH PATHOLOGIQUE (N=4), * P < 0,05 ; **** P < 0,0001). ....	125
FIGURE 69 : IMMUNOPRECIPITATION ANTI V5 ET WESTERN BLOT A LA RECHERCHE D'AHNAK ET CONFIRMATION PRESENCE DU V5 (SOURIS AGE DE 4 JOURS).....	126

FIGURE 70 : ANALYSE AU MICROSCOPE CONFOCAL DE LA LOCALISATION CELLULAIRE D'AHNAK SUR DES COUPES DE COEUR DE SOURIS CONTROLES VS SUREXPRIMANT PDZRN3 (PDZRN3 OE), AGEES DE 2 SEMAINES. ....	127
FIGURE 71 : A ANALYSE DE L'EXPRESSION PAR WESTERN BLOT D'AHNAK A 4, 7 ET 14 JOURS CHES LES SOURIS PDZRN3 OE VS LEUR CONTROLE ; B EVALUATION QUANTITATIVE DES VARIATIONS D'AHNAK DANS LE TEMPS. POUR CHAQUE TEMPS, LA QUANTITE DE AHNAK OBTENUE DANS LES LYSATS DE SOURIS SUREXPRIMANT PDZRN3 A ETE EXPRIMEE EN NORMALISANT PAR RAPPORT A LA QUANTITE D'AHNAK DANS LES LYSATS DE COEUR DE SOURIS CONTROLE, * p < 0,05.....	127
FIGURE 72 : WESTERN BLOT APRES IMMUNOPRECIPITATION ANTI V5 OU MYC DE CELLULES HELA COTRANSFECTEES PAR PDZRN3 - V5 ET SOIT MYC - AH - N TERM SOIT MYC - AH - N2 TERM, LT = LYSAT TOTAL .....	128
FIGURE 73 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT D'AHNAK, V5 ET A TUBULINE A PARTIR DE LYSATS DE CELLULES HELA TRANSFECTEES AVEC DES VECTEURS CODANT POUR PDZRN3-V5 EN PRESENCE SOIT UBIQUITINE (UB) SAUVAGE (WT) SOIT MUTEES (UB K48 OU K63). ....	129
FIGURE 74 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT D'AHNAK, V5 ET A TUBULINE DE LYSATS DE CELLULES HELA TRANSFECTEES PAR LES VECTEURS CODANT POUR PDZRN3-V5 ET POUR UBIQUITINE (UB WT) ET TRAITEES POUR UNE DUREE VARIABLE PAR UN INHIBITEUR DU PROTEASOME, MG132. ....	129
FIGURE 75 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT D'AHNAK ET DE L' A TUBULINE DANS UN PROTOCOLE D'ANGIOTENSINE 2 MAINTENU UN MOIS.....	130
FIGURE 76 : WESTERN BLOT ANALYSANT LA PRESENCE D'UNE ISOFORME DE ZO1 A UNE ET DEUX SEMAINES POST-NATAL, SOURIS <i>PdZRN3</i> OE VS CONTROLE. ....	131
FIGURE 77 : ANALYSE PAR FRACTIONNEMENT CELLULAIRE DE LA LOCALISATION D'UNE ISOFORME DE ZO1 SITUEE A ENVIRON 95 kDa, SOURIS <i>PdZRN3</i> OE VS CONTROLE.....	131
FIGURE 78 : ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MS/MS DES PROTEINES DANS DES LYSATS DE COEURS SUREXPRIMANT PDZRN3-V5 (PDZRN3-OE) VERSUS DES COEURS CONTROLES (CTL) A 7 JOURS POST NATAL .....	132
FIGURE 79 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT SUR LYSATS TOTAUX DE PYK2, V5 ET A TUBULINE A PARTIR DE COEUR SUREXPRIMANT PDZRN3 (+) VERSUS DES COEURS CONTROLE (-).....	132

## ABRÉVIATIONS

**AHA** : Association Américaine de Cardiologie

**ACC** : Collège Américain de Cardiologie

**ANP** : atrial natriuretic peptide

**APC** : adenomatous poliposis coli

**ATP** : adénosine triphosphate

**BNP** : Brain natriuretic peptide

**β MHC** : beta myosin heavy chain

**CMD** : cardiomyopathie dilatée

**CMH** : Cardiomyopathie hypertrophique

**Cx 43** : Connexine 43

**DAVD** : Dysplasie arrythmogène du ventricule droit

**Dvl** : Dishevelled

**ESC** : Association Européenne de Cardiologie

**GSK 3β** : glycogène synthase kinase – 3 β

**IRM** : imagerie par résonnance magnétique

**PCP** : voie de signalisation Wnt/Fzd dite non canonique, voie de polarité cellulaire planaire

**PDZRN3** : PDZ domain containing ring finger 3

**PKP2** : gène codant pour la plakophilin 2

**ROR2** : Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2

**ZO** : Zonula occludens



## AVANT PROPOS

Les maladies cardiovasculaires sont la deuxième cause de mortalité en France, environ 110 000 décès sont recensés chaque année. Parmi ces décès, 19,39% sont liés à des cardiomyopathies, d'après les données du rapport 2017 de la DREES (Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques). La compréhension des mécanismes moléculaires responsables de ces cardiomyopathies est un pré-requis nécessaire à la prise en charge et à l'adaptation thérapeutique de ces patients. Ma recherche s'inscrit dans l'étude de la maturation post-natale des disques intercalaires et leur régulation dans des processus pathologiques. Les protéines Wnt et leur récepteur Frizzled régulent le développement myocardique via une signalisation intra-cellulaire complexe. L'implication de la voie Wnt/Fzd dite canonique est clairement démontrée dans la littérature. En parallèle, il existe une voie de polarisation cellulaire dite voie de polarité planaire et cellulaire (PCP). Cette voie est impliquée dans le développement embryonnaire myocardique. Au sein du laboratoire, il a été trouvé, dans une stratégie de criblage d'acteurs des voies Wnt/Fzd, une ubiquitine ligase PDZRN3. Cette protéine a été impliquée dans la régulation des jonctions intercellulaires endothéliales lors de travaux précédents de l'unité. Par ailleurs dans le cadre des cardiomyopathies, les systèmes de jonctions intercellulaires (principalement les disques intercalaires), sont très fréquemment incriminés, notamment dans les cardiomyopathies arythmogènes (dysplasie arrhythmogène du ventricule droit (DAVD) par exemple). Dans ce contexte, il nous est paru intéressant d'évaluer l'action de cette protéine dans la régulation des systèmes de jonctions intercardiomyocytaires.

## INTRODUCTION

Tous les protocoles de traitement des myocardiopathies sont couramment basés sur le phénotype (signes cliniques de la myocardiopathie et symptômes). Les classifications basées sur le phénotype (myocardiopathie hypertrophique, myocardiopathie dilatée, myocardiopathie restrictive, dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD) et les non compactons du ventricule gauche) décrivent les formes majeures des cardiomyopathies mais pas leurs causes. Les myocardiopathies sont des pathologies hétérogènes cliniquement (Charron et al., 2010; Jacoby and McKenna, 2012; Watkins et al., 2011), dans chaque sous-type nosologique il y a des différences en terme de sex-ratio, d'âge de début des manifestations cliniques, de vitesse de progression de la pathologie, de risque de développer une insuffisance cardiaque clinique et de probabilité de mort subite.

Par exemple, dans le groupe des myocardiopathies dilatées, on trouve des patients avec une dilatation modérée et une dysfonction modérée du ventricule gauche qui développent une arythmie ventriculaire potentiellement mortelle, contrairement à d'autres patients dans ce même groupe qui présentent une dilatation et une dysfonction extrêmement importantes mais qui ont un risque d'arythmie faible. De façon similaire, dans le groupe des myocardiopathies hypertrophiques l'importance de l'hypertrophie pariétale n'est pas corrélée au risque d'arythmie. Pour définir le risque d'arythmie, de nombreux marqueurs électrocardiographiques sont associés aux myocardiopathies pour déterminer les patients à risque (bloc atrioventriculaire, le syndrome de pré-excitation (syndrome de Wolff Parkinson White), les anomalies de la repolarisation ou la diminution du voltage du QRS).

L'échocardiographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) myocardique peuvent révéler des caractéristiques variables parmi les patients présentant un phénotype similaire (incluant la sévérité et l'étendue de l'atteinte myocardique, la taille de la dilatation ventriculaire, l'importance de la dysfonction ventriculaire, l'étendue de la fibrose myocardique, la présence d'une infiltration graisseuse myocardique ...) (Karamitsos and Neubauer, 2013; Quarta et al., 2011).

Bien que chaque sous type de myocardiopathie soit clairement défini en tant que phénotype majeur morpho-fonctionnel, une évaluation clinique prudente est nécessaire devant l'extrême variabilité phénotypique.

La plupart des myocardopathies héréditaires se transmettent selon un profil autosomique dominant, cependant il existe des cas de myocardopathies transmises par une hérédité liée au chromosome X, des formes autosomales récessives ou des formes de transmission maternelle. Ainsi, l'élucidation de l'histoire familiale et la compréhension de la généalogie sont des impératifs nécessaires lors de la réalisation d'une étude familiale (Arbustini et al., 2002, 2006; Rapezzi et al., 2013). Cependant cette analyse ne peut être à elle seule suffisante pour établir le diagnostic de myocardopathie familiale. L'analyse familiale et l'examen clinique sont nécessaires pour identifier les membres de la famille asymptomatique et non conscients de leur pathologie et ceux qui présentent déjà des anomalies infra-cliniques de la pathologie sur des examens non-invasifs. Ces examens constituent par ailleurs des marqueurs de la pathologie à des stades précoces (Charron et al., 2010; Rapezzi et al., 2013). La connaissance des bases génétiques de différentes myocardopathies a progressivement augmenté (Jacoby and McKenna, 2012; Norton et al., 2013).

Les analyses génomiques, le séquençage du génome et les études d'associations génomiques ont contribué à augmenter la liste des gènes pathologiques, laquelle contient actuellement plus de 100 gènes (Jarcho et al., 1989; Meder et al., 2014; Villard et al., 2011). Ainsi les myocardopathies hypertrophiques sont liées à des mutations au niveau des gènes codant pour des protéines du sarcomère (Lopes et al., 2013). Tandis que les myocardopathies dilatées sont causées par des mutations de gènes impliqués dans la structure ou la fonction de l'enveloppe nucléaire, le cytosquelette, le sarcomère et ou le réticulum sarcoplasmique (Hershberger et al., 2013). La DAVD est quant à elle rapprochée d'un ensemble de mutations génétiques touchant le desmosome (Romero et al., 2013).

Toutefois, le lien rapide défini entre un phénotype et un groupe de gènes spécifiques dans le cadre d'une myocardopathie n'a pas été confirmé par les récentes analyses génétiques. En fait, les anomalies génétiques peuvent entraîner des phénotypes pathologiques similaires, la plupart des gènes pathologiques ne sont pas liés à un unique phénotype et une mutation génétique identique peut induire différents phénotypes pathologiques. Un nombre croissant de myocardopathies est associé à des modifications génétiques multiples (Girolami et al., 2010).

L'augmentation constante du nombre de gènes « pathologiques » suggère que le problème non résolu de la variabilité de la pénétrance peut être lié soit à un

génotypage incomplet des gènes impliqués dans l'expression clinique de la pathologie, soit à une erreur d'attribution d'une mutation génétique dans la physiopathologie d'une cardiopathie donnée. Bien que les études fonctionnelles permettent d'élucider vraisemblablement le rôle des mutations protéiques, la vitesse de détection des mutations génétiques continuera de dépasser les études expérimentales nécessaires pour confirmer leur importance fonctionnelle dans des modèles *in vivo* chez l'animal ou des études *in vitro*. Cette approche de test génétique peut continuer en étant guidée cliniquement soit par le séquençage de gènes sélectionnés sur la base des hypothèses diagnostiques cliniques soit sur le séquençage d'un large panel de gènes candidats ou associés à un groupe nosologique (Frese et al., 2013; Lopes et al., 2013; Morales and Hershberger, 2013; Sturm, 2013). Ainsi l'interprétation des résultats plus que la réalisation des tests apparaît comme un challenge plus important dans l'ère actuelle des nouvelles techniques de séquençage.

Sur cette base des évidences clinique et génétique montrant que la plupart des cardiopathies sont des pathologies familiales et que le diagnostic génétique est maintenant rattachable à une grande proportion de patients, les sociétés scientifiques, comme la société de rythmologie, la société américaine de l'insuffisance cardiaque et la société européenne de cardiologie ont fourni des directives et des recommandations pour le dépistage familial et les tests génétiques nécessaires dans le cadre des cardiomyopathies, Figure 1.

<b>ESC Position Statement on Genetic Counseling and Testing in Cardiomyopathies, 2010 (16)</b>		
	Legal rules for pre-natal diagnosis vary in different countries	No standards
	Selected disorders or high-risk situations in the setting of expert teams after detailed clinical and family assessment	Appropriate
	Molecular analyses and appropriate and correct interpretation	8
	Should be performed in certified diagnostic laboratories; requires expert multidisciplinary centers	Suggestion
	Phenotype and family assessment should be available for appropriate tests and correct interpretation	Suggestion
	Post-test genetic counseling	9
	Recommended for all patients and families (appropriate) with a cardiomyopathy	Recommended
	Should be performed by specifically-trained professionals, in a multidisciplinary manner, and in specialized centers	Suggestion
<b>HRS/EHRA, 2011 (77)</b>		
HCM	Genetic test should be performed in patients with clinical diagnosis of HCM, either comprehensive or targeted ( <i>MYBPC3, MYH7, TNNI3, TNNT2, TPM1</i> )	I
	Mutation-specific genetic testing in relatives of mutated probands	I
DCM	Diagnosis in probands/index patients with DCM with CCD, either comprehensive or targeted ( <i>LMNA and SCN5A</i> )	I
	Mutation-specific genetic testing in relatives of mutated probands	I
	Patients with familial DCM: confirm diagnosis; identify patients at risk of arrhythmias; and facilitate family screening and monitoring plans	IIa
RCM	Mutation-specific test in family members after identification of the causative mutation in the index case.	I
	Patients with clinical suspicion for RCM	IIb
ACM/ARVC	Mutation-specific test in family members after identification of the causative mutation in the index case.	I
	Comprehensive and targeted ( <i>DSC2, DSG2, DSP, JUP, PKP2, and TMEM43</i> ) for patients satisfying task force criteria for ACM/ARVC.	IIa
	Patients with 1 major or 2 minor criteria, according to the 2010 task force criteria	IIb
	Patients with only a single minor criterion	III
LVNC	Mutation-specific test in family members after identification of the causative mutation in the index case.	I
	Patients with an established clinical diagnosis of LVNC	IIb
<p>The table summarizes the strength of evidence for genetic testing provided in existing documents from scientific societies with the caveat that randomized and/or blinded studies do not exist and published data are either from a single institution or multicenter collections or registries.</p> <p>ACM = arrhythmogenic cardiomyopathy; ARVC = arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; CCD = cardiac conduction disease; CK-MM = creatine kinase-MM; CMR = cardiac magnetic resonance; DCM = dilated cardiomyopathy; ECG = electrocardiogram; ECHO = echocardiogram; EHRA = European Heart Rhythm Association; ESC = European Society of Cardiology; HCM = hypertrophic cardiomyopathy; HRS = Heart Rhythm Society; LVNC = left ventricular noncompaction; RCM = restrictive cardiomyopathy.</p>		

**Figure 1 : Recommandation de bonnes pratiques des tests génétiques dans le cadre des myocardiopathies d'après l'ESC**

# PARTIE I : CARDIOMYOPATHIES

## I / Classification des myocardiopathies

### 1 / Classification de l'Association Américaine de Cardiologie (AHA)

La classification des myocardiopathies est complexe du fait de la multiplicité des étiologies et leur potentielle intrication. En 2006, l'association américaine de cardiologie (AHA) définit les cardiomyopathies comme un groupe hétérogène associant des dysfonctions mécaniques et électriques entraînant le plus souvent, mais de façon inconstante, une modification de la morphologie myocardique, soit une hypertrophie pariétale soit une dilatation ventriculaire. Cependant cette société précise l'importance et la fréquence d'implication des facteurs génétiques dans la survenue des cardiomyopathies. Ces myocardiopathies pouvant s'intégrer dans le cadre de syndromes génétiques généraux ou cardio-spécifiques. Dans cette classification, elle identifie deux groupes distincts :

- Les cardiopathies primitives (d'origine génétique, non génétique et mixte),  
Figure 2.

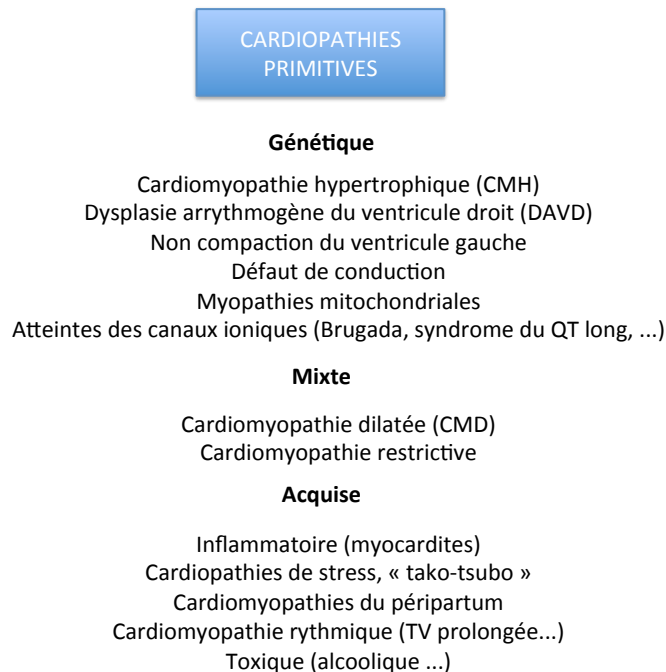


Figure 2 : Classification des myocardiopathies primitives selon l'association américaine de cardiologie (AHA)

- Les cardiopathies secondaires, liées à une atteinte myocardique dans le cadre d'un grand nombre de pathologies systémiques affectant différents organes (Figure 3).

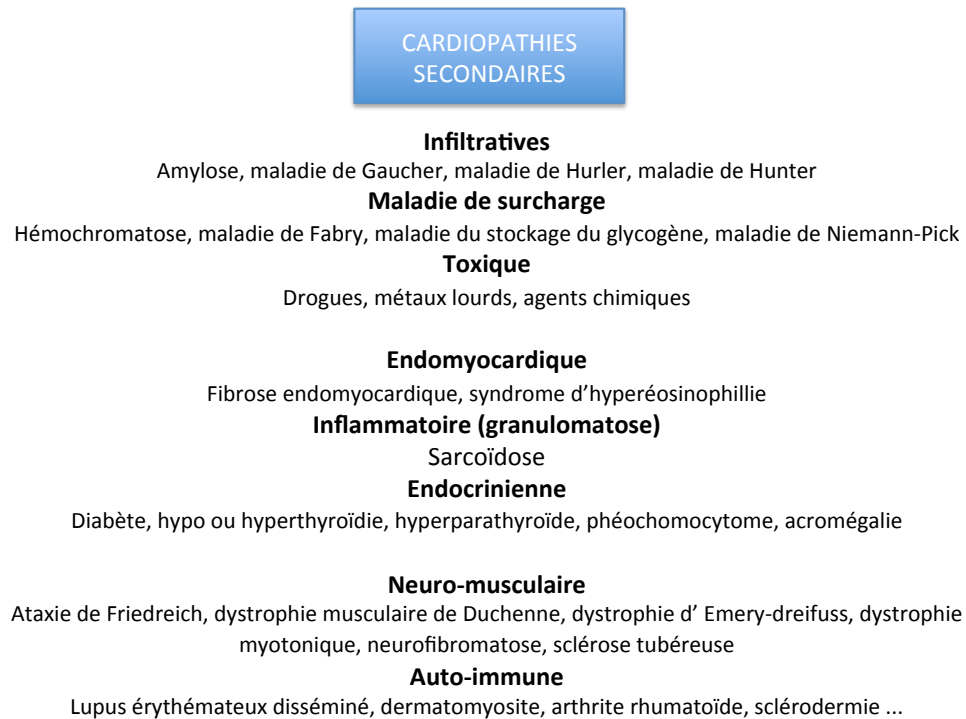


Figure 3 : Classification des cardiopathies secondaires selon l'Association Américaine de Cardiologie (AHA)

## 2 / Classification de l'Association Européenne de Cardiologie (ESC)

La classification de l'ESC est davantage basée sur une vision clinique permettant de contourner la complexité de la physiopathologie des cardiomyopathies. En effet celle-ci n'est pas toujours appréciable par la présentation clinique des patients. Dans les recommandations de l'ESC les myocardopathies sont classées par phénotypes morpho-fonctionnels et chaque phénotype est ensuite subdivisé en forme familiale et non familiale (figure 3). Dans ce contexte, la forme familiale est définie par la survenue d'une même atteinte morpho-fonctionnelle myocardique chez au moins deux membres d'une même famille. Une mutation génétique est alors suspectée. Toutefois, il ne faut pas inclure dans ces formes familiales les atteintes cardiaques ou systémiques acquises, au sein d'une même famille, qui sont influencées par le polymorphisme génétique. La plupart des

myocardiopathies familiales résultent d'une atteinte d'un seul gène (c'est à dire qu'une modification génétique unique est suffisante pour provoquer la pathologie). Une cardiomyopathie familiale monogénique peut être sporadique en cas de mutation de novo. Une attention particulière doit donc être portée sur sa descendance. (Elliott et al., 2008).

Les myocardiopathies non familiales sont définies cliniquement par l'absence dans l'entourage familial d'autre sujet atteint. Dans ce groupe nosologique, la myocardiopathie peut être idiopathique (pas de cause identifiable) ou acquise. Dans ce dernier cas, la dysfonction ventriculaire est la résultante de l'évolution d'un processus pathologique plus qu'une atteinte intrinsèque du myocarde.

### **3/ Nouvelle classification des cardiomyopathies : « MOGE(S) »**

Les cardiomyopathies sont des atteintes du muscle cardiaque qui sont suffisantes pour causer des anomalies structurelles et fonctionnelles du myocarde en l'absence de pathologies favorisantes (coronaropathies, hypertension artérielle, valvulopathie ou cardiopathie congénitale). La plupart des cardiomyopathies « primitives » sont héréditaires comme le montrent les arguments cliniques et génétiques actuels (Raghow, 2016; Xu et al., 2010). Les systèmes de classification actuels soulignent l'importance de l'apport des cardiologues dans la compréhension du phénotype des patients et de leur famille atteinte par une cardiomyopathie morpho-fonctionnelle.

La classification de l'association américaine de cardiologie (AHA) distingue les cardiomyopathies en fonction de leur origine génétique ou acquise ou mixte. La classification de la société européenne de cardiologie (ESC) propose quant à elle de séparer les différentes formes majeures de cardiomyopathies en formes familiales ou génétiques, des autres formes qui ne le sont pas.

Le collège américain de cardiologie (ACC) et l'association américaine de cardiologie (AHA) définissant l'insuffisance cardiaque incluent les patients asymptomatiques avec une histoire familiale de myocardiopathie dans les stade A ou « pré » - insuffisance cardiaque (Arbustini et al., 2014).

Ces vingt dernières années, le dépistage systématique, notamment le criblage



généétique, des familles atteintes de myocardiopathies permet de mieux évaluer les formes familiales de ces pathologies. Cette méthode permet l'identification des sujets à risque de développer la pathologie au sein une famille, dont un individu est atteint, en fonction de l'hérédité et de la connaissance des liens entre la myocardiopathie et les mutations génétiques associées. L'électrocardiogramme et l'échocardiographie peuvent ainsi apporter des arguments « précliniques » d'une atteinte myocardique (Baig et al., 1998; Gavazzi et al., 2001; Hamid et al., 2002; Mahon et al., 2005; Maron et al., 2006; McKenna et al., 1997; Murphy et al., 2005; Nava et al., 2000).

D'un autre coté, les myocardiopathies « non-génétiques » peuvent être associées à une étiologie spécifique, qu'elles soient liées à une infection virale, une maladie auto-immune, ou une cardiotoxicité endogène ou exogène. Ainsi actuellement l'algorithme diagnostique des myocardiopathies repose sur des arguments d'imagerie spécifique (échocardiographie, IRM myocardique), des biomarqueurs spécifiques et des analyses génétiques (Caforio et al., 2013).

La nécessité d'une nouvelle classification vient du fait de l'augmentation des connaissances en terme de modifications génétiques responsables de la survenue de myocardiopathies et de la difficulté d'association clinique stricte entre une modification génétique précise et le phénotype clinique des patients. En effet le phénotype est secondaire à des modifications génétiques pouvant être multiples ou une modification génétique peut être responsable d'un phénotype variable soit dans l'expression clinique (patients asymptomatiques notamment) soit dans le phénotype présenté par le patient (par exemple une même modification génétique peut « entraîner » ou plutôt participer à l'expression d'une myocardiopathie hypertrophique ou dilatée).

Soutenu par la fédération mondiale de cardiologie, la classification MOGE(S) a été développée à partir du besoin de décrire les myocardiopathies en intégrant le phénotype morpho-fonctionnel basé sur la description des implications extracardiaques, de la clinique (mode de transmission génétique) et de la génétique moléculaire (gène « pathologique » et mutations) dans le cadre d'une pathologie familiale (Arbustini et al., 2013). La classification MOGE(S) vise également à décrire les formes sporadiques de myocardiopathies et spécifier leur étiologie lorsqu'elle est connue ou non.

Même pour les myocardiopathies sporadiques, l'origine génétique de la pathologie ne peut être exclue sauf si une cause non génétique est prouvée. Un dépistage familial doit être organisé pour exclure une hérédité familiale. En l'absence de certitude, chaque myocardiopathie doit être considérée comme une potentielle maladie génétique.

Un parallèle peut être fait entre la classification TNM en oncologie et la classification MOGE(S), Figure 4. La classification MOGE(S) de la nosologie des myocardiopathies repose sur cinq éléments :

- Le phénotype morpho - fonctionnel (M)
- Les anomalies extracardiaques (O)
- Le mode de transmission génétique (G)
- La description étiologique (E), présence ou absence de mutations génétiques comme cause sous-jacente.
- Le statut fonctionnel (S), utilisant la classification de l'insuffisance cardiaque du collège américain de cardiologie et de l'association américaine de cardiologie (ACC/AHA, de A à D) et la classification fonctionnelle de la NYHA (New York Heart Association)(I à IV) étant également intégré

Le S de cette classification est rajouté principalement pour intégrer les patients porteurs d'une mutation génétique (responsable potentiellement d'une myocardiopathie) en bonne santé ou présentant des éléments para-cliniques, mais infra-cliniques, suggestifs d'une myocardiopathie.

NOTATION	M MORPHO-FUNCTIONAL PHENOTYPE	O ORGAN/SYSTEM INVOLVEMENT	G GENETIC INHERITANCE PATTERN	E ETIOLOGY	S STAGE
CHARACTERISTICS	Proband's cardiomyopathy (CM) diagnosis (DCM, HCM, RCM, ARVC/D, LVNC)	Clinical history and evaluation Organ involvement: Extracardiac organs/tissues Multidisciplinary evaluation according per clinical needs or diagnostic hypothesis	Genetic counseling with pedigree Clinical family screening Genetic testing in the proband	Genetic testing in the proband	Functional status ACC/AHA, NYHA
SUBSCRIPT	D Dilated H Hypertrophic R Restrictive R EMF Endomyocardial fibrosis A ARVC NC LVNC E Early, with type in parentheses NS Nonspecific phenotype NA Information non available O Unaffected*	H Heart M Muscle (skeletal) N Nervous C Cutaneous E Eye, Ocular A Auditory K Kidney G Gastrointestinal Li Liver Lu Lung S Skeletal O Absence of organ/system involvement*, e.g. in family members who are healthy mutation carriers; the mutation is specified in E and inheritance in G	Familial Non-familial; Phenotypically sporadic Inheritance AD, AR XL (R or D) or Matrilineal Informative and non-informative families Consultant non-informed about family history	Affected, asymptomatic relative unaware of the disease Relatives with ECG and/or Echo abnormalities Healthy family members with normal ECG and ECHO Positive Negative Cascade genetic testing in relatives New tests novel genes Regular monitoring in relatives	ACC-AHA stage represented as letter A, B, C, D NA not applicable NU not used followed by NYHA class represented as Roman numeral I, II, III, IV

**CENTRAL ILLUSTRATION The MOGE(S) Nosology System for Classifying CM Patients**

Evaluation of cardiomyopathy patients and development of MOGE(S) nosology. **(M)** The morphofunctional phenotype description may contain more information using standard abbreviations: AVB = atrioventricular block; LQT = prolongation of the QT interval; ↓PR = short PR interval; ↓R = low electrocardiographic voltages; WPW = Wolf Parkinson White syndrome; and other clinical red flags. These red flags are to be placed in parentheses after the notation of morphofunctional phenotype. *Overlapping (H+R), (D+A), (NC+H), (H+D), (D+NC) or more complex combinations such as (H+R+NC).* \*Notation is zero (O) not the letter "O." **(E)** The etiologic annotation provides the description of the specific disease gene and mutation, as well as a description of nongenetic etiology. Even when genetic analysis is not available, the **(G)** may inform about a genetic disease, supporting family monitoring strategies. #According to the Human Genome Variation Society, genetic variants should be classified based on their effects on gene function as: affecting function, probably affecting function, unknown (variants of unknown significance [VUS]), probably not affecting function, and not affecting function. A color code assigned to each variant can provide information about the potential role of the identified variant: affects function or probably affects function (**red**); Variant of Unknown Significance (VUS) (**yellow**); and probably does not affect function (or probably no functional effect) or does not affect function (no functional effect) (**green**). The compilation is guided by the MOGES app (63). ACC = American College of Cardiology; AHA = American Heart Association; ARVC/D = arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia; DCM = dilated cardiomyopathy; ECG = electrocardiogram; ECHO = echocardiogram; HCM = hypertrophic cardiomyopathy; LVNC = left ventricular noncompaction; NYHA = New York Heart Association; RCM = restrictive cardiomyopathy.

**Figure 4 : Classification MOGE(S) des cardiomyopathies**

*M* : *Phénotype Morpho-fonctionnel*. Cette notation *M* fournit le diagnostic clinique de la pathologie correspondant à la description du phénotype ( $M_D$  pour Myocardiopathie dilatée,  $M_H$  pour hypertrophique,  $M_A$  pour DAVD, etc...). Cette notation correspond à la classification clinique courante des myocardiopathies. Cette classification permet également de préciser le profil évolutif de la myocardiopathie : en effet une myocardiopathie hypertrophique évoluant en myocardiopathie dilatée congestive ou une myocardiopathie hypertrophique présentant un caractère restrictif significatif peuvent être notés respectivement  $M_{H+D}$  ou  $M_{H+R}$ . Dans cette classification initiale il peut être rajouté des éléments cliniques importants, notamment la présence d'un intervalle PR court sur l'ECG, un Wolf Parkinson White (WPW), ces éléments seront alors notés :  $M_{H[PR]}$  ou  $M_{H[WPW]}$ . Enfin cette classification permet d'intégrer les patients présentant un phénotype pathologique précocement sans pathologie clairement déclarée : par exemple, lorsque les critères diagnostiques d'un phénotype clinique suspecté (comme une myocardiopathie dilatée ou hypertrophique) ne sont pas remplis mais que l'échocardiographie objective une augmentation du diamètre télédiastolique du ventricule gauche et une fraction d'éjection ventriculaire gauche limite ( $M_{E[D]}$ ) ou une possible hypertrophie ventriculaire gauche chez un patient ne portant pas la mutation génétique qui a causé la pathologie dans la famille ( $M_{E[H]}$ ). Les patients porteurs d'une mutation génétique potentiellement responsable d'une myocardiopathie mais n'ayant pas les caractéristiques phénotypiques de la pathologie sont notés  $M_0$ .

Lorsque les informations sur le phénotype pathologique ne sont pas disponibles (comme un proche décédé) la description est  $M_{NA}$ . Ainsi cette classification est flexible et permet de s'adapter à n'importe quelle combinaison de phénotype pathologique et de traits cliniques.

*O* : *Organes impliqués* : cette sous partie permet de préciser les autres atteintes organiques associées à la myocardiopathie (par exemple une atteinte rénale associée). Cette partie permet de restreindre les étiologies possibles en fonction du phénotype présenté et dans le cadre d'une analyse génétique de diminuer le nombre de cibles potentielles.

*G : Transmission génétique* : Cette troisième lettre descriptive représente le mode de transmission de la myocardopathie en fonction de l'analyse de l'arbre généalogique (par exemple  $G_{AD}$  pour autosomique dominant). Les patients présentant une myocardopathie étiquetée sans autre personne dans leur entourage présentent une mutation de novo et sont notés  $G_{DN}$ . Et ceux présentant un phénotype de cardiomyopathie « sporadique » sont notés  $G_S$ .

*E : Etiologie* : La notation « E » inclut une description en deux étapes :

- La première étape informe sur le type de cardiomyopathie (génétique ou non)

- La seconde étape définit l'étiologie précise, notamment en cas de pathologie génétique identifiée, en précisant la mutation génétique causale. Dans le cadre de myocardopathie non génétique, il peut être précisé l'infection virale causale, par exemple.

*S : Statut fonctionnel* : Le « S » se définit en deux notations décrivant la présentation clinique des patients en utilisant la classification de l'ACC et l'AHA de l'insuffisance cardiaque et la classe fonctionnelle NYHA (par exemple :  $S_{A-1}$ ).

La Figure 4 présente cette classification permettant l'étude et le suivi des patients présentant une myocardopathie.

#### **4 / Classification des cardiomyopathies dans la littérature scientifique**

L'hypertrophie cardiaque est caractérisée par l'augmentation de la taille cellulaire. Elle est accompagnée d'une synthèse protéique, de fibrose et d'une stimulation de l'expression des gènes embryonnaires (incluant l'ANP (atrial natriuretic peptide), le BNP (Brain natriuretic peptide) et le  $\beta$ -MHC (beta myosin heavy chain) (Rohini et al., 2010). Initialement l'hypertrophie est une réponse adaptative, secondairement cette hypertrophie peut conduire à un remodelage inadapté et à la survenue d'une insuffisance cardiaque. Trois formes d'hypertrophie sont décrites : l'hypertrophie excentrique, concentrique et physiologique. Cette définition de l'hypertrophie prédomine dans la vision scientifique en biologie.

L'hypertrophie excentrique, généralement liée à une surcharge volumique, se traduit par une dilatation ventriculaire associée à une élongation des cardiomyocytes.

L'hypertrophie concentrique, typiquement causée par une augmentation des pressions, se traduit par une augmentation de l'épaisseur de la paroi myocardique sans dilatation des massifs ventriculaires (Frey et al., 2004)

L'hypertrophie pathologique implique souvent l'action de stimuli comme la phényléphrine (PE), angiotensine II et l'endothéline - 1 (ET-1), lesquels activent la voie de la calcineurine impliquant NFAT.

L'hypertrophie adaptative ou physiologique s'observe chez les sportifs entraînés et les femmes enceintes. Dans ce contexte précis, les mécanismes moléculaires des voies de signalisation impliqués sont différents. Ils font appel principalement à la voie de signalisation impliquant la protéine kinase B (Akt), laquelle a de nombreuses cibles parmi lesquelles GSK-3 $\beta$ .

La progression de l'hypertrophie myocardique vers l'insuffisance cardiaque est très clairement délétère. En pratique clinique courante la prise en charge thérapeutique de ces pathologies fait appel à des médicaments ayant une action anti-hypertrophique (Bétabloquant, inhibiteur calcique) ou une action de réduction du volume de charge (pré ou post charge comme les vaso-dilatateurs ou les diurétiques) (McKinsey and Kass, 2007).

Dans ce cadre là, l'hypertrophie myocardique émerge comme une cible à part entière dans la prise en charge thérapeutique.

## **II / Cardiospécificité : Système de jonction inter-cardiomyocytaire**

Dans le myocarde adulte humain, une quantité énorme de cardiomyocytes intégrés fonctionnellement forme un syncytium qui transforme l'activation électrique en contraction au niveau du myocarde. La séquence des événements, permettant chaque contraction cardiaque, qui commence par la génération d'une impulsion spontanée au niveau du nœud sinusal et se termine par la relaxation ventriculaire est très précisément orchestrée. Un des aspects importants de cet organe, qui détermine

la fonctionnalité de ce syncytium, est donné par le mode spécifique d'interconnexion entre les cardiomyocytes. Les cardiomyocytes humains adultes sont de grandes cellules polarisées regroupées en fibres musculaires avec une longueur approximative de 100  $\mu\text{m}$  et un diamètre transversal d'environ 10  $\mu\text{m}$ . A leur extrémité longitudinale les cardiomyocytes sont interconnectés par des structures spécialisées appelées disques intercalaires (ID). Ces disques intercalaires sont composés de plusieurs complexes d'interaction protéique comprenant les jonctions intercellulaires dites jonctions communicantes ou Gap, les jonctions adhérentes et les desmosomes.

Le couplage mécanique intercellulaire est nécessaire pour assurer une contraction cardiaque appropriée. Ce couplage est favorisé par les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions adhérentes sont le point d'ancrage des myofibrilles qui sont elles capables de transmettre la force contractile d'un myocyte à un autre (Noorman et al., 2009).

Les disques intercalaires sont des structures complexes et très bien orchestrées dans lesquelles de multiples protéines interagissent et forment un large complexe de cohésion cellulaire et de communication intercellulaire. Un nombre certain de cardiopathies ont été décrites dans lesquelles il existe un défaut dans le couplage mécanique entre les cardiomyocytes conduisant à une myocardiopathie. Dans ces pathologies on observe non seulement une insuffisance contractile mais également des troubles rythmiques associés à la survenue d'arythmies fatales.

Du fait du rôle majeur des disques intercalaires, il est logique que des mutations de ces protéines constitutives soient responsable d'une multitude de cardiomyopathies. L'exemple le plus démonstratif et le plus étudié regroupe les cardiomyopathies arythmogènes (cardiomyopathie ou dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD), la pathologie de Naxos ou le syndrome de Brugada). Dans le cadre des dysplasies arythmogènes du ventricule droit, il est observé dans 60% des cas une anomalie des protéines constitutives des desmosomes, que ce soit la plakoglobine, ou la desmoplakine (Mayosi et al., 2017). Dans ce groupe nosologique, on observe un remaniement fibro-adipocytaire du myocarde. Une des explications mécanistiques repose sur la translocation de la plakoglobine au niveau nucléaire entraînant une transactivation de facteurs de transcription responsable de cette transformation des cardiomyocytes. Par ailleurs du fait d'une proximité de séquence

de la plakoglobine et de la  $\beta$ -caténine, il y a une diminution des facteurs de transcription induits par la voie wnt/ $\beta$  caténine dépendante (Corrado et al., 1997a; Garcia-Gras, 2006; Thiene et al., 1988).

La perturbation de cette délicate interaction entre le couplage électrique (rythmique) et mécanique semble être l'élément clé de ces pathologies. Ainsi ces disques intercalaires ont fait l'objet de multiples études humaines, animales et *in vitro*.

## 1/ Disques intercalaires

La structure principale des jonctions inter-cardiomyocytaires est représentée par le disque intercalaire, situé aux extrémités des cardiomyocytes en coupe longitudinale (Van Breemen, 1953). Ces structures sont composées de trois complexes protéiques individualisables : les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes, Figure 5.

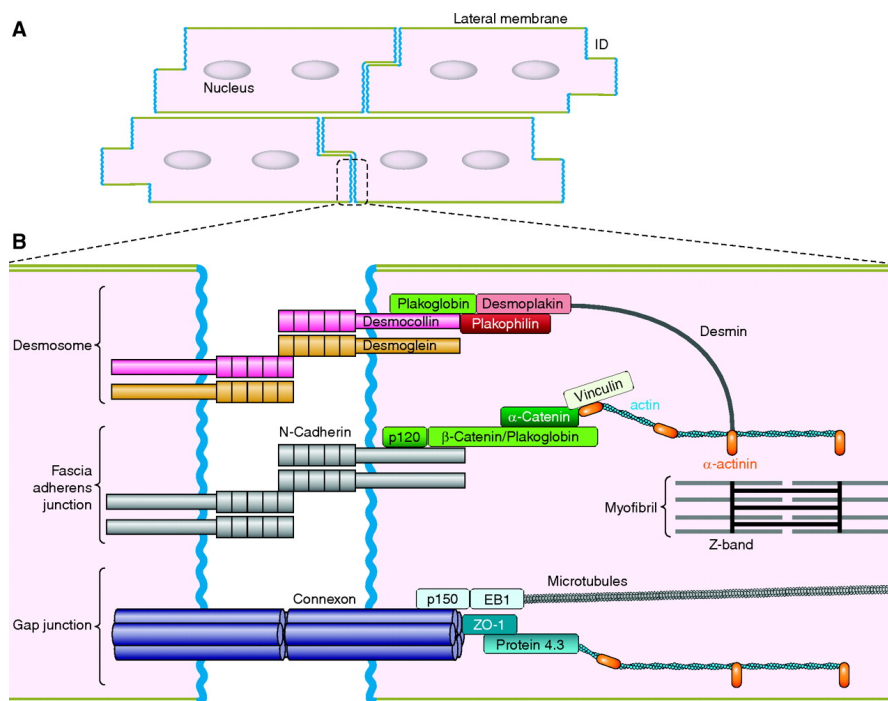


Figure 5 : Une structure spécialisées : le disque intercalaire des cardiomyocytes. A Schéma de l'organisation syncytiale du myocarde. Les cardiomyocytes sont des cellules allongées, couplées électriquement et mécaniquement dans un axe longitudinal grâce à une structure spécialisée et intriquée, les disques intercalaires (DI). B : schéma zoomant sur un disque intercalaire et ces trois structures spécialisées : desmosomes, les jonctions N-cadhérine et les jonctions Gap. La ligne bleue correspond à la membrane des disques intercalaires alors que la double ligne verte représente la membrane latérale du sarcolemme des cardiomyocytes (Balse et al., 2012).



### *1.1 – Les jonctions adhérentes :*

Ces structures assurent un couplage mécanique fort entre les cardiomyocytes en permettant d'interconnecter le cytosquelette d'actine des différentes cellules. Elles permettent ainsi une résistance mécanique uniforme du myocarde (Tepass et al., 2000). Elles maintiennent fermement les cardiomyocytes entre eux lors des contractions et relaxations du myocarde. Les jonctions adhérentes interagissent également avec les myofibrilles permettant la transmission de la force contractile de cellule en cellule (Ferreira-Cornwell et al., 2002).

Les jonctions adhérentes sont composées de cadhérines et de caténines. La N-Cadhérine est la principale isoforme dans le myocarde. C'est une protéine transmembranaire qui interagit avec la cellule adjacente via ses jonctions adhérentes par liaison homophile et cette liaison est calcium dépendante (Figure 6). La partie intracellulaire des cadhérines forme un complexe cytosolique avec l' $\alpha$ , la  $\beta$  et la  $\gamma$  (plakoglobine) caténine, P120 caténine et Zo - 1 et établit une connexion au cytosquelette d'actine (Niessen, 2007). Ce type de jonction a été récemment incriminé dans la survenue d'une dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD) (Mayosi et al., 2017)

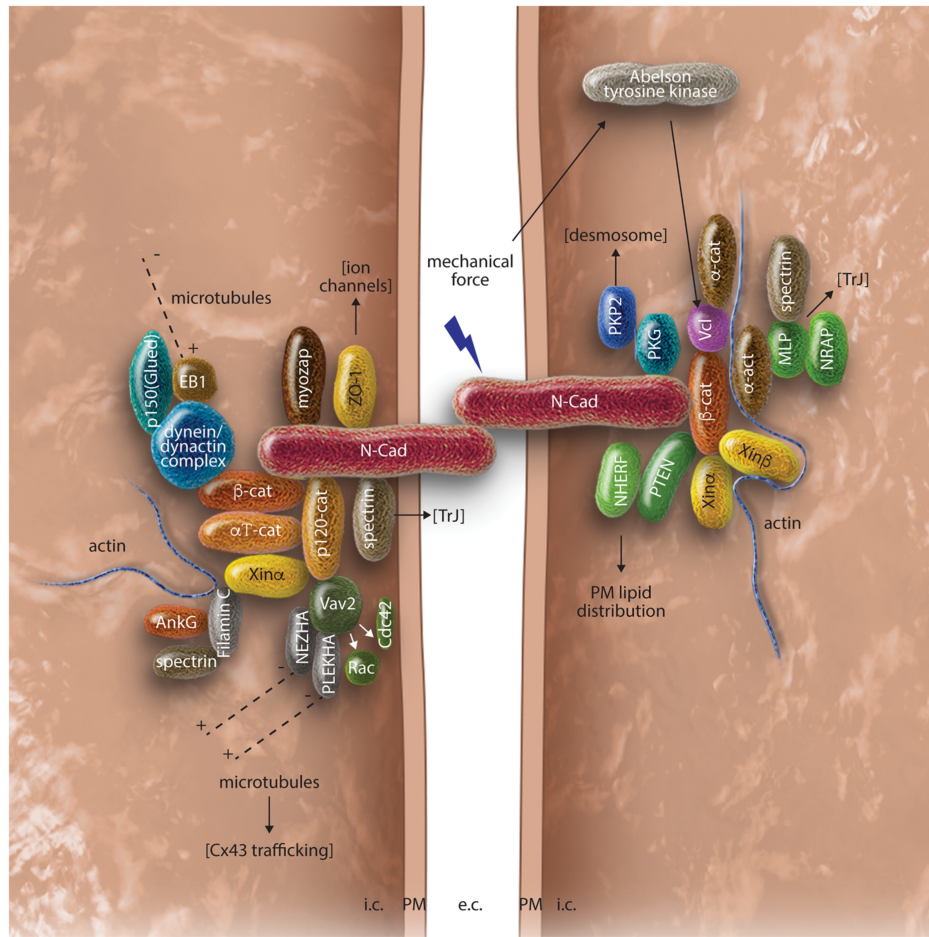


Figure 6 : Schéma des jonctions adhérentes (Vermij et al., 2017)

### 1.2 – Les desmosomes :

Les desmosomes permettent un support structural entre les cardiomyocytes par interaction avec les filaments intermédiaires. Les desmosomes sont des structures denses, robustes qui sont particulièrement abondantes dans les tissus soumis à des sollicitations contractiles ou des forces abrasives importantes comme le myocarde ou les épithéliums (Farquhar and Palade, 1963; Odland, 1958; Rayns et al., 1969). Les desmosomes sont composés d'une partie intercellulaire et d'une partie intracellulaire. La partie extracellulaire est composée de cadhérines desmosomales (desmocolline et desmogléine) qui interagissent de manière hétérophylique dans l'espace extracellulaire pour lier les cellules adjacentes. La partie intracellulaire est composée d'un complexe protéique impliquant la plakoglobine ( $\gamma$  - caténine), plakophiline et la desmoplakine. Cette dernière assure la liaison aux filaments intermédiaires intracellulaires.

### *1.3 – Les jonctions communicantes :*

Les jonctions communicantes ou Gap permettent la communication directe entre les cellules adjacentes. Ces canaux intercellulaires connectent les cytoplasmes des cellules voisines permettant la diffusion passive de nombreux composants différents (des métabolites, l'eau, les ions) jusqu'à des poids moléculaires de 1 kDa (Elfgang et al., 1995). Ainsi ces canaux permettent l'optimisation de la communication métabolique et électrique (Kumar and Gilula, 1996). Dans le myocarde les jonctions Gap assurent une propagation propre de l'impulsion électrique qui déclenche la séquence et coordonne la contraction des cardiomyocytes (Bernstein and Morley, 2006). Ces canaux sont constitués de 12 protéines appelées connexine (6 connexines par cellule). La sous – unité composée de 6 connexines, formant un héli – canal dans la membrane plasmique, est appelée connexon. L'interaction d'un connexon avec celui de la cellule adjacente dans l'espace intercellulaire forme un canal de jonction Gap complet.

Les connexines forment une large famille protéique présentant de fortes homologies de séquence mais ayant une fonctionnalité distincte. Dans le myocarde ventriculaire, l'isoforme de la connexine la plus importante est la Cx 43 (Cx 43) (Beyer et al., 1987; Van Kempen et al., 1996; Yancey et al., 1989).

## **2/ Avancés dans « l'anatomie » des disques intercalaires**

De nouvelles analyses plus récentes en microscopie électronique et immunofluorescence permettent de définir deux nouvelles structures au niveau des disques intercalaires, l'area composita et la zone de transition (transitional junction)(Bennett et al., 2006; Franke et al., 2006). De plus la caractérisation des composants des disques intercalaires par les approches moléculaires, cellulaires ou génétiques révèle une interaction étroite entre les systèmes de jonctions intercellaires de ces structures.

### *2.1 – Area composita*

Cette structure est définie et est présente uniquement dans les disques intercalaires des mammifères. En effet ces travaux démontrent que la composition moléculaire des jonctions adhérentes et des desmosomes est moins spécifique que

celle présente dans les jonctions épithéliales (Pieperhoff and Franke, 2007). Au sein du myocarde, les jonctions adhérentes sont composées non seulement des composants habituels mais également de cadhérines desmosomales et de complexes de protéines regroupées au niveau de plaques cytoplasmiques. En revanche, les desmosomes possèdent également des protéines atypiques (N – cadhérine,  $\beta$  caténine et  $\alpha$  caténine). A partir de ces observations un nouveau type de jonctions intercellulaires est proposé, *area composita*. Cette formation, composée du regroupement des composants des jonctions adhérentes et des desmosomes, semble être un processus tardif dans l'ontogenèse et l'évolution. Cette structure est uniquement retrouvée dans les cardiomyocytes matures des cœurs adultes de mammifères. La signification de cette structure reste cependant à déterminer, même si elle peut renforcer le couplage mécanique entre les cardiomyocytes adjacents et peut améliorer les interactions entre les différents types de jonctions. D'un autre côté, l'absence de cette structure dans les disques intercalaires des cœurs non mammifères peut participer avantageusement à la régénération en cas de cardiopathies. Cette possibilité est supportée par les résultats récents montrant que les cœurs de souris gardent une capacité impressionnante de régénération à la naissance mais cette capacité disparaît au delà d'une semaine de vie (Porrello et al., 2011). Le tempo de perte de la capacité de régénération coïncide avec la maturation des jonctions intercardiomyocytaires.

## *2.2 – La zone de transition (transitional junction)*

Une étude permet d'avancer dans la connaissance des mécanismes de connexion des sarcomères aux disques intercalaires. Il a été, depuis longtemps, observé que les disques intercalaires comprenaient des zones couvertes de systèmes de jonctions intercellulaires mais également d'autres régions qui en sont totalement dépourvues. L'équipe de Bennett observe que ces zones sont principalement localisées à l'extrémité d'expansion cytoplasmique et qu'elles sont associées à la présence d'une protéine particulière, la spectrine (Bennett et al., 2006). Il a été démontré que ces régions libres de système de jonction se situent au niveau où le disque Z du dernier sarcomère aurait été si le dernier sarcomère formait un disque Z à proximité des disques intercalaires. Dans cette région il a été identifié constamment les protéines constitutives des disques Z ( $\alpha$  actinine, la titine, ZASP). Bien que de fins filaments s'étendent des sarcomères aux disques intercalaires l'actine de ces disques semble être de la  $\beta$  - actine au lieu d'être de l'  $\alpha$  - actine sarcomérique

(Balasubramanian et al., 2010). Cette isoforme apparaît dans ces zones comparables aux disques Z, où l'on retrouve également la myosine non musculaire IIB (Ma et al., 2009) et NRAP (Manisastry et al., 2009; Zhang et al., 2001). Ainsi est définie la zone de transition.

### **3/ Maturation du myocarde : Distribution spatio-temporelle des jonctions intercardiomyocytaires.**

Les cardiomyocytes ventriculaires adultes sont des cellules allongées et polarisées. Une séparation structurelle et fonctionnelle existe entre les différentes parties de la membrane plasmique qu'elles soient parallèles (membrane latérale des cardiomyocytes) ou perpendiculaires (disques intercalaires) à l'axe longitudinal de la cellule. La membrane latérale permet l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire grâce aux costamères. D'un autre côté la membrane qui est perpendiculaire à l'axe longitudinal de la cellule forme une structure spécifique et spécialisée, les disques intercalaires qui assurent l'adhésion et la communication intercellulaire (Perriard et al., 2003).

Les premières observations en microscopie électronique suggèrent que la formation des disques intercalaires est un élément tardif du développement du myocarde. Une étude, d'analyse en microscopie électronique, montre que les cardiomyocytes de cœurs néonataux de chiens sont étroitement regroupés et présentent une grande cohésion cellulaire, contrastant avec le nombre limité de contacts intercellulaires au niveau des disques intercalaires dans les cœurs adultes (Legato, 1979). En 1985, une étude de microscopie électronique s'intéresse à l'analyse des disques intercalaires sur des myocardiens de souris âgées de 2 jours. Cette étude montre une immaturité des disques intercalaires (comparativement aux disques intercalaires des myocardiens adultes) avec moins d'expansion cytoplasmique et une diminution de la densité des plaques cytoplasmiques (Forbes and Sperelakis, 1985). Toutefois les études de microscopie électronique ne peuvent pas étudier les composants moléculaires incorporés spécifiquement dans ces systèmes de jonctions. Ainsi une étude extensive des modifications développementales pendant la formation des disques intercalaires est nécessaire en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre les composants protéiques de ces structures. Même si les trois unités structurelles des systèmes de jonctions présentes dans le myocarde adulte

sont identifiées dans les cardiomyocytes embryonnaires dès le 10<sup>ème</sup> jour (E10), les études utilisant des anticorps spécifiques démontrent que les disques intercalaires se forment grâce à une série d'événements survenant préférentiellement en post natal. Chez le rat, les disques intercalaires adultes ne sont pas complètement formés avant le 90<sup>ème</sup> jour post natal, période où la proportion des jonctions Gap, des desmosomes et des jonctions adhérentes au niveau des disques intercalaires n'est plus statistiquement différente ( $P > 0,05$ ) (Angst et al., 1997). Chez l'homme, la maturation complète des disques intercalaires est obtenue au cours de la septième année de vie (Hirschy et al., 2006a; Peters et al., 1994; Pieperhoff and Franke, 2007; Vreeker et al., 2014).

La formation et la maturation des disques intercalaires sont un processus de spécialisation et d'organisation spatiale des domaines de la membrane cytoplasmique des cardiomyocytes (membrane latérale et membrane « terminale »). Pendant la formation des disques intercalaires, les cardiomyocytes redistribuent et localisent les jonctions adhérentes (jonctions adhérentes et desmosomes) et les jonctions communicantes au niveau de la membrane terminale. De plus, par des processus connus de manière partielle actuellement, ces cellules regroupent au sein de ces disques intercalaires une panoplie de protéines de jonction, de canaux et de protéines accessoires ou impliquées dans différentes voies de signalisation.

### *3.1 – Maturation des jonctions adhérentes :*

Le rôle principal des jonctions adhérentes dans la hiérarchie d'établissement et de maintien des différentes jonctions intercellulaires a été démontré dans plusieurs systèmes (in vivo ou in vitro) y compris au sein des cardiomyocytes (Eppenberger and Zuppinger, 1999; Hertig et al., 1996a, 1996b; Kostetskii et al., 2005a). Les changements au cours du développement des jonctions adhérentes sont particulièrement importants lorsque l'on étudie la formation des disques intercalaires. En effet les composants des jonctions adhérentes dans ces structures sont largement redistribués pendant le développement du myocarde au stade embryonnaire mais également en post natal.

L'analyse par immunofluorescence de la localisation de la N-Cadhérine à la surface des cardiomyocytes met en évidence une distribution homogène sur la membrane cytoplasmique à 10,5 jours du développement embryonnaire chez la souris. Plus tard durant le développement embryonnaire, la N-cadhérine est répartie

à la surface plasmique de manière hétérogène (Sinn et al., 2002). Au 5<sup>ème</sup> jour post natal, on observe une diminution de la quantité de marquage de la N-cadhérine au niveau de la membrane latérale, même si très peu de structures, se rapprochant des disques intercalaires, sont retrouvées. A partir du 7<sup>ème</sup> jour post natal, on observe une augmentation des zones de contact entre les membranes terminales des cardiomyocytes, fortement marquées par les anticorps anti N-cadhérine. La N-cadhérine adopte alors une orientation transversale par rapport à l'axe longitudinal de la cellule se rapprochant de la structure des disques intercalaires matures. Comparativement au 3<sup>ème</sup> jour post natal, le niveau de N-cadhérine identifiable au niveau de la membrane latérale diminue et occupe de moins en moins de surface. Au 15<sup>ème</sup> jour post natal, une majorité des cardiomyocytes forment des disques intercalaires, suggérant une certaine rapidité de formation de ces structures (entre 7,5 et 15,5 jours). Le changement dans la répartition de la N-cadhérine de la membrane latérale vers les disques intercalaires matures de la membrane terminale peut être supporté par la quantification du signal de la N Cadhérine à ces différents niveaux par analyse de l'imagerie confocale. La proportion de la densité intégrée du signal de la N-cadhérine (nombre de pixel x intensité) au niveau des disques intercalaires mature augmente progressivement pendant la première semaine post natale et plus rapidement durant la 2<sup>ème</sup> semaine de vie et atteint un plateau à un mois (Wang et al., 2012).

### *3.2 – Maturation des desmosomes*

La dépendance des desmosomes pour leur formation et leur maintien vis à vis des jonctions adhérentes est bien documentée. De ce fait, la chronologie d'incorporation des composants protéiques des desmosomes au sein des disques intercalaires semble suivre celle des jonctions adhérentes (Angst et al., 1997), même si l'établissement de l'area composita et l'intrication entre les jonctions adhérentes et les desmosomes semble être un événement plus tardif du développement post natal. Ainsi les structures sont présentes précocément au niveau de la membrane terminale mais celle ci continue d'évoluer ultérieurement (par exemple intégration de la N-cadhérine et de la desmogléine – 2 durant la troisième semaine de vie post natale chez la souris) (Pieperhoff and Franke, 2007).

### *3.3 – Maturation des jonctions Gap*

La redistribution des jonctions Gap durant le développement est un des premiers phénomènes retrouvés et démontrés en faveur de la maturation tardive des disques intercalaires (Peters et al., 1994). L'incorporation des jonctions Gap au sein des membranes terminales des cardiomyocytes semble être plus tardive que celle des jonctions adhérentes ou des desmosomes et ce phénomène est partagé par différentes espèces de mammifères. Chez la souris, à trois semaines post natales, la plupart du marquage de la Cx 43 est retrouvé sous forme de large point au niveau de la membrane terminale mais également au niveau de la membrane latérale (Angst et al., 1997). L'analyse quantitative de la distribution des jonctions adhérentes et des jonctions Gap confirme le délai d'incorporation des jonctions Gap au sein de la membrane terminale des cardiomyocytes (Angst et al., 1997; Peters et al., 1994).

### **4/ Mécanismes moléculaires de la formation des disques intercalaires**

Les composants des jonctions adhérentes semblent suivre deux phases de redistribution pour former les disques intercalaires. Durant le développement embryonnaire et post natal précoce, les composants des jonctions adhérentes forment des points discrets de regroupement à partir d'un pool de localisation diffus. Après, les zones de contact au niveau des membranes terminales se développent grâce à la formation des disques intercalaires matures tandis que la composante située au niveau des membranes latérales réduit en nombre et en intensité. Les connaissances actuelles des mécanismes régissant ce processus sont faibles. Cependant, comme les interactions intercellulaires médiées par la cadhérine sont un système fondamental dans le développement d'une multitude de tissus dans différents types d'organismes multicellulaires, plusieurs mécanismes impliqués dans l'établissement, le maintien et la régulation des jonctions adhérentes peuvent être extrapolés au développement des jonctions adhérentes au sein des cardiomyocytes. Les processus d'apparition de la N-cadhérine à la membrane latérale des cardiomyocytes puis de réduction de sa diffusion peuvent être médiés par le regroupement des cadhérines. Le regroupement de la cadhérine est un point critique dans l'établissement et le maintien des jonctions adhérentes même si cet élément est toujours très débattu. Un modèle suggère que les domaines extracellulaires des cadhérines interagissent faiblement avec les molécules de cadhérines voisines et que le domaine



intracellulaire est requis pour le regroupement latéral (Kusumi et al., 1999; Yap et al., 1998). Actuellement les études avec une forme tronquée de la E-Cadherine indiquent que le domaine extracellulaire des cadhérines peut former des dimères solides, le regroupement et l'incorporation au sein des jonctions intercellulaires pourraient être une propriété intrinsèque des domaines extracellulaires des cadhérines (Hong et al., 2010; Troyanovsky et al., 2007) et le regroupement des cadhérines au stade initial de la formation des jonctions est médié par un mécanisme de piège, lié à l'affinité des domaines extracellulaires des cadhérines, reposant sur la diffusion des molécules de cadherine au niveau de la membrane cytoplasmique (Perez et al., 2008). Depuis des arguments solides portent l'importance du rôle de la partie cytoplasmique de la cadherine dans son regroupement. Il en est probablement de même pour la molécule de cadherine intacte, leur tendance intrinsèque à se regrouper est fortement régulée par des mécanismes intracellulaires (par exemple, le rôle de la  $\beta$  caténine et d'autres facteurs dans la polarisation de la E cadherine dans les premières phases de l'embryon (Green et al., 2010)). Dans les cellules épithéliales, il a été montré que les complexes formés par les E-cadhérine sont des structures dynamiques. De nouvelles molécules de E-cadhérine sont continuellement ajoutées par des mécanismes dépendant de l'ATP. La taille des regroupements de cadhérines est maintenu par le renouvellement actif des molécules de E-cadhérines. La déplétion en ATP des cellules entraîne la présence de larges regroupements de cadherine suggérant que la taille de ces regroupements est le résultat d'un équilibre dynamique. Le renouvellement actif de la cadherine à partir de leur regroupement requiert des mécanismes d'endocytose (de Beco et al., 2009; Hong et al., 2010).

Si des mécanismes similaires existent pour le regroupement de la N-cadhérine dans le cœur, ils pourraient avoir une importante implication dans la formation des disques intercalaires. En principe, la balance entre le regroupement et la dissociation pourrait expliquer la réduction de la N-cadhérine au niveau de la membrane latérale et l'expansion des jonctions adhérentes au niveau des membranes terminales des cardiomyocytes. En effet, le rôle de l'endocytose des cadhérines et leur recyclage ont été montrés comme un élément critique de la formation et du remodelage des jonctions épithéliales (Classen et al., 2005; Lock and Stow, 2005). Il est bien reconnu que p120 – caténine est un élément central de régulation de l'internalisation des cadhérines (Xiao et al., 2007). Ainsi les partenaires moléculaires de p120 – caténine sont également d'importants régulateurs de la stabilité des cadhérines.

Le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans l'établissement et le maintien des jonctions adhérentes. Par conséquent la régulation de l'interaction entre le complexe cadhérine – caténine et le cytosquelette d'actine peut être un élément important dans le remodelage des jonctions adhérentes pendant la formation des disques intercalaires. Même s'il a été montré qu'il était peu probable que l' $\alpha$ -caténine contrôle seule le lien direct et stable entre le complexe cadhérine -  $\beta$  caténine et les filaments d'actine, des arguments indiquent que d'autres molécules indépendantes ou associées à l' $\alpha$ -caténine peuvent stabiliser cette interaction protéique (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005).

Dans le cœur, il a été montré qu'une protéine  $\alpha$  peut stabiliser les jonctions adhérentes. En effet  $\alpha$  interagit directement avec la  $\beta$ -caténine et les filaments d'actine (Choi et al., 2007).

En plus de réguler la stabilité des jonctions adhérentes à la membrane latérale et de participer à la maturation des disques intercalaires, les cardiomyocytes promeuvent également l'expansion des disques intercalaires matures grâce à des mécanismes actifs. Dans les cellules épithéliales, il a été montré que les petites protéines de la famille des Rho GTPase participent non seulement à la médiation du signal initié par la cadhérine mais également elles conduisent l'initiation et l'expansion des jonctions adhérentes (Perez et al., 2008; Yamada and Nelson, 2007). L'activité de Rac permet la formation des lamellipodes, lesquels permettent la formation de contact, alors que RhoA contrôle l'expansion des contacts par la régulation de la contractilité de l'actine et de la myosine nécessaires à la formation des jonctions adhérentes (Yamada and Nelson, 2007). Il a été montré dans les cellules non musculaires que la petite GTPase, Rap1, intervient en amont de Rac et Rho pour réguler les jonctions adhérentes (Kooistra et al., 2007; Pannekoek et al., 2009). De manière intéressante, Rap 1 est un médiateur impliqué dans le renforcement de la formation des jonctions adhérentes suivi par l'établissement des jonctions Gap dans les cardiomyocytes, suggérant que le rôle de ces petites GTPases est probablement conservé dans ce type cellulaire (Somekawa et al., 2005).

D'un autre côté, il est fermement établi que les phénomènes d'étirement mécanique jouent un rôle critique dans l'établissement et le maintien de la polarisation des composants jonctionnels dans les cultures de cardiomyocytes et la petite GTPase, Rac1, est un important médiateur dans ces processus (Matsuda et al.,

2005; Salameh et al., 2010; Yamane et al., 2007). Toutefois, il n'est pas clairement défini comment les cardiomyocytes transmettent l'étirement mécanique en signal de localisation permettant de contrôler le positionnement des jonctions intercellulaires.

## 5/ Régulation des jonctions Gap

Les jonctions Gap correspondent à une multitude de canaux individuels. Ces jonctions permettent le couplage électromécanique en favorisant la propagation du potentiel d'action et le passage de petites molécules solubles entre les cellules myocardiques.

Le développement, la régulation et la dégradation des jonctions Gap sont soumis à des processus très bien orchestrés et régis par un roulement rapide : la demi vie de la Cx 43 est courte (1 à 3 heures) (Balse et al., 2012; Noorman et al., 2009; Rhett et al., 2011). La perte de la fonction de la Cx 43 indépendante des jonctions Gap entraîne des arythmies sévères et la mort (Agullo-Pascual et al., 2014).

### 5.1 Liaisons entre les jonctions adhérentes et les jonctions Gap

Au cours du développement, les jonctions Gap apparaissent seulement au niveau des disques intercalaires lorsque les jonctions adhérentes sont déjà formées. En d'autres termes, le couplage mécanique précède le couplage électrique (Balse et al., 2012; Vreeker et al., 2014; Yoshida et al., 2011). La stabilité des jonctions Gap repose sur la solidité des jonctions adhérentes (Giepmans and van Ijzendoorn, 2009; Zemljic-Harpf et al., 2014). Cela montre que le couplage électrique et mécanique des cardiomyocytes est étroitement lié. La connexine 43 (Cx 43) des connexons est transportée dans des vésicules depuis le système du golgi jusqu'aux disques intercalaires grâce aux microtubules qui sont attachés aux jonctions adhérentes par la N-cadhérine, la  $\beta$  caténine et le complexe Dynéin/Dynactine. Ainsi la Cx 43 interagit avec +TIP EB1 and p150. Bien que les microtubules coiffés de EB1 puissent également interagir avec les jonctions Gap matures, les souris délétées pour le gène de la N-cadhérine ne peuvent pas former de jonctions Gap et le blocage de la liaison intercellulaire de N-Cadhérine inhibe également la formation des jonctions Gap. De manière intéressante, ce système de transport des connexons assure que les Gap jonctions sont formées uniquement entre les cellules homologues (lorsque la

cadhérine se connecte seulement avec une cadhérine homologue) (Shaw et al., 2007). Lorsque les jonctions adhérentes dysfonctionnent, par exemple dans le cadre d'un déficit en PKP2 (gène codant pour la plakophilin 2), les jonctions Gap se réorganisent : la Cx 43 se latéralise et sa présence au niveau des disques intercalaires diminue. Cela peut être un substrat pro-arythmogène (Noorman et al., 2009; Yoshida et al., 2011).

De plus, la réorganisation des jonctions Gap secondaires à un déficit en protéine Xin viendrait de son interaction avec Zo1 et/ou la Cx 43 (Wang et al., 2012).

L'expression de la Cx 43 (Cx 43) est aberrante dans de nombreuses cardiopathies (par exemple relocalisation, déphosphorylation et Cx 43 non fonctionnelle située au niveau de la membrane latérale des cardiomyocytes peut être vue dans la fibrillation atriale, les surcharges atriales chez l'homme ou dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat). Ceci entrave notamment le couplage au niveau des disques intercalaires et peut conduire à la survenue de bloc de conduction (Rucker-Martin et al., 2006).

Le phénomène de réorganisation des disques intercalaires est complexe et implique un grand nombre de partenaires. Différentes revues de la littérature se sont intéressées à ces mécanismes (Lyon et al., 2015; Noorman et al., 2009).

Il est clair que les jonctions Gap sont des structures vulnérables et rapidement modulables comme l'illustrent leurs nombreuses implications dans les cardiopathies. Les jonctions Gap sont les premières structures à être délocalisées des disques intercalaires.

Prenons pour exemple un modèle de souris délétée pour le gène de la N-cadhérine spécifiquement dans le cœur qui montre une diminution du niveau d'expression de la Cx 43. Cette diminution entraîne une réduction de la vitesse de la conduction et la survenue d'arythmie ventriculaire même si l' $\alpha$ -, la  $\beta$ -caténine et p120 sont abaissés. Ceci indiquerait que la N-cadhérine et la Cx 43 sont étroitement liées, probablement par le biais de Zo-1 (Noorman et al., 2009). La voie de signalisation CAMK II est probablement impliquée dans la latéralisation de la Cx 43, car lorsque l'on inhibe cette voie on peut observer une amélioration de la conduction et de la localisation de la Cx 43 aux disques intercalaires par rapport à la situation de base.

On observe également une préservation de cette localisation même dans le cadre d'une insuffisance cardiaque (Takanari et al., 2016).

### *5.2 La protéine MAGUK : ZO-1*

L'implication de Zo-1 dans la connection des jonctions adhérentes et des jonctions Gap est suspectée de part ses capacités d'échafaudage. Zo-1 est constitué de trois domaines, le domaine non fonctionnel GUK, le domaine SH3 qui interagit avec les séquences PXXP riches en proline et un domaine PDZ. Ce domaine PDZ interagit avec la N-Cadhérine, laquelle stabilise à la fois les jonctions Gap et adhérentes, et avec la Cx 43. Zo-1 lie également les fibres d'actine du cytosquelette. Généralement les MAGUK protéines se localisent à proximité de la membrane plasmique pour réguler l'expression à la surface membranaire de certains domaines spécialisés dans différents tissus (Giepmans and van Ijzendoorn, 2009; Zemljic-Harpf et al., 2014). Par ailleurs Zo-1 peut également connecter les jonctions adhérentes et les Gap jonctions par l'interaction avec l' $\alpha$ -caténine par son fragment N-terminal et avec l'actine via son extrémité C terminale (Wang et al., 2012). Dans les cardiomyocytes et les lignées cellulaires dépourvues de Zo-1, l'organisation normale de la Cx 43 et de la N-cadhérine est perdue et les jonctions Gap sont localisées sur la membrane latérale (Chkourko et al., 2012). L'effet de Zo-1 sur la localisation des jonctions Gap n'est possible que grâce à son interaction avec les jonctions adhérentes. Cette interaction nécessite une forte cohésion des jonctions adhérentes nécessaire à la bonne localisation des jonctions communicantes (Palatinus et al., 2011).

Dans les cardiopathies, la fonction de Zo-1 en relation avec les systèmes de jonctions peut changer. Dans les cœurs sains, Zo-1 colocalise plus préférentiellement avec la N-cadhérine qu'avec la Cx 43. Dans le myocarde ventriculaire de patients insuffisants cardiaques même si l'expression de Zo-1 est augmentée, la Cx 43 et Zo-1 colocalisent fortement, ce qui pourrait signifier que Zo-1 prévient une augmentation des jonctions Gap fonctionnelles (Bruce et al., 2008; Wang et al., 2012).

Enfin Zo-1 interagit également avec la plakoglobine, APC (adenomatous polyposis coli, un important modulateur de la voie Wnt/Fzd) et avec la claudine (généralement associée aux jonctions serrées) (Giepmans and van Ijzendoorn, 2009; Zemljic-Harpf et al., 2014)

## PARTIE II : SYSTEME WNT/FRIZZLED

Les cardiomyocytes sont des cellules polarisées caractérisées par une accumulation de protéines au niveau des disques intercalaires aux extrémités cellulaires (proximale/distale) créant une polarisation antéro-postérieure. Les mécanismes moléculaires qui gouvernent cette distribution asymétrique sont mal connus. Dans mon projet de recherche je me suis intéressé à la voie de signalisation dépendante des facteurs Wnt, la voie de polarité planaire ou Planar Cell Polarity (PCP). Cette voie de signalisation a été impliquée dans les mécanismes d'alignement au niveau d'un organe/tissus des cellules. L'établissement de la polarité planaire dans un épithélium induirait une répartition asymétrique de protéines aux pôles de la cellule permettant la communication entre cellules voisines (Devenport, 2014). Cette voie de signalisation n'avait pas ou peu été analysée dans la polarisation post natale des cardiomyocytes.

La première description d'un gène Wnt, *int-1*, a été faite en 1984, dans l'étude d'un cancer mammaire murin. En 1987, il a été mis en évidence une homologie de séquence de *int-1* avec le gène *wingless* de la drosophile (Rijsewijk et al., 1987). L'appellation *Wnt - 1* provient du regroupement et de la contraction de ces deux gènes (*int-1* et *wingless*). Une famille de gènes, dite famille Wnt, a ensuite été identifiée par regroupement de protéines présentant des caractéristiques communes dans leur cascade de signalisation (qui deviendront les voies de signalisation Wnt/Fzd).

Les gènes et les voies de signalisation de cette famille sont particulièrement conservés au cours de l'évolution des différentes espèces.

Le gène *wnt - 1* est le premier gène identifié comme oncogène. Cependant ce n'est qu'en 1993 que des mutations en oncologie humaine ont été reliées aux voies de signalisation Wnt (Ashton-Rickardt et al., 1989; Groden et al., 1991; Rubinfeld et al., 1993).

Par ailleurs des recherches intensives ont été menées chez la drosophile révélant un rôle majeur des voies Wnt dans le développement (Klaus and Birchmeier, 2008).

La signalisation Wnt/Frizzled (Wnt/Fzd) met en jeu des morphogènes Wnt qui agissent en tant que ligands pour activer des voies de signalisation impliquant des récepteurs Frizzled (Fzd). Actuellement, le système Wnt/Fzd comprend 19 ligands Wnt différents et 10 récepteurs Frizzled. Ce système active différentes voies de signalisation, lesquelles sont regroupées en voies canoniques ( $\beta$  caténine dépendante) et voies non canoniques. Des études ont émis l'hypothèse que certains Wnt activeraient préférentiellement la voie de signalisation Wnt canonique, alors que d'autres activeraient les voies de signalisation non-canoniques. Plusieurs membres du système Wnt/Fzd possèdent un profil d'expression spatio-temporel et pourraient interagir de façon spécifique, permettant une régulation fine de la réponse initiée par l'activation du système (Angers and Moon, 2009).

Depuis de nombreuses années, les fonctions de ce système ont fait l'objet de nombreuses études génétiques. Ainsi, les voies Wnt/Fzd contrôlent divers processus cellulaires et biologiques et interviennent notamment dans la régulation de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires (adhésion, prolifération, migration, apoptose, polarité, différenciation). Ce système joue un rôle essentiel au cours de l'embryogénèse (convergence – extension, formation de la crête neurale, formation de l'axe antéro-postérieur) et participe au développement et à la maturation tissulaire (système cardiovasculaire, système nerveux central). Enfin les composants de la voie de signalisation Wnt ont été reliés chez l'homme à diverses pathologies telles que les cancers, l'ostéoporose ou encore la maladie d'Alzheimer (Angers and Moon, 2009).

Depuis une dizaine d'années, le rôle des voies Wnt/Fzd est reconnu dans le développement embryonnaire myocardique et ces voies sont étudiées dans les mécanismes physiopathologiques des cardiopathies qu'elles soient « congénitales » ou acquises.

## **I / Les voies de signalisation Wnt/Fzd**

Le système Wnt/Fzd est schématiquement subdivisé en deux voies :

- La voie Wnt canonique,  $\beta$  caténine dépendante

- Les voies de signalisation indépendantes de la  $\beta$  caténine subdivisées en deux voies :
  - La voie de polarité cellulaire planaire (PCP)
  - La voie calcium dépendante.

Malgré les nombreuses investigations et études qui ont été menées sur le système Wnt/Fzd, notre connaissance de ces voies de signalisation, bien qu'ayant beaucoup progressé, reste à ce jour incomplète. En effet, l'existence de 19 ligands Wnt et de 10 récepteurs Fzd conduit à une multiplicité d'interactions possibles et explique la complexité de ce système. D'autre part, en plus des ligands Wnt et des récepteurs Fzd, il existe un grand nombre d'autres molécules pouvant réguler et moduler ces voies de signalisation rendant ainsi ce système très complexe.

### 1/ Voie Wnt Canonique

La voie Wnt canonique également appelée voie Wnt/ $\beta$ -caténine est la voie de signalisation Wnt la plus étudiée (Kikuchi et al., 2006; Nelson and Nusse, 2004). Cette voie fait intervenir en tant que second messager, la  $\beta$  caténine qui a d'abord été caractérisée en tant que protéine d'échafaudage qui relie schématiquement la queue cytoplasmique de cadhérines classiques (N-cadhérine et VE-cadhérine) au cytosquelette d'actine via l' $\alpha$ -caténine. En l'absence de stimulation par les ligands Wnt, la  $\beta$  caténine cytosolique est recrutée dans un complexe qui va permettre sa dégradation et contribuer au maintien de niveaux d'expression cytoplasmiques bas de cette protéine. Ce complexe est composé de l'Axin2, des protéines issues de gènes suppresseurs de tumeur APC (adenomatous poliposis coli), de la caséine kinase 1 (CK1) et de la glycogène synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). APC et Axin2 se lient à la  $\beta$  caténine nouvellement synthétisée et servent de protéines d'échafaudage dans la séquestration de la  $\beta$  caténine (Hinoi et al., 2000). Cette dernière est ainsi phosphorylée sur des résidus sérine/thréonine à son extrémité N-terminale (codée par l'exon 3) par la CK1, puis elle fait l'objet de trois autres phosphorylations par la GSK-3 $\beta$ . La  $\beta$ -caténine phosphorylée induit le recrutement et la liaison de l'ubiquitine ligase E3  $\beta$ -TrCP qui transforme la  $\beta$ -caténine en une cible pour la dégradation par le protéasome. En conséquence, les niveaux de  $\beta$ -caténine libre dans les cellules restent faibles. Le facteur de transcription TCF (T-cell factor)/LEF (Lymphoid enhancer binding factor) reste complexé avec Groucho qui assure la répression des gènes cibles



de Wnt et la formation du complexe nucléaire TCF/LEF/ $\beta$ -caténine est empêchée (Kimelman and Xu, 2006).

Ainsi, lors de l'absence de stimulation de la voie de signalisation Wnt, la GSK-3 $\beta$  est constitutivement active et les cellules maintiennent de faibles niveaux cytoplasmiques et nucléaires de  $\beta$  caténine tandis qu'une autre partie se retrouve associée aux cadhérines présentes à la membrane plasmique (Nelson and Nusse, 2004).

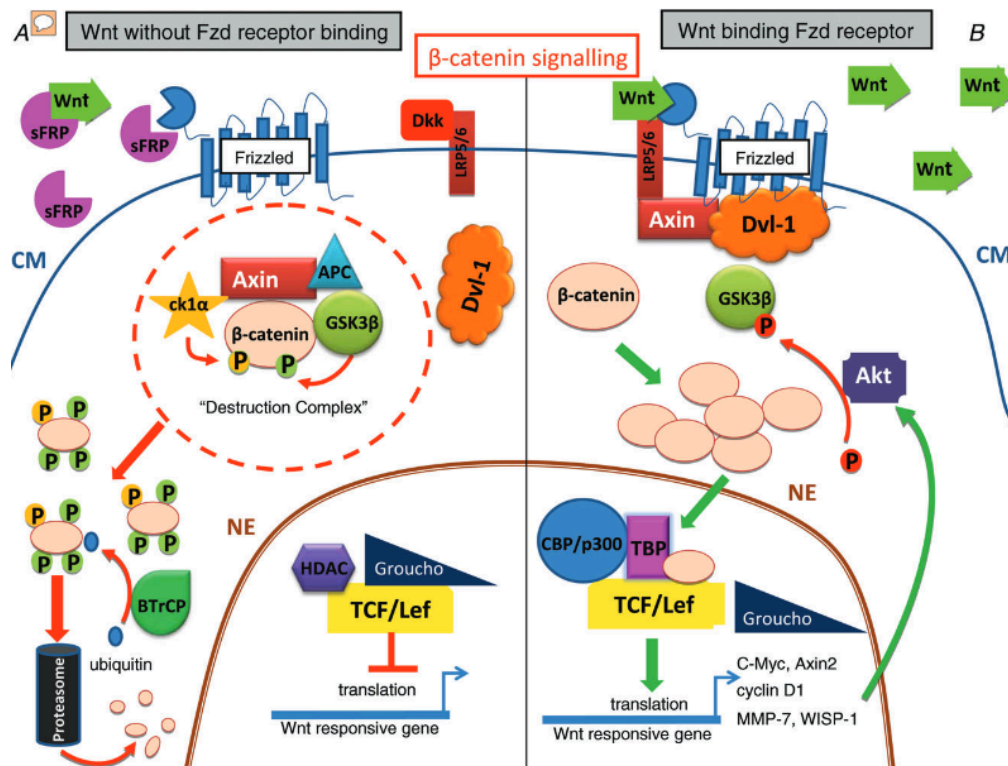


Figure 7 : Voie de signalisation canonique dépendante de la  $\beta$  caténine ; A, lorsque sFRP inhibe le ligand Wnt ou le récepteur Frizzled ou que DKK lie LRP 5/6, la voie de signalisation Wnt est réprimée. Le complexe de destruction (composé de l' Axin, APC, CK1 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -caténine) est assemblé. CK1 $\alpha$  phosphoryle  $\beta$ -caténine sur la sérine 45, ce qui entraîne la phosphorylation des sérines 33, 37 et de la thréonine 41 par GSK-3 $\beta$ . Les sites de phosphorylation sont reconnus par BTrCP (une E3-ligase) et  $\beta$ -caténine est ubiquitinilée et ciblée par le protéasome pour la dégrader. La transcription des cibles wnt est réprimée par HDAC et Groucho par liaison des facteurs de transcription TCF/Lef. B, lorsque Wnt interagit avec son récepteur Frizzled, la voie canonique est activée. Axin et Dvl-1 sont recruté à la membrane et la  $\beta$ -caténine cytoplasmique s'accumule. La  $\beta$ -caténine non-phosphorylée transloque dans le noyau, où elle lie le complexe TCF/Lef (déplaçant Groucho) et active la transcription des gènes cibles. Parmi les gènes cibles qui sont activés, WISP-1 active Akt. Akt phosphoryle GSK-3 $\beta$  sur la sérine9, entraînant son inhibition. Abréviations: APC, adenomatous polyposis coli; BTrCP,  $\beta$ -transducin repeat containing protein; CK1 $\alpha$ , casein kinase 1 $\alpha$ ; CM, cell membrane; GSK-3 $\beta$ , glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; Dkk, Dickkopf; Dvl-1; Dishevelled-1; HDAC, histone deacetylase; NP, nuclear pore; sFRP, secreted frizzled related protein; TCF/Lef, T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor; WISP-1, wnt1 inducible signalling pathway protein 1; TBP, TATA-binding protein. (Dawson et al., 2013).

La signalisation Wnt/ $\beta$  caténine est engagée quand un ligand Wnt se lie à un complexe formé par un récepteur transmembranaire Fzd et un corécepteur Lrp5/6 (Cong et al., 2004). La protéine Dvl est alors phosphorylée, activée, recrutée à la membrane et permettrait ainsi le recrutement de l'Axin2 (et du reste du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine) à la membrane qui peut alors interagir avec la partie intracytoplasmique de Lrp5/6. L'Axin2 est alors dégradée, ce qui favorise le désassemblage du complexe de dégradation et protège la  $\beta$  caténine cytosolique (Cliffe et al., 2003; Tolwinski et al., 2003). L'activation de Dvl entraîne également l'inhibition de la GSK-3 $\beta$ , ce qui permet de diminuer la phosphorylation de la  $\beta$  caténine et sa dégradation. Ainsi, l'activation de la voie canonique permet une stabilisation post-traductionnelle de la  $\beta$  caténine par une dégradation de l'Axin2 et une inhibition de la GSK-3 $\beta$  qui sont dépendantes des Wnt. Au fur et à mesure que le taux de  $\beta$  caténine cytosolique augmente, celle ci peut être transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs LEF/TCF liés à l'ADN et transactiver l'expression des gènes cibles.

La voie Wnt canonique joue un rôle important au cours du développement mais intervient également dans la régulation de la prolifération, la différenciation, l'apoptose cellulaire et l'homéostasie tissulaire. Une dérégulation de cette voie est impliquée dans plusieurs pathologies, notamment en cancérologie. Cette voie impliquée dans de nombreux processus cellulaires et biologiques régule de nombreux gènes cibles (Logan and Nusse, 2004; MacDonald et al., 2009; Vlad et al., 2008).

Parmi ces gènes, on peut citer c-myc (He et al., 1998), c-jun (Mann et al., 1999), la E-cadhérine (Anna et al., 2003). Les composants de la voie Wnt, incluant Wnt3A (Zhang et al., 2009), Axin2 (Jho et al., 2002), TCF/LEF (Filali et al., 2002) sont également régulés par la voie  $\beta$ -caténine, Figure 7.

## **2/ Voies Wnt non canoniques**

Pendant plusieurs années, la recherche dans le domaine de la signalisation Wnt/Fzd s'est focalisée sur la voie canonique. Cependant, depuis ces 15 dernières années, un nombre croissant de travaux viennent démontrer l'implication de voies non canoniques, indépendantes de la  $\beta$ -caténine (Veeman et al., 2003). Ces voies

restent encore moins bien caractérisées que la voie canonique mais peuvent être divisées en 2 branches distinctes : la voie de polarité planaire cellulaire (PCP) et la voie calcium-dépendante (Wnt/Ca<sup>2+</sup>). Les voies de signalisation non canoniques ont été mises en évidence dans les mouvements cellulaires de convergence – extension ayant lieu lors de la gastrulation des vertébrés (Myers et al., 2002), en particulier chez le xénope (Du et al., 1995).

#### *A/ La voie de la polarité cellulaire planaire (PCP)*

La voie de signalisation PCP, découverte tout d'abord chez la drosophile, est une voie conservée régulant l'organisation du tissu épithélial (Yang and Mlodzik, 2015). En effet, les cellules de l'épithélium possèdent une polarité apico-basolatérale et sont également polarisées le long du plan de la couche épithéliale, polarité proximale/dorsale. Chez la drosophile, cette organisation régit l'orientation des structures comprenant l'orientation des follicules pileux, les soies et l'organisation hexagonale des ommatidies de l'œil (Fanto and McNeill, 2004; Zallen, 2007). Chez les vertébrés, ce système est à la base de l'organisation des cils de l'épithélium sensoriel dans l'oreille interne (Montcouquiol et al., 2003), de l'organisation des poils sur l'épiderme (Guo et al., 2004) et de la migration des cellules mésodermes dorsales durant la gastrulation (Wang and Nathans, 2007). Plus récemment des études ont montré que la voie PCP est impliquée dans des processus physiologiques du développement tels que la migration neuronale, la guidance des axones et l'organogénèse du cœur, du poumon, du rein et de l'œil (Gessert and Kuhl, 2010; Jiang et al., 2013; Tissir and Goffinet, 2010; Wang and Nathans, 2007; Yates and Dean, 2011), l'alignement des cellules musculaires et l'élongation des cartilages (Gao et al., 2011; Hopyan et al., 2011; Jessen et al., 2002; Keller, 2002; Kibar et al., 2001; Marlow et al., 2002; Murdoch et al., 2001; Myers et al., 2002; Wallingford et al., 2000; Yin et al., 2009).

Une des caractéristiques propres de cette voie est que les facteurs de la voie de signalisation PCP, avant toute interaction et signalisation de type PCP, sont localisés de manière uniforme sur l'ensemble de la surface intracellulaire de la membrane plasmique. Ils recouvrent donc de larges zones où sont présentes les jonctions adhérentes. Leur répartition asymétrique est alors le premier signe détectable de la mise en place de la voie de signalisation PCP (Yang and Mlodzik, 2015). Lors des études menées, le changement dans la distribution de la localisation d'un des

composants de cette voie (par utilisation de modèles entraînant la perte ou le gain de sa fonction) affecte la localisation de tous les autres, même ceux constitutifs du complexe opposé via des boucles de rétrocontrôle (Seifert and Mlodzik, 2007; Strutt, 2003). Ce phénomène est différent lorsque le composant, qui devient asymétrique, l'est du fait de l'implication de facteurs partenaires de la voie PCP. Sa localisation est alors considérée comme le but de la mise en place de la voie (Adler et al., 2004).

La voie PCP met en jeu la régulation du cytosquelette d'actine pour une organisation polarisée des structures et une migration dirigée. Comme pour la voie canonique, l'activation de la voie PCP requiert l'activation de récepteurs Fzd et le recrutement de Dvl à la membrane. Cependant, après la relocalisation de Dvl à la membrane, on peut observer une activation de deux branches indépendantes faisant intervenir les petites GTPases Rho et Rac (Gao and Chen, 2010; Habas et al., 2003; Tahinci et al., 2007). La première branche active Rho et la molécule DAAM1 (Dishevelled associated activator of morphogenesis 1) qui activent ensuite ROCK (Rho-associated kinase) (Habas et al., 2001; Ju et al., 2010). La deuxième branche implique l'activation de Rac puis de c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Fanto and McNeill, 2004; Kikuchi et al., 2007), Figure 8.

Les mécanismes de régulation et le fonctionnement de cette voie sont conservés entre les espèces. Cependant, chez les vertébrés, on observe l'implication de nouvelles molécules de signalisation et de nouveaux schémas de régulation permettant de faire face à l'importante expansion du spectre des fonctions possibles. Ainsi il est impératif d'étendre notre connaissance de cette voie de signalisation, d'un point de vue moléculaire, étant donné l'importance de celle-ci dans le développement embryonnaire, la physiologie des organismes matures et son implication dans la régénération tissulaire (Yang and Mlodzik, 2015).

### *B/ La voie calcium dépendante*

La voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> reste la voie de signalisation Wnt/Fzd la moins décrite, mais il a été démontré que cette voie intervient dans des processus importants au cours du développement ou en pathologie (Ho et al., 2012). La voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> joue ainsi un rôle dans la polarité dorso-ventrale et les mouvements de convergence –

extension (Kühl et al., 2000; Lin et al., 2010) et est également impliquée dans les cancers (Dissanayake et al., 2007; Pukrop et al., 2006).

Cette voie de signalisation Wnt non canonique fait intervenir la liaison de protéines Wnt sur des récepteurs Fzd, le recrutement de Dvl et l'activation de la phospholipase C (PLC) en aval. Ceci entraîne une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Kikuchi et al., 2007; Pandur et al., 2002) et induit l'activation de plusieurs cibles en aval y compris la protéine kinase C (PKC) et la calcium calmoduline kinase II (CaMKII) (Pongracz and Stockley, 2006). Le taux élevé de  $Ca^{2+}$  peut également activer la calcineurine phosphatase qui induit la déphosphorylation du facteur de transcription nucléaire des cellules T (NFAT), entraînant une accumulation de NFAT dans le noyau et une activation de gènes cibles (van Es et al., 2003), Figure 8.

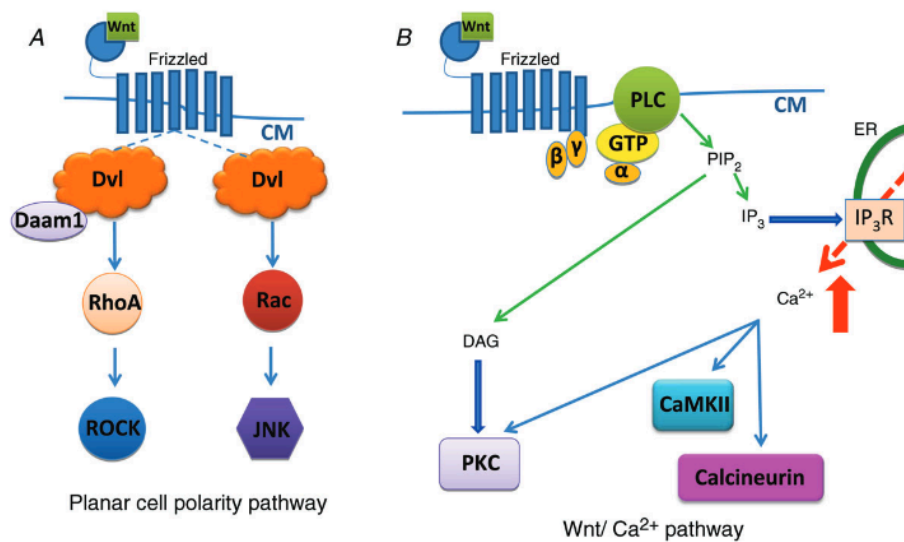


Figure 8 : Voie non canonique,  $\beta$  - caténine – indépendante ; A, la voie de polarité cellulaire planaire (PCP) est activée par des récepteurs Fzd indépendants de LRP5/6. Lorsque le récepteur est activé, Dvl-1 transduit le signal via les petites GTPases. Daam1 forme un complexe avec Dvl-1, lequel permet l'activation de Rho et ROCK. Une seconde branche existe, indépendante de Daam1, l'activation de Dvl-1 stimule Rac1, lequel régule JNK. B, La voie Wnt/ $Ca^{2+}$  dépendante. L'activation du récepteur Fzd recrute des protéines G hétéromériques qui activent la phospholipase C (PLC), permettant la production de DAG et inositol triphosphate. DAG active directement la PKC. IP3 augmente la concentration de calcium intracellulaire, activant des enzymes sensibles au  $Ca^{2+}$  comme CaMKII, calcineurine et PKC. Abbréviations: CaMKII,  $Ca^{2+}$ /calmoduline-dépendante protéine kinase II; Daam-1, activateur de la morphogénèse associé à Dishevelled; Fzd, Frizzled; JNK, c-Jun terminal kinase; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; ROCK, kinase associée à Rho. (Dawson et al., 2013).

## II / Les voies de signalisation Wnt/Fz en cardiologie

### 1/ Signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine

Le rôle de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$  caténine dans le développement cardiaque a été intensément étudié dans de nombreux organismes. Pendant les phases précoces de développement du cœur, cette voie présente des effets spécifiques biphasiques en fonction du stade de développement (Naito et al., 2006; Ueno et al., 2007). L'activation de la voie de signalisation avant la gastrulation favorise la formation du mésoderme et la génèse du cœur. Alors que cette voie de signalisation pendant et après la gastrulation inhibe la différenciation cardiomyocytaire par opposition à la signalisation par la protéine morphogénétique (BMP) (Marvin et al., 2001; Tzahor and Lassar, 2001). Toutefois, l'hypothèse que l'activation de Wnt inhibe la cardiogénèse reste cependant trop simple. Des études plus récentes, utilisant des analyses à partir de gain ou de perte de fonction de la voie Wnt/ $\beta$  caténine ont montré que cette voie de signalisation agit en coopération avec les signaux du facteur de croissance fibroblastique (FGF) et du BMP pour favoriser l'expansion des progéniteurs intervenant dans la cardiogénèse, lesquels contribuent à la formation des voies d'éjection et du ventricule droit (Ai et al., 2007; Buckingham et al., 2005; Klaus et al., 2007; Srivastava, 2006).

Dans le cœur post-natal et adulte, l'importance de la signalisation Wnt/ $\beta$  caténine a été très largement abordée dans le cadre du remodelage en condition physiologique ou pathologique. L'activation de la  $\beta$  caténine, dans des cultures cellulaires de cardiomyocytes de rat néonataux, est nécessaire, mais non suffisante, pour induire une hypertrophie des cardiomyocytes (Force et al., 2007; Haq et al., 2003).

Des études *in vivo* utilisant des systèmes de délétion inductibles spécifiquement dans le cœur ou des souris transgéniques, pour moduler le niveau d'expression des composants de la signalisation Wnt/ $\beta$  caténine, ont également confirmé que la stabilisation de la  $\beta$  caténine ou l'activation de la voie est requise pour l'induction de l'hypertrophie physiologique ou pathologique (Chen et al., 2006; Malekar et al., 2010; Qu et al., 2007). Toutefois des résultats contradictoires ont été rapportés dans une autre étude (Baurand et al., 2007). Les raisons précises d'une telle

divergence ne sont pas connues mais peuvent être le reflet des effets pléthoriques dépendants de la signalisation Wnt dans des conditions expérimentales. Des études portant sur des souris transgéniques exprimant de manière conditionnelle soit une forme inactive de  $\beta$  caténine soit une forme stabilisée, exprimée spécifiquement dans les ventricules (promoteur MLC2v-Cre) ont révélé que les souris ne produisant pas de  $\beta$  caténine dans les ventricules adultes ne présentent aucun phénotype particulier (Hirschy et al., 2010). Ce résultat est possible car parallèlement on observe une augmentation de la plakoglobine qui aurait un effet compensateur (Zhou et al., 2007). Par ailleurs, les souris exprimant une forme stabilisée de la  $\beta$  caténine développent une hypertrophie cardiaque et une cardiomyopathie dilatée à l'âge de 2 mois et elles ne survivent pas plus de 5 mois. La forme stabilisée de la  $\beta$  caténine est trouvée uniquement au niveau des disques intercalaires et pas au niveau nucléaire. Ces résultats suggèrent que le rôle de la  $\beta$  caténine dans le noyau pourrait être peu significatif en physiologie dans le cœur adulte. L'action pathologique de la  $\beta$  caténine dans ce contexte est donc la résultante de son action cytoplasmique or au niveau des disques intercalaires la  $\beta$  caténine interagit avec la N-cadhérine. Ainsi la stabilisation de la  $\beta$  caténine entraîne une augmentation de la quantité de cette protéine au niveau des jonctions qui peut alors affecter de manière critique la signalisation N-cadhérine/ $\beta$  caténine et conduire à une cardiomyopathie dilatée. Par ailleurs, une augmentation du niveau de  $\beta$  caténine peut être également détectée dans des cœurs humains de patients ayant une cardiomyopathie hypertrophique ou chez des hamsters présentant des déficits spontanés en  $\delta$ -sarcoglycane (Masuelli et al., 2003). L'accumulation de la  $\beta$  caténine au niveau des disques intercalaires, mais pas au niveau nucléaire, est accompagnée par une augmentation de l'expression de Wnt 5A (Wnt non canonique), une diminution de l'expression de GSK3  $\beta$  et une expression différente d'isoforme de APC. L'existence de ces multiples voies de signalisation Wnt dans le myocarde donne un autre niveau de complexité dans la signalisation Wnt relative au remodelage cardiaque.

## **2/ Interaction signalisation Wnt et signalisation des jonctions adhérentes**

L'inhibition de la signalisation Wnt/ $\beta$  caténine a été montrée associée dans des cœurs de patients avec une pathologie de dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD). L'inhibition de la voie Wnt canonique serait induite par la translocation de la plakoglobine au niveau nucléaire (Garcia-Gras et al., 2006;

Lombardi et al., 2009). Les souris mutantes déficientes pour la desmoplakine dans le cœur (inactivation d'un allèle), ont été développées. Elles présentent les caractéristiques majeures de la DAVD humaine. Le déficit de la desmoplakine entraîne une insuffisance de l'assemblage des desmosomes, qui libère ainsi la plakoglobine de sa séquestration au niveau des desmosomes. Cette libération augmente la localisation nucléaire de la plakoglobine dans les cardiomyocytes. La plakoglobine est connue pour être en compétition avec la  $\beta$  caténine à de multiples niveaux cellulaires avec comme conséquence un net effet négatif sur la voie de signalisation Wnt/ $\beta$  caténine (Klymkowsky et al., 1999; Zhurinsky et al., 2000). Ainsi, l'augmentation de la localisation nucléaire de la plakoglobine en supprimant la signalisation Wnt/ $\beta$  caténine favoriserait la transformation adipocytaire, la fibrose et l'apoptose, correspondant aux éléments caractéristiques de la pathologie humaine (Longo et al., 2002).

A partir de différents mutants murins ayant été modifiés génétiquement pour des gènes codant diverses protéines des jonctions cardiomyocytaires (jonctions adhérentes et desmosomes), différents mécanismes moléculaires ont été identifiés conduisant au développement d'une DAVD (Li et al., 2011; Lombardi et al., 2009). L'élévation de la plakoglobine dans le noyau altère la signalisation Wnt/ $\beta$  caténine qui permettrait l'expression des phénotypes décrits dans la DAVD tels que l'apoptose, la fibrose et la transformation adipocytaire. Le signal généré par les desmosomes joue également un rôle dans la pathologie de la DAVD, car la diminution du signal Wnt/ $\beta$  caténine par simple délétion conditionnelle de la  $\beta$  caténine dans des cœurs postnataux n'entraîne pas de DAVD. L'implication spécifique des signaux provenant des desmosomes dans la DAVD est également supportée par l'absence de phénotype de DAVD chez les souris ayant des délétions conditionnelles des composants des jonctions adhérentes comme la N-cadhérine (Kostetskii et al., 2005b),  $\alpha$ -caténine (Sheikh et al., 2006), mXin $\alpha$  (Gustafson-Wagner et al., 2007) ou la  $\beta$ -caténine (Chen et al., 2006; Hirschy et al., 2010; Zhou et al., 2007). Ces souris présentent un phénotype de cardiomyopathie dilatée sans perte cardiomyocytaire ni inflammation ce qui est différent du phénotype de celles ayant une délétion conditionnelle de la plakoglobine ou d'autres modèles animaux de DAVD (Li et al., 2011; Lombardi et al., 2009; Yang et al., 2006). Ces différences suggèrent que des signaux différents peuvent être transmis par une altération des jonctions adhérentes ou des desmosomes.



### 3/ Signalisation non canonique dite de Polarité Planaire

Les informations directionnelles sont utilisées pour rompre la symétrie tissulaire permettant de générer des structures organisées et complexes et d'établir des architectures cellulaires requises pour le fonctionnement de nombreux tissus et organes. Ces informations directionnelles chargent les cellules d'organiser certaines structures ou certaines fonctions dans une direction donnée. Des exemples de polarisation peuvent être donnés par l'orientation de la division cellulaire, de la migration cellulaire, par la mise en place de systèmes d'adhésion différentielle autour d'une cellule, par l'orientation des éléments du cytosquelette ou par la position des zones d'expansion cellulaire (par exemple les cils ou les axones). La polarisation dirigée des cellules est un élément clé du développement des organismes, de la génèse des organes et également un élément important pour le fonctionnement des organes matures.

La voie de signalisation PCP a été impliquée dans le développement du cœur chez les vertébrés (Henderson and Chaudhry, 2011). Chez le poisson zèbre l'implication d'homologue protéique des partenaires de la voie PCP décrite chez la drosophile (Diversin/Diego ; Disheveled) et la réversibilité des phénotypes observés par injection des effecteurs de cette voie de signalisation (Rho A notamment) suggèrent fortement le rôle de cette voie dans la migration des précurseurs des cardiomyocytes (Matsui et al., 2005). Cependant chez les mammifères, l'implication de cette voie reste à établir dans des processus développementaux équivalents.

Une fois le tube cardiaque formé (chez l'homme et chez la souris), la couche myocardique s'épaissit pour constituer un myocarde compact et trabéculé. Au 12,5<sup>ème</sup> jour du développement murin, quand la paroi ventriculaire commence à s'épaissir, les cardiomyocytes présents dans la paroi ventriculaire apparaissent essentiellement sphériques, et les protéines composant les systèmes de jonction sont distribuées uniformément sur la membrane cellulaire (Henderson and Chaudhry, 2011; Hirschy et al., 2006b). Au 13.5<sup>ème</sup> jour, les cardiomyocytes commencent à s'allonger, apparaissant de forme ovoïde et les protéines constitutives des systèmes de jonction cellulaire se regroupent au niveau de la membrane cytoplasmique. Sur les 5 premiers jours et durant les deux premières semaines de vie post-natale, les cellules s'allongent progressivement, acquérant les caractéristiques des cardiomyocytes adultes. A ce moment là, la majorité des protéines dites de jonction sont localisées

spécifiquement au niveau des disques intercalaires, solidarisant les cellules à leurs extrémités terminales (Henderson and Chaudhry, 2011). Par ailleurs, les costamères le long de la membrane latérale accroche les cardiomyocytes allongés à la matrice extracellulaire environnante et sont responsable de la transmission de force.

Avec le temps les cardiomyocytes s'allongent, cependant le myocarde n'est pas un épithélium et l'organisation des cardiomyocytes en cavité ventriculaire est complexe (Henderson and Anderson, 2009). Même si les cardiomyocytes matures sont hautement polarisés, la question de l'implication de la voie PCP dans les processus de polarisation reste posée. Des composants de la voie PCP sont exprimés durant le développement cardiaque (Vangl2, Scrib) (Murdoch et al., 2003; Phillips et al., 2007). Parmi les éléments protéiques de cette voie PCP, la protéine de polarité Scribble est localisée sur toute la surface de la membrane latérale mais est exclue des disques intercalaires dans les cardiomyocytes adultes. Il est montré que la mutation de Scribble entraîne une mauvaise localisation temporaire de la N-cadherine dans les cœurs embryonnaires de souris. Malheureusement, le rôle de Scribble dans la formation mature des disques intercalaires ne peut pas être étudié à cause de la létalité précoce des mutants Scribble (Phillips et al., 2007). L'analyse des embryons mutants Scribble au 13,5<sup>ème</sup> jour de développement, révèle une paroi myocardique affinée et des cardiomyocytes sphériques par rapport à leurs contrôles. Par ailleurs, lors d'une analyse moléculaire, la Rho kinase semble être impliquée dans ce processus de polarisation cardiomyocytaire et peut être partiellement responsable du phénotype observé (Phillips et al., 2008). Ces anomalies myocardiques sont retrouvées de manière similaire dans un modèle murin délété pour Wnt11. Wnt 11 est une molécule impliquée dans la voie de signalisation Wnt/Fzd non canonique. Lorsque ce gène est délété chez l'embryon, on observe au niveau myocardique une désorganisation des cardiomyocytes et une mauvaise organisation des protéines de jonctions (N cadherine et  $\beta$  caténine) (Nagy et al., 2010).

Bien que ces anomalies morphologiques cellulaires et ces perturbations de l'organisation des protéines de jonction dans le myocarde ventriculaire ne peuvent pas être rapprochées d'une perturbation de la voie PCP classique, les composants de la voie PCP semblent avoir un rôle important dans la polarisation des cardiomyocytes fœtaux (Henderson and Chaudhry, 2011).

### III / *Pdzn3* et régulation de la signalisation PCP

Parmi les molécules intervenant dans les voies de signalisation Wnt/Fzd (chez les insectes ou chez les vertébrés), une famille de protéines est constamment retrouvée, la famille Dishevelled (DvL). Cette famille comporte trois isoformes (Etheridge et al., 2008). La protéine DvL assure le lien entre le récepteur Frizzled et les voies de signalisation Wnt (Gao and Chen, 2010). Dans le cadre de la voie de signalisation Wnt/Fzd,  $\beta$  caténine indépendante (voie PCP), DvL s'associe avec différentes protéines partenaires et induit la cascade de signalisation en augmentant notamment l'activation de c-Jun (marqueur de la voie PCP) et celle de petites protéines GTPases (Rho et Rac) (Park et al., 2005). Dans cette famille des protéines DvL, une isoforme semble particulièrement intéressante pour l'étude de la voie PCP, DvL3. En effet cette isoforme a une unique fonction, par rapport aux autres isoformes, lorsque l'on analyse le phénotype des différents mutants dishevelled (Etheridge et al., 2008). De plus les études *in vitro* semblent corroborer cette idée en mettant en évidence une activité spécifique (contrairement aux autres isoformes) non canonique via une activité dépendante de Dab2 (Hocevar et al., 2003).

Au sein de notre laboratoire, il a été mis en évidence un rôle important de DvL3 dans l'induction des cellules endothéliales par la voie PCP (Descamps et al., 2012). Pour approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'activité DvL3 dans la signalisation PCP, nous avons réalisé un criblage chez la levure (en double hybride) pour rechercher de nouvelles protéines partenaires de DvL3. Ainsi, nous avons identifié une ubiquitine ligase de type E3 contenant des domaines PDZ, appelée PDZRN3.

Une étude japonaise précédemment publiée a mis en évidence une implication de *Pdzn3* dans la maturation du muscle squelettique *in vitro*. Par ailleurs l'analyse de son expression lors du développement du muscle squelettique chez la souris met en évidence une régulation de son expression. Enfin, l'analyse de l'expression de cette protéine sur différents tissus humains montre une expression de PDZRN3 au niveau du cœur, du muscle squelettique, du foie mais également au niveau du cerveau, du rein (Ko et al., 2006). Une autre étude a montré l'implication de *Pdzn3* dans la différenciation des ostéoblastes par inhibition de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$  caténine (Honda et al., 2010).

Lors d'un premier travail de recherche, l'équipe a exploré le rôle *in vivo* de PDZRN3 dans l'angiogénèse. Lorsque *Pdzrn3* est délété au niveau de l'embryon, on observe une mortalité intra-utérine très précoce (à E11,5). Les embryons présentent des anomalies de la morphogénèse des vaisseaux vitellins et une insuffisance de l'invasion des capillaires embryonnaires primaires au niveau placentaire. De plus on retrouve un retard de croissance sévère. Lors de la délétion conditionnelle de *Pdzrn3* durant la période néonatale dans les cellules endothéliales, on observe un défaut de ramification du réseau vasculaire associé à une regression excessive des vaisseaux du plexus vasculaire superficiel de la rétine. L'analyse, *in vitro* et *ex vivo* de la perte et du gain de fonction de *Pdzrn3*, révèle un rôle de PDZRN3 dans la coordination de l'extension, de la polarisation et de la formation des plexus tubulaire dans les cellules endothéliales (Sewduth et al., 2014). PDZRN3 régule la migration et la polarité des cellules endothéliales. PDZRN3 est donc un nouveau partenaire de la voie de signalisation PCP.

Lors d'un second travail réalisé au sein du laboratoire, il a été montré le rôle de *Pdzrn3* dans la régulation de la perméabilité vasculaire. Dans les vaisseaux sanguins, les interconnexions entre les cellules endothéliales forment une barrière entre le réseau vasculaire et les tissus. L'intégrité des jonctions intercellulaires régule la perméabilité vasculaire. Lors d'un accident vasculaire cérébral (AVC), l'excès de liquide peut s'accumuler au niveau cérébral et causer des dommages irréversibles. Lors de ce travail, il a été mis en évidence une régulation des jonctions intercellulaires et de la perméabilité vasculaire par une voie de signalisation médiée par PDZRN3. La surexpression de cette protéine dans les cellules endothéliales est responsable d'une augmentation de la perméabilité vasculaire entraînant le décès des souris par hémorragie (observé dans différents tissus chez l'embryon de souris). Alors que la délétion de *Pdzrn3* chez les souris adultes diminue l'œdème cérébral post AVC. Cette diminution de la perméabilité est en partie reproduite par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de PKC $\zeta$  (kinase qui destabilise les jonctions intercellulaires endothéliales). Cette étude suggère que la variation de l'expression de PDZRN3 dans les cellules endothéliales influence l'activation de PKC $\zeta$  et sa localisation aux jonctions intercellulaires, et la perméabilité. Ces résultats suggèrent une possibilité de prévention de l'œdème cérébral pathologique (notamment dans les AVC) par inhibition de PDZRN3 ou de PKC $\zeta$  (Sewduth et al., 2017).

## **IV / Rôles des ubiquitines ligases dans les cardiomyopathies**

Le maintien de la fonction contractile myocardique nécessite la mise en place de mécanismes de contrôle et de surveillance de la qualité des protéines cellulaires. La dérégulation du renouvellement physiologique des protéines cellulaires a été impliquée dans les cardiomyopathies, notamment les cardiomyopathies hypertrophiques, dilatées ou les cardiomyopathies ischémiques. Le système ubiquitine/protéasome est fondamental dans ce contrôle. Ce système participe au contrôle de la dégradation, mais également de la localisation cellulaire des protéines et concourt à la transduction de signal cellulaire. L'importance des ubiquitines ligases au sein des cardiomyocytes, sains ou pathologiques, est illustrée par le nombre de travaux de recherche récents mettant en évidence de nouvelles cibles protéiques du système ubiquitine/protéasome mais également par les nouvelles fonctions décrites pour chaque ubiquitine ligase cardiospécifique (Willis et al., 2014).

Le processus de contrôle de qualité des protéines cellulaires implique le renouvellement des protéines qui sont endommagées avec le temps. Ce processus fonctionne en plusieurs étapes : les protéines endommagées sont reconnues puis dégradées pendant que des protéines, nouvellement synthétisées, assurent leur renouvellement. Ce mécanisme préserve le fonctionnement cellulaire. La fréquence de renouvellement varie en fonction de leur rôle dans la cellule. Le système ubiquitine/protéasome est étroitement régulé par une cascade de signalisation impliquant généralement trois classes différentes d'enzymes : les enzymes E1 (Ubiquitin-activating enzyme) permettant d'activer l'ubiquitination, les enzymes E2 (Ubiquitin-conjugating enzyme) permettant de transférer l'ubiquitine sur la protéine cible et les enzymes E3 (Ubiquitine ligase) établissant la spécificité de l'interaction entre les enzymes E1 et E2 et une protéine cible. Ce complexe permet ainsi une ubiquitination ciblée d'une protéine, Figure 9.

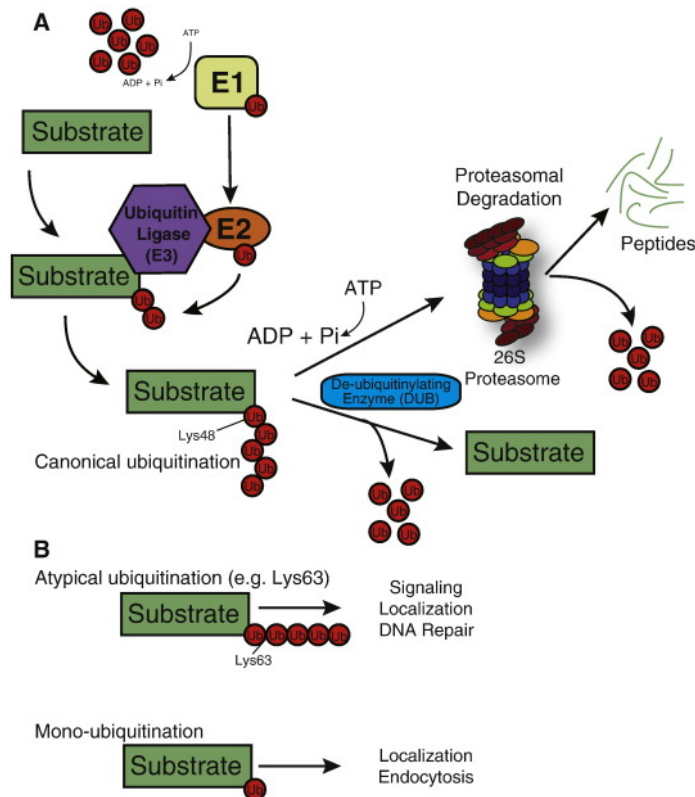


Figure 9: Le système ubiquitine-protéasome. A. Modification post traductionnelle de protéines cible nécessaire à leur dégradation via le protéasome. L'enzyme E1 active l'ubiquitine libre en utilisant l'énergie de l'ATP pour générer une liaison thioester avec l'ubiquitine. L'ubiquitine activée est alors transféré à l'enzyme E2 qui interagissent avec l'enzyme E3. L'ubiquitine ligase transfère finalement cette ubiquitine sur un résidu lysine de la protéine cible. Une fois la première ubiquitination réalisée, cette ubiquitination permet d'activer l'addition d'autres molécules d'ubiquitine entraînant des chaînes de poly-ubiquitination. B. L'ubiquitine a sept résidu lysines permettant la polyubiquitination (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63). La formation d'une poly-ubiquitination sur la Lys48 est considérée comme la poly-ubiquitination canonique et entraîne la dégradation du substrat par le protéasome. La polyubiquitination sur la Lys63 a été montrée comme modifiant l'activité de la protéine cible (relocalisation, translocation nucléaire...). De façon similaire, la mono-ubiquitination n'entraîne pas la dégradation de la protéine cible mais peut modifier l'activité de cette protéine (relocalisation dans un autre compartiment cellulaire, implication dans l'apoptose, la régulation du calcium...) (Willis et al., 2014).

Ce système n'est pas seulement impliqué dans la dégradation de protéines non fonctionnelles mais il joue également un rôle primordial dans la régulation de multiple processus intracellulaire. Il participe au contrôle de la prolifération, à l'adaptation au « stress » cellulaire, à la régulation de la taille des cardiomyocytes et au contrôle de l'apoptose cellulaire. La perturbation de ces processus de contrôle a été reconnue comme essentiel à la survenue d'une dysfonction myocardique (Rock et al., 1994; Willis et al., 2009).

Dans les cardiomyopathies hypertrophiques, des ubiquitines ligases spécifiques ont été impliquées. Chez les souris délétées pour des ubiquitines ligases, MuRF1 et atrogin-1, une exagération de l'hypertrophie myocardique survient en réponse à une augmentation de la post-charge dans le cadre d'un protocole de constriction aortique. Ces études illustrent le rôle protecteur de ces protéines dans le cadre de l'hypertrophie myocardique pathologique (Arya et al., 2004; Willis et al., 2007). Par ailleurs ces études suggèrent l'idée d'une implication d'une voie de signalisation indépendante de l'activité de dégradation protéique du protéasome sans toutefois le démontrer. Un article plus récent met en évidence l'implication d'une ubiquitine ligase de type E3, TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor6) dans la régulation de la réponse hypertrophique myocardique à un signal de stimulation (Angiotensine 2 ou constriction aortique). Lors d'un « stress » hypertrophique, TRAF6 est activé, provoquant son interaction avec un partenaire protéique (TAB2), permettant ensuite la liaison à une de ses protéines cibles, TAK1 (transforming growth factor beta-activated kinase1). Cette interaction permet l'ubiquitination de TAK1, son activation et l'activation des voies intra-cellulaires JNK et p38 dépendantes, modulant l'hypertrophie myocardique secondaire (Ji et al., 2016).

## **V / Projet de recherche :**

Les cardiomyocytes au sein du myocarde sont des cellules hautement polarisées. Lors de leur maturation, ils s'allongent et se polarisent rapidement après la naissance. Cette organisation et cette maturation tissulaire sont évocatrices de la mise en place de mécanismes de signalisation orientant cette polarisation. Par ailleurs, ces cellules sont équipées des protéines de la voie de polarité planaire PCP mais l'implication de cette voie de signalisation est peu comprise dans les mécanismes de polarisation post natale des cardiomyocytes. Je me suis donc intéressé à l'analyse de cette voie dans le développement myocardique post natal et dans des modèles pathologiques sollicitant les systèmes de jonction. Pour évaluer cette hypothèse, j'ai analysé l'implication de PDZRN3 dans la maturation des cardiomyocytes. Cette protéine est exprimée dans le cœur chez la souris et chez l'homme. Dans une première partie je me suis intéressé à l'analyse de l'expression de PDZRN3 au niveau transcriptionnel et protéique au cours du développement post-natal du cœur murin. Lors de cette analyse, une diminution de l'expression est retrouvée durant les premières semaines de vie post natales. J'ai donc poursuivi mon travail en analysant le phénotype des souris sur-exprimant PDZRN3 de manière constitutive après avoir vérifié le niveau de surexpression de notre souris transgénique. Puis j'ai évalué le retentissement de la délétion conditionnelle de cette protéine à l'état physiologique puis, devant l'absence de retentissement macroscopique, dans des modèles pathologiques d'induction d'hypertrophie myocardique. Enfin j'ai évalué une éventuelle implication de PDZRN3 dans des myocardiopathies humaines. En parallèle, j'ai mené une analyse moléculaire à la recherche d'une protéine cible de PDZRN3.



# MATERIEL ET METHODES

## I / ANALYSE *IN VIVO*

### 1/ Modèle murin de sur-expression *Pdzn3* dans les cardiomyocytes

Pour étudier le rôle de la surexpression de *Pdzn3* dans les cardiomyocytes, nous avons généré plusieurs lignées de souris transgéniques. Les souris transgéniques portant des séquences TRE encadrant la séquence codante de *Pdzn3* floquées d'une étiquette V5 notées *Pdzn3* - V5 ont été générées par le laboratoire et ont été élevées dans un fond génétique C57BL6/J et CBA. Les souris *Pdzn3* - V5 présentent un développement normal, sont viables et fertiles. Pour étudier l'effet de la surexpression spécifique de *Pdzn3* dans les cardiomyocytes sur le développement myocardique, nous avons utilisé une lignée de souris : la lignée MHC - Tta qui permet une surexpression spécifique de *Pdzn3* dans les cardiomyocytes par trans-activation de son promoteur TRE. Les souris MHC - Tta ont été croisées avec des femelles *Pdzn3* - V5 pour donner des souris MHC - Tta ; *Pdzn3* - V5 (*Pdzn3* OE) dont la surexpression est constitutive. Les souris MHC - Tta ou *Pdzn3* - V5 constituent le groupe contrôle correspondant (Figure 10).

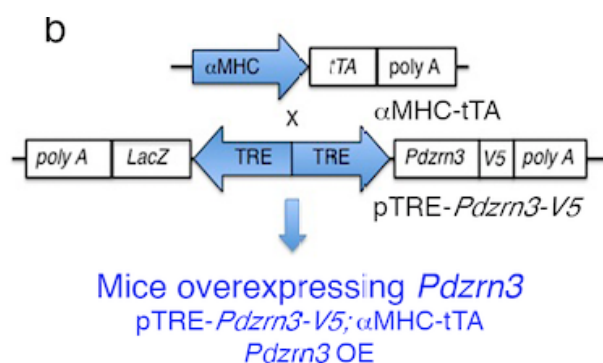


Figure 10 : Schéma de la sur-expression de *Pdzn3* dans les cardiomyocytes. Les souris contrôles sont appelées Contrôle et les souris *Pdzn3* OE sont génétiquement MHC-Tta ; *Pdzn3* - V5.

Pour génotyper les souris issues de ce croisement, l'ADN d'un échantillon de queue provenant de l'animal est extrait dans une solution de tampon de lyse (DirectPCR, Viagen) supplémentée en protéinase K. Après centrifugation, le surnageant contenant l'ADN extrait est soumis à une réaction de polymérase en chaîne (PCR).

Les amorces P1/P2 utilisées pour le génotypage par PCR de la séquence de *Pdzrn3* - V5 sont : 5' CAGCTTGAGGATAAGGCGCT-3' ; P2 : 5'-CTTCGAGCTGGACCGCTTC-3'.

Nos résultats ont montré une augmentation modérée du transcrit de *Pdzrn3* dans les cardiomyocytes des souris *Pdzrn3* OE comparés à leur contrôle. Ce modèle est donc valide et nous permet de continuer notre étude sur le rôle de *Pdzrn3* dans le développement myocardique.

Par ailleurs dans notre étude la sur-expression de *Pdzrn 3* est un système tet-off. Ainsi, nous pouvons bloquer la surexpression de *Pdzrn 3* en ajoutant dans l'eau d'hydratation des cages de la Doxycycline.

## 2/ Modèle de délétion conditionnelle de *Pdzrn3* dans les cardiomyocytes

Pour étudier le rôle de la délétion de *Pdzrn3* en biologie cardiaque, nous avons utilisé une lignée de souris transgéniques *Pdzrn3 floxé* (stock 01750, Riken institute). Ainsi les souris transgéniques, portant des séquences Flox encadrant la séquence codante de *Pdzrn3* notées  $Pdzrn3^{F/F}$ , ont été générées par le Dr Y. Saga dans un laboratoire japonais (National Institute of Genetics, Japan) et nous les avons élevées sur un fond génétique C57BL6/J. La cassette néomycine de cette construction a été enlevée par recombinaison avec une flippase en croisant les souris  $Pdzrn3^{F/F}$  avec des souris *Flp*. Les souris homozygotes  $Pdzrn3^{F/F}$  présentent un développement normal, sont viables et fertiles. Pour étudier l'effet de la délétion spécifique de  $Pdzrn3^{F/F}$  dans les cardiomyocytes sur le développement myocardique, nous avons utilisé une lignée de souris : la lignée MHC - Cre qui permet une délétion spécifique de  $Pdzrn3^{F/F}$  dans les cardiomyocytes, induite par l'injection de tamoxifène. Les souris MHC - Cre ont été élevées dans un fond génétique  $Pdzrn3^{F/F}$  et les mâles

MHC – Cre ;  $Pdzn3^{F/F}$  ont été croisés avec des femelles  $Pdzn3^{F/F}$  pour donner des souris MHC – Cre  $Pdzn3^{F/F}$  (MCM –  $Pdzn3^{F/F}$ ) dont la délétion est inducible. Les souris  $Pdzn3^{F/F}$  sont les contrôles correspondants. Pour ces souris la délétion post natale a été induite par l’injection de tamoxifène (50  $\mu$ l d’une solution de 10 mg/ml) en intrapéritonéale quotidiennement durant 3 jours à différents temps en fonction du protocole réalisé. Pour les inductions de délétion intra utéro, 100  $\mu$ l de tamoxifène (10 ng/ml) est injecté à la femelle 24h avant l’euthanasie.

Les souris issues de ce croisement sont viables et fertiles (Figure 11)

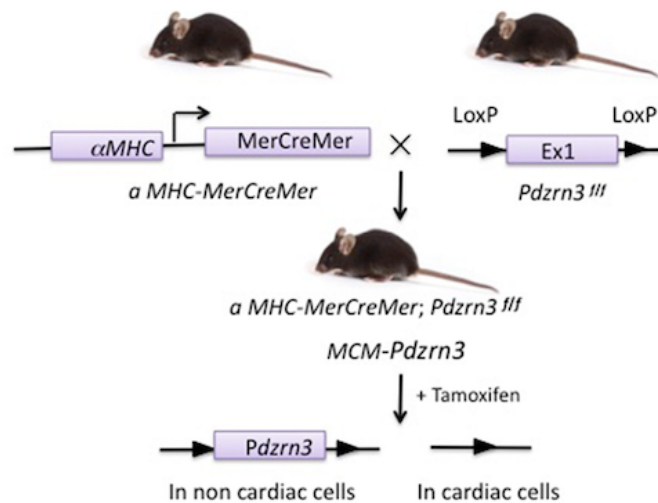


Figure 11 : Schéma de la délétion de  $Pdzn3$  dans les cardiomyocytes. Les souris contrôles sont nommées  $Pdzn3^{F/F}$ . Les souris MCM -  $Pdzn3^{F/F}$  correspondent au souris génétiquement MHC-MerCreMer ;  $Pdzn3^{F/F}$ .

Le génotypage de ces souris, a été réalisé sur un prélèvement de queue. Les amorces utilisées pour la PCR ont été les suivantes : les amorces P1/P2 utilisées pour l’allèle sauvage et pour l’allèle Flox et les amorces P3/P4 utilisées pour l’allèle KO.

P1 5'- CGACCCACTTGCTCCAGTAACCGGAAAG – 3'

P2 5'- GAGGCTGACATAATTCCCGATCAGC – 3'

P3 5'- TCTGGCCTGTCCCATCCAGACAGCTGGA – 3'

P4 5'- GGAGATGTTTTAATTCAAGGAGGCTATC) – 3'.

Pour vérifier la spécificité et l'efficacité de la Cre – recombinaise, nous avons croisé des souris transgéniques exprimant la Cre sous le promoteur MHC avec des souris transgéniques GT (ROSA)26 Sortm4 (ACTB-td Tomato, -EGFP)Lu/J exprimant un gène rapporteur et notées souris mT/mG (A, Eichmann laboratory). Lorsque la Cre recombinaise est exprimée sous le promoteur MHC, il y a excision de la cassette tomato encadrée par des séquences Flox et expression de la GFP par les cellules myocardiques. Ainsi, seuls les cardiomyocytes expriment la GFP et apparaissent en vert, tandis que les autres tissus et cellules exprimant la tomato sont en rouge, montrant ainsi la spécificité et l'efficacité de recombinaison de la Cre.

Enfin, pour vérifier si la délétion de *Pdzrn3* sous le contrôle du promoteur MHC se traduit bien par une diminution d'expression du transcrite de *Pdzrn3* dans le myocarde, des qPCR ont été réalisées sur des lysats de cœur totaux de souris MCM - *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> et leurs contrôles respectifs à l'âge de 2 mois. Nos résultats ont montré une forte diminution du transcrite de *Pdzrn3* dans les cardiomyocytes des souris MCM - *Pdzrn3*<sup>F/F</sup>, comparées à leur contrôle. Ce modèle est donc valide et nous permet de continuer notre étude sur le rôle de *Pdzrn3* dans la régulation des disques intercalaires, Figure 12.

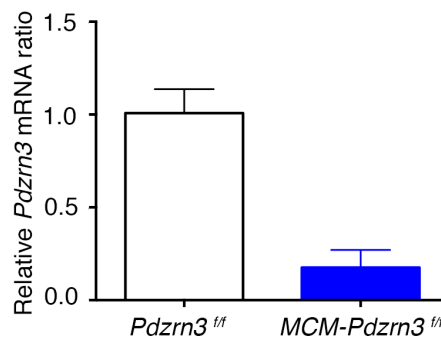


Figure 12 : Analyse par RT qPCR des ARNm de *Pdzrn3* après induction des souris MCM - *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> par le tamoxifène vs *Pdzrn3*<sup>F/F</sup>.

### 3/ Procédures chez l'animal

Toutes les procédures chez l'animal ont été menées en accord avec les normes et réglementations européennes et françaises en matière d'expérimentation animale.

#### 4 / Prélèvements humains

Des échantillons de myocarde humains ont été collectés dans différentes populations de patients:

- Des biopsies tissulaires de myocarde de ventricule gauche ou de septum ont été prélevées immédiatement sur les coeurs explantés chez des patients au stade d'insuffisance cardiaque terminale bénéficiant d'une transplantation orthotopique au sein de l'hôpital universitaire de Bordeaux. Les patients avaient une dysfonction ventriculaire gauche (<35%) et étaient symptomatiques (NYHA stade III ou IV). Les échantillons étaient ensuite classés en fonction des données cliniques pré-opératoire en cardiomyopathie dilatée (CMD), qu'elle soit primitive ou ischémique et en cardiomyopathie hypertrophique (CMH).

- Des échantillons de myocarde ventriculaire gauche ont été obtenus lors de chirurgie de remplacement valvulaire aortique associée à la réalisation d'une résection septale (intervention dite de Morrow) dans le cadre de rétrécissement aortique serré associé à un bourrelet septal responsable d'une obstruction sous aortique.

- Un échantillon a pu être prélevé sur un coeur d'un patient donneur en raison d'une impossibilité technique de transplantation du patient receveur initialement prévu. Cet échantillon a été utilisé comme contrôle. Les données clinique et para-clinique du donneur ne retrouvent pas de signe de cardiopathie.

Chaque échantillon est fixé en paraformaldéhyde 4% pour l'analyse histologique et une autre partie est conservée dans une solution de protection de la dégradation des acides nucléiques (RNALater® Thermo Fisher Scientific) et congelée à - 80°C pour une analyse transcriptionnelle.

La récupération des échantillons tissulaires de myocarde humain a été réalisée dans le cadre de protocole et d'un consentement approuvé par le centre de ressource biologique et le comité d'éthique de l'université de Bordeaux.

# I / PROTOCOLES DÉTAILLÉS

## 1 / Analyse morphologique non invasive

Lors des différents protocoles réalisés, une analyse et un suivi morphologiques des différents modèles murins modifiant l'expression de *Pdzrn3* est conduite. Cette analyse comprend une étude de la contractilité ventriculaire gauche par échocardiographie et une étude de l'activité électrique du cœur par électrocardiogramme.

### *1.1 Analyse échocardiographique*

Les analyses échocardiographiques sont conduites sur tous les animaux transgéniques. Lors de la phase initiale d'étude les souris sont suivies par échographie toutes les semaines. Dans le cadre des protocoles d'induction d'une hypertrophie myocardique induite par soit la constriction aortique soit l'administration d'Angiotensine II en sous cutanée, la fréquence de surveillance dépend du type de protocole (de manière mensuelle ou hebdomadaire respectivement). Cependant dans tous les protocoles d'induction d'hypertrophie, les souris ont bénéficié d'une échocardiographie pré-protocole afin d'éliminer toute défaillance pré-existante.

Pour les analyses échocardiographiques, un échographe à haute fréquence et haute résolution est utilisé (Vevo® 2100 Imaging System, FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Canada). Pour permettre l'analyse de la fonction contractile myocardique des souris nous utilisons une sonde d'échocardiographie à haute fréquence permettant de fournir une résolution et une profondeur de pénétration suffisantes (VisualSonics MS400, FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Canada with a frequency range of 18 – 38 MHz). Toutes les échocardiographies sont réalisées par une seule personne entraînée (par ailleurs cardiologue de formation). Afin de réaliser cet examen, les lignées de souris sont anesthésiées par inhalation d'un mélange de 95% d'oxygène associé à 2,5 à 3% d'isoflurane. Après avoir correctement anesthésié les souris, des mesures anthropomorphiques sont prises. Lors de chaque analyse, on relève le poids total de la souris. Par ailleurs la température des souris est contrôlée par l'utilisation d'une plaque chauffante durant toute la durée de l'examen (plaque chauffante réglée à 37°C). Pour réaliser l'examen, il est nécessaire de procéder à la dépilation de l'hémithorax gauche (à l'aide d'une crème dépilatoire). 2 ml de gel à

électrodes est appliqué sur chaque pad afin de connecter les souris (par le biais de leur pattes) et d'enregistrer ainsi l'électrocardiogramme durant toute la durée de l'examen.

Les souris sont constamment monitorées permettant de contrôler en permanence la fréquence cardiaque qui est maintenue à une fréquence de 425 +/- 50 battements minutes (BPM). La fréquence cardiaque normale d'une souris consciente et active est généralement supérieure à 600 battements par minute pour les souris C57BL. La fréquence cardiaque est un bon marqueur du niveau d'anesthésie. Plus la fréquence est basse, plus l'anesthésie est profonde. Par ailleurs, l'isoflurane a montré lors d'études préalables une certaine cardiotoxicité directe. Son monitoring est donc primordial pour pouvoir réaliser une analyse de la contractilité myocardique correcte. Une fréquence cardiaque inférieure à 300 Battements par minute (en l'absence de troubles conductifs observés chez les souris analysées) est généralement un bon indicateur du potentiel toxique de l'isoflurane (dépression sévère de la respiration et de la contractilité myocardique). A ce moment là, l'anesthésie doit être stoppée et l'analyse échocardiographique différée. De même une fréquence supérieure à 500 battements par minute peut révéler une anesthésie inadéquate.

Lors de l'analyse échocardiographique, la fraction d'éjection est évaluée par planimétrie. Lors de l'examen des coupes parasternales grand axe et petit axe sont acquises. Secondairement le contour de l'endocarde de chaque coupe est réalisé en diastole et en systole. Ainsi l'aire minimale et maximale sont déterminées pour évaluer le volume télésystolique du ventricule gauche (VtsVG) et le volume télédiastolique (VtdVG). Le logiciel du système utilise ensuite une formule basée sur l'extrapolation d'un modèle cylindrique héli-ellipsoïde (volume =  $(8 \times \text{aire}) / 3 \times \pi / \text{Longueur}$ ). La fraction d'éjection ventriculaire gauche est alors dérivée de la formule suivante :

$$(\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV} * 100$$

La contractilité ventriculaire gauche est alors définie selon les techniques d'échocardiographie humaines, le Teicholz et le modèle de Simpson.

La significativité des résultats est déterminée par la réalisation d'un test statistique de Student (T-test) et est défini par un  $P < 0.05$ .

## 1.2 Analyse électrocardiographique

Cette étude a été menée dans le cadre de la caractérisation des deux modèles murin modifiant l'expression de *Pdzrn3* (sur-expression constitutive ou délétion conditionnelle). Les souris ont été suivies sur une durée totale de 5 mois.

L'électrocardiogramme (ECG) est un enregistrement de surface des courants électriques traversant le cœur. Cette onde électrique (de dépolarisation) représente l'activité électrique du cœur et permet par couplage électromécanique la contractilité myocardique. L'ECG permet l'analyse des différentes ondes de dépolarisation et permet de déceler les potentiels troubles de la conduction ou la présence d'une activité électrique anormale.

Le tracé d'ECG typique comprend :

- une première onde P correspondant à une onde de dépolarisation des oreillettes
- un trio d'ondes consécutives formant ce que l'on appelle le QRS correspondant à l'onde de dépolarisation des ventricules
- enfin une onde T correspondant à une onde de repolarisation correspondant à la phase de relaxation ventriculaire.

Le temps compris entre les différentes ondes correspond au temps de transmission du courant électrique (ou temps de conduction du signal électrique) entre chaque composant. En général, l'onde R est l'onde la plus distincte qui présente le plus important différentiel, en terme de voltage, par rapport à la ligne de base permettant ainsi d'être plus facilement détectée et avec une haute spécificité par des logiciels de reconnaissance automatique. De même le temps entre deux ondes R est considéré comme le temps d'un battement permettant ainsi de définir la fréquence cardiaque.

L'enregistrement digital de la fréquence cardiaque est permis par amplification du signal électrique du cœur. Ce signal est ensuite analysé par un cardiotelemètre qui définit le temps entre deux signaux de même amplitude permettant ensuite de calculer la fréquence cardiaque. Ensuite le signal est analysé à



l'aide d'un logiciel d'analyse permettant de traiter les différents paramètres de conduction (logiciel : PowerLab device and labChart software (ADInstruments) et appareil de recueil de l'ECG utilisé : ADInstruments Animal Bio Amps).

## **2 /Analyse histologique**

### *2.1 Prélèvement et préparation des tissus*

#### 2.1.1 Prélèvements murins

Les souris sont euthanasiées par une injection intra-péritonéale (IP) létale de thiopental sodique (200  $\mu$ L). Le cœur est arrêté en diastole par instillation épocardique de 200  $\mu$ L de KCl. Le cœur est ensuite lavé par une injection intracardiaque (ponction au niveau de l'apex) à flux constant par 10 mL de PBS (phosphate buffered salin). Le cœur est ensuite prélevé et pesé (permettant d'établir le ratio poids du cœur/poids total). La partie apicale des ventricules destinée à l'analyse moléculaire est conservée à -80°C à sec. Les 2/3 restant du cœur sont fixés en paraformaldéhyde 4% pendant 3 heures ou en méthanol, en fonction du protocole suivi, au vue d'une analyse histologique.

#### 2.1.2 Prélèvements humains

Les prélèvements tissulaires réalisés ont été divisés en deux :

- une partie est congelée à -80°C après avoir été plongée dans une solution de protection de la dégradation des ARN (RNALater® Thermo Fisher Scientific) pour une analyse moléculaire
- une autre partie est fixée en paraformaldéhyde 4% pendant 24 heures pour une analyse histologique.

### *2.2 Coupe en Paraffine*

#### 2.2.1 Inclusion en paraffine

Ensuite les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'Ethanol et de Xylène. Enfin les échantillons sont inclus en blocs de paraffine. Les blocs sont

ensuite séparés au microtome en coupe de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les tissus sont ensuite colorés au trichrome de Masson (Hémalun, Eosine et Safran (HES)). Puis les coupes sont analysées en lumière froide en l'absence de renseignements cliniques, hémodynamiques ou échocardiographiques.

### 2.2.2 Analyses morphologiques

Pour mener cette analyse, des coupes transversales de cœur sont réalisées puis colorées au trichrome de Masson et ensuite analysées à l'aide d'un microscope optique, AxioZoom (Zeiss) doté d'une caméra AxioCam ERC5. Ainsi les dimensions ventriculaires (grand axe, épaisseur de la paroi latérale, épaisseur septale) et les surfaces ventriculaires (aire cardiaque, surface ventriculaire interne) sont déterminées par étude à l'aide du logiciel ImageJ. Les différents paramètres sont rapportés au poids de la souris lors du sacrifice.

Une analyse de la fibrose myocardique est également conduite et permise par la réalisation de deux colorations différentes : la coloration au Trichrome de Masson (fibres de collagène) et la coloration au Rouge Sirius (fibres de collagène et de réticuline). L'analyse des lames est réalisée au moyen d'un microscope optique Nikon (Microphot-FXA) doté d'une caméra AxioCAM 104 color. Pour chacun des cœurs, trois images sont prises au niveau ventriculaire gauche et ventriculaire droit. Grâce au logiciel de traitement d'image, ImageJ©, nous calculons un pourcentage, qui est moyenné sur les trois coupes, de fibrose myocardique par rapport à la surface totale de myocarde.

### 2.3 Analyse en immunohistochimie

Pour les immunomarquages, la peroxydase endogène est saturée par incubation des échantillons dans du PBS associé à du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 3% pendant 20 minutes. Les tissus sont ensuite incubés avec l'anticorps primaire (dilué dans du PBS associé à du sérum équin 1% et du triton 0,5%) pendant deux heures, puis avec l'anticorps secondaire adapté associé à la peroxydase pendant deux heures à température ambiante. Le kit de révélation de la peroxydase est ensuite utilisé pour mettre en évidence le marquage cellulaire.

Les anticorps primaires utilisés sont : Ac anti-Cx43 (lapin, 1:400, Sigma-Aldrich, C6219), Ac anti-Zo-1 (lapin, 1:100, Invitrogen, 402200), Ac anti-CD45 (rat, 1:200, Pharmingen, 01111D) et comme anticorps secondaire, une IgG anti-lapin (1:100, GE Healthcare) et IgG anti-rat (1:100, GE Healthcare) respectivement.

#### *2.4 Analyse en immunofluorescence*

Les analyses par immunofluorescence sont réalisées sur différents échantillons tissulaires. Les échantillons sont incubés avec l'anticorps primaire (dilué dans du PBS associé à de HS 1% et du triton 0,5%) pendant une heure à 37 °C ou toute la nuit à 4°C puis avec l'anticorps secondaire associé au fluorochrome pendant soit une ou quatre heures à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés sont soit l'anticorps de chèvre anti souris (Alexa 488) soit l'anticorps de chèvre anti lapin (Alexa 568). Lors de ces marquages, l'ADN est marqué par utilisation du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Lors des analyses par immunofluorescence, nous analysons notamment les dimensions et la morphologie myocytaire. Pour cela, nous utilisons un marquage des lectines membranaires, couplé à un fluorochrome vert (WGA Alexa 488, Invitrogen, dilution 1/200, incubation 30 min à température ambiante, protégée de la lumière). Les lames sont analysées en microscopie confocale à fluorescence (Olympus FV100). Pour chaque coupe, trois images différentes sont prises au niveau ventriculaire gauche. Pour chaque coupe, 100 à 150 cellules en section transversale sont manuellement détournées, grâce au programme ImageJ©. Nous nous intéressons à la surface de section transversale et au périmètre myocytaire, ainsi qu'à un indice de sphéricité myocytaire. Cet indice, défini par le rapport  $(4\pi \times Aire)/Périmètre^2$  nous permet de quantifier la géométrie et la polarisation myocytaire. Plus cet indice est proche de 1 et plus la cellule est sphérique.

### **3 / Analyse de l'expression des ARN m par RT-PCR quantitative**

Les tissus de souris ou les tissus humains ont été lysés et homogénéisés dans du TRI - REAGENT© (Euromedex) et les ARN ont été extraits par une méthode phénol/chloroforme selon le protocole du fournisseur. Les ARN ont ensuite été

traités par la DNase (Qiagen) puis dosés à l'aide d'un NanoQuant Plate Infinite M200 Pro© (Tecan).

La RT – PCR a été réalisée sur 1  $\mu\text{g}$  d'ARN total de tissu murin ou humain. La q PCR a ensuite été menée par utilisation d'un mixe de qPCR (SYBR Green supermix© Bio-rad). Les paramètres de cycle de PCR en temps réel utilisés étaient les suivants : 5 minutes à 95°C suivi de 34 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C, 30 secondes à 72°C, 1 minute à 76 °C et enfin 1 minute à 80 °C.

Les contrôles négatifs (sans utilisation de transcriptase inverse (RT)) étaient préparés en parallèle de chaque échantillon d'ARN. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. Les résultats sont donnés par les  $\Delta\Delta\text{ct}$ , normalisés par rapport à l'expression de la cyclophylline pour les échantillons murins et la GAPDH pour les échantillons humains et calculés selon la méthode décrite par K.J. Livak et al. (Livak & Schmittgen 2001). Les séquences des amorces utilisées en qPCR sont listées ci-dessous (listes des réactifs).

#### **4 / Analyse protéique par Western-blot**

Les Western blots ont été réalisés comme décrit précédemment (Descamps et al 2012). Brièvement les protéines ont été lysées dans un tampon RIPA (NP-40 1%, déoxycholate de sodium 0,5%, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS 0,1%, tampon tris pH 8 5 mM) supplémenté en inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément (aprotinine 1mM, leupeptine 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , AEBSF 2 mM, benzamidine, acide okadaic 1 mM) ainsi qu'un inhibiteur de phosphatases (orthovanadate 1mM). Les tissus ont été homogénéisés par centrifugation à 1 000g pendant 10 min. Les différentes fractions ont été dosées à l'aide d'un kit de dosage BCA (Thermo scientific). Les protéines (25  $\mu\text{g}$ ) ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide puis transférées sur une membrane PVDF (Milipore) par électro-transfert. Un marquage protéique est ensuite réalisé à l'aide d'anticorps spécifiques révélés par un système de lecture infra-rouge (Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences)). Les protéines ont été révélées avec les anticorps suivants, voir liste des réactifs ci dessous

La quantification des immunoblots a été réalisée avec le logiciel Image J et les valeurs obtenues lors de ces quantifications ont été normalisées à la quantité d'  $\alpha$  tubuline.

## **5 / Immuno-précipitation des protéines**

Les protéines ont été immuno-précipitées à partir de lysats totaux homogénéisés. Les lysats ont été incubés pendant 1 heure avec l'anticorps primaire à +4°C sur une roue d'incubation. Ensuite, 25  $\mu$ l de billes de protéine G couplées à la sépharose ont été rajoutés aux différents échantillons et ont été incubés toute la nuit à +4°C. Le lendemain, les billes ont été lavées trois fois successives, puis resuspendues dans 60  $\mu$ l d'une solution tampon de SDS-PAGE (H2R).

## **6 / Analyse des images**

Les images acquises lors des analyses immunohistochimiques sont analysées à l'aide d'un logiciel d'imagerie analytique (ImageJ). Ce logiciel permet la quantification des marquages moléculaires et également l'évaluation des caractéristiques morphologiques à l'échelle myocardique ou à l'échelle des cardiomyocytes. L'ensemble de ces données est ensuite étudié à l'aide d'un logiciel de statistiques (Graphpad Prism5) permettant l'analyse statistique de l'ensemble de ces éléments. Pour des variables quantitatives, un test statistique non paramétrique, ANOVA, est utilisé. La différence est retenue comme significative lorsque  $p < 0,05$ .

## **7 / Protocoles chirurgicaux**

Ces protocoles chirurgicaux ont été réalisés dans le cadre de l'étude des souris ayant une délétion conditionnelle de *Pdzrn3*, pour induire une hypertrophie myocardique (médicamenteuse par l'administration d'Angiotensine II ou mécanique par la constriction aortique) et analyser le retentissement de la délétion de *Pdzrn3*.

### 7.1 Protocole Angiotensine II

Dans le cadre du protocole d'injection sous cutanée d'angiotensine II, la délétion des souris a été induite par le traitement au tamoxifène (3 injections de 50  $\mu$ l de tamoxifène 3 jours de suite) chez des souris âgées de 2 mois. Deux semaines plus tard, on vérifie en échocardiographie l'absence de retentissement sur la contractilité myocardique, de l'induction par le tamoxifène (ce traitement présente une certaine cardiotoxicité). Les groupes d'analyse sont ensuite constitués et les groupes traitement par angiotensine 2 sont implantés des pompes osmotiques. Les souris implantées sont réparties en deux groupes, le groupe des souris mutantes (MCM -  $Pdzrn3^{F/F}$ ) et celui des souris contrôles ( $Pdzrn3^{F/F}$ ).

Pour administrer l'Angiotensine II de manière continue des pompes osmotiques (Alzet pump model 1002) sous cutanées sont placées le long de la colonne vertébrale des souris. Ces pompes permettent de délivrer 1,5  $\mu$ g/h d'angiotensine II sur 14 jours au débit de 0,28  $\mu$ l/h (ANGIOTENSIN II ACETATE HUMAN, A9525).

L'administration d'Angiotensine II est maintenue pendant 1 mois, nécessitant la réimplantation des pompes osmotiques chez les souris porteuses du traitement, au bout de deux semaines. Dans tous les cas une échocardiographie est réalisée afin de mettre en évidence la survenue d'une hypertrophie myocardique révélatrice du bon déroulement du protocole.

Le protocole de surveillance est le suivant :

- o Une échocardiographie est réalisée en début de protocole, pour éliminer une éventuelle cardiopathie préexistante, puis après 15 jours de traitement (confirmation du bon déroulement du protocole) et enfin à 1 mois de traitement (qui correspond à la fin du protocole).
- o Une analyse histologique à un mois de traitement, les cœurs prélevés sont séparés transversalement en deux parties, la partie du côté de la base du coeur est utilisée pour l'analyse histologique. Les cœurs sont fixés dans du formaldéhyde 4%, puis inclus en paraffine. L'autre partie est séparée longitudinalement, pour analyse moléculaire (qPCR et Western blot), et congelée à sec à -80°C.

o Une analyse de la transcription par RT-qPCR, les différents transcrits recherchés sont : les marqueurs d'hypertrophie myocardique (ANP, BNP), *Pdzrn3*.

o Une analyse moléculaire est également faite pour évaluer l'évolution des marqueurs des voies Wnt/Fz à 1 mois (par RT qPCR et western blot (c-jun,  $\beta$ -catenin, Lef1, Tcf4, axin2, CyclinD1, c myc)).

L'objectif de ce protocole est d'évaluer le rôle de la délétion de *Pdzrn3* dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque.

### *7.2 Protocole de constriction de l'aorte transverse (Transverse Aortic Constriction, TAC)*

Un second protocole d'induction d'une hypertrophie myocardique est conduit. En effet le protocole d'induction pharmacologique (Angiotensine II) entraîne une modulation des voies de signalisation in vivo. L'intérêt de ce protocole associé au précédent est d'évaluer spécifiquement le retentissement de notre délétion conditionnelle sur la modulation de l'hypertrophie, en utilisant cette fois un modèle d'induction « mécanique ».

Dans le cadre de ce protocole, les souris ont été induites par le traitement au tamoxifène à l'âge de deux mois. Deux semaines plus tard, une échocardiographie est réalisée pour éliminer une cardiopathie préexistante. Les souris ont ensuite été envoyées dans un laboratoire toulousain rompu à la réalisation de la constriction de l'aorte transverse. Différents groupes ont été établis :

- un groupe (SHAM) : n'ayant pas subi de constriction aortique mais une cervicotomie et composé d'animaux contrôles « sains » (*Pdzrn3*<sup>F/F</sup>) et délété pour notre gène d'intérêt (MCM - *Pdzrn3*<sup>F/F</sup>).

- un groupe contrôle : composé de souris *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> ayant subi la constriction aortique.

- un groupe d'intérêt : composé de souris MCM - *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> ayant subi la constriction.

Le protocole de suivi est comparable au précédent. Cependant, du fait de l'apparition progressive de la constriction et donc de l'hypertrophie myocardique, les

durées de protocole sont spécifiques. La première analyse échocardiographique est réalisée à quinze jours après la chirurgie et le protocole est terminé à quatre mois.

## **8 / Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyennes +/- écarts types.

L'analyse statistique des résultats a été réalisée par une comparaison de moyennes (variables continues entre deux groupes) par un t - test non apparié, suivie, si une différence statistiquement significative est observée, d'un test non paramétrique (Man Whitney) avec le logiciel GraphPAD Prism©. Les valeurs inférieures à  $p < 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.



## II / REACTIFS

### 1 / Liste des anticorps utilisés

Anticorps	Référence	Produit par	Western blot	Immuno - précipitation	Immuno - cytochimie	Immuno- histochimie
V5	46 - 0705	Invitrogen	1/3000	1/1000	1/1000	ND
Myc	05 - 724	Milipore	1/3000		1/1000	ND
PDZRN3	sc - 99507	Santa Cruz	1/1000	1/1000	1/500	1/100
c - Jun	sc - 45	Santa Cruz	1/1000	1/1000	1/200	1/100
β caténine	C2206	Sigma	1/3000	ND	1/1000	1/500
α tubuline	B 5 - 1 - 2	Sigma	1/8000	ND	ND	ND
c - Jun Phosphorylé	9261S	Cell Signaling	1/1000	ND	ND	ND
Ubiquitine	U5379-1vl	Sigma	1/3000	ND		ND
ZO - 1	617300	Invitrogen	1/1000	1/1000	1/1000	1/200
Pyk2	3480S	Cell Signaling			ND	ND
Pkc ζ	Sc - 216	Santa Cruz				
AHNAK	Sc - 390743	Santa Cruz				
Cx 43	C6219	Sigma	1/8000		1/400	

## 2 / Listes des amorces utilisées

	Amorces sens (5' au 3')	Amorces antisens (5' au 3')
m Cyclophylin	AGCTAGACTTGAAGGGGAATG	ATTTCTTTTGACTTGCGGGC
m Pdzn 3	CTGACTCTTGTCTGCATCGGGACT	ATGGGCTCCTTGGCTGTCTTGAAAGC
h GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
h Pdzn 3	CAGCTTGAGGATAAGGCGCT	CTTCGAGCTGGACCGCTC
<i>m Nppa</i>	CGTCTTGGCCTTTTGGCTTC	GGTGGTCTAGCAGGTTCTTGAAA
<i>m Nppb</i>	AAGCTGCTGGAGCTGATAAGA	GTTACAGCCCAAACGACTGAC
m <i>Gja1</i>	ATCAGGGAGGCAAGCCATGCTCA	ACGTTGGCCCACACCACAAAGA
h <i>Gja1</i>	AAAGTCAGGGAATCAAGCCATGCTT	ACACCATATTGGCCCACACCACA

### 3 / Réactifs chimiques

#### Réactifs pour RT qPCR

Réactifs	Produit par
SYBR Green mix	Applied Biosystems
Isopropanol	BDH AnalaR
Chloroforme	Sigma-Aldrich
GelRed™	Biotum
10mM dNTP mix	Invitrogen
TRIzol Reagent	Invitrogen
1 kb DNA ladder	Invitrogen
Agarose	Fisher BioReagents
10x PCR Buffer	Invitrogen
10x RT Buffer	Roche
Glycogène	Invitrogen
DNase 10x Buffer	Invitrogen

#### Réactifs pour Western blot

Réactifs	Produit par
Protéine G plus agarose	Santa Cruz
Solution de lyse RIPA	
Marqueur de taille protéique	Invitrogen
β mercaptoéthanol	Sigma
Tris	Sigma
Tween	Sigma
Sodium dodécyl sulfate	Sigma
TEMED	Sigma

#### Enzymes pour RT qPCR

Réactifs	Unité	Produit par
RNase inhibiteur	40U/μl	Roche
M-MLV Transcriptase inverse (RT)	200U/μl	Invitrogen
Taq DNA polymérase	200U/μl	Invitrogen
DNase	200U/μl	Invitrogen

#### Réactifs pour immunomarquage

Réactifs	Produit par
Triton X100	Sigma
Acide Trichloroacétique	Sigma
Saccharose	Sigma
Paraformaldéhyde	Sigma
Sérum d'albumine bovin	Sigma
Sérum de singe	Sigma
Hémalum éosine	Sigma
Glycérole	Sigma

#### 4 / Equipements

Appareil	Référence
Ultracentrifugeuse	Centrikon T2060
Spectrophotomètre	Tecan Infinite M200 PRO
Robot d'immunomarquage	Ventana Discovery XT
Lecture des membranes de western blot	Odyssey LICOR
Imagerie confocale	Olympus FSV 100
Imagerie microscope optique	Nikon Microphot FXE ; Nikon SM 780800
Générateur pour électrophorèse	Bio – Rad Power Pack 300
Vibratome	Leica VT 1000S
Coupes en paraffine	Reichert-Jung 2030 BioCut Rotary Microtome
Microcentrifugeuse	Eppendorf 5415 Microcentrifuge
Machine de PCR	VWR Uno cycler
Homogénéisateur de tissu	QIAGEN Tissue lyser
Machine de qPCR	Biorad DNA engine  Opticon 2

## RESULTATS

Les cardiomyocytes sont des cellules polarisées hautement différenciées. L'organisation des cardiomyocytes matures, via la maturation des jonctions intercellulaires (disques intercalaires) est un phénomène post-natal. Or l'organisation des disques intercalaires correspond à un mécanisme de polarisation des protéines d'interaction intercellulaire qui sont par ailleurs les protéines constitutives des structures composant ces mêmes disques intercalaires (N-Cadhérine, Cx 43 et protéines constitutives des desmosomes). Notre hypothèse de travail est que la polarisation des cardiomyocytes en post natal serait contrôlée par une voie de signalisation impliquant PDZRN3.

Ce travail de thèse peut être divisé en trois axes de recherche, dans un premier temps la caractérisation de notre modèle murin de sur-expression constitutive de *Pdzrn3* puis la caractérisation du modèle de délétion conditionnelle de *Pdzrn3* et enfin l'évaluation de la délétion de *Pdzrn3* dans le cadre de protocoles chirurgicaux permettant une induction d'une hypertrophie myocardique.

A partir des données de la littérature et de part les spécificités du laboratoire de recherche accueillant ce travail de recherche, les études ont été menées sur des souris transgéniques en postnatal et à l'âge adulte.

# I / CARACTERISATION DE PDZRN3 DANS LES CARDIOMYOCYTES

L'un des premiers éléments nécessaire est de caractériser l'expression de *Pdzn3* au sein du myocarde. D'après des études japonaises *Pdzn3* est exprimé dans de nombreux tissus, notamment dans les muscles squelettiques et le tissu osseux (objet de leur travaux de recherche). Cependant cette protéine est également exprimée dans le myocarde, dans les reins et dans le cerveau. Nous avons dans un premier temps évalué la présence et le niveau d'expression de *Pdzn3* au sein du myocarde par RT qPCR et par western blot chez la souris, Figure 13 et Figure 14.

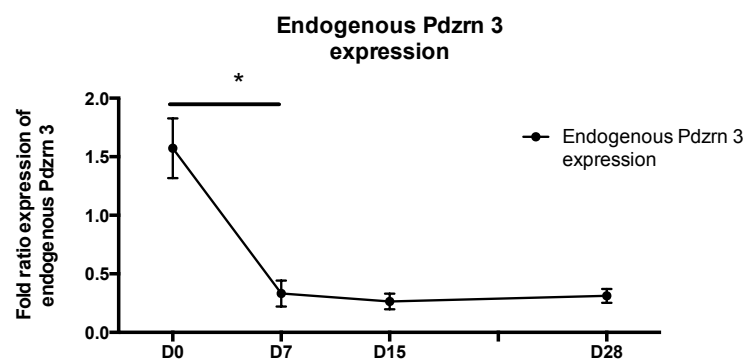


Figure 13 : Analyse en RT-qPCR de l'expression de *Pdzn3* dans les cardiomyocytes murins.

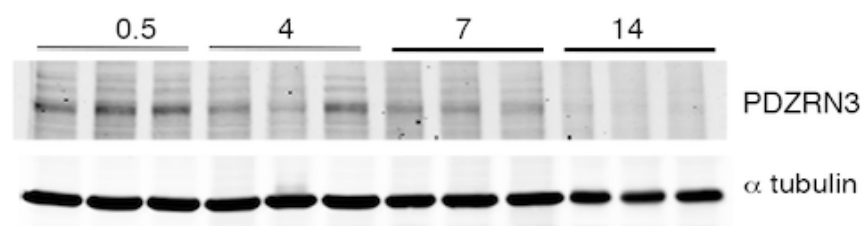


Figure 14 : Analyse par western blot de l'expression endogène de *Pdzn3* chez les souris de phénotype sauvage (à 0.5, 4, 7, 14 jours de vie).

*Pdzn3* est donc exprimé dans le myocarde murin et son expression diminue lors des deux premières semaines de vie. Une diminution de sa transcription est observée associée à une diminution de la quantité de protéine de PDZRN3, sur les deux premières semaines post-natales.

## II / MODELE MURIN DE SUR-EXPRESSION CONSTITUTIVE DE PDZRN3

Pour étudier l'implication de *Pdzrn3* dans le développement des cardiomyocytes, nous utilisons des souris exprimant notre protéine d'intérêt de manière constitutive selon un système dit Tet-off. Le croisement aboutit à la production de souris sur-exprimant *Pdzrn3* spécifiquement au niveau du cœur, notées *Pdzrn3* OE. La surexpression de notre protéine est visualisée par la mise en évidence de l'étiquette V5 de notre transgène ou la mise en évidence du gène rapporteur, représenté par la  $\beta$  galactosidase. Enfin la surexpression de *Pdzrn3* peut être stoppée par l'administration de doxycycline per os du fait du montage dit « Tet off », Figure 15

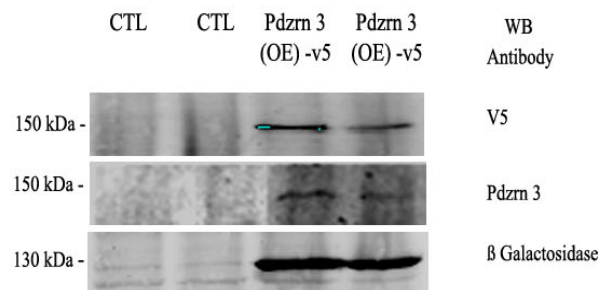


Figure 15 : Analyse western blot permettant la visualisation de la surexpression de notre transgène (Ac anti V5 et Anti  $\beta$  galactosidase)

Nous avons ensuite évalué par western blot le niveau d'expression de notre transgène d'un point de vue chronologique, Figure 16.

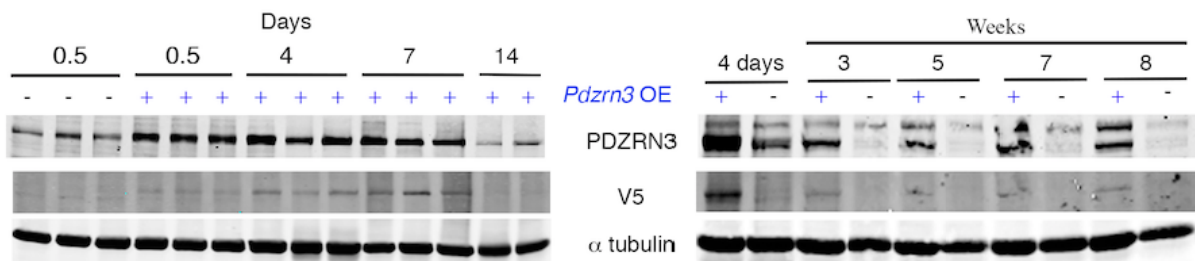


Figure 16 : Analyse chronologique par western blot de l'expression du transgène de *Pdzrn3*, Ac anti PDZRN3, anti-V5 et  $\alpha$  tubuline (comparatif par rapport au niveau d'expression de *Pdzrn3* chez les souris de phénotype sauvage à la naissance (0.5 jour), évalué à 0.5, 4, 7, 14 jours puis en comparaison avec leur contrôle à 3, 5, 7, 8 semaines post natales).

Le croisement génétique réalisé permet une sur-expression de PDZRN3 qui reste à un niveau physiologique puisque lorsqu'on analyse l'expression de PDZRN3 à trois, cinq, sept et huit semaines, on observe une quantité de protéine équivalente, chez les souris *Pdzn3* OE, au niveau de protéine présente au quatrième jour post natal chez les souris de phénotype sauvage, Figure 16. Nous avons ensuite quantifié le niveau d'expression du transgène par rapport à l'expression physiologique, Figure 17.

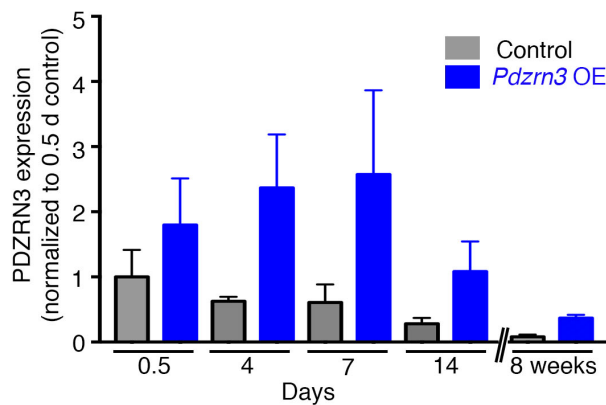


Figure 17 : Evaluation des ratio d'expression de la protéine PDZRN3 par rapport à l'expression physiologique de cette protéine le jour de la naissance (0.5 jours) sur les deux premières semaines et 8 semaines post natal.

Durant les deux premières semaines l'expression de PDZRN3 reste physiologique avec un pic de sur-expression au septième jour. La quantité protéique liée à la sur-expression de PDZRN3 est 2 à 3 fois supérieure à celle physiologique.



# 1 / Caractérisation phénotypique

## 1.1 Mortalité et données échocardiographiques

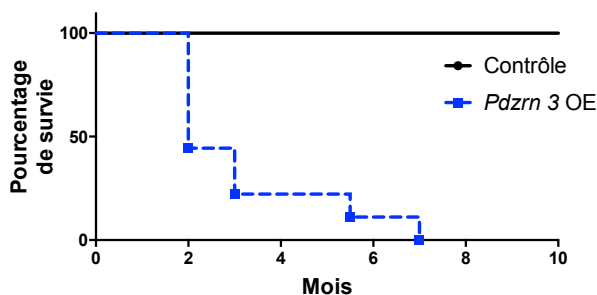


Figure 18 : Courbes de Kaplan Meyer, survie des souris transgéniques Pdzrn3 OE vs Contrôle (n=9 par groupe), test statistique de Gehan-Breslow-Wilcoxon  $p < 0,0001$ .

L'analyse de la mortalité des souris *Pdzrn3* OE met en évidence une augmentation significative de la mortalité. La totalité des souris sur-exprimant *Pdzrn3* décèdent dans les sept premiers mois de vie. De plus une forte mortalité est observée durant les deux premiers mois de vie (plus de 50%) (Figure 18).

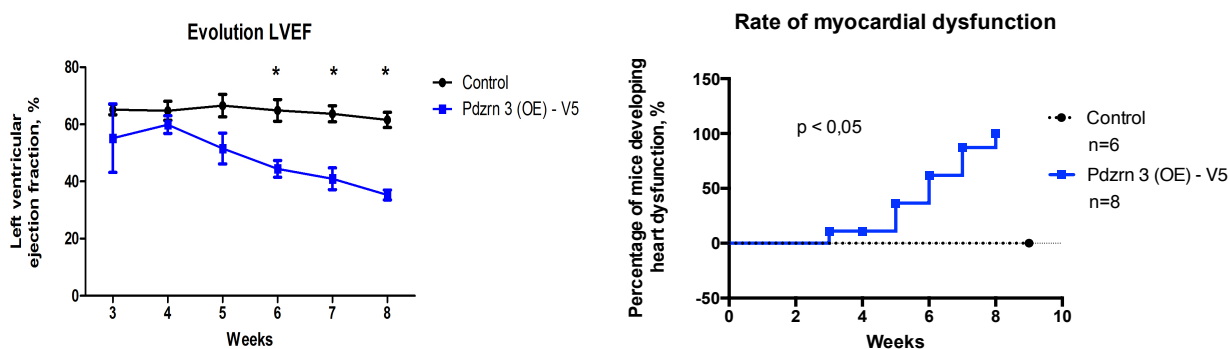


Figure 19 : Analyse du suivi échocardiographique des souris surexprimant notre transgène (*Pdzrn3* OE) vs contrôle, suivi réalisé de la troisième semaine post natale à la 8<sup>e</sup> semaine.

Initialement un suivi échocardiographique est réalisé. Ce suivi a permis de mettre en évidence la survenue d'une dysfonction contractile myocardique avec l'apparition d'une myocardiopathie précoce et sévère. Cette myocardiopathie apparaît dès la troisième semaine de vie post-natale. Cependant une certaine variation de l'expression phénotypique peut être observée car la dysfonction ventriculaire gauche objectivée à l'échocardiographie survient entre la troisième semaine de vie post-natale et la huitième semaine. Cependant la dysfonction contractile (Fraction d'éjection ventriculaire gauche (FeVg)  $< 45\%$ ) est toujours

authentifiée. La médiane de survenue d'événement se situe à 6 semaines. A la 8<sup>me</sup> semaine, la FeVg est en moyenne de 61,54 +/- 5,33% dans le groupe contrôle vs 39,03 +/- 10,55% dans le groupe MHC/PDZRN3-V5 ( $p < 0,05$ ), Figure 19.

Par ailleurs, pour caractériser le type de mycardiopathie, nous avons évalué un rapport (tiré des données échocardiographiques) de l'épaisseur de la paroi latérale du ventricule gauche sur le diamètre interne télédiastolique du ventricule gauche. Ce rapport permet d'orienter sur le type de mycardiopathie (hypertrophique (augmentation du rapport) ou dilatée (mycardiopathie hypertrophique excentrique caractérisée par une diminution de ce rapport)). Ce rapport est diminué objectivant donc une mycardiopathie de type hypertrophique excentrique ou mycardiopathie dilatée ( $p < 0,05$ ), Figure 20.

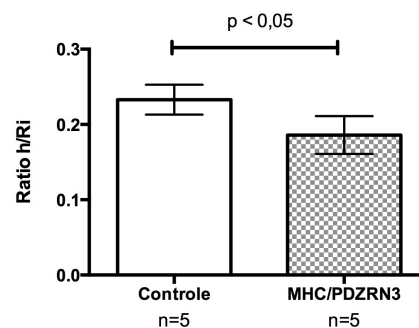


Figure 20 : Rapport de l'épaisseur de la paroi latérale ventriculaire gauche sur le diamètre interne télédiastolique du ventricule gauche (h/Ri)

### 1.2 Analyse électrocardiographique

Du fait de la survenue de cette mycardiopathie, une analyse des souris *Pdzrn3* OE, par réalisation d'électrocardiogramme (ECG) hebdomadaire, a été menée pour étudier une éventuelle répercussion rythmique de cette mycardiopathie. En effet les mycardiopathies dilatées sont un groupe nosologique pourvoyeur de ces troubles (troubles de la conduction atrio-ventriculaire ou troubles électriques pro-arrhythmogènes). De l'analyse de l'ensemble des éléments de l'électrocardiogramme, il ressort une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) du temps de conduction atrio-ventriculaire (allongement de l'espace PR sur l'ECG), Figure 21.

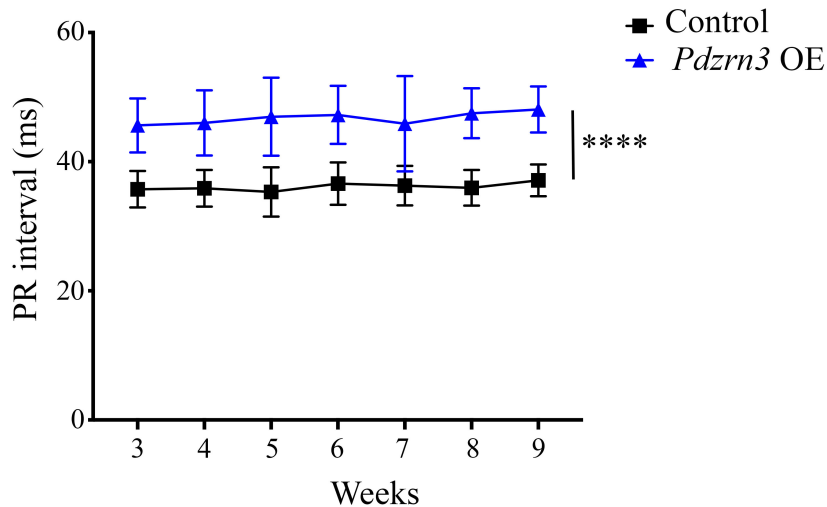


Figure 21 : Variation de la durée de l'espace PR (conduction atrio-ventriculaire) souris *Pdzrn3* OE (4) vs CTL (6).

Par ailleurs sur la série d'enregistrements menée, il n'a pas été décelé de troubles électriques pro-arythmogènes (Extrasystole ventriculaire (ESV) polymorphe, salve de tachycardie ventriculaire, fibrillation ventriculaire). Il faut cependant marquer une réserve car les enregistrements ont été réalisés sur une période de suivi de 2 minutes de manière hebdomadaire. Il n'a pas été conduit d'analyse ECG en continu sur 24h (télémétrie ECG).

### 1.3 Analyse morphologique *ex-vivo*

#### 1.3.1 Caractérisation phénotypique histologique

Pour préciser les caractéristiques de la dysfonction contractile, notamment d'un point de vue histologique, et confirmer la présence d'un remodelage excentrique chez les souris *Pdzrn3* OE, nous avons réalisé un suivi échocardiographique hebdomadaire de 10 souris (5 contrôles et 5 *Pdzrn3* OE). Dès l'apparition d'une altération de la FeVg (<45%), les souris étaient sacrifiées avec leur souris contrôle (appareillée en fonction de l'âge et du sexe), Figure 22. Nous avons utilisé le critère, FeVg < 45%, pour définir la présence d'une myocardiopathie clinique, selon les données de la littérature (Carll et al., 2011).

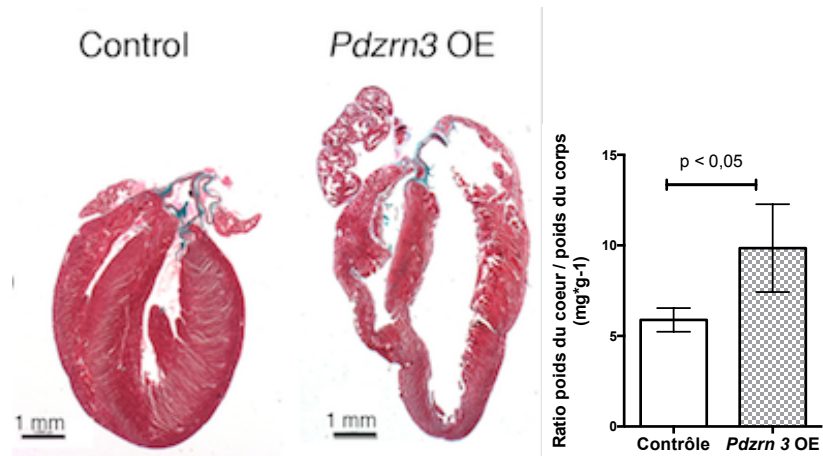


Figure 22 : A : Coupe histologique longitudinale colorée au trichrome de Masson (Contrôle vs Pdzrn3 OE) ; B Ratio poids du cœur / poids souris. Au moment du prélèvement, une cardiomégalie est observée avec une augmentation de l'index cardiaque (rapport de la taille du cœur par rapport au diamètre de la cage thoracique). Par ailleurs, une augmentation du ratio poids du cœur sur poids total de la souris est notée de manière statistiquement significative (5,89 +/- 0,65 ; 9,85 +/- 2,42 mg·g<sup>-1</sup>).

Nous avons ensuite réalisé une coloration au Trichrome Masson afin d'apprécier histologiquement les dimensions ventriculaires et de confirmer les données échocardiographiques, Figure 23. Nous avons mis en évidence une augmentation significative de la surface interne télédiastolique ventriculaire gauche rapportée au poids, par rapport au groupe contrôle.



Figure 23 : A : Coupes histologiques transversales de myocarde murin colorées au trichrome de Masson et évaluation du rapport surface interne du ventricule gauche sur le poids total.

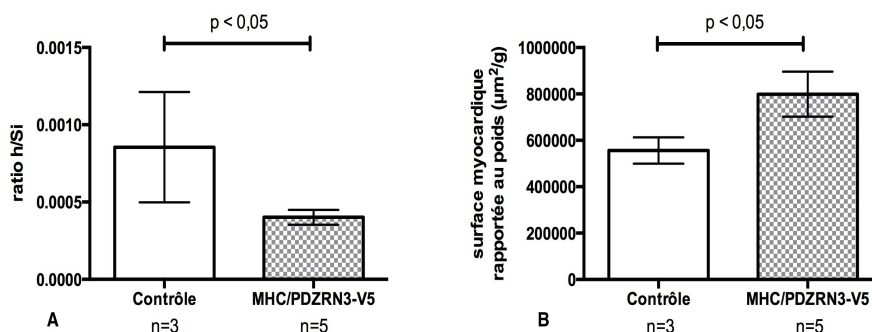


Figure 24 : Analyse histologique : évaluation du rapport de l'épaisseur de la paroi latérale du ventricule gauche (h) sur le diamètre interne du ventricule (Si) dans le groupe contrôle vs *Pdzn3* OE et rapport de la surface myocardique (surface totale du cœur – surface de la cavité interne du ventricule gauche) sur le poids total de la souris.

Lorsque différents paramètres de caractérisation phénotypique sont utilisés, certains marqueurs mettent en évidence une différence significative. Ainsi les souris *Pdzn3* OE présentent une diminution du rapport de l'épaisseur de la paroi libre sur la surface interne ventriculaire gauche (h/Si). Par ailleurs, le rapport de la surface myocardique (définie par la surface cardiaque totale moins la surface interne du ventricule gauche) sur le poids de la souris montre une augmentation significative dans le groupe sur-exprimant *Pdzn3*, Figure 24.

La conjonction de ces deux paramètres signe le phénotype de cardiopathie hypertrophique excentrique, confirmant les données échocardiographiques.

En vue d'approfondir la caractérisation phénotypique, nous avons évalué la fibrose myocardique par coloration au Trichrome Masson et au Rouge Sirius, Figure 25.

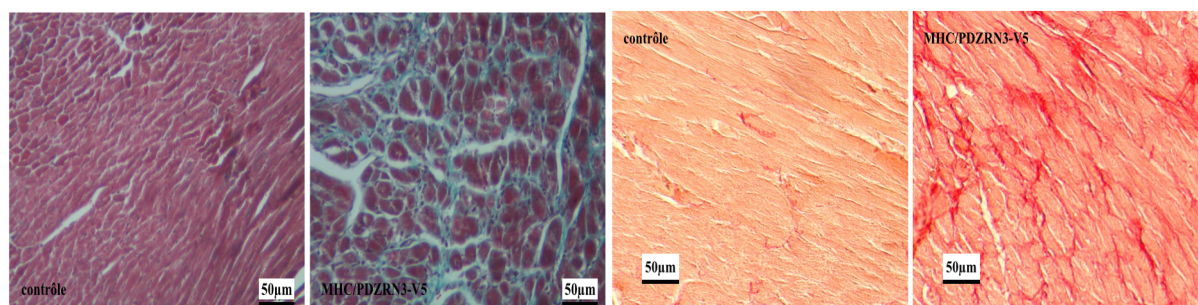


Figure 25 : Coupes histologiques de coeur contrôle ou *Pdzn3* OE colorés soit au trichrome de Masson (à gauche) soit au Rouge Sirius, Echelle = 50µm.

La présence de fibrose au niveau du myocarde des souris *Pdzrn3* OE, « symptomatique » (FeVg<45%) est confirmée. La quantité de fibrose est significativement plus importante dans le groupe *Pdzrn3* OE par rapport au groupe contrôle, respectivement 12,4 +/- 6,4 vs 1,5 +/- 1,1% (p<0,05), Figure 26A.

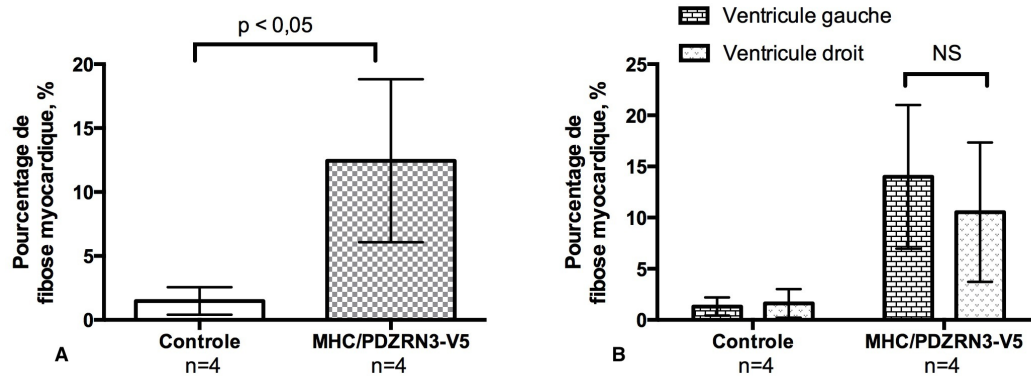


Figure 26 : Pourcentage de fibrose myocardique en fonction du génotype (A) et de sa topographie (B).

En revanche, il n'y a pas de différence dans la répartition de la fibrose entre le ventricule droit et le ventricule gauche dans la population des souris mutantes, Figure 26B. La présence d'un infiltrat inflammatoire est recherchée par immunomarquage au CD 45.

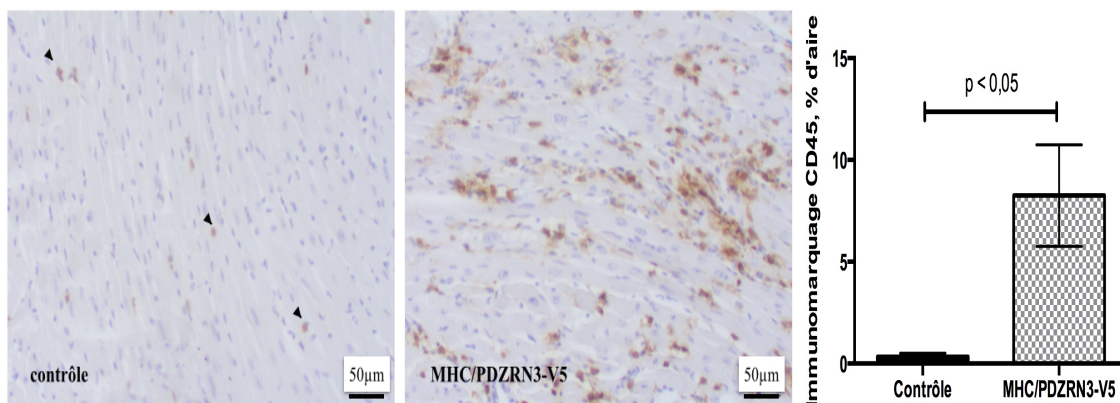


Figure 27 : immunohistochimie pour CD 45 (CTL vs *Pdzrn3* OE) et quantification du marquage CD 45 (CTL vs *Pdzrn3* OE).

Les souris sur-exprimant *Pdzrn3* présentent un infiltrat inflammatoire significativement plus important que les souris contrôles (8,25 +/- 2,49% vs 0,33 +/- 0,17 (p<0,05)), Figure 27.

L'ensemble de ces données montre que les souris mutantes *Pdzrn3* OE développent une dysfonction contractile qui apparaît entre la cinquième et la huitième semaine post natale. De plus la dysfonction myocardique résulte d'un remodelage ventriculaire gauche de type hypertrophique excentrique. Enfin, cette myocardiopathie s'accompagne d'une fibrose myocardique associée à une infiltration pariétale par des cellules CD 45 positives.

### 1.3.2 Analyse morphologique en histologie

Notre hypothèse de travail est que *Pdzrn3* participe à la régulation de la polarisation des cardiomyocytes et donc à la régulation de la morphologie cellulaire. Pour analyser cette hypothèse, l'évaluation comparative de la morphologie et des dimensions cardiomyocytaires, dans le groupe contrôle et le groupe *Pdzrn3* OE, est intéressante. Un marquage des lectines membranaires est donc réalisé. Ce marquage est permis par une solution de WGA couplée à un fluorochrome (Alexa 488), Figure 28.

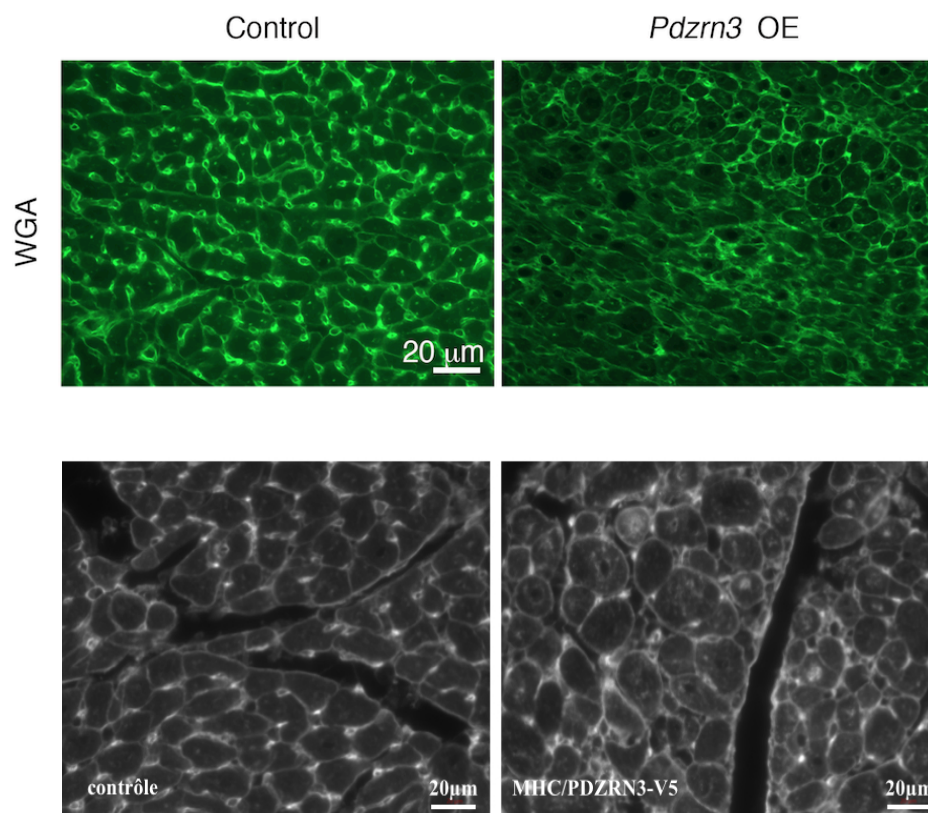


Figure 28 : Coupes histologiques transversales de coeur immunomarquées par le WGA couplé à un fluorochrome, Alexa 488 (contrôle vs *Pdzrn3* OE), échelle = 20 μm

Il n'y a pas de différence significative lors de l'évaluation du périmètre ou de la surface de section transversale cardiomyocytaire entre les 2 groupes. La surface de section transversale et le périmètre cardiomyocytaire sont respectivement en moyenne de  $237,85 \pm 60,75 \mu\text{m}^2$  et de  $61,17 \pm 7,85 \mu\text{m}$  dans le groupe *Pdzrn3* OE versus  $236,06 \pm 49,97 \mu\text{m}^2$  et  $57,42 \pm 6,0 \mu\text{m}$  dans le groupe contrôle, Figure 29.

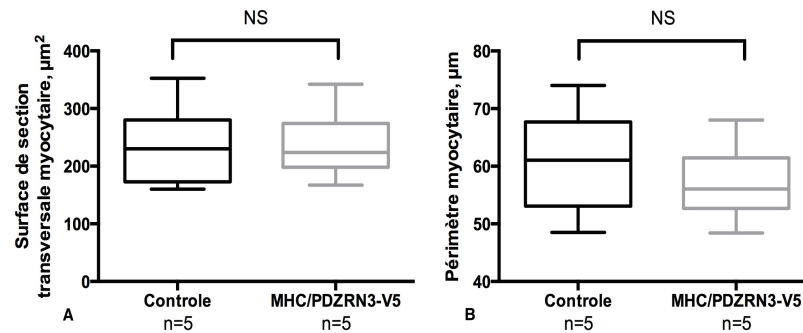


Figure 29 : Surface de section transversale (A) et périmètre (B) cardiomyocytaire sur coupe transversale de myocarde (CTL vs *Pdzrn3* OE)

Dans le cadre de la maturation cardiomyocytaire, il y a un remodelage myocardique qui permet la polarisation des cardiomyocytes avec notamment la formation des disques intercalaires au niveau de la membrane terminale des cellules. Une fois ces structures organisées, les cellules s'allongent pour permettre le développement du myocarde mature. Nous nous sommes donc intéressés à l'évaluation de la sphéricité des cardiomyocytes. Cet élément peut être évalué, après marquage des membranes cellulaires par un indice, l'indice de sphéricité. Cet indice est calculé par la formule suivante :  $(4\pi \times \text{Aire})/\text{Périmètre}^2$ . Le calcul de cet indice montre que les cardiomyocytes issus des souris *Pdzrn3* OE sont plus sphériques que leur contrôle et ceci de manière statistiquement significatif, Figure 30.



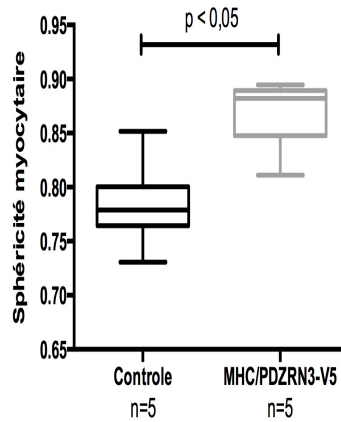


Figure 30 : Analyse de l'indice de sphéricité cardiomyocytaire à 3 semaines de vie post natale (Contrôle vs *Pdzn3* OE)

Ainsi, nous mettons en évidence une absence de différence en terme de taille des cardiomyocytes (périmètre et aire cardiomyocytaire) mais une différence d'organisation avec des cellules plus sphériques dans le groupe sur-exprimant *Pdzn3*. Par ailleurs, lorsque l'on analyse l'évolution de cet indice dans le temps, on note une diminution de ce marqueur dans le groupe des souris contrôles. Ce marqueur est donc corrélé à la maturation des cardiomyocytes, Figure 31.

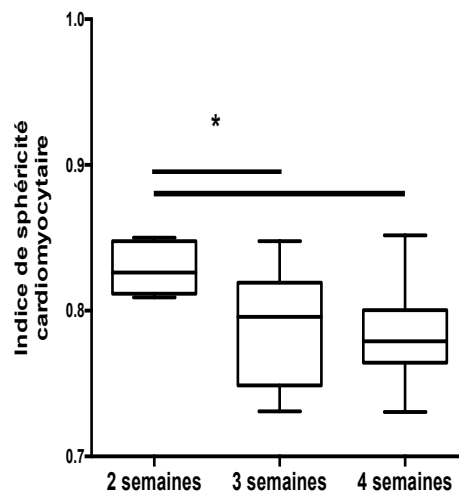


Figure 31 : Analyse de l'indice de sphéricité en fonction du temps de vie post natal des cardiomyocytes issus de souris sauvages. \*  $p < 0,05$ .

Dans le groupe sur-exprimant *Pdzn3*, on observe une stabilité de cet indice (différence non significative). Les cardiomyocytes issus des souris contrôles sont statistiquement significativement moins sphériques que ceux issus des souris *Pdzn3* OE dès 3 semaines post – natales, Figure 32.

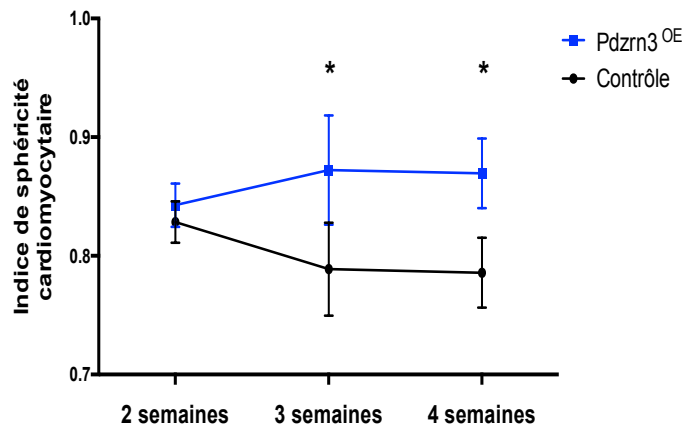


Figure 32 : Analyse comparative de l'indice de sphéricité entre les souris contrôles et les souris *Pdzn3* OE en fonction du temps de vie post natal. \*  $p < 0,001$ .

### 1.3.3 Analyse de la formation des disques intercalaires

Ces données amènent l'idée d'une perturbation de la maturation des cardiomyocytes entraînant des anomalies morphologiques avec la persistance de cellules « immatures » (plus sphériques). Or un des éléments de maturation des cardiomyocytes est la formation des disques intercalaires (grâce à la polarisation de protéines de jonctions transmembranaires (N-Cadhérine, Cx 43 et les protéines des desmosomes). L'analyse de ces éléments sur coupe histologique est primordiale. Nous avons donc procédé à une analyse attentive d'immunomarquage de protéines impliquées dans la constitution des éléments du disque intercalaire. Ces structures sont au nombre de trois, les jonctions adhérentes, les jonctions Gap et les desmosomes. Pour marquer ces systèmes de jonctions, nous avons utilisé des marqueurs spécifiques, respectivement : la N-cadhérine, la Cx 43 et la Plakoglobine. Par ailleurs étant donné notre hypothèse, nous avons également marqué la  $\beta$ -caténine afin d'évaluer un éventuel rôle de la voie Wnt/Fz  $\beta$ -caténine dépendante. Cependant étant donné que lors des enregistrements ECG, nous avons mis en évidence la présence d'un trouble de conduction atrioventriculaire, nous avons commencé notre analyse par l'évaluation de la localisation cellulaire de la Cx 43. Dans la population des souris *Pdzn3* OE, le marquage de la Cx 43 est

significativement diminué par rapport à leur contrôle, respectivement  $3,47 \pm 1,72\%$  vs  $22,97 \pm 1,36$  ( $p < 0,05$ ), Figure 33.

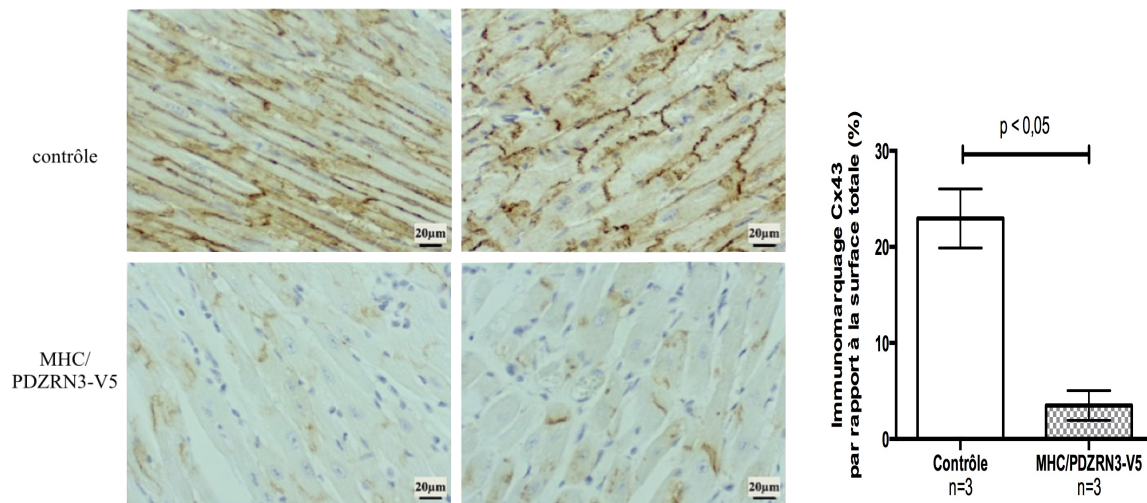


Figure 33 : (A) Immunohistochimie Cx43 (CTL vs Pdzn3 OE) et (B) représentation quantitative du marquage Cx 43 par rapport à la surface totale (CTL vs Pdzn3 OE)

Par ailleurs l'analyse des autres marqueurs des systèmes de jonction des disques intercalaires ne montre pas de différence significative entre les deux groupes, que ce soit en terme de quantité de protéine ou en terme de localisation cellulaire. En effet, les autres marqueurs se situent au niveau des disques intercalaires, Figure 34.

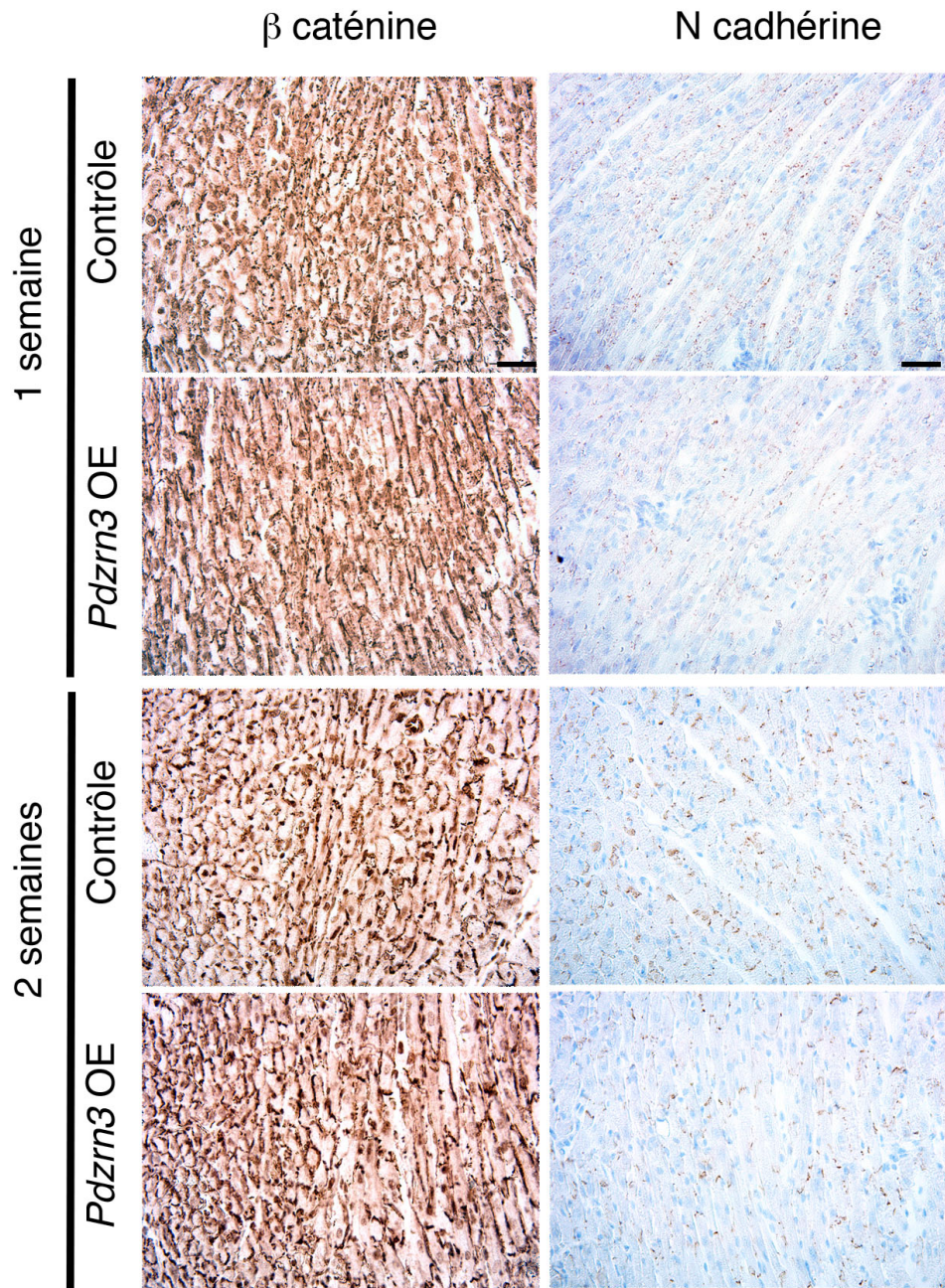


Figure 34 : Coupes histologiques de coeurs contrôles vs *Pdzrn3* OE à 1 et 2 semaines, marquage N cadhérine et  $\beta$  caténine.

D'après la littérature, la localisation de la Cx 43 est en partie régulée par son interaction avec Zo1. Pour évaluer cet élément, nous avons procédé à un immunomarquage de Zo1 sur des coupes histologiques de myocarde.

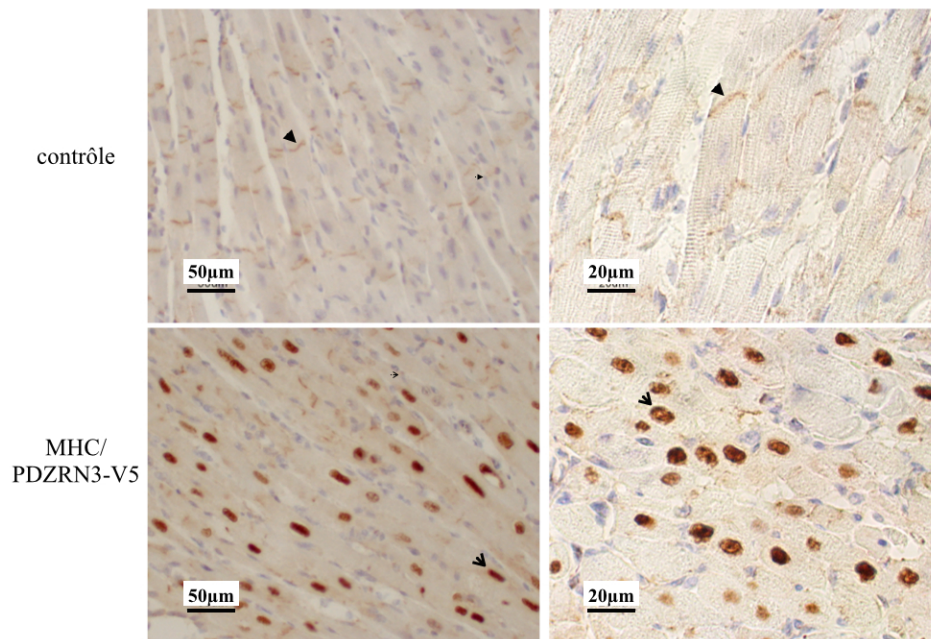


Figure 35 : Immunohistochimie Zo1 sur des coupes transversales de myocarde de souris (CTL vs *Pdzn3* OE), échelle = 50 µm Légende : ◄ = *disque intercalaire (DI)*, ◄ = *noyau*.

Ce marquage met en évidence une délocalisation de Zo1 des disques intercalaires vers le cytoplasme et notamment au niveau des noyaux chez les souris qui sur-expriment notre transgène par rapport aux contrôles. Le marquage de Zo1 chez les souris contrôles est lui situé strictement au niveau des disques intercalaires, Figure 35.

Suite à ces premières données recueillies sur des souris qui présentent déjà une altération de la contractilité ventriculaire gauche « clinique » (échocardiographiquement visible), nous avons conduit le même protocole de suivi et d'analyse sur des souris « asymptomatiques ». Nous avons établi différents temps d'exploration : à 4 jours, à 12 jours et à 21 jours. Les souris étaient par ailleurs appareillées sur leur âge et leur sexe. Avant toute analyse histologique, nous vérifions l'absence de myocardiopathie « déclarée » par échocardiographie. Les différents paramètres de fibrose et d'infiltration inflammatoire ont été analysés à trois semaines, montrant l'absence de fibrose à ce stade plus précoce. Echocardiographiquement, il n'y a pas de différence en terme de contractilité ventriculaire gauche. Lors de la réalisation de cette analyse chronologique de la formation des jonctions Gap constitutives des disques intercalaires, nous mettons en évidence, comme premier marquage révélateur de la sur-expression de *Pdzn3*, une localisation cytoplasmique (notamment nucléaire) de Zo-1 puis une diminution de la

concentration de Cx 43 et une localisation inconstante au niveau des disques intercalaires, Figure 36 et Figure 37.

Par ailleurs, ces éléments précèdent la survenue de la fibrose myocardique ainsi que l'infiltration par les cellules inflammatoires du myocarde. Cette anomalie histologique précède la survenue de la dysfonction contractile clinique (visualisée sur l'échocardiographie).

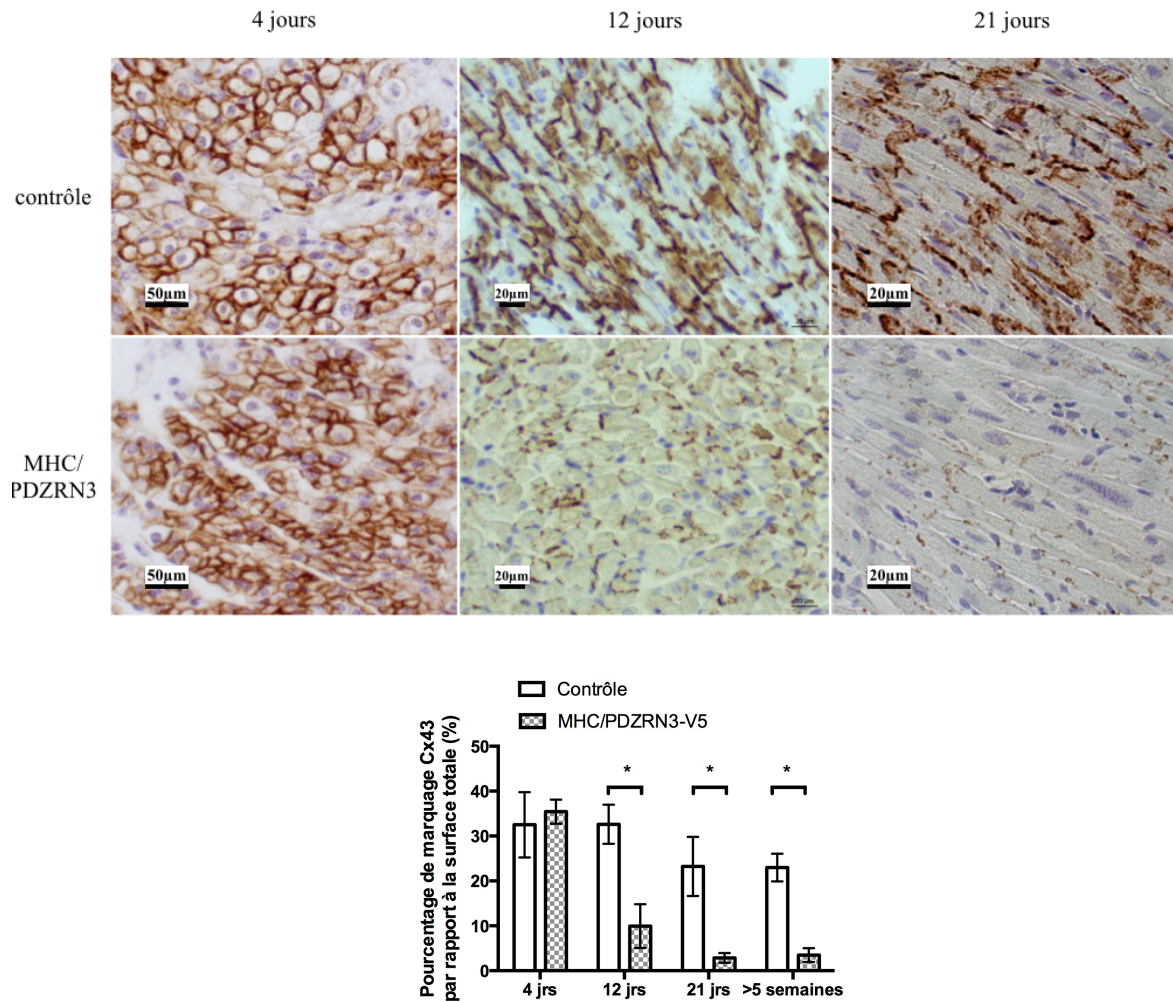
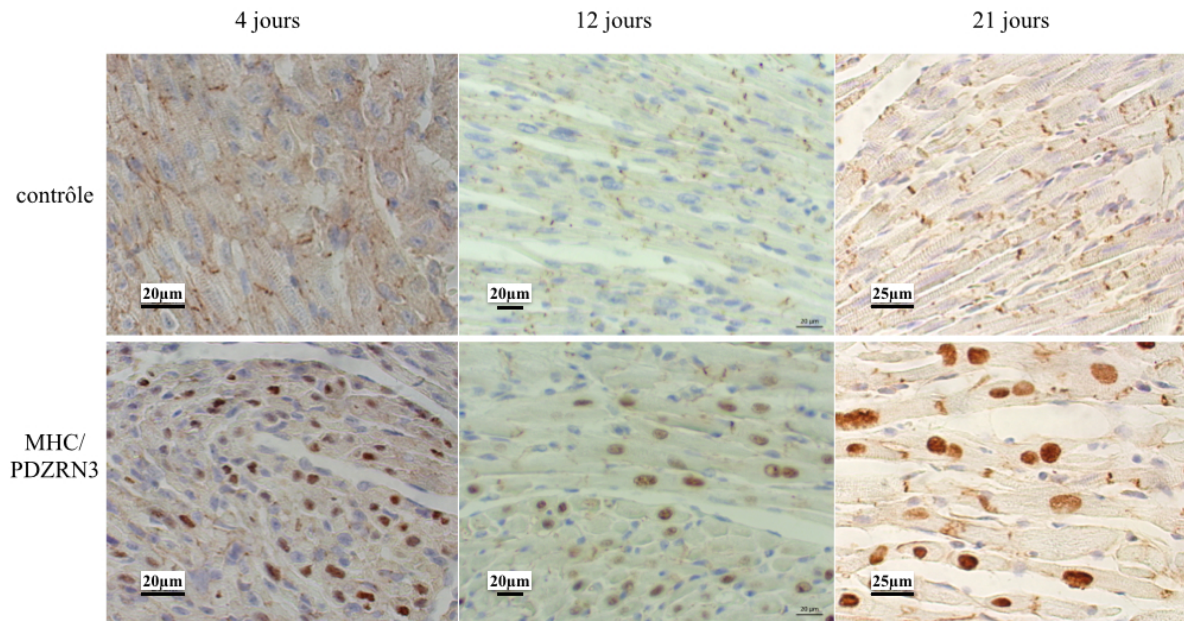


Figure 36 : Immunohistochimie Cx 43 chez les souris contrôles et Pdzn3 OE à 4 jours, 12 jours et 3 semaines (échelle = 50 µm à gauche, 20 µm au milieu et à droite). B Représentation quantitative de l'expression de Cx 43 dans les groupes Pdzn3 OE vs contrôle au cours du temps (\* p<0,05). 4 jours n=2, 12 jours n=4, 21 jours n=3, >5 semaines (avec FeVg <45 %), n=5.



**Figure 37** : Analyse immunohistochimique chez les souris contrôles et *Pdzn3* OE à 4 jours, 12 jours et 3 semaines, Anticorps anti Zo-1 (échelle = 20  $\mu\text{m}$  à gauche et au milieu, 25  $\mu\text{m}$  à droite).

Cette analyse chronologique met en évidence une organisation hiérarchisée de la mise en place des jonctions Gap. Pour pouvoir approfondir ces données et dans l'idée que la sur-expression de *Pdzn3* entraîne un défaut de maturation post-natal des disques intercalaires via les jonctions Gap, nous nous sommes intéressés au développement embryonnaire tardif des cardiomyocytes (par l'évaluation de la présence et de la localisation de la Cx 43 et de Zo1) chez des embryons, non porteurs de notre transgène, de 15.5 jours et chez des nouveaux nés âgés d'un jour. Au stade embryonnaire, l'expression de la Cx 43 est plus faible qu'à un jour de vie. Aux deux temps analysés, elle présente une localisation membranaire diffuse. La quantification du marquage de la Cx 43 par rapport à la surface totale de la coupe est de 5,8 à E 15.5 contre 36,2 au premier jour post-natal. En ce qui concerne Zo-1, le marquage est visualisé au niveau du noyau au stade embryonnaire puis il se localise au niveau de la membrane cytoplasmique à la naissance, Figure 38.

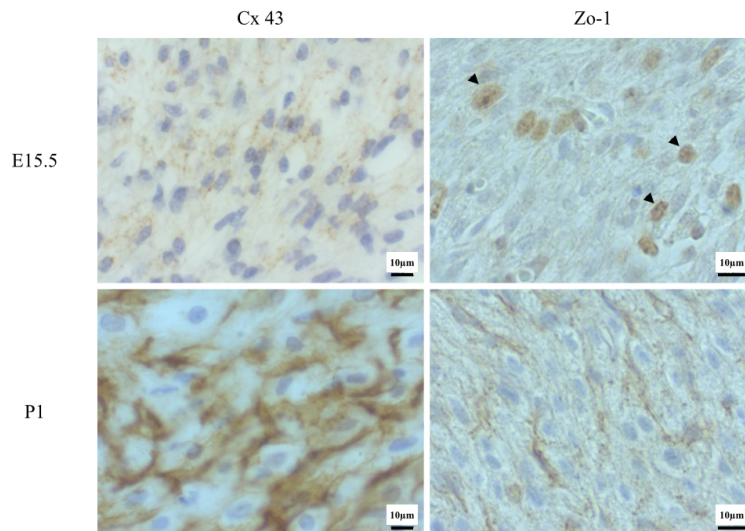


Figure 38 : Analyse immunohistochimique de Cx 43 et Zo-1 chez des souris sauvages C57Bl/6 au stade embryonnaire (15.5) et à un jour de vie post natal (P1) (échelle = 10  $\mu\text{m}$  à gauche et 20  $\mu\text{m}$  à droite) Légendes :  $\blacktriangleright$  = noyau.

Donc, d'un point de vue physiologique, chez la souris il y a une maturation des jonctions Gap post natale. Par ailleurs lors de la naissance, Zo-1 est relocalisé au niveau de la membrane plasmique. Ces changements de localisation cellulaire de Zo-1 sont concomitants à la naissance des souris.

#### 1.4 Analyse de la prolifération cellulaire

##### 1.4.1 Analyse de la prolifération par marquage histologique au BrdU.

La sur-expression de *Pdzrn3* entraîne une déstabilisation des disques intercalaires, notamment au niveau des jonctions Gap. Dans ce contexte, il nous est paru intéressant d'évaluer la prolifération cardiomyocytaire. Les souris sur-exprimant *Pdzrn3* montrent une prolifération statistiquement supérieure par rapport à leur contrôle. De plus les cardiomyocytes contrôles stoppent leur prolifération dès un mois de vie post-natal. Le lien entre cohésion inter-cellulaire et prolifération et leur dichotomie est donc illustré dans ce modèle de myocardopathie dilatée, Figure 39.



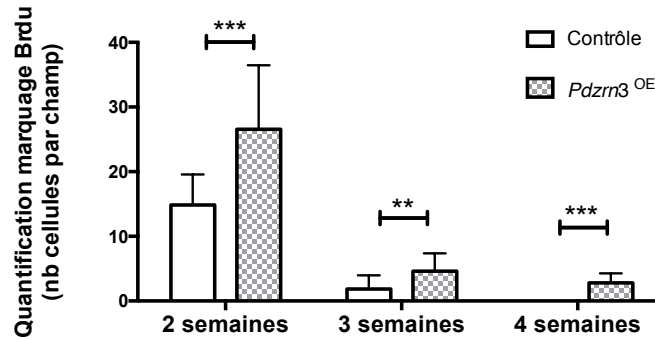


Figure 39 : Quantification du marquage au BrdU (marqueur de prolifération) des cardiomyocytes issus de souris contrôles vs souris *Pdzrn3* OE. \*\*  $p < 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 1.4.2 Analyse de marqueurs de la prolifération impliqués dans les voies Wnt/Fzd.

Pour étayer cette notion d'augmentation de la prolifération des cardiomyocytes issus des souris sur-exprimant *Pdzrn3*, nous avons analysé par RT qPCR l'expression de gènes impliqués classiquement dans la régulation de la prolifération médiée par les voies de signalisation Wnt/Fzd. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'analyse de l'expression de la *cycline D1*, Figure 40.

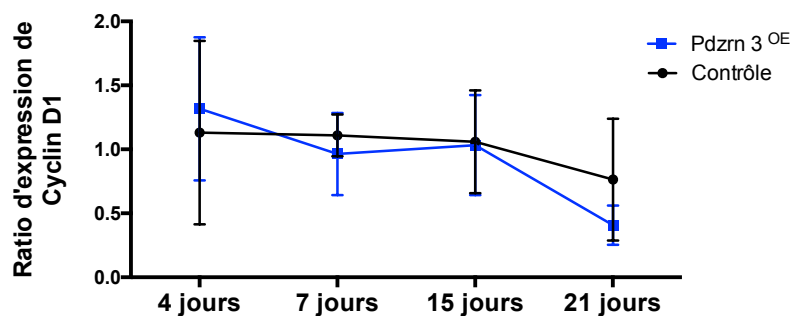


Figure 40 : Analyse en RT qPCR de l'expression de la *cycline D1* dans des coeurs de souris transgéniques (*Pdzrn3* OE) par rapport à leur contrôle (n=4 par groupe).

Il n'y a pas de variation dans l'expression de la *cycline D1* entre les deux groupes étudiés. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de *c - myc*, Figure 41.

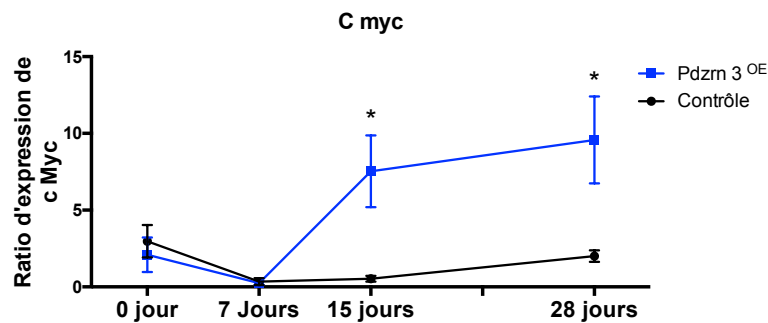


Figure 41 : Analyse en RT qPCR de l'expression de *c-myc* dans le groupe des souris sur-exprimant *Pdzn3* vs leur contrôle (n=4, \* =  $p < 0,05$ ).

On note une augmentation significative de l'expression de *c - myc* dans le groupe sur-exprimant *Pdzn3* par rapport au groupe contrôle et ceci dès quinze jours de vie post natal.

#### 1.4.3 Analyse de l'expression de marqueurs de différenciation cardiomyocytaire durant la phase de développement post natal.

L'ensemble de ces données montre un retentissement de la sur-expression de *Pdzn3* sur le développement myocardique post natal. Dans ce contexte, il paraît intéressant de rechercher une régulation de la transcription de protéines impliquées dans la maturation cardiomyocytaire. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de *Gata 4*, *Gata 6* durant les 3 premières semaines de vie chez la souris, Figure 42, Figure 43.

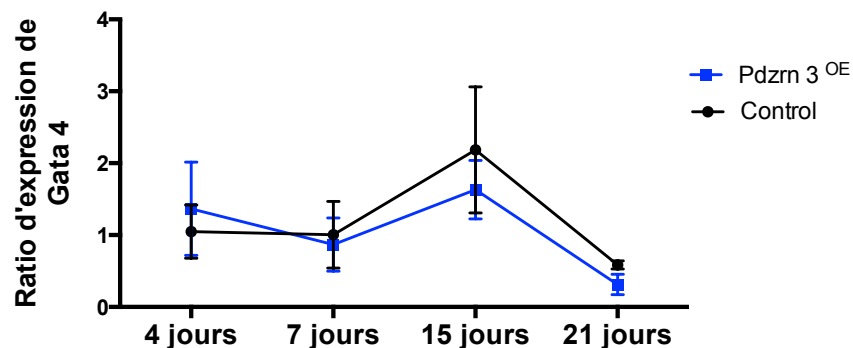


Figure 42 : Analyse de l'expression de *Gata 4* par RT qPCR sur des souris *Pdzn3* OE vs Contrôle (n=5 par groupe).

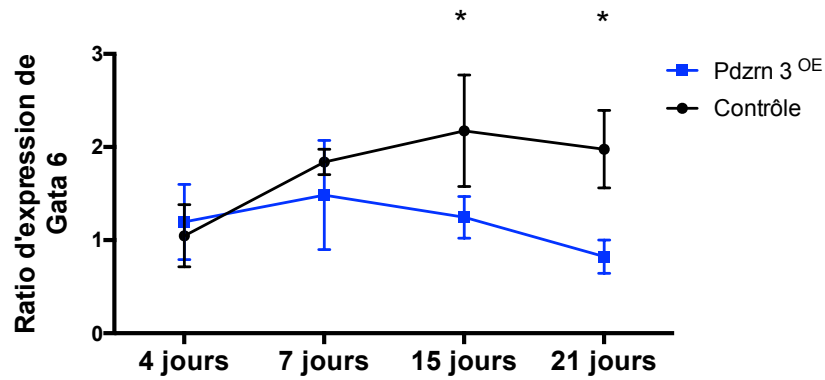


Figure 43 : Analyse de l'expression de *Gata 6* par RT qPCR sur des souris *Pdzn3* OE vs Contrôle (n=5 par groupe, \*p < 0,05).

La sur-expression de *Pdzn3* entraîne une modification de la synthèse de protéines impliquées dans la maturation des cardiomyocytes. Nous retrouvons une diminution significative de l'expression de *Gata 6* chez les souris transgéniques par rapport à leur souris contrôle. Cependant il n'est pas retrouvé de modification de l'expression de *Gata 4* entre les deux groupes.

Par ailleurs, un article récent publié dans Nature montre le rôle d'un facteur de transcription, *Meis1*, dans l'arrêt des capacités de régénération post natales des cardiomyocytes. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de ce facteur dans le groupe des souris transgéniques versus le groupe des souris contrôles, Figure 44.

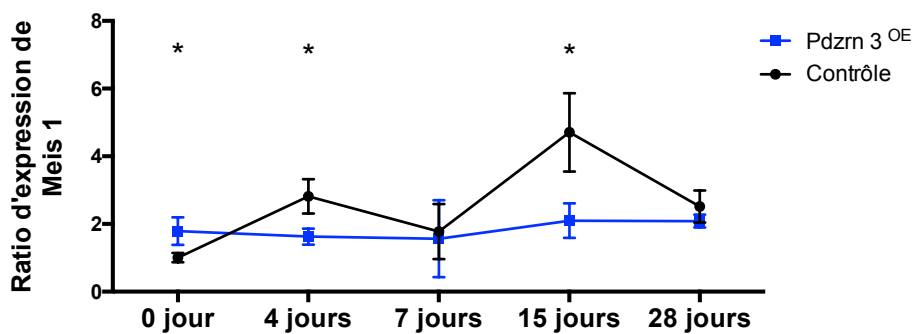


Figure 44 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de *Meis1* dans le groupe *Pdzn3* OE vs Contrôle (n=4 par groupe, \* p < 0,05).

Lors de cette analyse, il est retrouvé deux pics d'expression de *Meis 1* durant le premier mois de vie post natal dans le groupe contrôle. Par ailleurs dans le groupe sur-exprimant *Pdzn3*, ces pics d'expression ne sont pas retrouvés, la différence est statistiquement significative. Ces données confirment le rôle de la voie de

signalisation PDZRN3 dans la régulation de la maturation post natale des cardiomyocytes.

## 2 / Analyse des souris Pdzn3 OE, surexpression stoppée à JO ou J7

La surexpression de Pdzn3 dans les souris Pdzn3 OE est permise par un montage génétique dit Tet off. Ce montage permet de bloquer la surexpression de notre transgène par administration de Doxycycline dans l'eau de boisson des souris entraînant une compétition avec le facteur de transcription tTa bloquant ainsi la surexpression. A partir des données précédentes, nous définissons une période critique dans la maturation des disques intercalaires correspondant aux deux premières semaines de vie. Nous avons donc suivi deux protocoles différents pour mieux définir la période clé de la maturation des disques intercalaires. Dans un premier protocole, la surexpression est bloquée dès la naissance et dans le second protocole elle est stoppée à une semaine de vie post-natale, selon les schémas ci dessous, Figure 45.

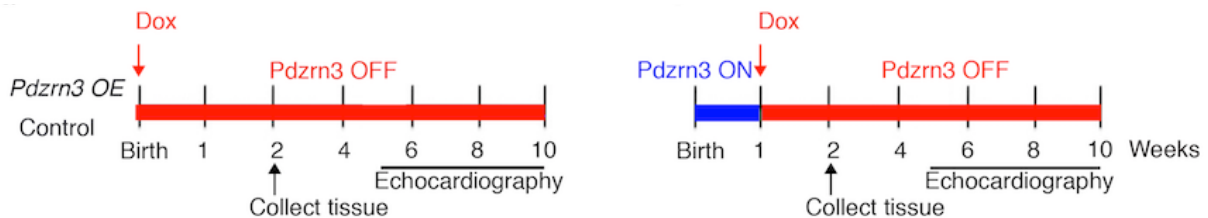


Figure 45 : Schéma des protocoles d'inhibition de la surexpression de Pdzn3 dès la naissance ou initié à une semaine de vie post natale. Dans chaque protocole un groupe était fléché pour l'analyse histologique à 15 jours et l'autre pour un suivi échocardiographique sur 10 semaines.

### 2.1 Analyse du protocole d'inhibition de la surexpression de Pdzn3 dès la naissance

Lorsque la surexpression de PDZRN3 est bloquée à la naissance il n'y a pas de modification au niveau des disques intercalaires à 15 jours, Figure 46. L'analyse moléculaire à 15 jours ne montre pas de diminution de la quantité de Cx 43. Enfin le suivi échocardiographique sur 10 semaines montre l'absence de différence de la contractilité ventriculaire gauche entre les deux groupes (Contrôle vs Pdzn3 OE traité dès la naissance par la doxycycline), Figure 47.

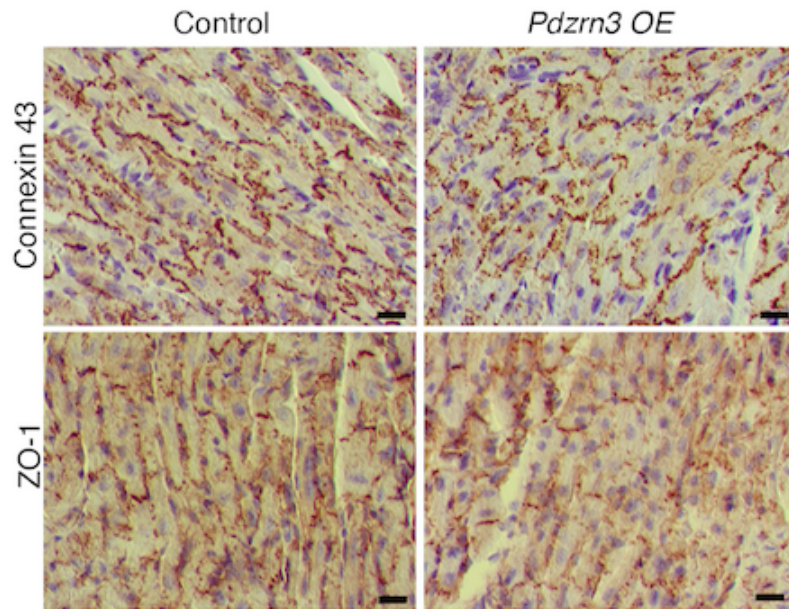


Figure 46 : Analyse histologique des jonctions Gap des disques intercalaires, marquage Cx 43 et Zo-1 à 15 jours de vie post natal chez des souris sauvages ou Pdzn3 OE traité par la doxycycline dès la naissance.

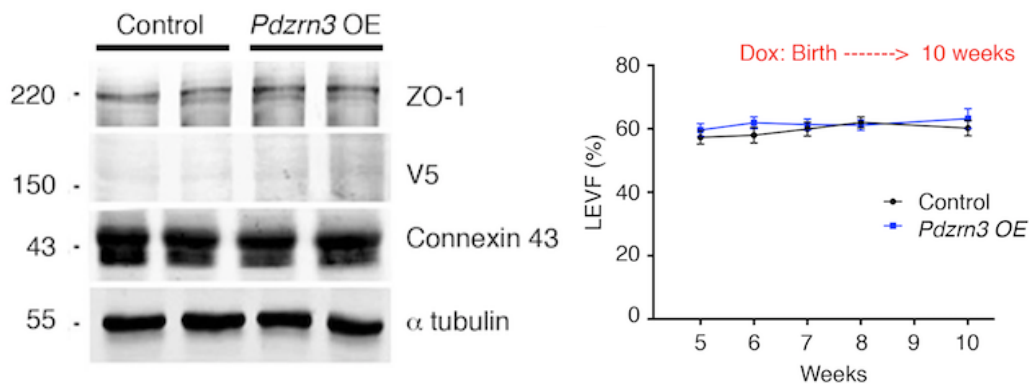


Figure 47 : A : Analyse par western blot de la Cx 43 à 15 jours de vie post natal des souris sauvages vs Pdzn3 OE traités par Doxycycline dès la naissance ; B : Suivi échocardiographique des souris de ce protocole pendant 10 semaines, n = 6 par groupe.

## 2.2 Analyse du protocole d'inhibition de la surexpression de Pdzn3 à partir d'une semaine de vie post natale.

De manière parallèle, au premier protocole, nous avons procédé à l'inhibition de la surexpression de PDZRN3 à partir de 1 semaine de vie post natale. Lorsque l'on bloque la surexpression du transgène dès la première semaine de vie post natale, la

localisation de la Cx 43 est normale sur l'analyse histologique à 15 jours, cependant sur l'analyse moléculaire, une diminution de la quantité totale de la Cx 43 est observée, Figure 48. De plus lors du suivi échocardiographique on note de manière intéressante une diminution de la contractilité ventriculaire gauche chez les souris surexprimant PDZRN3 (lorsque la surexpression est bloquée à la première semaine de vie post natale) statistiquement significative à 5, 6 et 7 semaines, puis la fraction d'éjection ventriculaire gauche redevient équivalente à celle des souris contrôles, Figure 49.

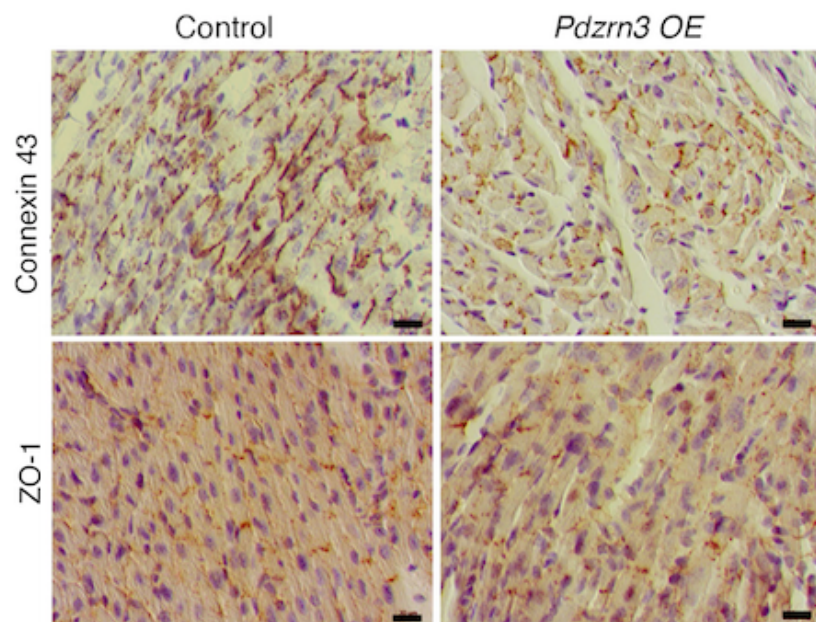


Figure 48 : Analyse histologique des coeurs de souris sauvages vs Pdzrn3 OE traité par doxycycline à partir d'une semaine post natale marqué par Cx 43 et Zo-1

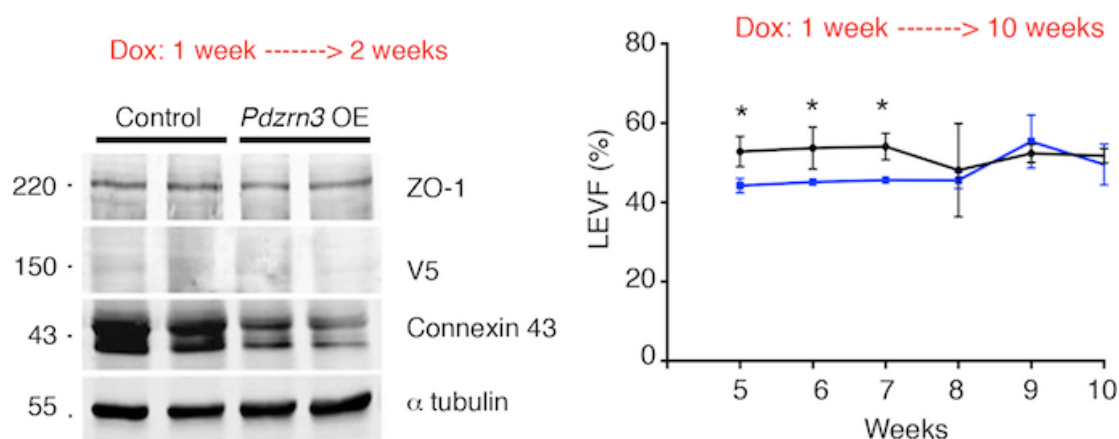


Figure 49 : A : Analyse par western blot de la Cx 43 chez les souris Pdzrn3 OE traitées par Dox à 7 jours vs Contrôle ; B : Suivi échocardiographique des souris dans le cadre de ce protocole, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 5$  par groupe.

Ces données suggèrent une mise en place précoce de la voie de signalisation entraînant une dérégulation des jonctions Gap.

## 2 / Analyse moléculaire de la surexpression de PDZRN3

Dans le but de définir les mécanismes moléculaires entraînant la survenue d'une cardiomyopathie dilatée chez les souris *Pdzrn3* OE, nous avons analysé par western blot les composants majeurs des voies de régulation des voies Wnt/Fzd, notamment la  $\beta$  caténine, *pkc $\zeta$*  et C jun, Figure 50.

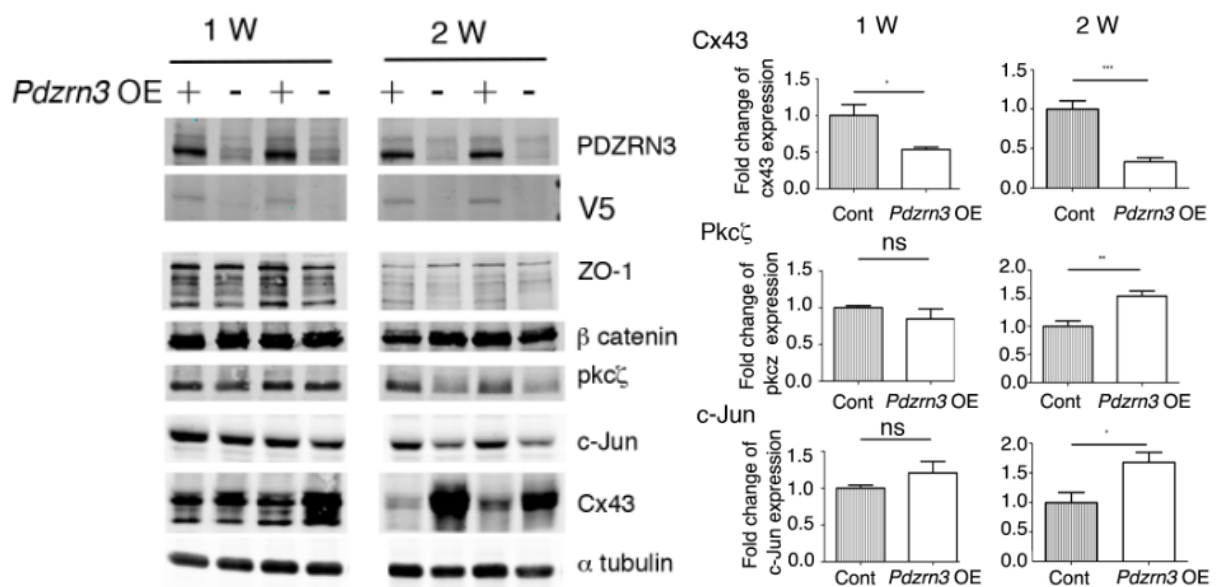


Figure 50 : : A : Analyse moléculaire des modifications par western blot de  $\beta$  caténine, *pkc $\zeta$*  et cjun à une et deux semaines post natal de souris *Pdzrn3* OE vs contrôle B : quantification de l'expression protéique de Cx 43, *Pkc $\zeta$*  et C-jun, \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001, à 1 semaine, n=4 par groupe et à 2 semaines n=6 par groupe.

La surexpression de PDZRN3 entraîne une diminution de la Cx 43. Il n'y a pas de modification significative de la quantité totale de  $\beta$  caténine. Par ailleurs on note une augmentation significative dans le groupe *Pdzrn3* OE, à quinze jours de vie, de protéines impliquées dans les voies de signalisation dite PCP, *pkc $\zeta$*  et C jun. Dans le cadre des régulations induites par les voies de signalisation Wnt/Fzd, des modifications de localisation cellulaire de protéines de signalisation peuvent être retrouvées. Nous avons donc réalisé une analyse protéique par fractionnement cellulaire à la recherche de modification de localisation cellulaire des protéines mises

en évidence lors de la précédente analyse moléculaire (Zo-1, Cx 43, pkc $\zeta$  et C jun et la  $\beta$  caténine), Figure 51.

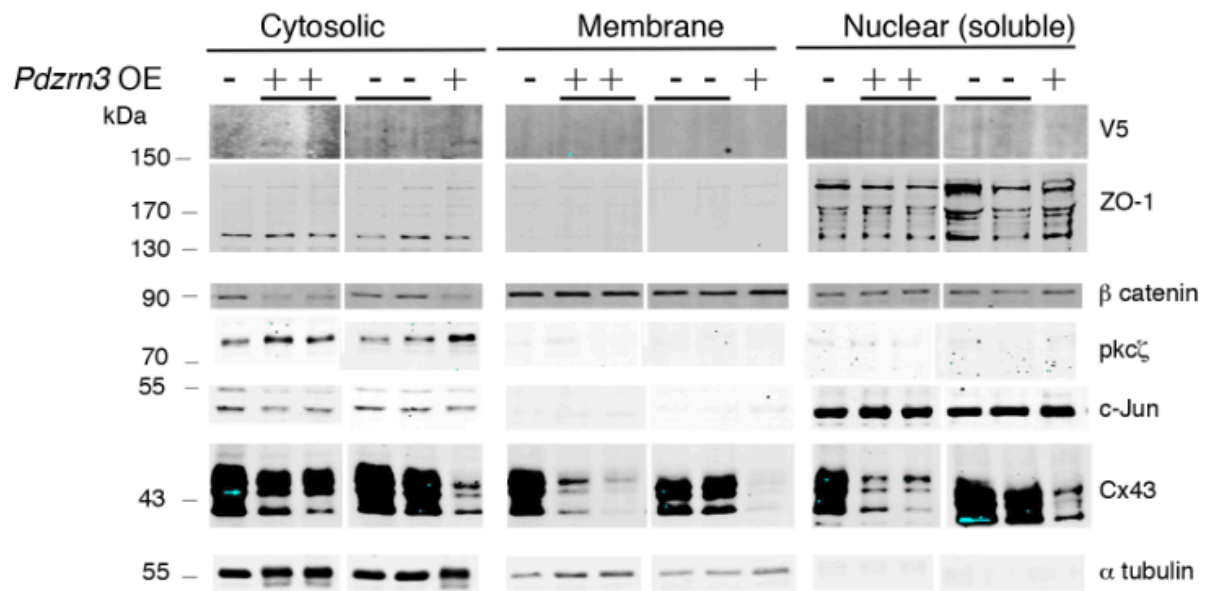


Figure 51 : Analyse par fractionnement cellulaire des souris *Pdzrn3* OE vs contrôle à 15 jours de vie post natal, analyse de Zo-1, V5,  $\beta$  caténine, pkc $\zeta$ , c-Jun, Cx 43 et  $\alpha$  tubuline, n = 3 par groupe.

Cette analyse montre une diminution de la quantité cytosolique de la  $\beta$  caténine sans modification des fractions membranaires et nucléaires. Par ailleurs la fraction cytosolique de pkc $\zeta$  augmente associée à une augmentation de la translocation de C-Jun au niveau nucléaire (diminution de la fraction cytosolique corrélée à une augmentation de la fraction nucléaire) dans les cœurs de souris surexprimant *Pdzrn3* à quinze jours de vie post-natale. L'ensemble de ces données est en faveur d'une activation d'une voie dérivée de la voie PCP non canonique des voies Wnt/Fzd dans les myocardiocytes de souris surexprimant *Pdzrn3* par rapport à leur contrôle. Cette activation permet d'expliquer le trouble de maturation des disques intercalaires observé chez ces souris entraînant la survenue d'une cardiopathie dilatée associée à une mortalité prématurée.



### III / MODELE MURIN DE DELETION CONDITIONNELLE DE PDZRN3

#### 1 / Définition du modèle murin de délétion conditionnelle de *Pdzn3*

Pour permettre une analyse de l'impact de la délétion de *Pdzn3* dans le développement myocardique post-natal, nous avons établi une lignée de souris présentant un transgène de *Pdzn3*. Ce transgène permet de déléter la séquence de *Pdzn3* car celle-ci est encadrée de séquence Flox permettant la délétion de *Pdzn3* lors de l'injection de tamoxifène. L'expression de la Cre recombinase est soumise à un promoteur spécifique des cardiomyocytes ( $\alpha$ MHC). Lorsque les souris, issues de la reproduction, possèdent une séquence de la Cre recombinase et sont homozygotes pour le transgène de *Pdzn3*, la délétion de *Pdzn3* peut être obtenue par l'injection intra-péritonéale de Tamoxifène. Le montage génétique est le suivant, Figure 52.

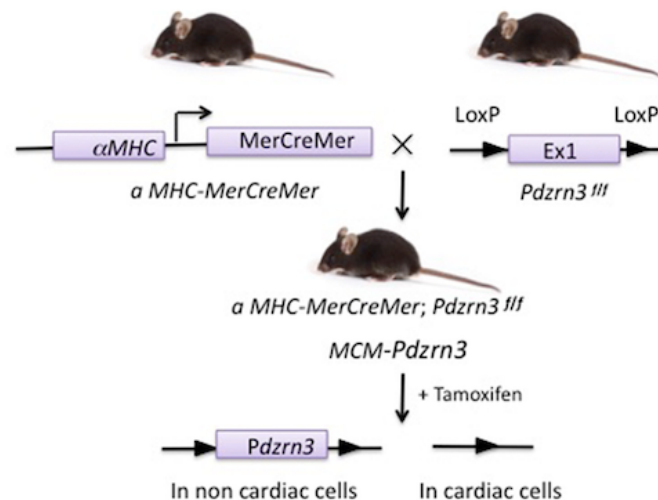


Figure 52 : Schéma de la délétion de *Pdzn3* dans les cardiomyocytes. Les souris contrôles sont notées *Pdzn3<sup>fl/fl</sup>* et Les souris MCM - *Pdzn3<sup>fl/fl</sup>* sont les souris génétiquement MHC-MerCreMer ; *Pdzn3<sup>fl/fl</sup>*.

## 2 / Caractérisation phénotypique :

### 2.1 Mortalité et données échocardiographiques

Pour pouvoir évaluer la mortalité des souris délétées pour *Pdzrn3* (MCM – *Pdzrn3*<sup>F/F</sup>) spécifiquement dans les cardiomyocytes, les souris ont été induites par le tamoxifène dans le cadre de 2 protocoles différents :

- dans le premier protocole, les souris ont été délétées par l'injection de Tamoxifène le jour de leur naissance. Le groupe comprend des souris contrôles (*Pdzrn3*<sup>F/F</sup>) et des souris porteuses de la séquence de *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> et de la Cre recombinase (MCM – *Pdzrn3*<sup>F/F</sup>). Elles ont été suivies sur seize semaines (Figure 53).

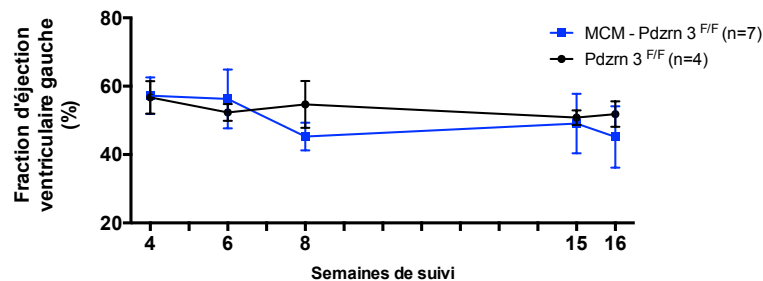


Figure 53 : Analyse échocardiographique des souris MCM - *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> induite à J0 vs contrôle.

Il n'y a pas de différence significative en terme de contractilité ventriculaire gauche entre les deux groupes.

- dans le deuxième protocole, les souris ont été délétées par l'injection de Tamoxifène trois semaines après la naissance. Ce groupe est également composé de souris *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> et de souris MCM – *Pdzrn3*<sup>F/F</sup>. Le suivi échocardiographique est mené sur 7 semaines (Figure 54).

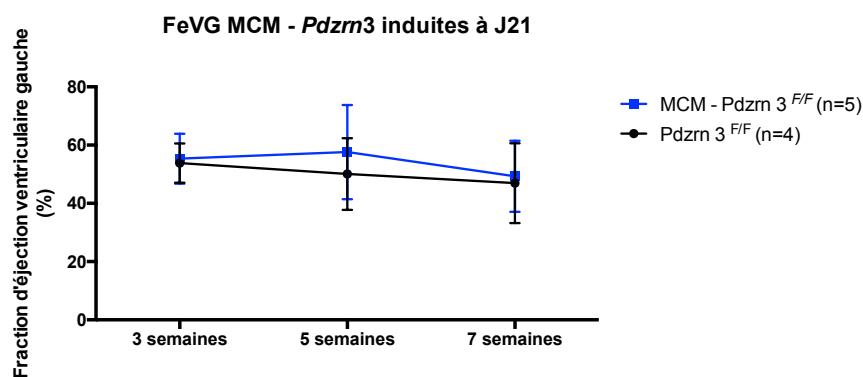


Figure 54 : Analyse échocardiographique souris MCM Pdzn3<sup>F/F</sup> induites à J21 vs contrôle.

Le suivi de ces deux groupes ne montre pas de sur-mortalité des souris délétées pour *Pdzn3*. La survie est comparable dans les deux groupes. Le suivi échocardiographique est également sans particularité. Il n'y a pas de variation de la fonction ventriculaire en fonction du génotype des souris.

### 2.2 Analyse par électrocardiogramme

Le suivi électrocardiographique des souris MCM – Pdzn3<sup>F/F</sup> par rapport aux souris Pdzn3<sup>F/F</sup> ne montre pas de différence significative entre les différents groupes de souris. Il n'y pas de variation de la conduction auriculo-ventriculaire ni intra-ventriculaire.

### 2.3 Analyse morphologique :

L'analyse en qPCR des cœurs de souris induites par le tamoxifène 15 jours avant met en évidence une diminution du transcrite codant pour *Pdzn3*, Figure 55.

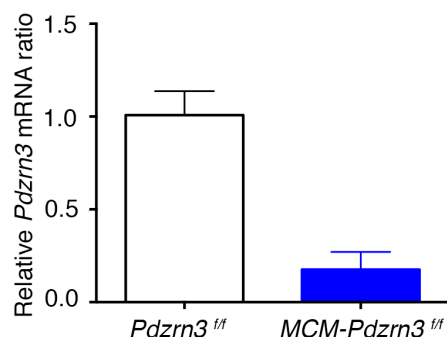


Figure 55 : Analyse des transcrits de *Pdzrn3* par RT qPCR après 15 jours d'induction par le tamoxifène chez des souris contrôles et des souris *Pdzrn3*<sup>f/f</sup> (n=5 par groupe).

L'analyse immunohistochimique des souris MCM – *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> par rapport aux souris *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> ne montre pas de variations morphologiques sur les marqueurs recherchés (inflammation, fibrose, localisation des protéines de jonctions intercellulaires (Plakoglobine, N-Cadhérine, β caténine, Cx 43, Zo – 1...)).

La caractérisation phénotypique, post natale, des souris délétées pour la séquence de *Pdzrn3* spécifiquement dans le myocarde, ne montre pas de différence significative par rapport au groupe contrôle. Ainsi, il paraît intéressant de rechercher un éventuel retentissement de la délétion de *Pdzrn3* dans des protocoles entraînant une modification de l'organisation cardiomyocytaire. Ainsi, deux protocoles de recherche, clairement établis, ont été utilisés. Ces protocoles permettent d'induire une hypertrophie myocardique soit de manière pharmacologique (protocole d'injection sous cutanée d'Angiotensine II) soit de manière mécanique (protocole de constriction aortique au niveau de l'aorte transverse (TAC)).

### 3 / Protocole d'induction d'une hypertrophie myocardique

#### 3.1 Protocole Angiotensine II

La première étape consiste à rechercher une modulation de l'expression de *Pdzrn3* dans le cadre d'un protocole d'induction d'hypertrophie myocardique par l'administration d'angiotensine II.

### 3.1.1 Modulation de l'expression de l'ARN de *Pdzn3*.

Lors d'une étude préliminaire, nous avons recherché une modulation de l'expression du transcrit de *Pdzn3* en fonction de la durée du protocole d'angiotensine 2 chez des souris de fond génétique C57Bl6. Nous avons pu observer une diminution significative de l'expression de *Pdzn3* lors des 2 premières semaines de traitement par angiotensine. Puis on observe sur les deux semaines suivantes une augmentation significative de l'expression de ce gène (Figure 56).

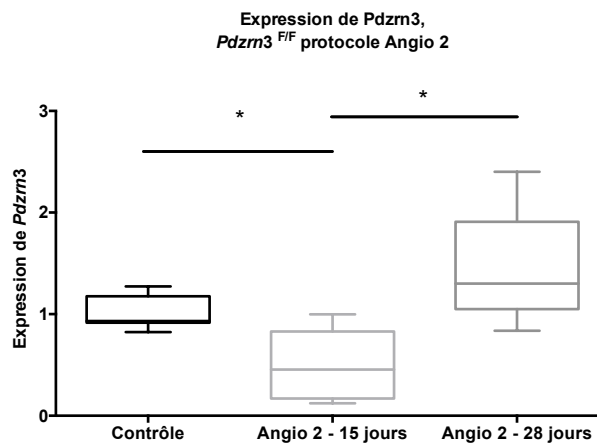


Figure 56 : Ratio d'expression du transcrit de *Pdzn3* en fonction de la durée du protocole d'angiotensine (\* =  $p < 0,05$ ).

Ces données suggèrent l'implication de PDZRN3 dans la régulation des phénomènes régissant l'induction de l'hypertrophie myocardique dans le cadre d'un protocole d'injection d'angiotensine II. Nous avons donc défini un protocole d'étude de l'impact de la délétion de *Pdzn3* lors d'un protocole de perfusion d'angiotensine 2 poursuivi sur un mois, Figure 57. L'analyse échocardiographique est réalisée à 15 jours de traitement puis à un mois.

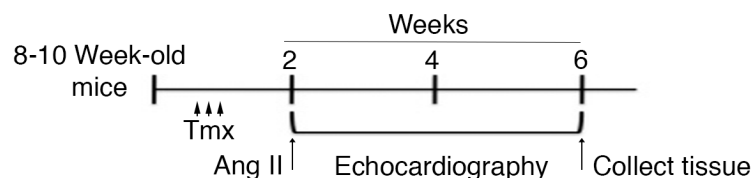


Figure 57 : Schéma du protocole d'induction d'une cardiomyopathie hypertrophique par perfusion sous cutanée d'Angiotensine 2, réimplantation des pompes sous cutanée à 15 jours.

### 3.1.2 Protocole d'induction d'hypertrophie myocardique par l'Angiotensine 2.

Le suivi échocardiographique de ces souris met en évidence l'induction de l'hypertrophie myocardique par l'augmentation significative de la fraction d'éjection ventriculaire gauche chez les souris incluses dans le protocole d'angiotensine 2 par rapport au groupe des souris contrôles, lors des quinze premiers jours de traitement, Figure 59. Le développement de l'hypertrophie myocardique est également affirmé par les données du rapport du poids du cœur sur le poids total obtenu en fin de protocole (Figure 58).

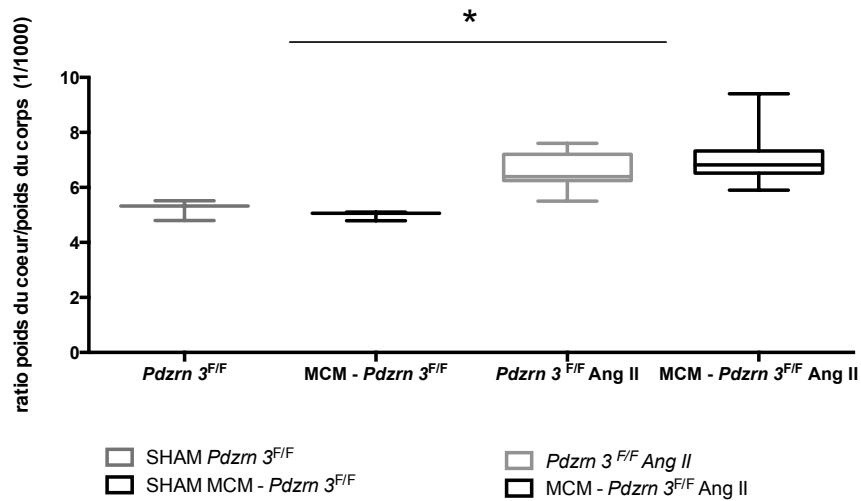


Figure 58 : Ratio Poids du coeur/ Poids total après un mois de traitement par angiotensine 2(\* p<0,05)

De manière intéressante, les souris MCM - *Pdzn3*<sup>F/F</sup> ne développent pas de dysfonction ventriculaire gauche lorsque le traitement par angiotensine II est prolongé sur une durée d'un mois consécutif contrairement à leur contrôle et ceci de manière statistiquement significatif, Figure 59.

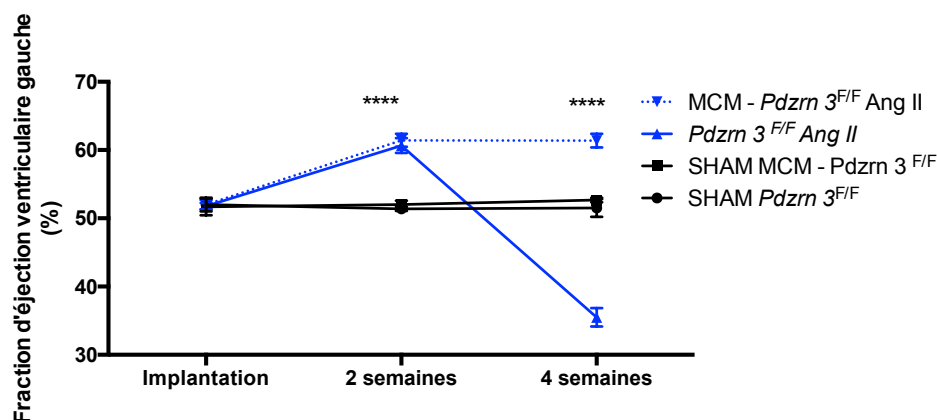


Figure 59 : Suivi échocardiographique dans le cadre du protocole d'Angiotensine II, souris MCM *Pdzn3*<sup>F/F</sup> vs *Pdzn3*<sup>F/F</sup> (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ), SHAM  $n=3$  par groupe et *Pdzn3*<sup>F/F</sup>  $n=7$ , MCM- *Pdzn3*<sup>F/F</sup>,  $n=11$ .

Nous avons donc recherché par Rt – qPCR, les modulations de l'expression de *Pdzn3* en fin de protocole de perfusion sous cutanée d'Angiotensine 2. Une augmentation non significative de l'expression de *Pdzn3* est observée dans le groupe contrôle. Dans le groupe des souris MCM – *Pdzn3*, il n'y a pas d'induction de la transcription de *Pdzn3* (confirmant l'efficacité de la délétion) et la différence d'expression entre le groupe contrôle et le groupe des souris MCM – *Pdzn3*<sup>F/F</sup>, soumis à la perfusion d'angiotensine 2, est statistiquement significative, Figure 60.

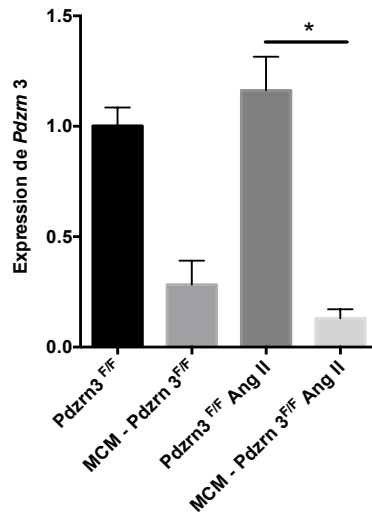


Figure 60 : Analyse de l'expression de Pdzn3 dans le cadre du protocole d'Angiotensine II (\*p<0,05).

#### c/ Analyse histologique cardiomyocytaire

Par ailleurs, lorsqu'on s'intéresse aux marqueurs histologiques de la géométrie cardiomyocytaire induite par l'activité *Pdzn3*, on s'aperçoit que l'indice de sphéricité varie au sein des cardiomyocytes dans les différents groupes. Une augmentation significative de cet indice est observée dans les groupes traités par l'angiotensine II par rapport au groupe contrôle. De plus l'indice de sphéricité est statistiquement plus élevé dans le groupe *Pdzn3*<sup>F/F</sup> traité par l'angiotensine II que dans le groupe MCM - *Pdzn3*<sup>F/F</sup>, c'est à dire dans le groupe exprimant *Pdzn3* par rapport au groupe délété pour cette protéine (Figure 61).



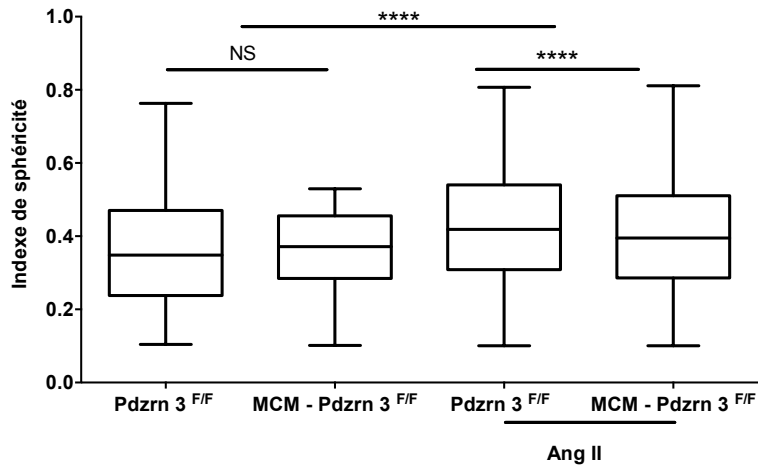


Figure 61 : Analyse de l'indice de sphéricité dans le cadre du protocole d'Angiotensine II, SHAM n=3, *Pdznr3*<sup>F/F</sup> n=3 et MCM- *Pdznr3*<sup>F/F</sup>, n=6, \*\*\*\* p < 0,0001.

### 3.2 Protocole d'induction mécanique : Constriction de l'aorte transverse (TAC)

Du fait des résultats obtenus dans le cadre du protocole d'induction d'hypertrophie ventriculaire gauche par administration d'angiotensine II, il paraît intéressant de tester l'impact de la délétion de *Pdznr3* dans un autre protocole d'induction d'hypertrophie. En effet dans le cadre du protocole d'angiotensine II, l'hypertrophie myocardique est induite par l'activation de différentes voies de signalisation. Pour évaluer l'impact de la délétion de *Pdznr3*, il nous est paru intéressant d'utiliser un protocole d'induction d'hypertrophie ventriculaire gauche plus mécanique. Dans ce cadre nous avons soumis les souris délétées à un protocole de constriction aortique au niveau de l'aorte transverse, Figure 62.

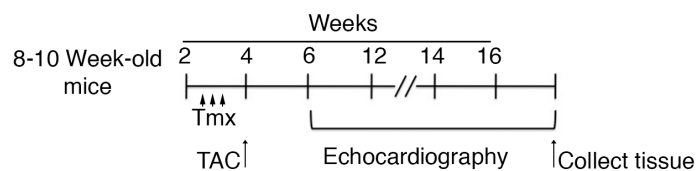


Figure 62 : Schéma du protocole d'induction d'hypertrophie par constriction de l'aorte transverse (TAC)

L'analyse morphologique des cœurs de souris en fin de protocole montre l'efficacité du protocole par l'augmentation de ratio poids du cœur sur poids total de la souris, Figure 63.

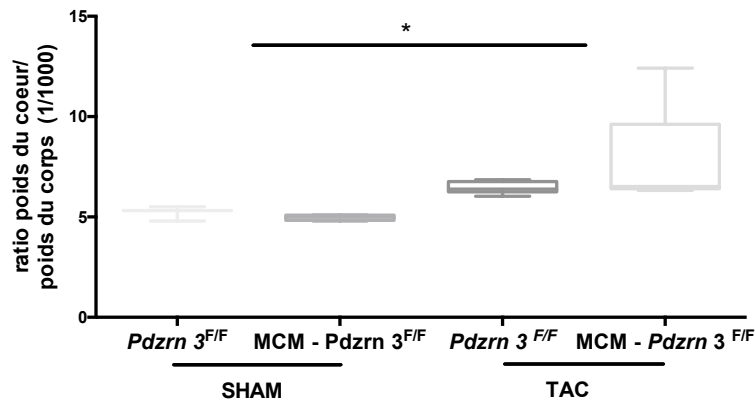


Figure 63 : Analyse Poids du coeur sur poids total de la souris dans le cadre d'un protocole TAC souris délétées (MCM *Pdzn3*<sup>F/F</sup>) vs contrôle (*Pdzn3*<sup>F/F</sup>), \* p<0,05.

Les souris soumises à une constriction aortique présentent une altération de la contractilité débutante dans le premier mois post constriction. La délétion de *Pdzn3* permet aux souris ayant subi la chirurgie de maintenir leur fraction d'éjection ventriculaire gauche. La différence de contractilité ventriculaire gauche est statistiquement significative entre les deux groupes (Figure 64).

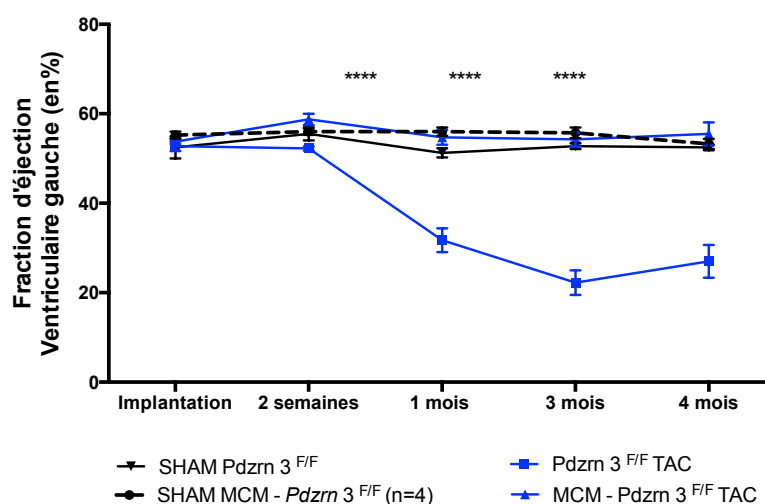


Figure 64 : Analyse de la contractilité ventriculaire gauche dans le cadre du protocole de constriction de l'aorte transverse (TAC), \*\*\*\* p < 0,0001.

## IV / ANALYSE HISTOLOGIQUE ET MOLECULAIRE HUMAINE

Dans le cadre de cette analyse, des échantillons de myocarde ventriculaire gauche humain ont été prélevés lors d'interventions chirurgicales, soit lors de résection myocardique septale dans le cadre de la prise en charge de patients présentant une cardiopathie hypertrophique asymétrique (le plus souvent lors d'une cure chirurgicale de rétrécissement aortique, intervention dite de « Morrow »), soit lors de transplantation cardiaque.

Ces prélèvements ont ensuite été analysés d'un point de vue moléculaire (par RT-qPCR) et en immunohistochimie. Du fait des données récoltées, dans le cadre des différents protocoles murins mis en place, nous avons décidé d'analyser ces échantillons humains en les classant en différents groupes :

- les échantillons obtenus dans le cadre des interventions de Morrow correspondent au groupe dit des cardiomyopathies hypertrophiques adaptatives (CMH - contrôle).

- les échantillons obtenus dans le cadre des transplantations ont été répartis en deux groupes différents, le groupe des cardiomyopathies hypertrophiques (CMH « pathologique ») et le groupe des myocardiopathies dilatées (CMD : cardiomyopathie ischémique ou primitive...).

### 1 / Analyse en RT qPCR de myocardiopathies humaines

L'analyse par RT-qPCR des transcrits met en évidence une variabilité significative de l'expression de *Pdzrn3* entre les deux groupes de patients transplantés. Nous retrouvons également une augmentation de *Pdzrn3* dans le groupe CMH pathologique par rapport au groupe des CMH physiologiques mais ceci de manière non statistiquement significative (Figure 65).

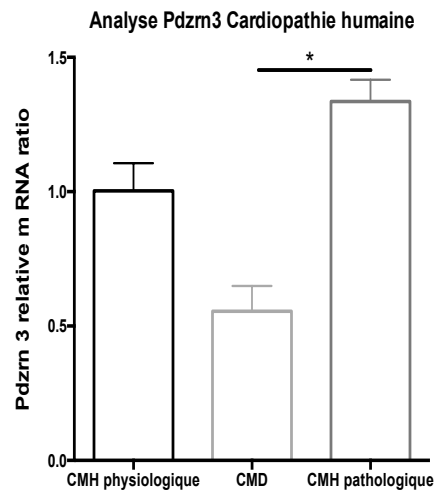


Figure 65 : Analyse par RT qPCR d'échantillons humains, cardiomyopathie hypertrophique (CMH) physiologique ou adaptative ; cardiomyopathie dilatée (CMD) ; cardiomyopathie hypertrophique (CMH) pathologique, n=5 dans le groupe contrôle et 6 dans les 2 autres, \* p < 0,05.

## 2 / Analyse histologique de myocardiopathies humaines

Nous avons analysé le marquage tissulaire des protéines de jonctions (Cx 43, Zo - 1, N Cadherine,  $\beta$  caténine...) au sein des échantillons de myocarde récupérés. Les mêmes anomalies dans la localisation des protéines de jonctions peuvent être retrouvées dans les échantillons de tissus issus des myocards de patients présentant une CMH pathologique contrairement aux autres échantillons, Figure 66.

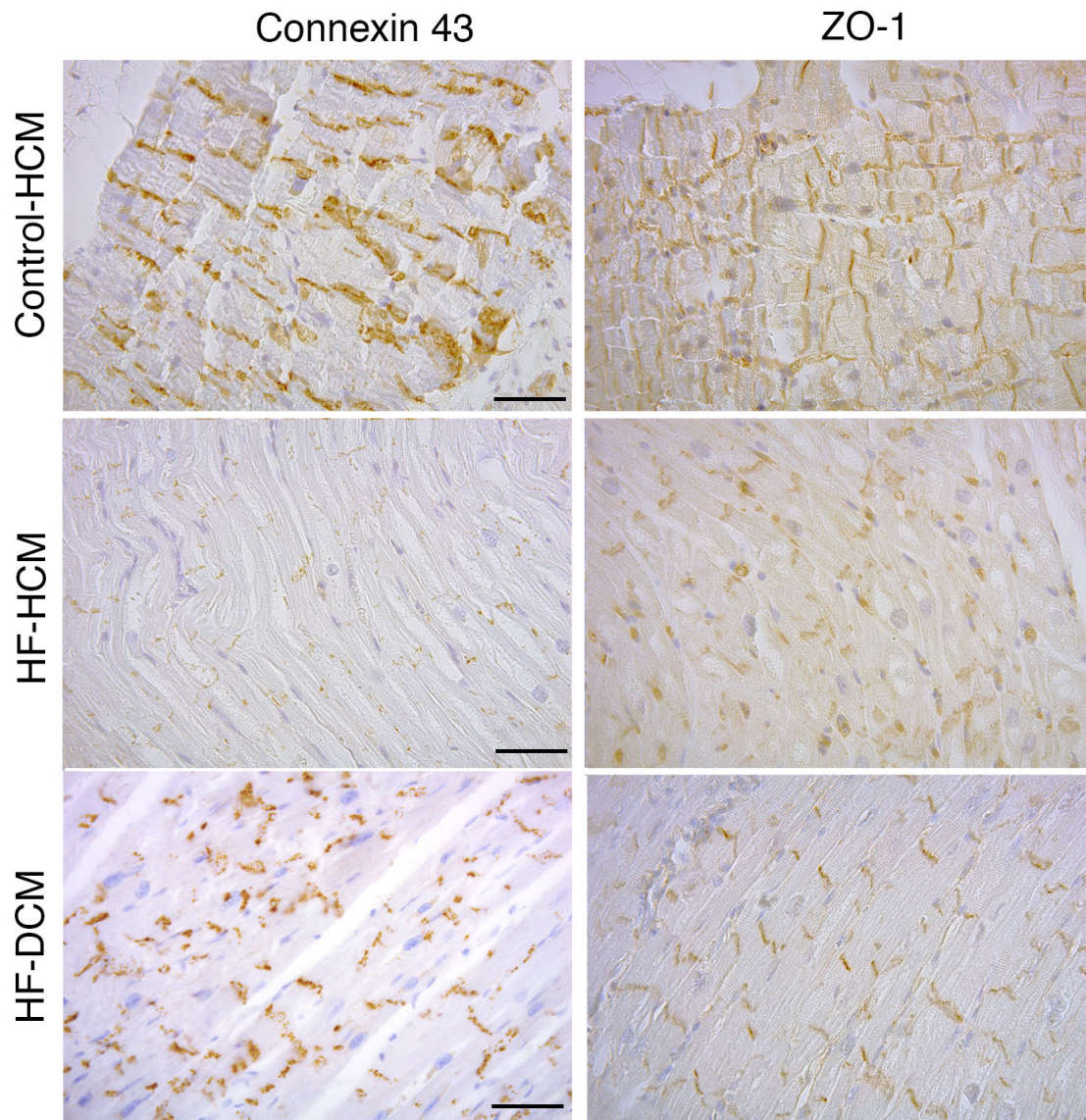


Figure 66 : Coupes histologiques de cardiomyopathies humaines marquées par Cx 43 et Zo - 1

Par ailleurs lorsque l'aire des cardiomyocytes est analysée, une augmentation significative est retrouvée dans le groupe des patients présentant une cardiomyopathie hypertrophique pathologique décompensée. Cette augmentation de l'aire des cardiomyocytes est concordante aux données de la littérature s'intéressant à ce groupe nosologique, Figure 67.

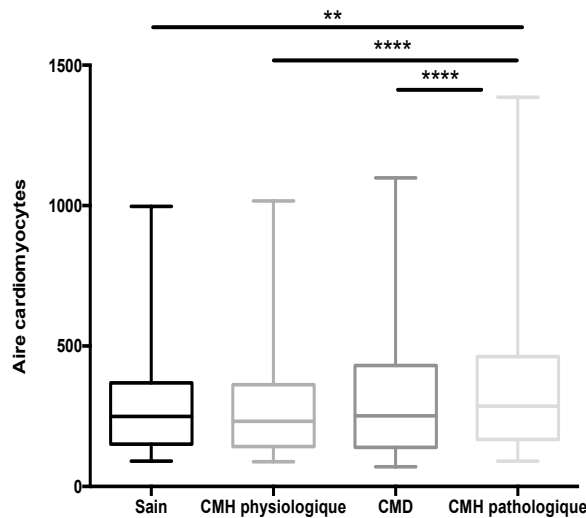


Figure 67 : Analyse de l'aire des cardiomyocytes sur des coupes transversales de myocarde humain : Cardiomyopathie adaptative (CMH « physiologique » (n=3)); Cardiomyopathie dilatée (CMD (n=6)); Cardiomyopathie hypertrophique pathologique (CMH pathologique (n=4), \*\* p < 0,01 ; \*\*\*\* p < 0,0001).

Par ailleurs, on note une diminution de l'index de sphéricité dans le groupe CMD versus CMH physiologique, de manière non significative. Par ailleurs, cet indice augmente significativement dans le groupe CMH pathologique orientant vers une réorganisation des cardiomyocytes pouvant être concordante avec les données mises en évidence lors des protocoles murins, Figure 68.

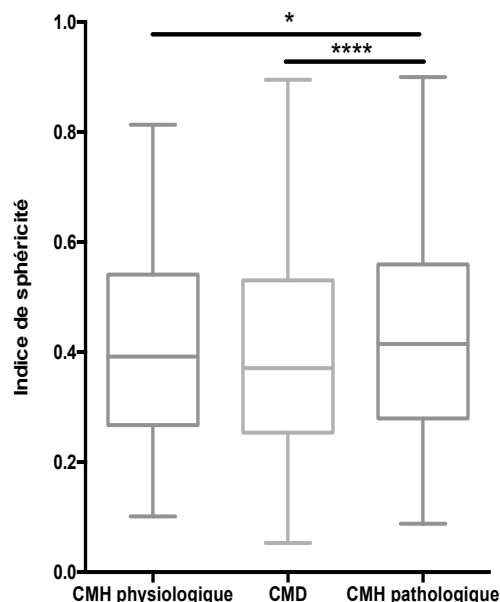


Figure 68 : Analyse de l'indice de sphéricité dans les myocardiopathies humaines : Cardiomyopathie adaptative (CMH « physiologique » (n=3)); Cardiomyopathie dilatée (CMD (n=6)); Cardiomyopathie hypertrophique pathologique (CMH pathologique (n=4), \* p < 0,05 ; \*\*\*\* p < 0,0001).

## V / ANALYSE DES MÉCANISMES MOLECULAIRES

### 1 / AHNAK

*Pdzn3* est une ubiquitine ligase de type E3. Le rôle biologique, de cette classe protéique, est de permettre l'interaction spécifique d'une protéine cible avec le complexe permettant son ubiquitination. Ses partenaires cibles sont mal connus. Une des questions de ce travail de thèse a été de rechercher la ou les protéines cibles de PDZRN3. Dans ce but, une analyse par spectrométrie de masse (MS/MS) a été menée sur les protéines issues d'une immunoprécipitation par un anticorps anti-V5 à partir de lysats de cœurs de souris mutantes surexprimant *PDZRN3-V5*. Cette analyse a révélé la présence de différentes protéines et notamment la présence d'AHNAK. Cette protéine est une protéine de structure participant à la stabilisation et à la localisation membranaire de certaines protéines notamment Zo-1.

#### 1.1 Interaction *Pdzn3* / *Ahnak*

Dans un premier temps nous avons confirmé les données obtenues par spectrométrie de masse en réalisant une immunoprécipitation à partir des lysats de cœurs de souris mutantes surexprimant *Pdzn3* à l'aide d'un anticorps anti-V5 pour rechercher la présence d'AHNAK, Figure 69.

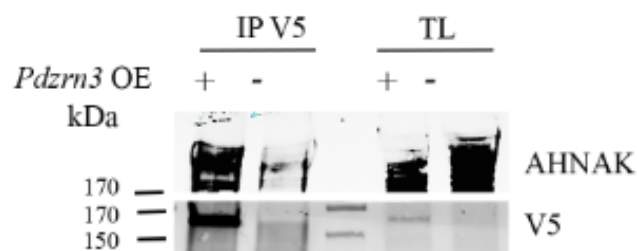


Figure 69 : Immunoprécipitation anti V5 et western blot à la recherche d'AHNAK et confirmation présence du V5 (souris âgée de 4 jours).

Cette immunoprécipitation met en évidence un bon enrichissement de la protéine ectopique PDZRN3-V5. Lorsque PDZRN3 est sur-exprimé on note une co-immunoprécipitation avec AHNAK. Nous avons ensuite recherché sa localisation cellulaire par marquage immunofluorescent analysé en microscopie confocale, Figure 70.

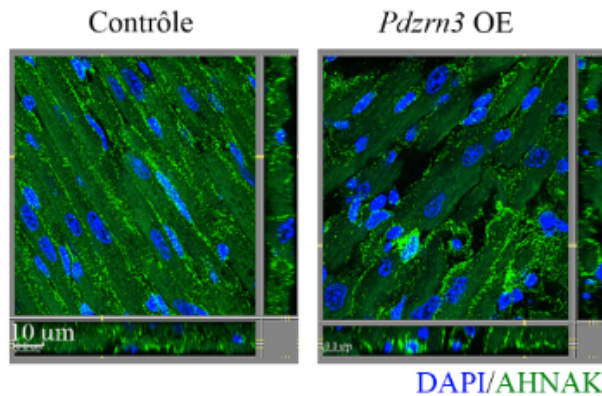


Figure 70 : Analyse au microscope confocal de la localisation cellulaire d'AHNAK sur des coupes de coeur de souris contrôles vs surexprimant PDZRN3 (*Pdzrn3* OE), âgées de 2 semaines.

AHNAK est située au niveau membranaire dans les cœurs contrôles alors que dans les cœurs transgéniques la localisation est moins précise, en partie cytosolique. Nous nous sommes donc intéressés à la chronologie d'évolution d'AHNAK par étude en Western blot (à 4, 7 et 14 jours post-natal dans les cœurs de souris contrôles versus mutants surexprimant *Pdzrn3*), Figure 71.

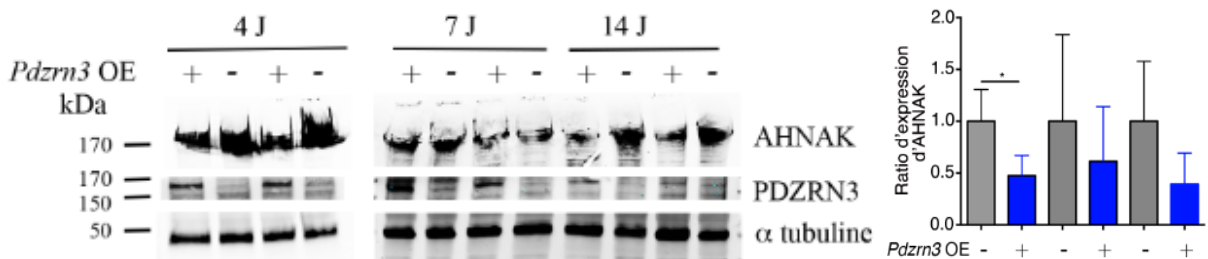


Figure 71 : A Analyse de l'expression par Western blot d'AHNAK à 4, 7 et 14 jours chez les souris *Pdzrn3* OE vs leur contrôle ; B Evaluation quantitative des variations d'AHNAK dans le temps. Pour chaque temps, la quantité de AHNAK obtenue dans les lysats de souris surexprimant *Pdzrn3* a été exprimée en normalisant par rapport à la quantité d'AHNAK dans les lysats de coeur de souris contrôle, \*  $p < 0,05$ .

Cette analyse montre une diminution constante de la quantité d'AHNAK dans le groupe transgénique par rapport à leur contrôle et ceci à 4, 7 et 14 jours (significative uniquement à J4). Ces données suggèrent que AHNAK pourrait être une cible de l'ubiquitine ligase de type E3, PDZRN3.



### 1.2 Spécificité de l'interaction de PDZRN3 avec AHNAK

Nous avons recherché *in vitro*, l'interaction entre PDZRN3 et AHNAK. AHNAK est une protéine de structure qui présente de fortes homologues de séquence avec une autre protéine, AHNAK 2. Pour tester la spécificité de l'interaction de PDZRN3 avec AHNAK, nous avons recherché l'interaction de PDZRN3 et d'AHNAK en co-transfectant des cellules HeLa avec des vecteurs comprenant la séquence de *Pdzrn3* -V5 et soit la séquence N terminale d'AHNAK marquée de l'étiquette c-myc soit la séquence N terminal d'AHNAK 2 également marquée de l'étiquette c-myc, les résultats sont présentés sur la Figure 72. PDZRN3 interagit spécifiquement avec la partie N terminale d'AHNAK. Il n'y a pas d'interaction de notre transgène avec AHNAK2. Nous avons ensuite analysé les mécanismes de régulation d'AHNAK par PDZRN3.

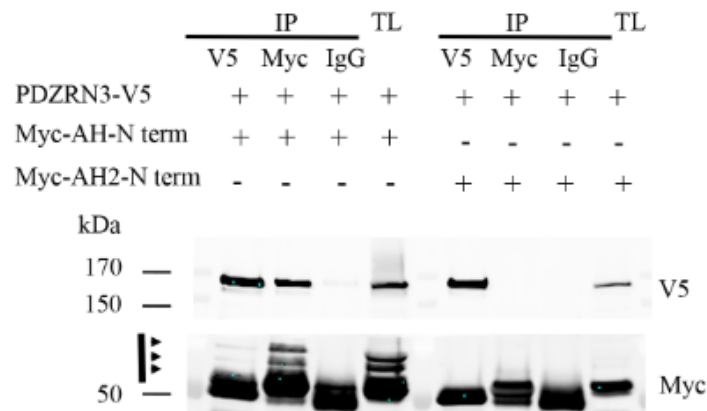


Figure 72 : Western blot après immunoprécipitation anti V5 ou Myc de cellules HeLa cotransfectées par *Pdzrn3* - V5 et soit Myc - AH - N tern soit Myc - AH - N2 term, LT = lysat total

### 1.3 Dégradation d'Ahnak par *Pdzrn3* via la voie du protéasome

Nous avons recherché si la dégradation d'AHNAK par PDZRN3 était liée à l'implication de son ubiquitination et si sa dégradation était dépendante du protéasome. Nous avons transfecté des cellules HeLa par le vecteur codant pour PDZRN3-V5 en présence d'un vecteur codant soit pour une ubiquitine (Ub), soit un vecteur codant pour une ubiquitine mutée permettant une incorporation de résidus ubiquitine uniquement sur les lysines en position 48 (Ub-only K48) ou soit un vecteur codant pour une ubiquitine mutée permettant une incorporation de résidus ubiquitine uniquement sur les lysines en position 63 ( Ub-only K63), Figure 73. La

poly-ubiquitination K48 entraînerait l'adressage de la protéine modifiée au protéasome pour dégradation alors que la poly-ubiquitination K63 serait impliquée dans l'adressage des protéines vers les mécanismes d'endocytose et de recyclage.

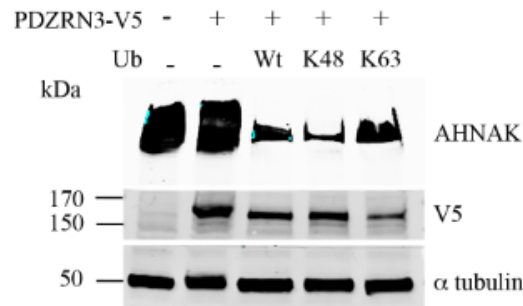


Figure 73 : Analyse par western blot d'AHNAK, V5 et  $\alpha$  tubuline à partir de lysats de cellules HeLa transfectées avec des vecteurs codant pour PDZRN3-V5 en présence soit Ubiquitine (Ub) sauvage (Wt) soit mutées (Ub K48 ou K63).

PDZRN3 ubiquitine bien AHNAK par une voie préférentiellement dépendante de l'ubiquitine K48, ce qui suggérerait un rôle dans la dégradation d'AHNAK via le protéasome. Enfin nous avons recherché l'implication du protéasome dans la dégradation d'AHNAK par utilisation d'un inhibiteur du protéasome (MG132), Figure 74.

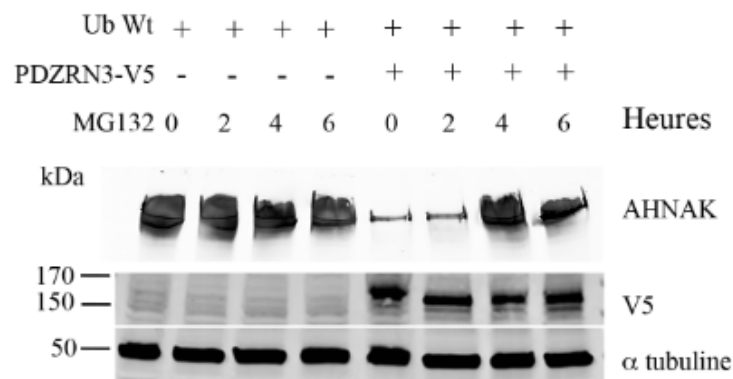


Figure 74 : Analyse par western blot d'AHNAK, V5 et  $\alpha$  tubuline de lysats de cellules HeLa transfectées par les vecteurs codant pour PDZRN3-V5 et pour Ubiquitine (Ub Wt) et traitées pour une durée variable par un inhibiteur du protéasome, MG132.

PDZRN3 induit donc la dégradation spécifique d'AHNAK par une voie dépendante du protéasome.

#### 1.4 Modulation d'AHNAK dans le protocole angiotensine II

Nous avons ensuite recherché la modulation d'AHNAK dans un protocole d'induction d'hypertrophie ventriculaire gauche par Angiotensine II. Dans le groupe contrôle *Pdzrn3*<sup>F/F</sup>, les cœurs de souris présentent une dégradation d'AHNAK après un mois de traitement. Dans le groupe sur-exprimant notre transgène, il n'y a pas de dégradation d'AHNAK. La différence entre ces deux groupes réside dans la présence de *Pdzrn3*, Figure 75.

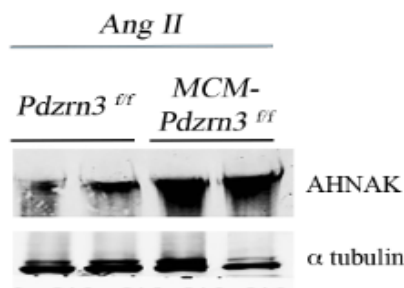


Figure 75 : Analyse par western blot d'AHNAK et de l'  $\alpha$  tubuline dans un protocole d'angiotensine 2 maintenu un mois.

## 2 / Isoforme de Zo 1

Lors des analyses moléculaires conduites sur les souris sur-exprimant *Pdzrn3*, nous retrouvons de manière reproductible une isoforme de Zo-1, de poids moléculaire inférieur à la forme conventionnelle (Poids moléculaire = 95 kDa), Figure 76.

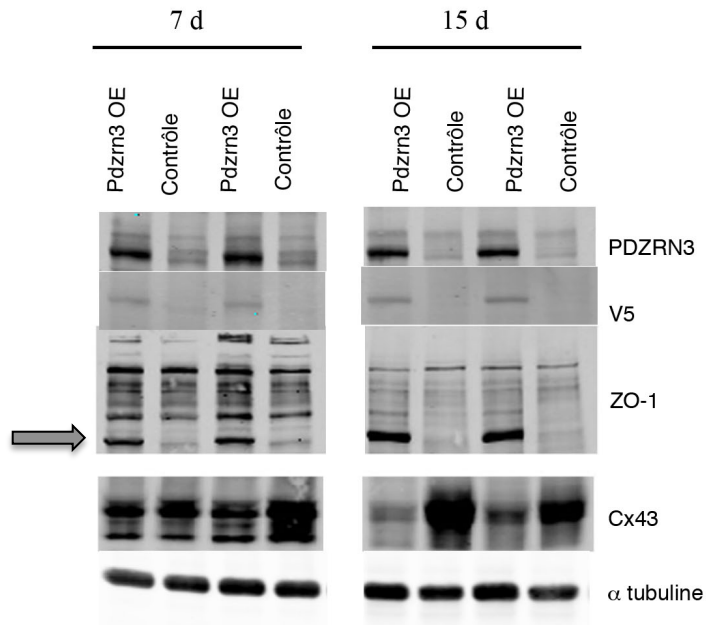


Figure 76 : Western blot analysant la présence d'une isoforme de Zo1 à une et deux semaines post-natal, souris *Pdzrn3* OE vs Contrôle.

Par ailleurs l'analyse en spectrométrie de masse de cette bande montre la présence d'un ensemble de peptides allant du C terminal au N terminal. Nous avons également analysé la répartition intracellulaire de cette isoforme de Zo1 par la réalisation d'un fractionnement cellulaire. Cette isoforme est retrouvée dans toutes les fractions cellulaires, Figure 77.

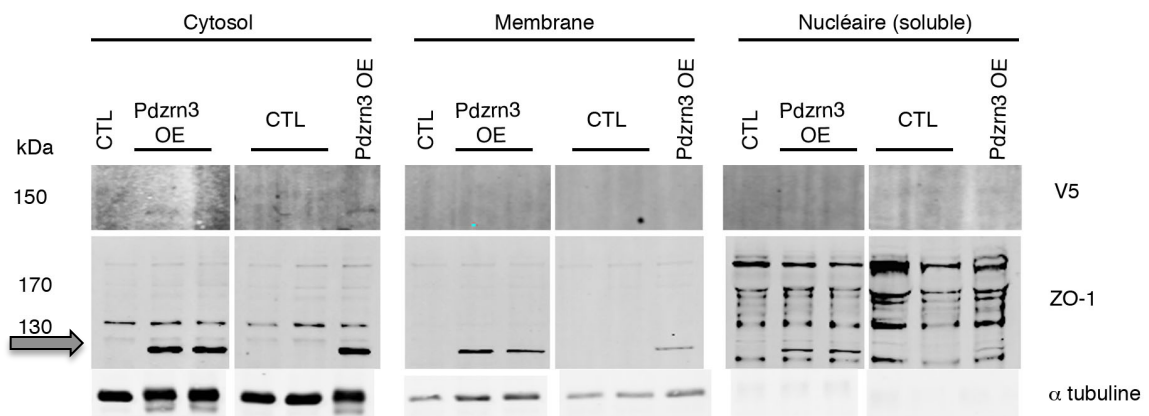


Figure 77 : Analyse par fractionnement cellulaire de la localisation d'une isoforme de Zo1 située à environ 95 kDa, souris *Pdzrn3* OE vs Contrôle.

### 3/ Pyk2

Nous avons analysé par spectrométrie de masse les protéines modifiées dans le lysats tissulaires des cœurs de souris mutantes (surexprimant PDZRN3 – V5), Figure 78. Parmi les protéines dont l'expression est fortement induite, nous avons identifié Pyk2, ou Ptk2b (proteine tyrosine kinase 2b).

Protein-tyrosine kinase 2-beta OS=Mus musculus GN=Ptk2b				CTL	Pdzn3OE	Pdzn3OE	CTL	Pdzn3OE	Pdzn3OE	
F	G	H	I	bjv150708_CF	bjv150708_C	bjv150708_C	bjv150708_CF	bjv150708_C	bjv150708_C	
5	98,75	Condition 2	Condition 1	316_NEW_HPZRN3_FL_V5HIS_B	2 837	302 315	257 934	3 040	302 315	264 613
6	71,54	Condition 2	Condition 1	Glycogenin-1 OS=Mus musculus GN=Gyg1 PE=2 SV=3 - [GLI	50 042	4 072 694	3 087 460	53 625	4 072 694	3 167 408
8	54,56	Condition 2	Condition 1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subu	388 890	18 574 989	23 860 203	416 732	18 574 989	24 478 046
10	26,74	Condition 2	Condition 1	<b>Protein-tyrosine kinase 2-beta OS=Mus musculus GN=Ptk2b</b>	2 597	34 482	104 453	2 783	34 482	107 158
11	26,49	Condition 2	Condition 1	Biglycan OS=Mus musculus GN=Bgn PE=2 SV=1 - [PGS1_M	1 206	9 875	54 005	1 292	9 875	55 403
12	20,80	Condition 2	Condition 1	Exportin-2 OS=Mus musculus GN=Cse1l PE=2 SV=1 - [XPO2	12 658	117 568	408 960	13 564	117 568	419 550

Figure 78 : Analyse par spectrométrie de masse MS/MS des protéines dans des lysats de cœurs surexprimant PDZRN3-V5 (Pdzn3-OE) versus des cœurs contrôles (CTL) à 7 jours post natal.

Pyk2, est une calcium dépendante tyrosine kinase avec une forte homologie avec la protéine p125 Focal Adhesion Kinase. Elle serait impliquée dans la réorganisation initiale des contacts focaux d'adhésion lors de la maturation cardiomyocytaire et également dans la survenue de dysfonction ventriculaire gauche après des protocoles d'induction d'hypertrophie par constriction de l'aorte transverse. Nous avons confirmé les résultats obtenus lors de l'analyse MS/MS par une analyse en Western blot. Lors de cette analyse, on retrouve une augmentation de la concentration protéique de Pyk2 dans les lysats cellulaires totaux issus de cœurs de souris surexprimant PDZRN3-V5 vs des cœurs de souris contrôles à 7 et 15 jours post natal, Figure 79.

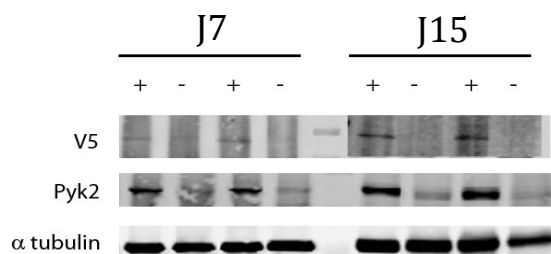


Figure 79 : Analyse par western blot sur lysats totaux de Pyk2, V5 et  $\alpha$  tubuline à partir de cœur surexprimant Pdzn3 (+) versus des cœurs contrôle (-).

## DISCUSSION

La communication entre les cardiomyocytes est primordiale aussi bien pour synchroniser les étapes du développement que pour assurer un bon fonctionnement du myocarde chez l'adulte. Les jonctions intercellulaires assurent cette communication ; elles seraient nécessaires pour la contractilité ventriculaire (Haase et al., 2004) et le couplage électrique intercardiomyocytaire (Frank et al., 2014; Kant et al., 2015). Dans le cœur, des protéines de jonction s'accumulent de manière polarisée au niveau des disques intercalaires lors de la maturation terminale des cardiomyocytes. Cette organisation assure le bon fonctionnement de l'unité contractile myocardique. Ces structures jonctionnelles permettent la mise en place de mécanismes d'adaptation aux contraintes pariétales, notamment dans le cadre de stress myocardique hypertrophique. Mon travail de recherche a porté sur l'étude des mécanismes moléculaires qui permettent la mise en place de ces complexes au pôle de la cellule cardiaque et leur maintenance. Ces mécanismes sont encore mal compris. Ils seraient dérégulés dans les cardiopathies.

Dans ce travail, nous identifions un rôle physiologique important de l'ubiquitine ligase PDZRN3 dans la régulation de la polarité des cardiomyocytes. Chez la souris, nous trouvons une diminution de *Pdzn3* après la naissance; *Pdzn3* serait réinduit dans les pathologies induisant une hypertrophie myocardique. Nous mettons en évidence un rôle protecteur de la délétion spécifique de *Pdzn3*, dans les cardiomyocytes, contre l'altération de la fonction ventriculaire gauche dans le cadre d'hypertrophie concentrique induite par augmentation de la post-charge. Le maintien forcé de *Pdzn3* (mutants surexprimant *Pdzn3* spécifiquement dans les cardiomyocytes) dans les cardiomyocytes durant les deux premières semaines de vie des souris empêche l'organisation complète des disques intercalaires et l'allongement post-natal des cardiomyocytes. Les mutants murins sur-exprimant *PDZRN3* présentent une morphologie myocardique anormale et développent une cardiopathie dilatée ou hypertrophique excentrique, conduisant à une mort prématurée. Enfin, de manière intéressante, les anomalies histologiques retrouvées chez la souris peuvent être retrouvées dans des cardiopathies humaines, notamment dans les cardiomyopathies hypertrophiques décompensées.

Les systèmes de jonctions intercellulaires font l'objet d'une intense recherche en raison de leur impact en physio-pathologie. Nos résultats indiquent que lors

d'une brève période post-natale, les cardiomyocytes néonataux murins évoluent d'un état arrondi immature non polarisé vers un état allongé, aligné et hautement polarisé. Nous avons caractérisé la maturation des cardiomyocytes par un suivi de la réorganisation des différentes protéines de jonctions Cx43, ZO-1, N-cadherine,  $\beta$  caténine aux pôles des cardiomyocytes dans les 2 premières semaines après la naissance chez la souris. Dans nos modèles murins, lorsque l'on surexprime *Pdzrn3*, la maturation des jonctions intercardiomyocytaires est incomplète aboutissant à la survenue d'une myocardiopathie dilatée précoce et grevée d'une mortalité importante et prématurée. L'analyse des différents composants des disques intercalaires montre que seules les jonctions Gap ne sont pas correctement polarisées dans notre modèle de myocardiopathie. Non seulement, la Cx 43 n'est pas correctement localisée au niveau des disques intercalaires mais son niveau de transcription et la quantité de protéine, au sein des cardiomyocytes, sont également fortement diminués. Zo-1 est également incorrectement polarisé au sein des cardiomyocytes sur-exprimant *Pdzrn3*. De nombreux articles montrent une interaction entre la Cx 43 et Zo - 1. Certains mettent en évidence une régulation de la densité et de la localisation de la Cx43 liée à son interaction avec Zo - 1 (Barker et al., 2002; Bruce et al., 2008; Laing et al., 2007; Zemljic-Harpf et al., 2014). Un des mécanismes pouvant expliquer cette diminution de la Cx 43 et sa mauvaise localisation cellulaire pourrait être liée à la délocalisation de Zo-1 (Hervé et al., 2014). Nous rapportons également une diminution presque complète du marquage de la Cx 43 après deux semaines de vie dans les cœurs de souris transgéniques *Pdzrn3* OE qui pourrait être due à la dégradation de la Cx43 par des voies dépendantes des lysosomes ou des protéasomes (Hervé et al., 2007).

Nous avons mis en évidence lors des études biochimiques une isoforme de Zo-1 d'environ 95 kDa non décrite dans la littérature induite par la surexpression de *Pdzrn3* dans les lysats de cœurs. La présence de cette nouvelle isoforme de Zo-1 a été confirmée par immunoprécipitation et par spectrométrie de masse. Les travaux du groupe de MS Balda ont décrit des isoformes de Zo-1 résultant d'un épissage alternatif et différent d'un épissage de 80 amino acids (Balda and Anderson, 1993). Ces isoformes seraient présentes dans des jonctions serrées différentes et pourraient réguler la plasticité et la perméabilité des jonctions intercellulaires. Des études complémentaires devront être menées pour déterminer si cette isoforme d'environ 95 kDa est issue d'un épissage alternatif. Zo-1 est une protéine fortement enrichie dans les jonctions membranaires mais aussi présente dans les noyaux. Dans les

épithéliums, Zo-1 serait capable d'interagir notamment avec le facteur ZONAB et régulerait la prolifération cellulaire (Balda and Matter, 2000). Dans nos expériences de fractionnement cellulaire, nous avons retrouvé une forte expression de ZO-1 dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires dans les extraits de coeurs contrôles et surexprimant *Pdzrn3*. L'isoforme de 95 kDa détectée par Western blot dans les lysats de coeurs surexprimant *Pdzrn3* est, elle aussi, retrouvée dans ces différentes fractions.

Par ailleurs la diminution de la quantité et la perturbation de la localisation de la Cx 43, dans notre modèle de sur-expression murin de *Pdzrn3*, s'accompagnent de troubles de la conduction authentifiés sur les électrocardiogrammes. Lors de ces enregistrements, il n'a pas été retrouvé d'extrasystole ventriculaire ni de troubles du rythme ventriculaire (tachycardie ventriculaire soutenue ou non). Cependant le suivi, par enregistrement de l'activité électrique, n'a été réalisé que sur une période de deux minutes et de manière hebdomadaire. Cette association de la diminution de la Cx 43 et de la survenue de troubles du rythme (troubles de la conduction (auriculo-ventriculaire ou intra-ventriculaire) ou hyper-exitabilité ventriculaire) correspond aux données de la littérature (Chen et al., 2017; Fontes et al., 2012; Leo-Macias et al., 2016; Palatinus et al., 2012).

Notre modèle transgénique de sur-expression de *Pdzrn3* bloque la maturation cardiomyocytaire. Nous avons alors analysé si *Pdzrn3* pouvait jouer un rôle sur la réorganisation, l'allongement des cardiomyocytes. Dans ce but nous avons mené une analyse histologique des membranes cardiomyocytaires (marquage des lectines membranaires par le WGA). La mesure des surfaces transversales des cardiomyocytes permet de définir un indice de sphéricité. Un indice de sphéricité se rapprochant de 1 est évocateur d'une cellule ovoïde. Nous avons analysé cet indice lors de la maturation post natale des cardiomyocytes et montré une diminution de cette valeur signant le passage d'une forme « arrondie » vers une forme allongée à partir de 3 semaines de vie post-natale. Ces données montrent que l'indice de sphéricité est un marqueur de la maturation des cardiomyocytes. De manière intéressante, la surexpression de PDZRN3 empêche cette réorganisation morphologique cellulaire ; le cardiomyocyte n'acquiert pas une forme allongée.

Une augmentation de l'indice de sphéricité est également observée dans le groupe des souris contrôles *Pdzrn3*<sup>F/F</sup> traitées pendant un mois par l'angiotensine II. Cette augmentation est corrélée à l'augmentation de l'expression de *Pdzrn3*. De



manière parallèle, les souris délétées pour *Pdzrn3* (MCM-*Pdzrn3*<sup>F/F</sup>), présentent une augmentation statistiquement plus faible que leur groupe contrôle lorsqu'elles sont soumises à un traitement par angiotensine II pendant un mois, suggérant que la délétion de *Pdzrn3* protège du remodelage des cardiomyocytes. Nous avons évalué la sphéricité des cardiomyocytes humains sur des coupes histologiques. Les échantillons analysés ont été répartis en trois groupes (les myocardiopathies hypertrophiques « adaptatives », les myocardiopathies dilatées et les myocardiopathies hypertrophiques « pathologiques »). De manière intéressante l'indice de sphéricité est statistiquement plus élevé dans le groupe où l'expression de *Pdzrn3* est la plus forte correspondant aux myocardiopathies hypertrophiques pathologiques décompensées.

Dans les études menées sur la polarisation et les systèmes de jonction intercellulaire dans le cadre de pathologie néoplasique notamment mais également dans les cardiopathies, un autre élément (dichotomique) est également étudié, la prolifération cellulaire (Ragni et al., 2017). Une équipe montre dans une étude récente l'implication d'un facteur de transcription, *Meis1* dans la régulation de la régénération des cardiomyocytes. Cette capacité de régénération est possible à l'état physiologique sur une période précise post natale (Mahmoud et al., 2013). Dans notre modèle, nous avons une diminution de la polarité cellulaire par la perte de la participation des jonctions Gap au système de jonctions des disques intercalaires et une perte de l'allongement des cardiomyocytes. Nous nous sommes donc intéressés à l'évaluation de la prolifération cellulaire dans les myocardes de souris surexprimant *Pdzrn3*. De manière intéressante, nous observons une augmentation significative de la prolifération cellulaire dans le groupe sur exprimant *Pdzrn3* par rapport à leur contrôle et ceci à 15 jours après la naissance. A 1 mois de vie, les souris contrôles ne présentent pas de prolifération cardiomyocytaire. L'analyse de la transcription montre (dans les marqueurs de prolifération recherchés) une augmentation significative de l'expression de *c-myc* dans le groupe surexprimant *Pdzrn3*. Ceci pourrait être interprété comme un maintien du cardiomyocyte dans un état non différencié par la voie de signalisation PDZRN3 dépendante.

On constate une modulation de la transcription de *Pdzrn3* dans des modèles murins d'induction d'hypertrophie ventriculaire, notamment dans le cadre du modèle d'angiotensine II. Lors de ce protocole, deux phases peuvent être définies en fonction de la durée du traitement sous cutanée par angiotensine. Une première

phase (correspondant aux 15 premiers jours de traitement) correspond à la mise en place des voies de signalisation induisant une hypertrophie ventriculaire gauche. Dans cette phase les cellules s'hypertrophient et sur l'analyse échocardiographique une augmentation de la fraction d'éjection ventriculaire gauche est observée. Puis lors d'une deuxième phase (lors du prolongement du traitement par angiotensine II pendant 15 jours supplémentaire), une dysfonction ventriculaire gauche apparaît progressivement. Durant cette seconde phase, d'autres mécanismes entrent en jeu provoquant l'altération de la contractilité ventriculaire. Lors de ce protocole, la délétion ciblée de *Pdzrn3* est suffisante pour maintenir la fraction d'éjection ventriculaire gauche lorsque le protocole est suivi pendant un mois. Ces données ont été validées dans un protocole d'induction métabolique d'hypertrophie (protocole d'angiotensine II) mais également dans le cadre d'un protocole d'induction mécanique d'hypertrophie (protocole de constriction aortique de l'aorte transverse).

Ces données suggèrent l'importance des mécanismes de régulation des jonctions intercellulaires (Liao et al., 2017; Rangrez et al., 2016; Zhang and Shaw, 2014). La mise en place de systèmes de régulation permettrait de renforcer les jonctions inter-cellulaires; une étude récente montre une augmentation du recrutement de la desmogléine 2 et la plakoglobine dans les disques intercalaires lors d'une stimulation  $\beta$  adrénergique, renforçant la cohésion intercardiomyocytaire (Schinner et al., 2017). Nous avons aussi proposé l'hypothèse suivante : la stabilité des jonctions intercardiomyocytaires serait nécessaire dans le maintien de la contraction ventriculaire dans des protocoles de « stress » pariétal induit. L'inhibition de l'expression de *Pdzrn3* permettrait le maintien des systèmes de jonctions intercardiomyocytaires et donc l'inotropisme myocardique.

Les voies de signalisation Wnt/Fzd, canonique ou non canonique ont été impliquées dans de multiples étapes du processus de développement du cœur (Flaherty et al., 2012; Gessert and Kuhl, 2010). Dans les cardiomyocytes adultes normaux, les voies Wnt/Fzd sont quiescentes mais elles peuvent être réactivées en pathologie comme dans l'hypertrophie (Cingolani, 2007; Hermans and Blankesteyn, 2015; Malekar et al., 2010). L'implication de la voie Wnt/frizzled canonique, dite «  $\beta$  caténine » dans les myocardopathies à l'âge adulte est abordée dans la littérature (Dawson et al., 2013; ter Horst et al., 2012). Cependant l'implication en pathologie adulte de la voies Wnt/Fzd non canonique est à l'heure actuelle moins connue. De plus, les mécanismes de régulation de la maturation post-natale des cardiomyocytes

ne sont pas connus. Avec notre travail de recherche, nous mettons en évidence l'implication d'une voie de polarisation et d'orientation cellulaire, médiée par *Pdzrn3*, dans la régulation des systèmes de jonctions intercellulaires (jonctions Gap, composant des disques intercalaires) lors de la maturation post natale et dans un processus pathologique de stress pariétal hypertrophique. En effet, lors de la sur-expression de notre transgène, une augmentation cytoplasmique de PKC $\zeta$  est observée avec une translocation au noyau de c-Jun corrélée à une diminution de la fraction cytosolique sans modification de la fraction membranaire de  $\beta$  caténine. L'augmentation de ces marqueurs, dits de la voie PCP, pourrait participer aux mécanismes moléculaires permettant la polarisation des protéines de jonctions des disques intercalaires. Ces données sont concordantes avec les études démontrant un rôle de la voie Wnt non canonique pendant l'embryogénèse du cœur par déstabilisation du signal Wnt canonique  $\beta$  caténine dépendant (Abdul-Ghani et al., 2011).

Ce travail de recherche a permis d'identifier une nouvelle cible moléculaire de *Pdzrn3*, AHNAK. PDZRN3 induit la dégradation d'Ahnak par orientation de cette protéine dans le système de dégradation protéique (protéasome). Plusieurs études ont été menées pour comprendre le rôle de cette protéine géante. Les premiers travaux rapportent que dans les cellules épithéliales et au sein des cardiomyocytes, AHNAK est décrit comme une protéine d'ancrage à la membrane plasmique fonctionnant comme un lien entre le cytosquelette d'actine et les canaux calciques (Hohaus et al., 2002). Dans les cellules endothéliales, une étude s'intéresse aux mécanismes d'action d'AHNAK au niveau des systèmes de jonctions (tight junction). Dans cette étude, ils montrent une colocalisation forte d'AHNAK et de Zo-1 et une variabilité de la quantité de ces protéines (de manière concordante) en fonction de la perméabilité du réseau vasculaire (Davis et al., 2014; Gentil et al., 2005). Nous montrons qu'AHNAK est régulée durant les premières semaines post natales dans les cardiomyocytes et par ailleurs nous mettons en évidence dans des études in vivo et in vitro que PDZRN3 entraîne la dégradation d'AHNAK. Il est tentant de poser l'hypothèse que le niveau d'expression de PDZRN3 est régulé pour ajuster précisément AHNAK, qui pourrait exercer un rôle dans l'arrêt de la croissance des cardiomyocytes matures, lors du développement myocardique post-natal.

Lors de l'analyse des souris surexprimant *Pdzrn3*, nous avons démontré une augmentation de la quantité protéique de Pyk2. Cette molécule est une calcium

dépendante tyrosine kinase avec une forte homologie avec la protéine p125 Focal Adhesion Kinase. Elle serait impliquée dans la réorganisation initiale des contacts focaux d'adhésion lors de la maturation cardiomyocytaire et également dans la survenue de dysfonction ventriculaire gauche après des protocoles d'induction d'hypertrophie par constriction de l'aorte transverse (Melendez et al., 2002). Une équipe montre une sur-expression de Pyk2 dans les cardiomyocytes de rat néonataux par rapport à la quantité de protéines dans les cardiomyocytes matures (Bayer et al., 2001). Ils montrent également une modulation de la quantité de cette protéine en fonction de l'activité contractile des cardiomyocytes *in vitro* et en fonction de leur confluence. La même équipe montre dans une autre étude une corrélation entre la quantité de Pyk2 et la dysfonction ventriculaire gauche dans les suites d'un protocole de TAC (Bayer et al., 2002). Plus récemment, il a été mis en évidence une diminution de la dysfonction ventriculaire gauche secondaire à un protocole de TAC par la modulation de la quantité de Pyk2 et la diminution de sa phosphorylation, grâce à l'administration d'un inhibiteur des tyrosines kinases (Balasubramanian et al., 2015). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une induction de Pyk2 qui serait corrélée à une perturbation de la maturation des cardiomyocytes lors du maintien forcé de l'expression de PDZRN3. L'ensemble de ces données est cohérent avec l'idée d'une mise en place d'un système entraînant la décompensation cardiaque impliquant Pyk2 et Pdzn3.

Les travaux réalisés utilisant des modèles murins d'hypertrophie ventriculaire induite pharmacologiquement (protocole d'angiotensine 2) ou mécaniquement (protocole de constriction aortique de l'aorte transverse, TAC) montrent l'importance des systèmes de jonctions intercardiomyocytaires dans la survenue d'une dysfonction ventriculaire gauche. Ces travaux montrent la réactivation de voie « embryonnaire » dans des processus pathologiques. Par ailleurs, la mise en évidence de ces mécanismes permet d'envisager d'évaluer une action pharmacologique pour prévenir le risque de décompensation cardiaque chez les patients présentant une cardiomyopathie hypertrophique. Surtout, que les mécanismes mis en évidence dans ces modèles murins semblent être extrapolables aux cardiomyopathies humaines, du fait de la mise en évidence de la modulation de l'expression de *Pdzn3* en fonction du type de cardiopathie et de la visualisation de stigmates histologiques comparables dans le cadre des atteintes murines et humaines.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Ce travail apporte de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes permettant le développement mature des disques intercalaires en post natal des cardiomyocytes. Il met également en évidence l'implication d'acteur de la voie de signalisation Wnt/frizzled non canonique dans la maturation de ces systèmes de jonctions introduisant par la même occasion l'idée de polarisation des cardiomyocytes. Cette polarisation est caractérisée par une répartition différentielle des protéines entre la membrane latérale des cardiomyocytes et la membrane « terminale » correspondant aux zones d'interaction entre les myofibrilles de cardiomyocytes adjacents. Ce travail met également en évidence l'implication de cette voie de signalisation PDZRN3 dépendante dans l'évolution de processus pathologique à partir d'un myocarde mature.

L'ensemble de ces données apporte des éléments permettant d'envisager la conduite de nouvelles recherches en vue d'améliorer la compréhension des mécanismes de régulation des jonctions intercardiomyocytaires et d'appréhender d'éventuelles pistes thérapeutiques par modulation de ces systèmes de jonctions. D'un point de vue clinique, ces données caractérisent la notion de contrainte pariétale et permettent d'apporter un nouveau regard sur la prise en charge médico-chirurgicale des patients. La connaissance des mécanismes moléculaires responsables de la survenue et de l'évolution d'une myocardiopathie permettra d'adapter la prise en charge thérapeutique (médicale ou chirurgicale) en fonction du risque individuel.

## BIBLIOGRAPHIE

Abdul-Ghani, M., Dufort, D., Stiles, R., De Repentigny, Y., Kothary, R., and Megeney, L.A. (2011). Wnt11 promotes cardiomyocyte development by caspase-mediated suppression of canonical Wnt signals. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 163–178.

Adler, P.N., Zhu, C., and Stone, D. (2004). Inturned localizes to the proximal side of wing cells under the instruction of upstream planar polarity proteins. *Curr. Biol. CB* *14*, 2046–2051.

Agullo-Pascual, E., Cerrone, M., and Delmar, M. (2014). Arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome: diseases of the connexome. *FEBS Lett.* *588*, 1322–1330.

Ai, D., Fu, X., Wang, J., Lu, M.-F., Chen, L., Baldini, A., Klein, W.H., and Martin, J.F. (2007). Canonical Wnt signaling functions in second heart field to promote right ventricular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 9319–9324.

Angers, S., and Moon, R.T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 468–477.

Angst, B.D., Khan, L.U., Severs, N.J., Whitely, K., Rothery, S., Thompson, R.P., Magee, A.I., and Gourdie, R.G. (1997). Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ. Res.* *80*, 88–94.

Anna, C.H., Iida, M., Sills, R.C., and Devereux, T.R. (2003). Expression of potential beta-catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *190*, 135–145.

Arbustini, E., Cecchi, F., Dubourg, O., Frenneaux, M., Keren, A., Khul, U., Maisch, B., Richardson, P., Seferovic, P., Tendera, M., et al. (2002). The need for European Registries in inherited cardiomyopathies. *Eur. Heart J.* *23*, 1972–1974.

Arbustini, E., Pasotti, M., Pilotto, A., Pellegrini, C., Grasso, M., Previtali, S., Repetto, A., Bellini, O., Azan, G., Scaffino, M., et al. (2006). Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene

defects. *Eur. J. Heart Fail.* 8, 477–483.

Arbustini, E., Narula, N., Dec, G.W., Reddy, K.S., Greenberg, B., Kushwaha, S., Marwick, T., Pinney, S., Bellazzi, R., Favalli, V., et al. (2013). The MOGE(S) Classification for a Phenotype-Genotype Nomenclature of Cardiomyopathy: Endorsed by the World Heart Federation. *Glob. Heart* 8, 355–382.

Arbustini, E., Narula, N., Tavazzi, L., Serio, A., Grasso, M., Favalli, V., Bellazzi, R., Tajik, J.A., Bonow, R.O., Fuster, V., et al. (2014). The MOGE(S) Classification of Cardiomyopathy for Clinicians. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 304–318.

Arya, R., Kedar, V., Hwang, J.R., McDonough, H., Li, H.-H., Taylor, J., and Patterson, C. (2004). Muscle ring finger protein-1 inhibits PKC $\epsilon$  activation and prevents cardiomyocyte hypertrophy. *J. Cell Biol.* 167, 1147–1159.

Ashton-Rickardt, P.G., Dunlop, M.G., Nakamura, Y., Morris, R.G., Purdie, C.A., Steel, C.M., Evans, H.J., Bird, C.C., and Wyllie, A.H. (1989). High frequency of APC loss in sporadic colorectal carcinoma due to breaks clustered in 5q21-22. *Oncogene* 4, 1169–1174.

Baig, M.K., Goldman, J.H., Caforio, A.L., Coonar, A.S., Keeling, P.J., and McKenna, W.J. (1998). Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31, 195–201.

Balasubramanian, S., Mani, S.K., Kasiganesan, H., Baicu, C.C., and Kuppaswamy, D. (2010). Hypertrophic stimulation increases beta-actin dynamics in adult feline cardiomyocytes. *PloS One* 5, e11470.

Balasubramanian, S., Pleasant, D.L., Kasiganesan, H., Quinones, L., Zhang, Y., Sundararaj, K.P., Roche, S., O'Connor, R., Bradshaw, A.D., and Kuppaswamy, D. (2015). Dasatinib Attenuates Pressure Overload Induced Cardiac Fibrosis in a Murine Transverse Aortic Constriction Model. *PloS One* 10, e0140273.

Balda, M.S., and Anderson, J.M. (1993). Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *Am. J. Physiol.* 264, C918-924.

Balda, M.S., and Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J.* 19, 2024–2033.

Balse, E., Steele, D.F., Abriel, H., Coulombe, A., Fedida, D., and Hatem, S.N. (2012). Dynamic of ion channel expression at the plasma membrane of cardiomyocytes. *Physiol. Rev.* 92, 1317–1358.

Barker, R.J., Price, R.L., and Gourdie, R.G. (2002). Increased association of ZO-1 with connexin43 during remodeling of cardiac gap junctions. *Circ. Res.* 90, 317–324.

Baurand, A., Zelarayan, L., Betney, R., Gehrke, C., Dunger, S., Noack, C., Busjahn, A., Huelsken, J., Taketo, M.M., Birchmeier, W., et al. (2007). Beta-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling. *Circ. Res.* 100, 1353–1362.

Bayer, A.L., Ferguson, A.G., Lucchesi, P.A., and Samarel, A.M. (2001). Pyk2 expression and phosphorylation in neonatal and adult cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1017–1030.

Bayer, A.L., Heidkamp, M.C., Patel, N., Porter, M.J., Engman, S.J., and Samarel, A.M. (2002). PYK2 expression and phosphorylation increases in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H695-706.

de Beco, S., Gueudry, C., Amblard, F., and Coscoy, S. (2009). Endocytosis is required for E-cadherin redistribution at mature adherens junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7010–7015.

Bennett, P.M., Maggs, A.M., Baines, A.J., and Pinder, J.C. (2006). The transitional junction: a new functional subcellular domain at the intercalated disc. *Mol. Biol. Cell* 17, 2091–2100.

Bernstein, S.A., and Morley, G.E. (2006). Gap junctions and propagation of the cardiac action potential. *Adv. Cardiol.* 42, 71–85.

Beyer, E.C., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* 105, 2621–2629.

Bruce, A.F., Rothery, S., Dupont, E., and Severs, N.J. (2008). Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc. Res.* 77, 757–765.



Buckingham, M., Meilhac, S., and Zaffran, S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.* 6, 826–835.

Caforio, A.L.P., Pankuweit, S., Arbustini, E., Basso, C., Gimeno-Blanes, J., Felix, S.B., Fu, M., Heliö, T., Heymans, S., Jahns, R., et al. (2013). Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* 34, 2636–2648, 2648a–2648d.

Carll, A.P., Willis, M.S., Lust, R.M., Costa, D.L., and Farraj, A.K. (2011). Merits of non-invasive rat models of left ventricular heart failure. *Cardiovasc. Toxicol.* 11, 91–112.

Charron, P., Arad, M., Arbustini, E., Basso, C., Bilinska, Z., Elliott, P., Helio, T., Keren, A., McKenna, W.J., Monserrat, L., et al. (2010). Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* 31, 2715–2726.

Chen, X., Shevtsov, S.P., Hsich, E., Cui, L., Haq, S., Aronovitz, M., Kerkelä, R., Molkenkin, J.D., Liao, R., Salomon, R.N., et al. (2006). The beta-catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4462–4473.

Chen, X., Chen, L., Chen, Z., Chen, X., and Song, J. (2017). Remodelling of myocardial intercalated disc protein connexin 43 causes increased susceptibility to malignant arrhythmias in ARVC/D patients. *Forensic Sci. Int.* 275, 14–22.

Chkourko, H.S., Guerrero-Serna, G., Lin, X., Darwish, N., Pohlmann, J.R., Cook, K.E., Martens, J.R., Rothenberg, E., Musa, H., and Delmar, M. (2012). Remodeling of mechanical junctions and of microtubule-associated proteins accompany cardiac connexin43 lateralization. *Heart Rhythm* 9, 1133–1140.e6.

Choi, S., Gustafson-Wagner, E.A., Wang, Q., Harlan, S.M., Sinn, H.W., Lin, J.L.-C., and Lin, J.J.-C. (2007). The intercalated disk protein, mXalpha, is capable of interacting with beta-catenin and bundling actin filaments [corrected]. *J. Biol. Chem.* 282, 36024–36036.

Cingolani, O.H. (2007). Cardiac hypertrophy and the Wnt/Frizzled pathway.

Hypertens. Dallas Tex 1979 49, 427–428.

Classen, A.-K., Anderson, K.I., Marois, E., and Eaton, S. (2005). Hexagonal packing of *Drosophila* wing epithelial cells by the planar cell polarity pathway. *Dev. Cell* 9, 805–817.

Cliffe, A., Hamada, F., and Bienz, M. (2003). A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr. Biol. CB* 13, 960–966.

Cong, F., Schweizer, L., and Varmus, H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Dev. Camb. Engl.* 131, 5103–5115.

Corrado, D., Basso, C., Thiene, G., McKenna, W.J., Davies, M.J., Fontaliran, F., Nava, A., Silvestri, F., Blomstrom-Lundqvist, C., Wlodarska, E.K., et al. (1997). Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 30, 1512–1520.

Davis, T.A., Loos, B., and Engelbrecht, A.-M. (2014). AHNAK: The giant jack of all trades. *Cell. Signal.* 26, 2683–2693.

Dawson, K., Aflaki, M., and Nattel, S. (2013). Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential. *J. Physiol.* 591, 1409.

Descamps, B., Sewduth, R., Ferreira Tojais, N., Jaspard, B., Reynaud, A., Sohet, F., Lacolley, P., Allières, C., Lamazière, J.-M.D., Moreau, C., et al. (2012). Frizzled 4 regulates arterial network organization through noncanonical Wnt/planar cell polarity signaling. *Circ. Res.* 110, 47–58.

Devenport, D. (2014). The cell biology of planar cell polarity. *J. Cell Biol.* 207, 171–179.

Dissanayake, S.K., Wade, M., Johnson, C.E., O'Connell, M.P., Leotlela, P.D., French, A.D., Shah, K.V., Hewitt, K.J., Rosenthal, D.T., Indig, F.E., et al. (2007). The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 282, 17259–17271.

Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123, 903–915.

Du, S.J., Purcell, S.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., and Moon, R.T. (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2625–2634.

Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Fraté, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hülser, D.F., and Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129, 805–817.

Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kühn, U., Maisch, B., McKenna, W.J., et al. (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* 29, 270–276.

Eppenberger, H.M., and Zuppinger, C. (1999). In vitro reestablishment of cell-cell contacts in adult rat cardiomyocytes. Functional role of transmembrane components in the formation of new intercalated disk-like cell contacts. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 13 *Suppl*, S83-89.

van Es, J.H., Barker, N., and Clevers, H. (2003). You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 28–33.

Etheridge, S.L., Ray, S., Li, S., Hamblet, N.S., Lijam, N., Tsang, M., Greer, J., Kardos, N., Wang, J., Sussman, D.J., et al. (2008). Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet.* 4, e1000259.

Fanto, M., and McNeill, H. (2004). Planar polarity from flies to vertebrates. *J. Cell Sci.* 117, 527–533.

Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17, 375–412.

Ferreira-Cornwell, M.C., Luo, Y., Narula, N., Lenox, J.M., Lieberman, M., and

Radice, G.L. (2002). Remodeling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart. *J. Cell Sci.* *115*, 1623–1634.

Filali, M., Cheng, N., Abbott, D., Leontiev, V., and Engelhardt, J.F. (2002). Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J. Biol. Chem.* *277*, 33398–33410.

Flaherty, M.P., Kamerzell, T.J., and Dawn, B. (2012). Wnt signaling and cardiac differentiation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *111*, 153–174.

Fontes, M.S.C., van Veen, T.A.B., de Bakker, J.M.T., and van Rijen, H.V.M. (2012). Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochim. Biophys. Acta* *1818*, 2020–2029.

Forbes, M.S., and Sperelakis, N. (1985). Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function. *Tissue Cell* *17*, 605–648.

Force, T., Woulfe, K., Koch, W.J., and Kerkelä, R. (2007). Molecular scaffolds regulate bidirectional crosstalk between Wnt and classical seven-transmembrane-domain receptor signaling pathways. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2007*, pe41.

Franke, W.W., Borrmann, C.M., Grund, C., and Pieperhoff, S. (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *Eur. J. Cell Biol.* *85*, 69–82.

Frese, K.S., Katus, H.A., and Meder, B. (2013). Next-generation sequencing: from understanding biology to personalized medicine. *Biology* *2*, 378–398.

Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N., and Hill, J.A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* *109*, 1580–1589.

Gao, C., and Chen, Y.-G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell. Signal.* *22*, 717–727.

Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M.A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., Minami, Y., et al. (2011). Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev. Cell* *20*,

163–176.

Garcia-Gras, E. (2006). Suppression of canonical Wnt/  $\beta$ -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* *116*, 2012–2021.

Gavazzi, A., Repetto, A., Scelsi, L., Inserra, C., Laudisa, M.L., Campana, C., Specchia, C., Dal Bello, B., Diegoli, M., Tavazzi, L., et al. (2001). Evidence-based diagnosis of familial non-X-linked dilated cardiomyopathy. Prevalence, inheritance and characteristics. *Eur. Heart J.* *22*, 73–81.

Gentil, B.J., Benaud, C., Delphin, C., Remy, C., Berezowski, V., Cecchelli, R., Feraud, O., Vittet, D., and Baudier, J. (2005). Specific AHNAK expression in brain endothelial cells with barrier properties. *J. Cell. Physiol.* *203*, 362–371.

Gessert, S., and Kuhl, M. (2010). The Multiple Phases and Faces of Wnt Signaling During Cardiac Differentiation and Development. *Circ. Res.* *107*, 186–199.

Giepmans, B.N.G., and van Ijzendoorn, S.C.D. (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 820–831.

Girolami, F., Ho, C.Y., Semsarian, C., Baldi, M., Will, M.L., Baldini, K., Torricelli, F., Yeates, L., Cecchi, F., Ackerman, M.J., et al. (2010). Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J. Am. Coll. Cardiol.* *55*, 1444–1453.

Green, K.J., Getsios, S., Troyanovsky, S., and Godsel, L.M. (2010). Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000125.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., and Robertson, M. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* *66*, 589–600.

Guo, N., Hawkins, C., and Nathans, J. (2004). Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9277–9281.

Gustafson-Wagner, E.A., Sinn, H.W., Chen, Y.-L., Wang, D.-Z., Reiter, R.S., Lin, J.L.-C., Yang, B., Williamson, R.A., Chen, J., Lin, C.-I., et al. (2007). Loss of

mXinalpha, an intercalated disk protein, results in cardiac hypertrophy and cardiomyopathy with conduction defects. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H2680-2692.

Habas, R., Kato, Y., and He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107, 843–854.

Habas, R., Dawid, I.B., and He, X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev.* 17, 295–309.

Hamid, M.S., Norman, M., Quraishi, A., Firoozi, S., Thaman, R., Gimeno, J.R., Sachdev, B., Rowland, E., Elliott, P.M., and McKenna, W.J. (2002). Prospective evaluation of relatives for familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia reveals a need to broaden diagnostic criteria. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 1445–1450.

Haq, S., Michael, A., Andreucci, M., Bhattacharya, K., Dotto, P., Walters, B., Woodgett, J., Kilter, H., and Force, T. (2003). Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4610–4615.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512.

Henderson, D.J., and Anderson, R.H. (2009). The development and structure of the ventricles in the human heart. *Pediatr. Cardiol.* 30, 588–596.

Henderson, D.J., and Chaudhry, B. (2011). Getting to the heart of planar cell polarity signaling. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 91, 460–467.

Hermans, K.C.M., and Blankesteyjn, W.M. (2015). Wnt Signaling in Cardiac Disease. *Compr. Physiol.* 5, 1183–1209.

Hershberger, R.E., Hedges, D.J., and Morales, A. (2013). Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat. Rev. Cardiol.* 10, 531–547.

Hertig, C.M., Eppenberger-Eberhardt, M., Koch, S., and Eppenberger, H.M. (1996a). N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. I. Functional role of N-cadherin and impairment of cell-cell contact by a truncated N-cadherin mutant. *J. Cell Sci.* 109 ( Pt 1), 1–10.

Hertig, C.M., Butz, S., Koch, S., Eppenberger-Eberhardt, M., Kemler, R., and Eppenberger, H.M. (1996b). N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. II. Spatio-temporal appearance of proteins involved in cell-cell contact and communication. Formation of two distinct N-cadherin/catenin complexes. *J. Cell Sci.* 109 ( Pt 1), 11–20.

Hervé, J.-C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D., and Duffy, H.S. (2007). Gap junctional complexes: from partners to functions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94, 29–65.

Hervé, J.-C., Derangeon, M., Sarrouilhe, D., and Bourmeyster, N. (2014). Influence of the scaffolding protein Zonula Occludens (ZOs) on membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 595–604.

Hinoi, T., Yamamoto, H., Kishida, M., Takada, S., Kishida, S., and Kikuchi, A. (2000). Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 275, 34399–34406.

Hirschy, A., Schatzmann, F., Ehler, E., and Perriard, J.-C. (2006a). Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Dev. Biol.* 289, 430–441.

Hirschy, A., Schatzmann, F., Ehler, E., and Perriard, J.-C. (2006b). Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Dev. Biol.* 289, 430–441.

Hirschy, A., Croquelois, A., Perriard, E., Schoenauer, R., Agarkova, I., Hoerstrup, S.P., Taketo, M.M., Pedrazzini, T., Perriard, J.-C., and Ehler, E. (2010). Stabilised beta-catenin in postnatal ventricular myocardium leads to dilated cardiomyopathy and premature death. *Basic Res. Cardiol.* 105, 597–608.

Ho, H.-Y.H., Susman, M.W., Bikoff, J.B., Ryu, Y.K., Jonas, A.M., Hu, L., Kuruvilla, R., and Greenberg, M.E. (2012). Wnt5a-Ror-Dishevelled signaling

constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 4044–4051.

Hocevar, B.A., Mou, F., Rennolds, J.L., Morris, S.M., Cooper, J.A., and Howe, P.H. (2003). Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2). *EMBO J.* 22, 3084–3094.

Hohaus, A., Person, V., Behlke, J., Schaper, J., Morano, I., and Haase, H. (2002). The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels and the actin-based cytoskeleton. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1205–1216.

Honda, T., Yamamoto, H., Ishii, A., and Inui, M. (2010). PDZRN3 negatively regulates BMP-2-induced osteoblast differentiation through inhibition of Wnt signaling. *Mol. Biol. Cell* 21, 3269–3277.

Hong, S., Troyanovsky, R.B., and Troyanovsky, S.M. (2010). Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3528–3533.

Hopyan, S., Sharpe, J., and Yang, Y. (2011). Budding behaviors: Growth of the limb as a model of morphogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 240, 1054–1062.

ter Horst, P., Smits, J.F.M., and Blankestijn, W.M. (2012). The Wnt/Frizzled pathway as a therapeutic target for cardiac hypertrophy: where do we stand? *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 204, 110–117.

Jacoby, D., and McKenna, W.J. (2012). Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* 33, 296–304.

Jarcho, J.A., McKenna, W., Pare, J.A., Solomon, S.D., Holcombe, R.F., Dickie, S., Levi, T., Donis-Keller, H., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (1989). Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N. Engl. J. Med.* 321, 1372–1378.

Jessen, J.R., Topczewski, J., Bingham, S., Sepich, D.S., Marlow, F., Chandrasekhar, A., and Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. *Nat. Cell Biol.* 4, 610–



Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., and Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1172–1183.

Ji, Y.-X., Zhang, P., Zhang, X.-J., Zhao, Y.-C., Deng, K.-Q., Jiang, X., Wang, P.-X., Huang, Z., and Li, H. (2016). The ubiquitin E3 ligase TRAF6 exacerbates pathological cardiac hypertrophy via TAK1-dependent signalling. *Nat. Commun.* 7, 11267.

Jiang, M., Ku, W., Fu, J., Offermanns, S., Hsu, W., and Que, J. (2013). Gpr177 regulates pulmonary vasculature development. *Dev. Camb. Engl.* 140, 3589–3594.

Ju, R., Cirone, P., Lin, S., Griesbach, H., Slusarski, D.C., and Crews, C.M. (2010). Activation of the planar cell polarity formin DAAM1 leads to inhibition of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6906–6911.

Karamitsos, T.D., and Neubauer, S. (2013). The prognostic value of late gadolinium enhancement CMR in nonischemic cardiomyopathies. *Curr. Cardiol. Rep.* 15, 326.

Keller, R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* 298, 1950–1954.

Kibar, Z., Vogan, K.J., Groulx, N., Justice, M.J., Underhill, D.A., and Gros, P. (2001). *Ltap*, a mammalian homolog of *Drosophila Strabismus*/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant *Loop-tail*. *Nat. Genet.* 28, 251–255.

Kikuchi, A., Kishida, S., and Yamamoto, H. (2006). Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp. Mol. Med.* 38, 1–10.

Kikuchi, A., Yamamoto, H., and Kishida, S. (2007). Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell. Signal.* 19, 659–671.

Kimelman, D., and Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482–7491.

Klaus, A., and Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 387–398.

Klaus, A., Saga, Y., Taketo, M.M., Tzahor, E., and Birchmeier, W. (2007). Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18531–18536.

Klymkowsky, M.W., Williams, B.O., Barish, G.D., Varmus, H.E., and Vourgourakis, Y.E. (1999). Membrane-anchored plakoglobins have multiple mechanisms of action in Wnt signaling. *Mol. Biol. Cell* 10, 3151–3169.

Ko, J.-A., Kimura, Y., Matsuura, K., Yamamoto, H., Gondo, T., and Inui, M. (2006). PDZRN3 (LNX3, SEMCAP3) is required for the differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. *J. Cell Sci.* 119, 5106–5113.

Kooistra, M.R.H., Dubé, N., and Bos, J.L. (2007). Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J. Cell Sci.* 120, 17–22.

Kostetskii, I., Li, J., Xiong, Y., Zhou, R., Ferrari, V.A., Patel, V.V., Molkenin, J.D., and Radice, G.L. (2005a). Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ. Res.* 96, 346–354.

Kostetskii, I., Li, J., Xiong, Y., Zhou, R., Ferrari, V.A., Patel, V.V., Molkenin, J.D., and Radice, G.L. (2005b). Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ. Res.* 96, 346–354.

Kühl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., and Moon, R.T. (2000). The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet. TIG* 16, 279–283.

Kumar, N.M., and Gilula, N.B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381–388.

Kusumi, A., Suzuki, K., and Koyasako, K. (1999). Mobility and cytoskeletal interactions of cell adhesion receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 582–590.

Laing, J.G., Saffitz, J.E., Steinberg, T.H., and Yamada, K.A. (2007). Diminished zonula occludens-1 expression in the failing human heart. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 16, 159–164.

Legato, M.J. (1979). Cellular mechanisms of normal growth in the mammalian heart. I. Qualitative and quantitative features of ventricular architecture in the dog from birth to five months of age. *Circ. Res.* *44*, 250–262.

Leo-Macias, A., Agullo-Pascual, E., and Delmar, M. (2016). The cardiac connexome: Non-canonical functions of connexin43 and their role in cardiac arrhythmias. *Semin. Cell Dev. Biol.* *50*, 13–21.

Li, J., Swope, D., Raess, N., Cheng, L., Muller, E.J., and Radice, G.L. (2011). Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of  $\beta$ -catenin signaling. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1134–1144.

Liao, W.-C., Juo, L.-Y., Shih, Y.-L., Chen, Y.-H., and Yan, Y.-T. (2017). HSPB7 prevents cardiac conduction system defect through maintaining intercalated disc integrity. *PLoS Genet.* *13*, e1006984.

Lin, S., Baye, L.M., Westfall, T.A., and Slusarski, D.C. (2010). Wnt5b-Ryk pathway provides directional signals to regulate gastrulation movement. *J. Cell Biol.* *190*, 263–278.

Lock, J.G., and Stow, J.L. (2005). Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1744–1755.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781–810.

Lombardi, R., Dong, J., Rodriguez, G., Bell, A., Leung, T.K., Schwartz, R.J., Willerson, J.T., Brugada, R., and Marian, A.J. (2009). Genetic fate mapping identifies second heart field progenitor cells as a source of adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ. Res.* *104*, 1076–1084.

Longo, K.A., Kennell, J.A., Ochocinska, M.J., Ross, S.E., Wright, W.S., and MacDougald, O.A. (2002). Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. *J. Biol. Chem.* *277*, 38239–38244.

Lopes, L.R., Rahman, M.S., and Elliott, P.M. (2013). A systematic review and meta-analysis of genotype-phenotype associations in patients with hypertrophic

cardiomyopathy caused by sarcomeric protein mutations. *Heart Br. Card. Soc.* 99, 1800–1811.

Lyon, R.C., Zanella, F., Omens, J.H., and Sheikh, F. (2015). Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circ. Res.* 116, 1462–1476.

Ma, X., Takeda, K., Singh, A., Yu, Z.-X., Zerfas, P., Blount, A., Liu, C., Towbin, J.A., Schneider, M.D., Adelstein, R.S., et al. (2009). Conditional ablation of nonmuscle myosin II-B delineates heart defects in adult mice. *Circ. Res.* 105, 1102–1109.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.

Mahmoud, A.I., Kocabas, F., Muralidhar, S.A., Kimura, W., Koura, A.S., Thet, S., Porrello, E.R., and Sadek, H.A. (2013). Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* 497, 249–253.

Mahon, N.G., Murphy, R.T., MacRae, C.A., Caforio, A.L.P., Elliott, P.M., and McKenna, W.J. (2005). Echocardiographic evaluation in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy reveals preclinical disease. *Ann. Intern. Med.* 143, 108–115.

Malekar, P., Hagenmueller, M., Anyanwu, A., Buss, S., Streit, M.R., Weiss, C.S., Wolf, D., Riffel, J., Bauer, A., Katus, H.A., et al. (2010). Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 55, 939–945.

Manisastry, S.M., Zaal, K.J.M., and Horowitz, R. (2009). Myofibril assembly visualized by imaging N-RAP, alpha-actinin, and actin in living cardiomyocytes. *Exp. Cell Res.* 315, 2126–2139.

Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J., et al. (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1603–1608.

Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D., and Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr. Biol.* CB 12, 876–884.

Maron, B.J., Towbin, J.A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A.J., Seidman, C.E., Young, J.B., American Heart Association, et al. (2006). Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113, 1807–1816.

Marvin, M.J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S.M., and Lassar, A.B. (2001). Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* 15, 316–327.

Masuelli, L., Bei, R., Sacchetti, P., Scappaticci, I., Francalanci, P., Albonici, L., Coletti, A., Palumbo, C., Minieri, M., Fiaccavento, R., et al. (2003). Beta-catenin accumulates in intercalated disks of hypertrophic cardiomyopathic hearts. *Cardiovasc. Res.* 60, 376–387.

Matsuda, T., Takahashi, K., Nariai, T., Ito, T., Takatani, T., Fujio, Y., and Azuma, J. (2005). N-cadherin-mediated cell adhesion determines the plasticity for cell alignment in response to mechanical stretch in cultured cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 228–232.

Matsui, T., Raya, A., Kawakami, Y., Callol-Massot, C., Capdevila, J., Rodríguez-Esteban, C., and Izpisua Belmonte, J.C. (2005). Noncanonical Wnt signaling regulates midline convergence of organ primordia during zebrafish development. *Genes Dev.* 19, 164–175.

Mayosi, B.M., Fish, M., Shaboodien, G., Mastantuono, E., Kraus, S., Wieland, T., Kotta, M.-C., Chin, A., Laing, N., Ntusi, N.B.A., et al. (2017). Identification of Cadherin 2 (CDH2) Mutations in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 10.

McKenna, W.J., Spirito, P., Desnos, M., Dubourg, O., and Komajda, M. (1997). Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families. *Heart Br. Card. Soc.* 77, 130–132.

McKinsey, T.A., and Kass, D.A. (2007). Small-molecule therapies for cardiac hypertrophy: moving beneath the cell surface. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 617–635.

Meder, B., Rühle, F., Weis, T., Homuth, G., Keller, A., Franke, J., Peil, B., Lorenzo Bermejo, J., Frese, K., Hüge, A., et al. (2014). A genome-wide association study identifies 6p21 as novel risk locus for dilated cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* 35, 1069–1077.

Melendez, J., Welch, S., Schaefer, E., Moravec, C.S., Avraham, S., Avraham, H., and Sussman, M.A. (2002). Activation of pyk2/related focal adhesion tyrosine kinase and focal adhesion kinase in cardiac remodeling. *J. Biol. Chem.* 277, 45203–45210.

Montcouquiol, M., Rachel, R.A., Lanford, P.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Kelley, M.W. (2003). Identification of *Vangl2* and *Scrb1* as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423, 173–177.

Morales, A., and Hershberger, R.E. (2013). Genetic evaluation of dilated cardiomyopathy. *Curr. Cardiol. Rep.* 15, 375.

Murdoch, J.N., Doudney, K., Paternotte, C., Copp, A.J., and Stanier, P. (2001). Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of *Lpp1*, a novel gene involved in floor plate specification. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2593–2601.

Murdoch, J.N., Henderson, D.J., Doudney, K., Gaston-Massuet, C., Phillips, H.M., Paternotte, C., Arkell, R., Stanier, P., and Copp, A.J. (2003). Disruption of scribble (*Scrb1*) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Hum. Mol. Genet.* 12, 87–98.

Murphy, R.T., Thaman, R., Blanes, J.G., Ward, D., Sevdalis, E., Papra, E., Kiotsekoglou, A., Kiotsekoglou, A., Tome, M.T., Pellerin, D., et al. (2005). Natural history and familial characteristics of isolated left ventricular non-compaction. *Eur. Heart J.* 26, 187–192.

Myers, D.C., Sepich, D.S., and Solnica-Krezel, L. (2002). Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity? *Trends Genet.* TIG 18, 447–455.

Nagy, I.I., Railo, A., Rapila, R., Hast, T., Sormunen, R., Tavi, P., Räsänen, J., and Vainio, S.J. (2010). Wnt-11 signalling controls ventricular myocardium

development by patterning N-cadherin and beta-catenin expression. *Cardiovasc. Res.* 85, 100–109.

Naito, A.T., Shiojima, I., Akazawa, H., Hidaka, K., Morisaki, T., Kikuchi, A., and Komuro, I. (2006). Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19812–19817.

Nava, A., Bauce, B., Basso, C., Muriago, M., Rampazzo, A., Villanova, C., Daliento, L., Buja, G., Corrado, D., Danieli, G.A., et al. (2000). Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 2226–2233.

Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483–1487.

Niessen, C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2525–2532.

Noorman, M., van der Heyden, M.A.G., van Veen, T.A.B., Cox, M.G.P.J., Hauer, R.N.W., de Bakker, J.M.T., and van Rijen, H.V.M. (2009). Cardiac cell-cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 23–31.

Norton, N., Li, D., Rampersaud, E., Morales, A., Martin, E.R., Zuchner, S., Guo, S., Gonzalez, M., Hedges, D.J., Robertson, P.D., et al. (2013). Exome sequencing and genome-wide linkage analysis in 17 families illustrate the complex contribution of TTN truncating variants to dilated cardiomyopathy. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6, 144–153.

Odland, G.F. (1958). The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 529–538.

Palatinus, J.A., O’Quinn, M.P., Barker, R.J., Harris, B.S., Jourdan, J., and Gourdie, R.G. (2011). ZO-1 determines adherens and gap junction localization at intercalated disks. *AJP Heart Circ. Physiol.* 300, H583–H594.

Palatinus, J.A., Rhett, J.M., and Gourdie, R.G. (2012). The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1831–

1843.

Pandur, P., Maurus, D., and Kühl, M. (2002). Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 24, 881–884.

Pannekoek, W.-J., Kooistra, M.R.H., Zwartkruis, F.J.T., and Bos, J.L. (2009). Cell-cell junction formation: the role of Rap1 and Rap1 guanine nucleotide exchange factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 790–796.

Park, T.J., Gray, R.S., Sato, A., Habas, R., and Wallingford, J.B. (2005). Subcellular localization and signaling properties of dishevelled in developing vertebrate embryos. *Curr. Biol. CB* 15, 1039–1044.

Perez, T.D., Tamada, M., Sheetz, M.P., and Nelson, W.J. (2008). Immediate-early signaling induced by E-cadherin engagement and adhesion. *J. Biol. Chem.* 283, 5014–5022.

Perriard, J.-C., Hirschy, A., and Ehler, E. (2003). Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc. Med.* 13, 30–38.

Peters, N.S., Severs, N.J., Rothery, S.M., Lincoln, C., Yacoub, M.H., and Green, C.R. (1994). Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium. *Circulation* 90, 713–725.

Phillips, H.M., Rhee, H.J., Murdoch, J.N., Hildreth, V., Peat, J.D., Anderson, R.H., Copp, A.J., Chaudhry, B., and Henderson, D.J. (2007). Disruption of planar cell polarity signaling results in congenital heart defects and cardiomyopathy attributable to early cardiomyocyte disorganization. *Circ. Res.* 101, 137–145.

Phillips, H.M., Hildreth, V., Peat, J.D., Murdoch, J.N., Kobayashi, K., Chaudhry, B., and Henderson, D.J. (2008). Non-cell-autonomous roles for the planar cell polarity gene *Vangl2* in development of the coronary circulation. *Circ. Res.* 102, 615–623.

Pieperhoff, S., and Franke, W.W. (2007). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adhaerens junction components - late processes in



mammalian heart development. *Eur. J. Cell Biol.* 86, 377–391.

Pongracz, J.E., and Stockley, R.A. (2006). Wnt signalling in lung development and diseases. *Respir. Res.* 7, 15.

Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078–1080.

Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, T., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trümper, L., and Binder, C. (2006). Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5454–5459.

Qu, J., Zhou, J., Yi, X.P., Dong, B., Zheng, H., Miller, L.M., Wang, X., Schneider, M.D., and Li, F. (2007). Cardiac-specific haploinsufficiency of beta-catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal gene expression in response to aortic constriction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 319–326.

Quarta, G., Sado, D.M., and Moon, J.C. (2011). Cardiomyopathies: focus on cardiovascular magnetic resonance. *Br. J. Radiol.* 84 *Spec No 3*, S296-305.

Raghow, R. (2016). An “Omics” Perspective on Cardiomyopathies and Heart Failure. *Trends Mol. Med.* 22, 813–827.

Ragni, C.V., Diguët, N., Le Garrec, J.-F., Novotova, M., Resende, T.P., Pop, S., Charon, N., Guillemot, L., Kitasato, L., Badouel, C., et al. (2017). *Amotl1* mediates sequestration of the Hippo effector Yap1 downstream of Fat4 to restrict heart growth. *Nat. Commun.* 8, 14582.

Rangrez, A.Y., Eden, M., Poyanmehr, R., Kuhn, C., Stiebeling, K., Dierck, F., Bernt, A., Lüllmann-Rauch, R., Weiler, H., Kirchof, P., et al. (2016). Myozap Deficiency Promotes Adverse Cardiac Remodeling via Differential Regulation of Mitogen-activated Protein Kinase/Serum-response Factor and  $\beta$ -Catenin/GSK-3 $\beta$  Protein Signaling. *J. Biol. Chem.* 291, 4128–4143.

Rapezzi, C., Arbustini, E., Caforio, A.L.P., Charron, P., Gimeno-Blanes, J., Heliö, T., Linhart, A., Mogensen, J., Pinto, Y., Ristic, A., et al. (2013). Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final

diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* 34, 1448–1458.

Rayns, D.G., Simpson, F.O., and Ledingham, J.M. (1969). Ultrastructure of desmosomes in mammalian intercalated disc; appearances after lanthanum treatment. *J. Cell Biol.* 42, 322–326.

Rhett, J.M., Jourdan, J., and Gourdie, R.G. (2011). Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol. Biol. Cell* 22, 1516–1528.

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50, 649–657.

Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761–771.

Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C.N., and Singh, R. (2010). Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol. Res.* 61, 269–280.

Romero, J., Mejia-Lopez, E., Manrique, C., and Lucariello, R. (2013). Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC/D): A Systematic Literature Review. *Clin. Med. Insights Cardiol.* 7, 97–114.

Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731–1734.

Rucker-Martin, C., Milliez, P., Tan, S., Decrouy, X., Recouvreux, M., Vranckx, R., Delcayre, C., Renaud, J.-F., Dunia, I., Segretain, D., et al. (2006). Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts. *Cardiovasc. Res.* 72, 69–79.

Salameh, A., Wustmann, A., Karl, S., Blanke, K., Apel, D., Rojas-Gomez, D., Franke, H., Mohr, F.W., Janousek, J., and Dhein, S. (2010). Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein

connexin43. *Circ. Res.* 106, 1592–1602.

Schinner, C., Vielmuth, F., Rötzer, V., Hiermaier, M., Radeva, M.Y., Co, T.K., Hartlieb, E., Schmidt, A., Imhof, A., Messoudi, A., et al. (2017). Adrenergic Signaling Strengthens Cardiac Myocyte Cohesion. *Circ. Res.* 120, 1305–1317.

Seifert, J.R.K., and Mlodzik, M. (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat. Rev. Genet.* 8, 126–138.

Sewduth, R.N., Jaspard-Vinassa, B., Peghaire, C., Guillabert, A., Franzl, N., Larrieu-Lahargue, F., Moreau, C., Fruttiger, M., Dufourcq, P., Couffignal, T., et al. (2014). The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nat. Commun.* 5, 4832.

Sewduth, R.N., Kovacic, H., Jaspard-Vinassa, B., Jecko, V., Wavasseur, T., Fritsch, N., Pernot, M., Jeaningros, S., Roux, E., Dufourcq, P., et al. (2017). PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKC $\zeta$ -containing polarity complex to increase vascular permeability. *Sci. Signal.* 10.

Shaw, R.M., Fay, A.J., Puthenveedu, M.A., von Zastrow, M., Jan, Y.-N., and Jan, L.Y. (2007). Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell* 128, 547–560.

Sheikh, F., Chen, Y., Chen, Y., Liang, X., Hirschy, A., Stenbit, A.E., Gu, Y., Dalton, N.D., Yajima, T., Lu, Y., et al. (2006).  $\alpha$ -E-catenin inactivation disrupts the cardiomyocyte adherens junction, resulting in cardiomyopathy and susceptibility to wall rupture. *Circulation* 114, 1046–1055.

Sinn, H.W., Balsamo, J., Lilien, J., and Lin, J.J.-C. (2002). Localization of the novel Xin protein to the adherens junction complex in cardiac and skeletal muscle during development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 225, 1–13.

Somekawa, S., Fukuhara, S., Nakaoka, Y., Fujita, H., Saito, Y., and Mochizuki, N. (2005). Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 97, 655–662.

Srivastava, D. (2006). Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 126, 1037–1048.

Strutt, D. (2003). Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 4501–4513.

Sturm, A.C. (2013). Genetic testing in the contemporary diagnosis of cardiomyopathy. *Curr. Heart Fail. Rep.* *10*, 63–72.

Tahinci, E., Thorne, C.A., Franklin, J.L., Salic, A., Christian, K.M., Lee, L.A., Coffey, R.J., and Lee, E. (2007). *Lrp6* is required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 4095–4106.

Takanari, H., Bourgonje, V.J.A., Fontes, M.S.C., Raaijmakers, A.J.A., Driessen, H., Jansen, J.A., van der Nagel, R., Kok, B., van Stuijvenberg, L., Boulaksil, M., et al. (2016). Calmodulin/CaMKII inhibition improves intercellular communication and impulse propagation in the heart and is antiarrhythmic under conditions when fibrosis is absent. *Cardiovasc. Res.* *111*, 410–421.

Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M., and Peifer, M. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 91–100.

Thiene, G., Nava, A., Corrado, D., Rossi, L., and Pennelli, N. (1988). Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N. Engl. J. Med.* *318*, 129–133.

Tissir, F., and Goffinet, A.M. (2010). Planar cell polarity signaling in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *20*, 572–577.

Tolwinski, N.S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., DiNardo, S., and Wieschaus, E. (2003). Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity. *Dev. Cell* *4*, 407–418.

Troyanovsky, R.B., Laur, O., and Troyanovsky, S.M. (2007). Stable and unstable cadherin dimers: mechanisms of formation and roles in cell adhesion. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4343–4352.

Tzahor, E., and Lassar, A.B. (2001). Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes Dev.* *15*, 255–260.

Ueno, S., Weidinger, G., Osugi, T., Kohn, A.D., Golob, J.L., Pabon, L., Reinecke, H., Moon, R.T., and Murry, C.E. (2007). Biphasic role for Wnt/beta-catenin

signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9685–9690.

Van Breemen, V.L. (1953). Intercalated discs in heart muscle studied with the electron microscope. *Anat. Rec.* 117, 49–63.

Van Kempen, M.J., Vermeulen, J.L., Moorman, A.F., Gros, D., Paul, D.L., and Lamers, W.H. (1996). Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA distribution patterns in the rat heart. *Cardiovasc. Res.* 32, 886–900.

Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell* 5, 367–377.

Vermij, S.H., Abriel, H., and van Veen, T.A.B. (2017). Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. *Cardiovasc. Res.* 113, 259–275.

Villard, E., Perret, C., Gary, F., Proust, C., Dilanian, G., Hengstenberg, C., Ruppert, V., Arbustini, E., Wichter, T., Germain, M., et al. (2011). A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* 32, 1065–1076.

Vlad, A., Röhrs, S., Klein-Hitpass, L., and Müller, O. (2008). The first five years of the Wnt targetome. *Cell. Signal.* 20, 795–802.

Vreeker, A., van Stuijvenberg, L., Hund, T.J., Mohler, P.J., Nikkels, P.G.J., and van Veen, T.A.B. (2014). Assembly of the cardiac intercalated disk during pre- and postnatal development of the human heart. *PloS One* 9, e94722.

Wallingford, J.B., Rowning, B.A., Vogeli, K.M., Rothbacher, U., Fraser, S.E., and Harland, R.M. (2000). Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 405, 81–85.

Wang, Y., and Nathans, J. (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Dev. Camb. Engl.* 134, 647–658.

Wang, Q., Lin, J.L.-C., Wu, K.-H., Wang, D.-Z., Reiter, R.S., Sinn, H.W., Lin, C.-I., and Lin, C.-J.J. (2012). Xin proteins and intercalated disc maturation, signaling and diseases. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 17, 2566–2593.

Watkins, H., Ashrafian, H., and Redwood, C. (2011). Inherited cardiomyopathies. *N. Engl. J. Med.* *364*, 1643–1656.

Willis, M.S., Ike, C., Li, L., Wang, D.-Z., Glass, D.J., and Patterson, C. (2007). Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ. Res.* *100*, 456–459.

Willis, M.S., Schisler, J.C., Portbury, A.L., and Patterson, C. (2009). Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. *Cardiovasc. Res.* *81*, 439–448.

Willis, M.S., Bevilacqua, A., Pulinilkunnil, T., Kienesberger, P., Tannu, M., and Patterson, C. (2014). The role of ubiquitin ligases in cardiac disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *71*, 43–53.

Xiao, K., Oas, R.G., Chiasson, C.M., and Kowalczyk, A.P. (2007). Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 8–16.

Xu, Q., Dewey, S., Nguyen, S., and Gomes, A.V. (2010). Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 899–909.

Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* *178*, 517–527.

Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., and Nelson, W.J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* *123*, 889–901.

Yamane, M., Matsuda, T., Ito, T., Fujio, Y., Takahashi, K., and Azuma, J. (2007). Rac1 activity is required for cardiac myocyte alignment in response to mechanical stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *353*, 1023–1027.

Yancey, S.B., John, S.A., Lal, R., Austin, B.J., and Revel, J.P. (1989). The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology, and functional domains. *J. Cell Biol.* *108*, 2241–2254.

Yang, Y., and Mlodzik, M. (2015). Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind (Wnt). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *31*, 623–646.

Yang, Z., Bowles, N.E., Scherer, S.E., Taylor, M.D., Kearney, D.L., Ge, S., Nadvoretzkiy, V.V., DeFreitas, G., Carabello, B., Brandon, L.I., et al. (2006). Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ. Res.* 99, 646–655.

Yap, A.S., Niessen, C.M., and Gumbiner, B.M. (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J. Cell Biol.* 141, 779–789.

Yates, L.L., and Dean, C.H. (2011). Planar polarity: A new player in both lung development and disease. *Organogenesis* 7, 209–216.

Yin, C., Ciruna, B., and Solnica-Krezel, L. (2009). Convergence and extension movements during vertebrate gastrulation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 89, 163–192.

Yoshida, M., Ohkusa, T., Nakashima, T., Takanari, H., Yano, M., Takemura, G., Honjo, H., Kodama, I., Mizukami, Y., and Matsuzaki, M. (2011). Alterations in adhesion junction precede gap junction remodelling during the development of heart failure in cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc. Res.* 92, 95–105.

Zallen, J.A. (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* 129, 1051–1063.

Zemljic-Harpf, A.E., Godoy, J.C., Platoshyn, O., Asfaw, E.K., Busija, A.R., Domenighetti, A.A., and Ross, R.S. (2014). Vinculin directly binds zonula occludens-1 and is essential for stabilizing connexin-43-containing gap junctions in cardiac myocytes. *J. Cell Sci.* 127, 1104–1116.

Zhang, S.-S., and Shaw, R.M. (2014). Trafficking highways to the intercalated disc: new insights unlocking the specificity of connexin 43 localization. *Cell Commun. Adhes.* 21, 43–54.

Zhang, J.Q., Elzey, B., Williams, G., Lu, S., Law, D.J., and Horowitz, R. (2001). Ultrastructural and biochemical localization of N-RAP at the interface between myofibrils and intercalated disks in the mouse heart. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 14898–14906.

Zhang, Z., Deb, A., Zhang, Z., Pachori, A., He, W., Guo, J., Pratt, R., and Dzau, V.J. (2009). Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by

blocking the effect of canonical Wnt3a. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *46*, 370–377.

Zhou, J., Qu, J., Yi, X.P., Graber, K., Huber, L., Wang, X., Gerdes, A.M., and Li, F. (2007). Upregulation of gamma-catenin compensates for the loss of beta-catenin in adult cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *292*, H270-276.

Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A. (2000). Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4238–4252.



## VASCULAR BIOLOGY

# PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKC $\zeta$ -containing polarity complex to increase vascular permeability

Raj N. Sewduth,<sup>1,2</sup> H el ena Kovacic,<sup>1</sup> B eatrice Jaspard-Vinassa,<sup>1</sup> Vincent Jecko,<sup>3</sup> Thomas Wavasseur,<sup>3</sup> Nicolas Fritsch,<sup>1</sup> Mathieu Pernot,<sup>1,4</sup> Sylvie Jeaningros,<sup>1</sup> Etienne Roux,<sup>1</sup> Pascale Dufourcq,<sup>1</sup> Thierry Couffinal,<sup>1,4\*</sup> C ecile Dupl aa<sup>1\*†</sup>

2017   The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science.

Endothelial cells serve as a barrier between blood and tissues. Maintenance of the endothelial cell barrier depends on the integrity of intercellular junctions, which is regulated by a polarity complex that includes the  $\zeta$  isoform of atypical protein kinase C (PKC $\zeta$ ) and partitioning defective 3 (PAR3). We revealed that the E3 ubiquitin ligase PDZ domain-containing ring finger 3 (PDZRN3) regulated endothelial intercellular junction integrity. Endothelial cell-specific overexpression of *Pdzrn3* led to early embryonic lethality with severe hemorrhaging and altered organization of endothelial intercellular junctions. Conversely, endothelial-specific loss of *Pdzrn3* prevented vascular leakage in a mouse model of transient ischemic stroke, an effect that was mimicked by pharmacological inhibition of PKC $\zeta$ . PDZRN3 regulated Wnt signaling and associated with a complex containing PAR3, PKC $\zeta$ , and the multi-PDZ domain protein MUPP1 (Discs Lost–multi-PDZ domain protein 1) and targeted MUPP1 for proteasomal degradation in transfected cells. Transient ischemic stroke increased the ubiquitination of MUPP1, and deficiency of MUPP1 in endothelial cells was associated with decreased localization of PKC $\zeta$  and PAR3 at intercellular junctions. In endothelial cells, *Pdzrn3* overexpression increased permeability through a PKC $\zeta$ -dependent pathway. In contrast, *Pdzrn3* depletion enhanced PKC $\zeta$  accumulation at cell-cell contacts and reinforced the cortical actin cytoskeleton under stress conditions. These findings reveal how PDZRN3 regulates vascular permeability through a PKC $\zeta$ -containing complex.

## INTRODUCTION

Cell-cell junctions are important gatekeepers in the maintenance of adhesion and barrier properties of endothelial cell monolayers. Regulation of cell-cell contact is essential for physiological processes including vascular development, tissue regeneration, and organ morphogenesis (1). Disruption of cell-cell contacts is associated with human diseases including edema, ischemia, and inflammation.

The integrity of endothelium is mediated by adhesive interactions between endothelial cells, which involve adherens junctions and tight junctions (2). Tight junctions seal endothelial cells to create a primary barrier and maintain cell polarity. At the molecular level, tight junctions are primarily composed of claudin (3), occludin, and junctional adhesion molecule family members. They are linked to the cytoskeleton and adherens junction by adaptor molecules, including postsynaptic density-95/disc large/zona occludens 1 (ZO1) (PDZ) proteins. Tight junctions are regulated by two protein complexes: one containing Pals1 (protein associated with Lin seven), PATJ (PALS-1-associated tight junction protein) or its paralog MUPP1 (Discs Lost–multi PDZ domain protein 1) (4, 5), and PAR3 (partitioning defective 3), and the other containing PAR3, PAR6, and aPKC (6, 7). In epithelial cells, these complexes maintain apical-basal polarity, maintain the integrity of tight junction complexes, and act as anchor proteins, recruiting other proteins to cell junctions (8–10). However, the molecular mechanisms by which endothelial tight junctions are maintained in specialized areas remain largely unknown.

Wnt signaling is crucial to vascular formation and endothelial cell functional differentiation (11). At the cellular level, Wnt signaling is facilitated through activation of the canonical pathway, which leads to the stabilization of  $\beta$ -catenin, and the noncanonical Wnt-Ca<sup>2+</sup> and Wnt-planar cell polarity (PCP) pathways (12). Initially identified as a signaling mechanism promoting polarization and organization of cells within the plane of the epithelium (12, 13), the Wnt-PCP pathway plays a role in endothelial cell reorganization and directional migration (14) and acts through adherens junction stabilization during lymphatic valve formation (15). Many conserved downstream effectors of PCP signaling, including the small guanosine triphosphatases Rho, Rac, and Cdc42 and c-Jun N-terminal kinase (JNK), participate in the regulation of adherens junction and tight junction formation and maturation (16–18). However, the mechanistic link between activation of PCP signaling, downstream effector activation, and fine intercellular junction organization and stabilization is poorly understood. In cultured brain endothelial cells, the Wnt-PCP signaling pathway regulates the formation of tight junctions by recruitment of molecules involved in the formation of cell polarity, such as PAR3 and aPKC (19). These findings suggest that Wnt-PCP signaling may regulate junction protein clustering to maintain polarized organization of endothelial cells during vascular morphogenesis in vertebrates.

Our group has shown that the E3 ubiquitin ligase PDZ domain-containing ring finger 3 (PDZRN3) drives noncanonical Wnt-PCP signaling to regulate polarized migration of endothelial cells and vascular morphogenesis (20). Here, we investigated whether PDZRN3 contributed to the regulation of endothelial junction stability with in vivo and in vitro endothelial cell-specific *Pdzrn3* gain- and loss-of-function approaches. Our data demonstrated that endothelial cell-specific *Pdzrn3* overexpression induced severe hemorrhage in embryos, and conversely, endothelial cell-specific *Pdzrn3* depletion reduced rupture of the blood-brain barrier (BBB) and, consequently, edema

<sup>1</sup>Univ. Bordeaux, Inserm, UMR1034, Biology of Cardiovascular Diseases, F-33600 Pessac, France. <sup>2</sup>Laboratorium voor Endotheliale Moleculaire Biologie (Vesalius Research Center), 3000 Leuven, Belgium. <sup>3</sup>CHU de Bordeaux, Service de Neurochirurgie, Bordeaux F-33000, France. <sup>4</sup>CHU de Bordeaux, Service des Maladies Cardiaques et Vasculaires, F-33600 Pessac, France.

\*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: cecile.dupl aa@inserm.fr

formation in an adult mouse model of stroke after middle cerebral artery occlusion (MCAO). We found that PDZRN3 regulated Wnt signaling and interacted with the polarity proteins PAR3, PKC $\zeta$ , and MUPP1 at endothelial cell junctions to regulate tight junction stabilization. Elucidating a molecular link between Wnt-PCP signaling and polarity protein complexes may provide the basis for further understanding the process of turnover and signaling of cell adhesion molecules.

## RESULTS

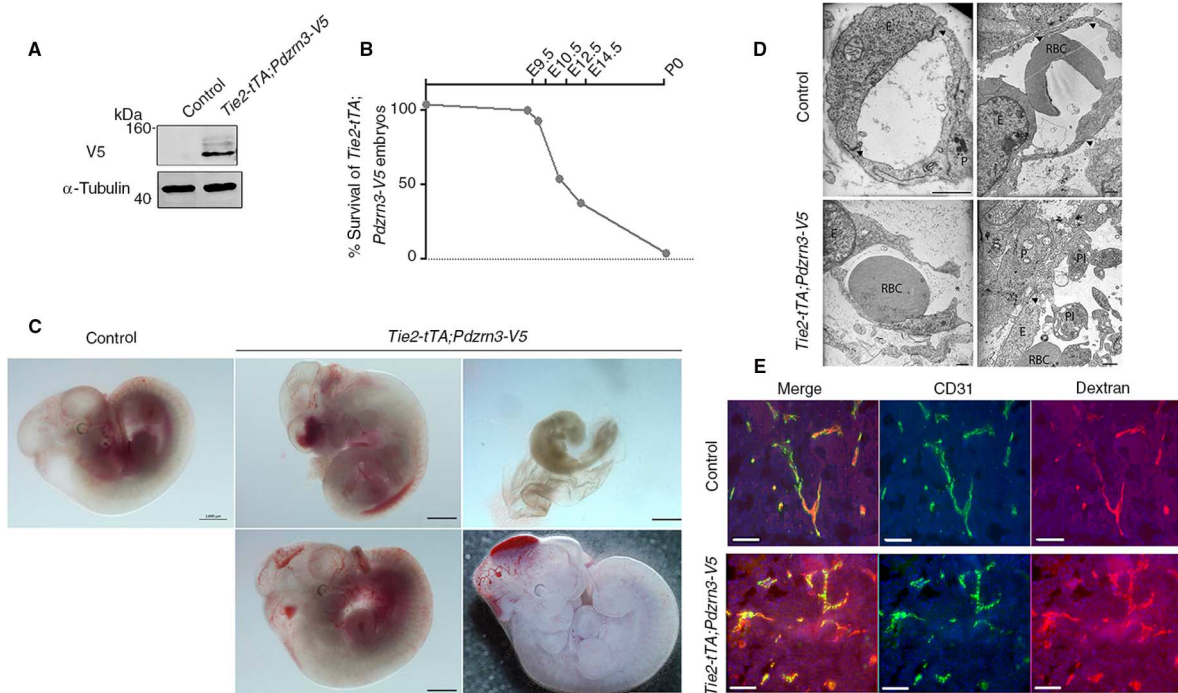
### Overexpression of *Pdzrn3* induced vascular leakage, leading to early embryonic lethality

To investigate the functional role of PDZRN3 signaling on vascular integrity, we selectively induced *Pdzrn3* expression in endothelial cells by crossing transgenic mice, which express the transcriptional activator *tTA* under the control of the *Tie2* promoter (*Tie2-tTA*), with reporter mice, which harbor a bidirectional Tet-promoter cassette with genes for PDZRN3-V5 and  $\beta$ -galactosidase (*Tie2-tTA;Pdzrn3-V5*). Efficient transactivation was verified by  $\beta$ -galactosidase staining and Western blotting for PDZRN3-V5 expression in heterozygous mouse embryos (Fig. 1A and fig. S1A). No *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* pups were produced, suggesting that *Pdzrn3* overexpression was embryonically lethal. Genotypic analysis demonstrated no overt defect until embryonic day 9.5 (E9.5), and by E15.5, all mutants were resorbed (Fig. 1B). Upon further

dissection, abnormal *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* embryos exhibited a hemorrhagic phenotype at E10.5, in which fetal blood had hemorrhaged into the lumen of cephalic ventricles (Fig. 1C).

We compared the whole-mount CD31 staining pattern of wild-type and *Pdzrn3*-overexpressing mutant embryos at E10.5. During this developmental period, the vascular plexus appeared to be developed in *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* and wild-type embryos. However, upon closer examination, we observed enlargement of cranial vessels, indicating defects in vessel maturation (fig. S1B). Hemorrhages were not seen in the yolk sac, but embryonic vessels appeared dilated in mutant embryos with a hemorrhagic phenotype. In addition, some embryonic vessels in the labyrinth of the placenta exhibited a leaky phenotype (fig. S1C).

We examined brain embryos by electron microscopy and reported that, in control embryos, endothelial cells formed in linear junctions with red blood cells contained in blood vessels (Fig. 1D). The vessels had mature endothelial cell junctions, and endothelial cells are interconnected with overlapping flaps in their luminal surface. Moreover, pericytes were closely associated with the microvascular endothelium and had long, narrow cytoplasmic extensions surrounding the endothelial cells. In the *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* embryos, some cytoplasmic regions of endothelial cells appeared to be thinner, and there were ruptures visible in the junctions between endothelial cells, along with evidence of red blood cell extravasation. In contrast to control embryos, endothelial cells in these mutant embryos had large vacuoles in the cytoplasm, had visible ruptures in the luminal portion of the cytoplasm, and were



**Fig. 1. Overexpression of *Pdzrn3-V5* in EC induces early embryo lethality and vascular dysfunction.** (A) Lysates of *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* (V5) and control embryo heads at E10.5 were analyzed by immunoblotting using indicated antibodies and representative of three independent experiments. (B) To determine the stage of embryonic lethality, timed pregnancies were performed, and embryos were isolated and genotyped at various stages of gestation. Embryo numbers were  $n = 31$  at E9.5,  $n = 34$  at E10.5,  $n = 12$  at E11.5,  $n = 9$  at E14.5, and  $n = 27$  at P0. (C) Representative images showing the gross phenotypes of *Pdzrn3-V5*-overexpressing ( $n = 3$ ) and control ( $n = 3$ ) embryos. Mutant embryos exhibited hemorrhage-filling ventricles at E10.5. Scale bars, 1  $\mu$ m. (D) Representative electron microscopy images of E10.5 embryo cerebral microvessels from *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* ( $n = 3$ ) and control ( $n = 3$ ) embryos. In *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* embryos, rupture of endothelium was seen, and large cytosolic vacuoles were detected in the cytoplasm of the cells. E, endothelial cells; RBC, red blood cells; Pl, platelets; P, pericyte. Scale bars, 1  $\mu$ m. Representative of three control and three *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* embryos. (E) Representative images of leakage from brain cortical vessels *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* and control embryos injected in utero with dextran tracer (red) at E14.5. Capillaries were labeled with CD31 antibody (green). Scale bars, 50  $\mu$ m. Data are representative of two independent experiments.

poorly covered by pericyte processes (Fig. 1D). These data confirm that endothelial cells were dysfunctional in *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* embryos and that the barrier function of the neurovascular unit was not well maintained. Tracer experiments performed in E14.5 embryos that received intracardiac injection of 10-kDa rhodamine dextran showed that, although the tracer was contained to brain vessels of control mice, it was extravasated in the parenchymal tissues of *Tie2-tTA;Pdzrn3-V5* mutant mice (Fig. 1E). These results revealed that the endothelial cell barrier function was perturbed in mutant mice and confirmed the hypothesis that PDZRN3 signaling alters organization of junction complexes during vessel formation between E10.5 and E14.5.

### Loss of *Pdzrn3* reduced BBB disruption in a stroke model of MCAO

Disruption of tight junctions leads to impaired BBB function. We surmised that the loss of *Pdzrn3* could strengthen tight junctions and reduce vessel permeability in a mouse model of stroke because PDZRN3 is detected in brain endothelial cells by immunofluorescence analysis (fig. S2). To confirm this hypothesis, we used mice with an endothelial cell-specific deletion of *Pdzrn3* (*Pdzrn3<sup>iECKO</sup>*), which was achieved by crossing *Pdzrn3* conditional knockout (*Pdzrn3<sup>fl/fl</sup>*) mice (20) with Pdgf tamoxifen-inducible Cre<sup>+/-</sup> mice (*Pdgfb-ICreER*) (21). Because *Pdzrn3* deletion impaired precocious events during vessel morphogenesis (20), we depleted *Pdzrn3* in adult *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* mice and verified depletion by immunofluorescence analysis of isolated kidney endothelial cells (fig. S3A) and by Western blot analysis of brain lysates from *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* and *Pdzrn3<sup>iECWT</sup>* mice (fig. S3B). One month after tamoxifen treatment, micro-computed tomography (micro-CT) was performed to image the whole-brain vascular network and verify that *Pdzrn3* depletion did not induce any vascular modification under basal conditions (fig. S4).

Tamoxifen-treated mice were subjected to occlusion of the middle cerebral artery followed by a reperfusion period. Vascular damage to the BBB was analyzed by the injection of 70-kDa fluorescein isothiocyanate-conjugated dextran (FITC dextran) 2 hours after reperfusion. This tracer leaked into the brain interstitial space about 10 min after injection in the injured hemisphere, whereas none leaked into the contralateral hemisphere (Fig. 2A). We noted that significantly less tracer leaked in *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* mice than in *Pdzrn3<sup>iECWT</sup>* mice (Fig. 2A). To measure BBB integrity, the amount of Evans Blue dye extravasation was analyzed 6 and 24 hours after reperfusion. Consistently, the quantity of Evans Blue dye content in the injured hemisphere was significantly reduced in *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* mice compared to control mice at both time points (Fig. 2B). To confirm these observations, we performed mouse immunoglobulin G (IgG) staining of brains of mice subjected to MCAO. The area of extravasation in the infarcted hemisphere was significantly decreased in *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* mice compared to that in control *Pdzrn3<sup>iECWT</sup>* mice (Fig. 2C). These results demonstrated that loss of *Pdzrn3* limits BBB breakdown and leakage after transient MCAO.

### *Pdzrn3* deletion impaired disassembly of ZO1 and c-Jun from tight junction complexes

To study the molecular mechanisms involved in mediating the protective effect of *Pdzrn3* deletion on BBB disruption, we used a biochemical fractionation protocol (22) that enriches microvessels on infarcted and contralateral brain hemispheres. Because different *Wnt* genes have been reported to be involved during brain vascular formation and maintenance, we analyzed whether they were induced 6 hours after MCAO injury. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed a significant increase in the abundance of

*Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt7a*, and *Wnt7b* in both *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* and *Pdzrn3<sup>iECWT</sup>* microvessel-enriched fractions (fig. S5), suggesting that Wnt signaling could be activated during stroke. We also found that phosphorylation of c-Jun and PKC $\zeta$  was increased after 6 hours of reperfusion in *Pdzrn3<sup>iECWT</sup>* vessel lysates from the infarcted hemisphere, as compared to the control hemisphere (Fig. 3A). In *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* mutants, endothelial depletion of *Pdzrn3* impaired the increase in phosphorylation of both c-Jun and PKC $\zeta$ , providing further evidence that PDZRN3 signaling is required for c-Jun and PKC $\zeta$  activation in endothelial cells after MCAO injury.

Canonical Wnt signaling controls BBB integrity and organization of endothelial intercellular junctions through  $\beta$ -catenin stabilization and induction of claudin protein (23, 24). After injury, a decrease in Ve-cadherin at cell-cell junctions correlates with an accumulation of phosphorylated  $\beta$ -catenin and forkhead box protein O1 (FOXO1) in the nucleus where they repress the expression of the claudin 5 gene in tight junctions. Conversely, under resting conditions, Ve-cadherin limits endothelial cell permeability by maintaining a pool of  $\beta$ -catenin at the cell-cell junctions and localization of the transcriptional factor FOXO1 in the cytosol, in a phosphorylated inactive form (25). Thus, we measured the fraction of phosphorylated  $\beta$ -catenin, phosphorylated FOXO1, and claudin 5 after MCAO in the enriched microvessel fractions (Fig. 3A). Phosphorylation of FOXO1 was decreased in both *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* and *Pdzrn3<sup>iECWT</sup>* mice after 6 hours of reperfusion, suggesting that FOXO1 was activated under conditions of cerebral ischemia in a *Pdzrn3*-independent manner. We detected a strong increase in the phosphorylation of  $\beta$ -catenin in *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* vessel-enriched extracts after MCAO (Fig. 3A). Claudin 5 and Ve-cadherin amounts were not substantially modified under either condition. Together, these data suggest that impairing endothelial PCP signaling by deleting *Pdzrn3* may favor endothelial Wnt canonical signaling, which may participate in the stabilization of the BBB during ischemic injury in adult mice.

Immunofluorescence and confocal analysis revealed that endothelial cell junctions in vessels from the contralateral noninfarcted areas of the cortex had clearly delineated circular lumens, as indicated by ZO1 and CD31 staining and aquaporin 4 staining, which identifies astrocytes around the vessels (Fig. 3B). In infarcted areas of the cortex of *Pdzrn3<sup>iECWT</sup>* mice, vessels appeared to be irregularly shaped in some regions, had discontinuous ZO1 labeling, and exhibited low amounts of aquaporin 4 labeling. In *Pdzrn3<sup>iECKO</sup>* mice, cortical vessels were less affected in the infarcted areas, as demonstrated by strong and abundant ZO1 labeling of CD31-positive vessels and maintenance of aquaporin 4 labeling (Fig. 3B). Together, these results suggest that endothelial cell-specific deletion of *Pdzrn3* was associated with reduced activation of c-Jun and PKC $\zeta$  in a model of ischemic stroke and increased canonical Wnt signaling through enhanced accumulation of phosphorylated  $\beta$ -catenin. We propose that decreased expression of *Pdzrn3* reduces injury-induced breakdown of the BBB and may also limit vascular edema after injury.

### PDZRN3 signaling destabilized endothelial cell-cell junctions through PKC $\zeta$

PKC $\zeta$  is localized in junction complexes in epithelial (26) and endothelial cells (27) and is involved in regulating endothelial cell permeability (28). We therefore tested whether PKC $\zeta$  was required for the ability of PDZRN3 to regulate endothelial cell permeability and whether PDZRN3 signaling regulated PKC $\zeta$  localization in endothelial cells. In vitro permeability tests indicated that endothelial cells transduced with *Pdzrn3* lentivirus were more permeable to FITC dextran, an effect attenuated by blocking PKC $\zeta$  with pseudosubstrate (Fig. 4A) or by depleting PKC $\zeta$  (Fig. 4B and fig. S6B). These results were further supported by Western

blot analysis of PKC $\zeta$  activation, which showed that the phosphorylation of c-Jun and PKC $\zeta$  was increased by *Pdzn3* overexpression, an effect blocked by PKC $\zeta$  pseudosubstrate treatment (Fig. 4C). Note that ectopic expression of *Pdzn3* led to an increased amount of total c-Jun, which may result in an enhancement of total c-Jun activity.

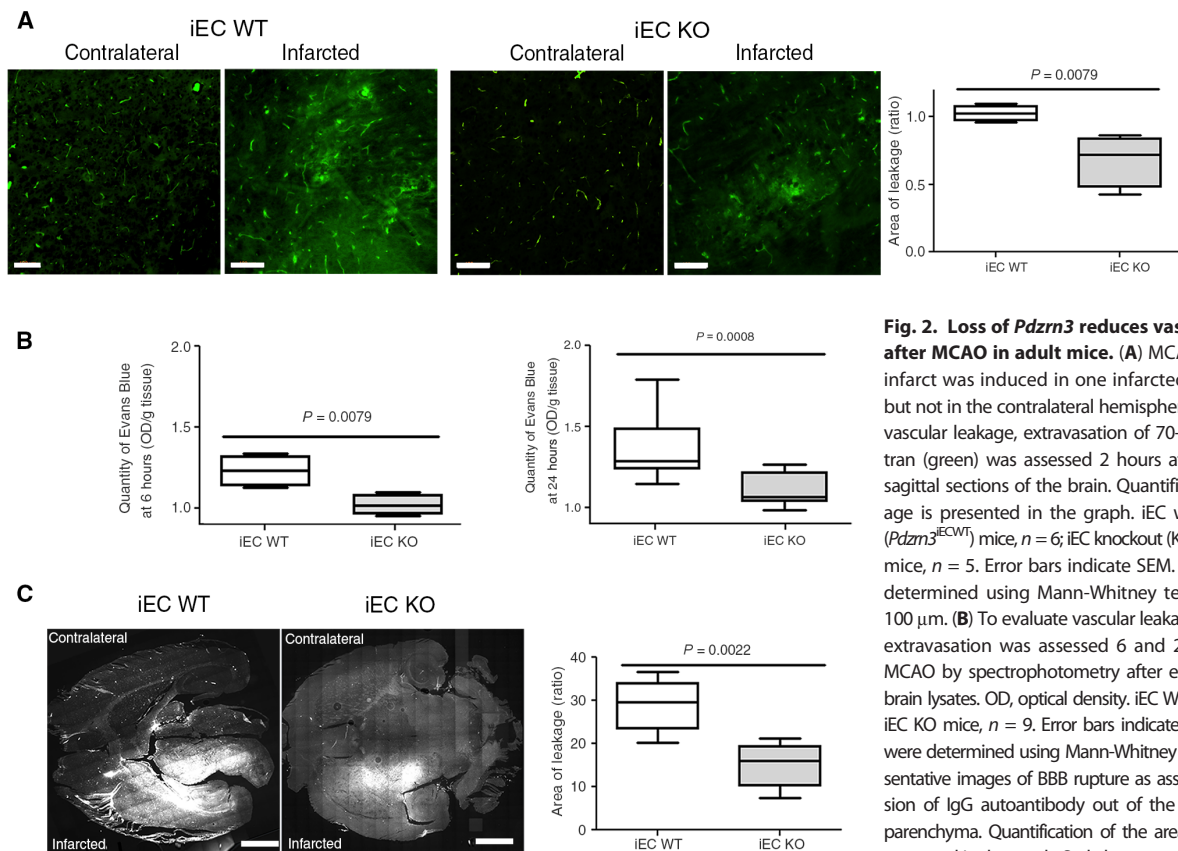
Finally, to examine the physiological importance of PKC $\zeta$  activation, we analyzed the effects of PKC $\zeta$  activity blockade on brain edema and BBB breakdown after MCAO and reperfusion. At 24 hours after reperfusion, the quantity of extravasated Evans Blue was significantly reduced in mice treated with PKC $\zeta$  pseudosubstrate (Fig. 4D), suggesting that the induction of the PKC $\zeta$  pathway could contribute to stroke-induced barrier damage. PKC $\zeta$  pseudosubstrate treatment also resulted in the impaired activation of PKC $\zeta$  and c-Jun in microvessel-enriched fractions from the injured hemisphere compared to those from the noninjured contralateral hemisphere (Fig. 4E). These results mimicked the molecular effects induced by endothelial cell-specific *Pdzn3* deletion. Note that the total abundance of PKC $\zeta$  increased after ischemia, which may contribute to the extent of ischemic injury. Together, these data suggest that PDZRN3 signaling reduces the accumulation of the polarity effector PKC $\zeta$  at cell-cell contacts and is associated with an alteration of intercellular junctions that are sufficient for increased endothelial cell monolayer permeability.

### PDZRN3 targeted MUPP1 for polyubiquitination to destabilize tight junctions

Endothelial cell junction integrity is regulated by the recruitment of polarity complexes to cell-cell junctions; these complexes can include the

adaptor PAR3, the effector PKC $\zeta$  (29), and large scaffolding PDZ-containing proteins including MUPP1 (5, 30). Because molecules that regulate signaling upstream of these polarity complexes remain unknown, and because PDZRN3 is a PDZ domain-containing protein, we speculated that it could be recruited to these polarity complexes. Coimmunoprecipitation experiments using HeLa cells expressing PAR3, PKC $\zeta$ , and PDZRN3 demonstrated that PKC $\zeta$ , MUPP1, and a small amount of endogenous PDZRN3 were detected in PAR3 complexes, whereas a large amount was associated with PKC $\zeta$  in a PAR3-independent manner (Fig. 5A).

We hypothesized that PDZRN3 might be an effector of the PAR3/aPKC polarity complex that mediates MUPP1 degradation to destabilize endothelial cell junctions. PDZRN3 was immunoprecipitated with MUPP1 from enriched microvessel fractions from contralateral and infarcted brain hemispheres in *Pdzn3*<sup>iECWT</sup> mice (Fig. 5B). The increase in MUPP1 ubiquitination in vessel-enriched lysates from the infarcted brain hemisphere suggested that MUPP1 could be a substrate for PDZRN3 (Fig. 5B). Furthermore, the amount of ubiquitinated MUPP1 was greater in lysates from *Pdzn3*<sup>iECWT</sup> mice than in those from *Pdzn3*<sup>iECKO</sup> mice, suggesting that MUPP1 may be a specific substrate of PDZRN3-mediated ubiquitination in endothelial cells. Coimmunoprecipitation analysis indicated that PDZRN3-V5 coimmunoprecipitated MUPP1-Flag and vice versa from transiently transfected HeLa cells (Fig. 5C). Cycloheximide chase experiments in cells transiently expressing PDZRN3-V5 and MUPP1-Flag revealed that the abundance of MUPP1-Flag was maximally reduced at 6 hours, which correlated with a decrease in the membrane fractions, suggesting



**Fig. 2. Loss of *Pdzn3* reduces vascular edema after MCAO in adult mice.** (A) MCAO leading to infarct was induced in one infarcted hemisphere but not in the contralateral hemisphere. To evaluate vascular leakage, extravasation of 70-kDa FITC dextran (green) was assessed 2 hours after MCAO on sagittal sections of the brain. iEC wild-type (WT) (*Pdzn3*<sup>iECWT</sup>) mice,  $n = 6$ ; iEC knockout (KO) (*Pdzn3*<sup>iECKO</sup>) mice,  $n = 5$ . Error bars indicate SEM.  $P$  values were determined using Mann-Whitney test. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ . (B) To evaluate vascular leakage, Evans Blue extravasation was assessed 6 and 24 hours after MCAO by spectrophotometry after extraction from brain lysates. OD, optical density. iEC WT mice,  $n = 10$ ; iEC KO mice,  $n = 9$ . Error bars indicate SEM.  $P$  values were determined using Mann-Whitney test. (C) Representative images of BBB rupture as assessed by diffusion of IgG autoantibody out of the vessels in the parenchyma. Quantification of the area of leakage is presented in the graph. Scale bars, 1 mm. iEC WT mice,  $n = 6$ ; iEC KO mice,  $n = 6$ . Error bars indicate SEM.  $P$  values were determined using Mann-Whitney test.

that PDZRN3 affected MUPP1 turnover. Addition of the proteasome inhibitor MG132 prevented this decrease in the amount of MUPP1, indicating that the reduction in MUPP1 abundance was mediated by the proteasome (Fig. 5D). These results suggest that *Pdzrn3* overexpression enhances proteasomal degradation of MUPP1, thereby enhancing disassociation of tight junction complexes.

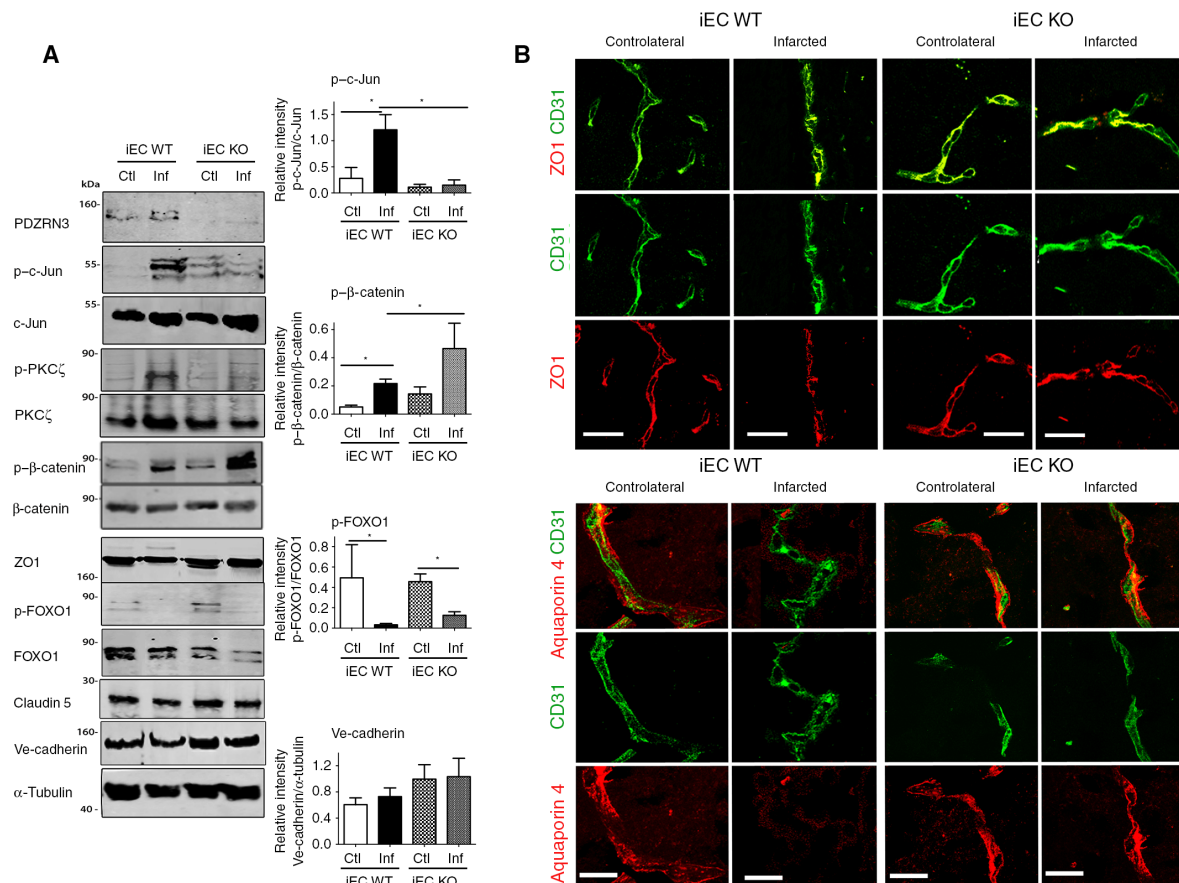
To determine the importance of endogenous PDZRN3 on polarity complex stabilization, we used human microvascular endothelial cells (HMVECs), which express PDZRN3 and display well-developed cell-cell junctions. *Pdzrn3*-depleted HMVECs (fig. S6A) showed increased PKC $\zeta$  recruitment at cell-cell membrane junctions (Fig. 5E). Conversely, *MUPP1* knockdown (fig. S6C) resulted in partial disruption of the continuous ZO1 staining pattern in HMVECs, which was changed to a zig-zag staining pattern (Fig. 5E), and PKC $\zeta$  and PAR3 were no longer localized at cell-cell junctions. Examination of the actin cytoskeletal organization revealed that *Pdzrn3*-depleted cells had only a thin rim of cortical actin, whereas control siRNA-treated cells showed an increase in actin fiber density. Serum depletion enhanced actin fiber density in control siRNA-treated HMVECs but not in *Pdzrn3*-depleted cells (Fig. 5F), suggesting that decreasing PDZRN3 abundance acts to prevent stress fiber formation and to favor actin cytoskeleton stabilization for stable cell-cell junctions. Collectively, these data suggest that junction stability is maintained by a PDZRN3-dependent fine-tuning mech-

anism that balances polarity protein complex stabilization with intercellular tensional cytoskeletal forces.

## DISCUSSION

We used conditional mouse mutants to study the *in vivo* *Pdzrn3* function and signaling pathway in the vascular system. We report that overexpression of endothelial *Pdzrn3* led to embryonic lethality with hemorrhages and endothelial cell junction alteration. Conversely, endothelial loss of *Pdzrn3* in adult mice led to impaired endothelial cell junction rupture events during ischemic stroke and limited consequent permeability.

Vascular growth is a complex cellular process, which requires endothelial cells to proliferate, change their morphology, and move directionally. Endothelial cells do not keep their position but continuously shuffle from the back to the front position (31), which requires dynamic remodeling of their junctions with neighboring cells to follow the shape of the vascular tube and coordination between adjacent cells. We found that mice lacking global expression of *Pdzrn3* from E7.5 displayed vascular defects, such as impaired vascular network remodeling in the extra-embryonic vasculature, but no obvious defects were observed in the embryo proper during vascular formation. Mutant embryos die in utero between E11.5 and E12.5 (20). We found that endothelial overexpression



**Fig. 3. Loss of *Pdzrn3* protects from tight junction disruption induced by MCAO surgery.** (A) Enriched microvessel fractions from contralateral (Ctl) and infarcted (Inf) hemispheres from *Pdzrn3*<sup>IECWT</sup> (IEC WT) and *Pdzrn3*<sup>IECKO</sup> (IEC KO) mice were analyzed by Western blot with indicated antibodies. The band intensities were quantified. Data are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. *P* values were determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc Bonferroni test. p, phosphorylated. (B) Representative images of cortical microvessels of contralateral and infarcted areas from iEC WT and iEC KO mice were analyzed by immunostaining with CD31 (green) and ZO1 (red) antibodies (top) or CD31 (green) and aquaporin 4 (red) antibodies (bottom). Scale bars, 20  $\mu$ m. Data are representative of two independent experiments.

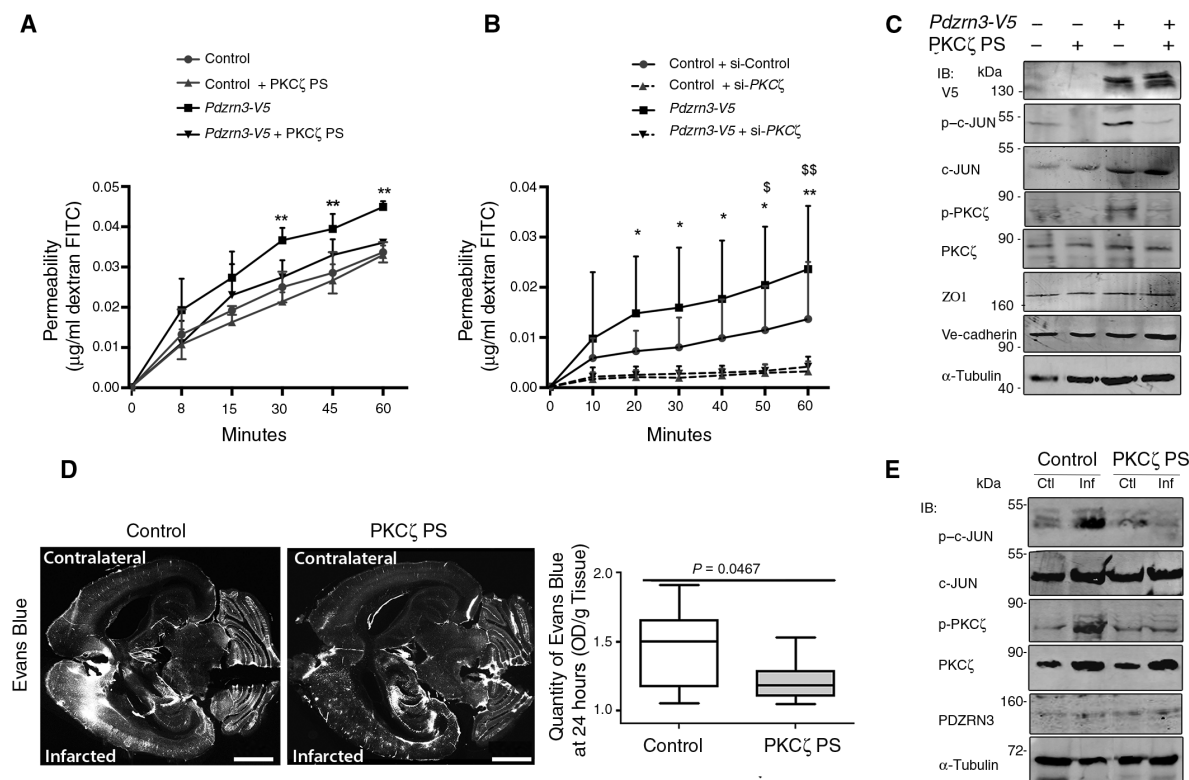
of *Pdzn3* induced vascular defects with localized vascular hemorrhages in both the placenta and the head of embryos without altering developmental vasculogenesis and angiogenesis. These results suggest that PDZRN3 signaling did not perturb early vessel formation steps.

Electron microscopy revealed that *Pdzn3*-overexpressing endothelial cells appeared more elongated and had more vacuoles, which could be linked to interendothelial junction weakness, causing vascular breaks and leakages.  $\beta$ -Catenin null mutants have focal hemorrhages within E11.5 and E13.5, which may be due to molecular remodeling of endothelial cell junctions with an increase of fenestrae (32). The vascular phenotypes in both loss- and gain-of-function *Pdzn3* endothelial mutants underscore the fact that *Pdzn3* gene dosage is critical for vascular network remodeling and stability.

Although various studies have linked the angiogenic process with the PCP pathway, the underlying molecular mechanism has yet to be clearly delineated (33–35). Endothelial cell-specific conditional deletion of *Evi* (evenness interrupted), which blocks Wnt release from the Golgi (36), or treatment with the Wnt inhibitor TNP470 led to reduced microvessel density and an increase in vessel regression in postnatal retina (37), revealing an important role of the Wnt noncanonical pathway in vessel stability and remodeling. Accordingly, we have shown that the intracellular effector PDZRN3 regulates PCP signaling in endothelial

cells and that deletion of *Pdzn3* in endothelial cells impairs the polarized organization of the intermediate vascular plexus in postnatal retina with an increase in vascular regression (20). Wnt-PCP signaling has been proposed to control cell polarity and cell movement through the activation of Rac1, Cdc42, RhoA/B, and downstream JNK signaling cascades (14, 38).

We speculated that the vascular phenotype caused by *Pdzn3* overexpression may be linked to its stimulatory role in the Wnt-PCP pathway. Several pieces of evidence have implicated Wnt canonical signaling in regulating the formation of cerebral vessels. Wnt7a and Wnt7b have been implicated in brain angiogenesis (39, 40) by promoting canonical Wnt  $\beta$ -catenin signaling. Moreover, canonical Wnt  $\beta$ -catenin signaling induces BBB maturation and tight junction stabilization [reviewed in (11, 41, 42)]. Conversely, endothelial depletion of *frizzled4* leads to vascular leakage in the cerebellum (24). In addition, the transcriptional factor ETS-related gene promotes endothelial stability through the Wnt  $\beta$ -catenin pathway (43). However, the role of Wnt-PCP signaling in brain vessels has not yet been fully elucidated. We propose that blocking the Wnt-PCP signaling pathway may protect the brain from a disruption of the BBB under pathological ischemic conditions. We demonstrated that endothelial depletion of *Pdzn3* reduced tight junction disruption and vascular leakage in the brain after

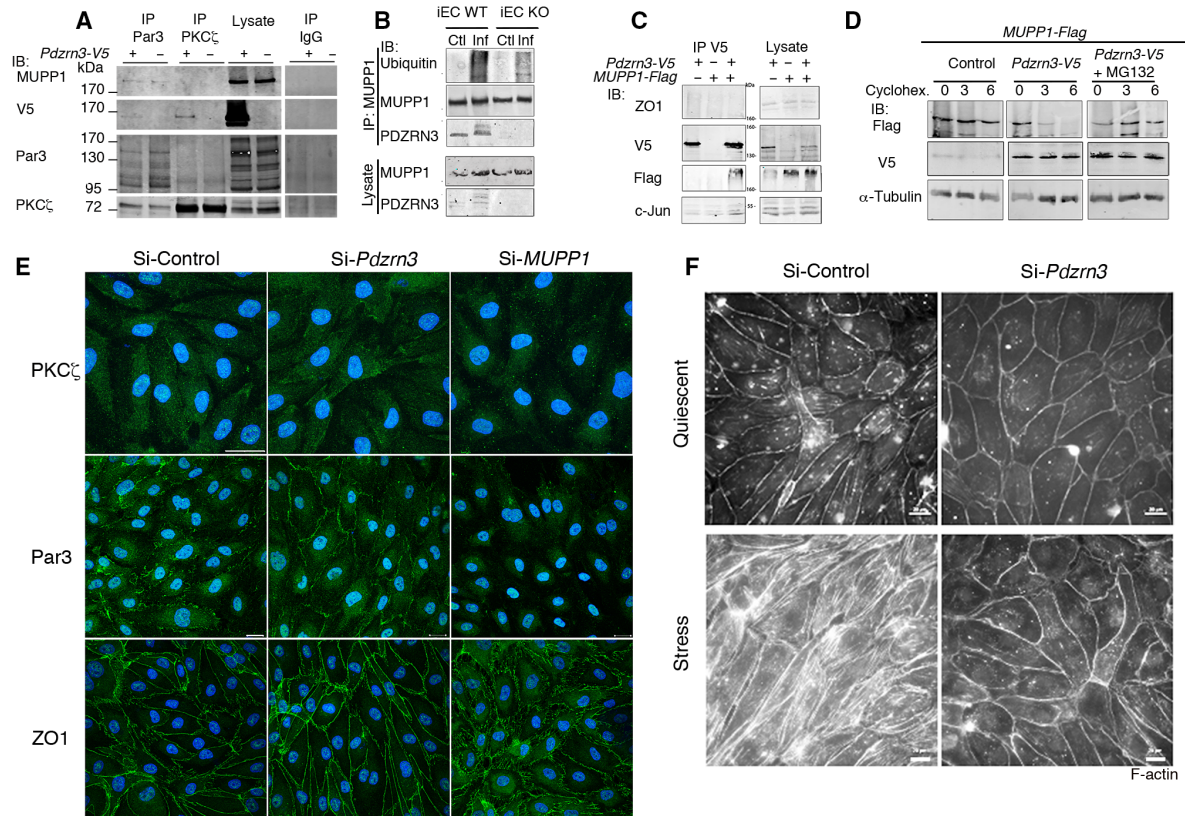


**Fig. 4. *Pdzn3* overexpression induces endothelial cell permeability through PKC $\zeta$ .** (A and B) Control or *Pdzn3-V5*-transduced human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were grown on Transwell inserts and either treated with PKC $\zeta$  pseudosubstrate (PS) (A) or transfected with small interfering RNA (siRNA) directed against PKC $\zeta$  (si-PKC $\zeta$ ) or a control siRNA (si-Control) (B). Leakage of FITC dextran added to the upper wells into the lower wells over the indicated time intervals was measured. Data were from three independent experiments carried out in triplicate and are presented as means  $\pm$  SD. *P* values were determined using two-way ANOVA, followed by post hoc Bonferroni test. In (A),  $***P < 0.01$  for *Pdzn3-V5* compared to control. In (B),  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$  for *Pdzn3-V5* + si-Control compared to control + si-Control;  $^{\$}P < 0.05$  and  $^{\$\$}P < 0.05$  for control + si-PKC $\zeta$  compared to control + si-Control. (C) Lysates of control or *Pdzn3-V5*-transduced HUVECs after PKC $\zeta$  PS treatment were analyzed by immunoblotting (IB) using the indicated antibodies. (D) Vascular leakage was evaluated in mice with Evans Blue injection after PKC $\zeta$  PS or no treatment by spectrophotometry after extraction from brain lysates (in micrograms per gram of tissue) 24 hours after MCAO. Control mice,  $n = 9$ ; PKC $\zeta$  PS-treated mice,  $n = 10$ . Error bars indicate SEM. *P* values were determined using Mann-Whitney test. Scale bars, 1 mm. (E) Enriched microvessel fractions from infarcted and contralateral hemispheres from control and PKC $\zeta$  PS-treated mice were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Blots in (C) and (E) are representative of two independent experiments.

acute ischemic stroke, which correlated with an impairment of c-Jun activation. We found that Wnt ligand expression increased after MCAO in both *Pdzn3*-deleted and control enriched microvessel fractions, which correlated with an accumulation of phosphorylated forms of c-Jun, a terminal effector that stimulates vascular permeability (44). We reported here an increased amount of active phosphorylated  $\beta$ -catenin in enriched microvessel fractions from *Pdzn3*-deleted mutants after MCAO injury. We have proposed that PDZRN3 plays a role in switching from canonical to Wnt-PCP signaling (20) and suggest that, when endothelial *Pdzn3* is depleted, canonical Wnt signaling is activated, which may help maintain and/or reinduce barrier function in brain microvessels in the infarcted area. However, because we used *Pdzn3* gain- and loss-of-function mouse mutants as molecular tools to decrypt the role of PDZRN3 signaling on maintaining vessel barrier functions in vivo, future experiments are required to further clarify the precise role of PDZRN3 signaling under physiological conditions at the tissue or organ level. Furthermore, our study was focused on the role of PDZRN3 signaling in endothelial cells. Brain microvasculature is an interdependent, multicellular unit with endothelial cells, astrocytes, and pericytes, all of which interact through numerous autocrine and paracrine signaling pathways

(45). Deletion of PDZRN3 signaling in endothelial cells may modify cell interdependence, which may account for the fragility of blood vessels. Future studies investigating the role of PDZRN3 signaling in BBB unit regulation at the cellular level are warranted.

We speculated that PDZRN3 could interact with these polarity complexes because maintenance of tight junction stability relies on the recruitment of large scaffolding proteins to polarity complexes and because PDZRN3 contains PDZ domains, which are often found in scaffold proteins (46). MUPP1 assembles protein complexes through their cytoplasmic domains to regulate biological processes, such as cell polarity in epithelial cells (7, 47) and directional cell migration (48). Translocation of MUPP1 to the cytoplasm in cells infected with tumorigenic human viruses induces disruption of tight junctions and endothelial cell polarity (49). The Rho-specific synectin-binding exchange factor (Syx) is involved in endothelial junction stabilization and endothelial barrier function during angiogenesis (50) and has been proposed to interact with MUPP1 and Crumbs polarity complexes. The MUPP1/Syx complex is recruited to endothelial cell-cell junctions to regulate cell junctions and to maintain tight junction integrity (30). Here, we propose a model in which PDZRN3 signaling induces the ubiquitination of MUPP1 at



**Fig. 5. PDZRN3 interacts with a polarity complex containing PAR3, PKC $\zeta$ , and MUPP1 to regulate endothelial junction stability.** (A) Extracts from HeLa cells transfected with *Pdzrn3*-V5 vector were immunoprecipitated with antibodies against PAR3 and PKC $\zeta$  or nonspecific immunoglobulin (IgG). Immunoprecipitates (IPs) and lysates were then immunoblotted with the indicated antibodies. (B) Coprecipitation of MUPP1 and PDZRN3 on enriched microvessel fractions from the infarcted and contralateral hemisphere from *Pdzn3*<sup>IECWT</sup> (iEC WT) and *Pdzn3*<sup>IECKO</sup> (iEC KO) mice subjected to MCAO. IPs and lysates were then immunoblotted with the indicated antibodies. (C) PDZRN3 interacts with MUPP1. Extracts from HeLa cells transfected with *Pdzrn3*-V5 (+) and *MUPP1*-Flag (+) vectors were immunoprecipitated with antibody against V5. IPs and lysates were then immunoblotted with the indicated antibodies. Blots in (A) to (C) are representative of two independent experiments. (D) PDZRN3 induced ubiquitination of MUPP1 and its degradation. HeLa cells were transfected with *MUPP1*-Flag and *Pdzn3*-V5 and then treated with cycloheximide (cyclohex.) for 3 or 6 hours. Lysates were then immunoblotted with indicated antibodies. Results are representative of three independent experiments. (E) PKC $\zeta$ , PAR3, and ZO1 immunostaining (white) were performed on si-Control, si-*Pdzn3*, or si-MUPP1 HMVECs. Cell nuclei were labeled with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Scale bars, 20  $\mu$ m. (F) PDZRN3 controls actin cytoskeleton organization: Staining for F-actin showed that *Pdzn3* depletion impaired stress fiber formation induced by serum deprivation during 4 hours (stress condition). Scale bars, 20  $\mu$ m. Data in (E) and (F) are representative of three independent experiments.

tight junctions, leading to its degradation, which, in turn, loosens tight junctions. This body of work supports a model in which PDZRN3 may occupy a key position at the crossroads of Wnt signaling and the PAR3/PKC $\zeta$ /MUPP1 polarity protein complex to control vascular permeability and, notably, BBB integrity (fig. S7). The potential interactions between these two pathways remain to be found. It will be of interest to gain more insight into the biological importance of regulating such PDZRN3-dependent pathways to determine its impact during vascular morphogenesis.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental animals

For endothelial cell-specific deletion, *PDGF-icre* (21) mice were crossbred to *Pdzrn3<sup>fl/fl</sup>* mice (20). For *Pdzrn3* gene deletion in adults, 1 mg of tamoxifen was injected intraperitoneally for three successive days 2 weeks before surgery. For endothelial *Pdzrn3* overexpression, we generated *TRE-Pdzrn3-V5* mutant mice by microinjection of a construct containing the bidirectional tet-responsive promoter, which allows simultaneous expression of PDZRN3 and LacZ (51). The *Pdzrn3* transgene fused in the C terminus with a V5 epitope in pcDNA3 expression vector (Invitrogen) was excised from the plasmid backbone with Eco RI and Pme I restriction enzymes and cloned in the Pst I sites. These mice were subsequently backcrossed onto a C57BL6/J background. Interbred, homozygous *Pdzrn3-V5* mice exhibited apparently normal development and were viable and fertile. For endothelial cell-specific overexpression, *Tie2-tTA* males were mated with *Pdzrn3-V5* females. Tails of pups were genotyped by PCR using the P1 and P2 primer set to detect the *Pdzrn3-V5* coding gene (P1, 5'-CAGCTTGAGGATAAGGCGCT-3'; P2, 5'-CTTCGAGCTGGACCGCTTC-3') and using the P3 and P4 primer set to detect the *tTA* coding gene (P3, 5'-GCTGCTTAATGAGGTCCG-3'; P4, 5'-CTCTGCACCTTGGTGATC-3').

### Middle cerebral artery occlusion

Focal ischemia was induced by transient (90 min) MCAO, as described previously (52). Briefly, core body temperature was regulated at 37°C. Under isoflurane anesthesia (30% O<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>O), a silicon-coated nylon monofilament (Dermalon) was introduced into the external carotid artery and advanced along the internal carotid artery until the origin of the middle cerebral artery was occluded. After 90 min, the filament was withdrawn to establish reperfusion. Evans Blue [100  $\mu$ l at 2% (w/v)] was injected just after reperfusion. PKC $\zeta$  pseudosubstrate (3 mg/kg; Santa Cruz Biotechnology) was injected after reperfusion. Neurological status was assessed according to a neurological grading score of increasing severity of deficit: 0, no observable deficit; 1, torso flexion to right; 2, spontaneous circling to right; 3, leaning, falling, or barreling to right; 4, no spontaneous movement or unconscious; 5, death.

For assessment of brain edema, mice were perfused transcardially with phosphate-buffered saline (PBS) and then with 4% formalin. For measurement of the area of brain edema, brains were removed and embedded in agarose. Slices of 100  $\mu$ m were then observed under a Zeiss Axio Observer microscope, taking advantage of the fact that Evans Blue fluorescence was at 540 nm. For quantification of Evans Blue using spectrophotometry, brain hemispheres were separated and frozen. After sonication in PBS, the lysates were centrifuged and resuspended in trichloroacetic acid (volume/volume). After overnight incubation at 4°C, the lysates were centrifuged, and the quantity of Evans Blue in the supernatant was estimated by measuring the optical density at 610 nm.

### Vessel extraction

Brain tissues were frozen at -20°C and, after thawing, pottized 20 times on ice in PBS. After a 10-min centrifugation at 1000g, the pellet was resuspended in PBS and placed on top of a PBS/17.5% dextran gradient. After a 10-min centrifugation at 4400g, the pellet was resuspended and filtered through a 40- $\mu$ m filter (BD Biosciences). The fraction that was retained on the filter was then eluted with PBS by inversion of the filter. For optimal extraction of vessels, the vessel fraction can be loaded on a column containing glass beads. After washing with PBS, the purified vessel fraction was harvested by gentle agitation.

### Isolation of primary endothelial cells from mouse kidney

Kidneys of sacrificed mice were removed in PBS containing CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> (Gibco), minced in slices, and incubated for 45 min at 37°C in a solution of PBS Ca/Mg containing collagenase type I (Sigma-Aldrich). The suspensions were triturated with a cannula and filtered first with a 70- $\mu$ m filter (BD Biosciences) and then with a 30- $\mu$ m filter (Miltenyi). After centrifugation, cells were seeded on petri dishes in minimum essential medium supplemented with D-valine. Five days later, cells were trypsinized and incubated with antibodies against CD31 (Pharmingen) and endoglin (Santa Cruz Biotechnology) for 30 min at room temperature. The cell suspension was then placed in the presence of microbeads coupled with rat IgG (Miltenyi) for 15 min at 4°C. After several washes with Ca/Mg PBS and passaging through a magnetic column (MACS MS columns, Miltenyi), the endothelial cell preparation was harvested.

### FITC dextran or rhodamine dextran injection

FITC dextran (70 kDa) was injected in the ventricle and left for circulation for 5 min in adult mice (500  $\mu$ l at 10 mg/ml). Rhodamine dextran (10 kDa) was injected in the liver of E14.5 embryos and left for circulation for 5 min (5  $\mu$ l at 100 mg/ml) using a microinjector. The head was then decapitated, and the brain was removed and placed in a tube containing paraformaldehyde for 24 hours; the brain was then incubated in 30% sucrose for 48 hours and embedded in OCT (optimal cutting temperature). Sections of 7  $\mu$ m were then cut for visualization.

### Micro-CT analysis

The brain vasculature was imaged with a high-resolution micro-CT imaging system (Bruker MicroCT), set to an effective detector pixel size of 0.08 mm. The apparatus used for imaging the vessels was the Bruker SkyScan microCT scanner from Bruker with spatial resolutions of 7 to 36  $\mu$ m and used with the Bruker Acquisition and DigiXCT reconstruction utility programs from Digisens. Data were acquired in axial mode, as described previously (53). The volume was visualized with the Avizo program.

### Expression constructs

From human *Pdzrn3* complementary DNA (cDNA) provided by M. Inui (54), the sequence of *Pdzrn3* was subcloned in frame into the pcDNA3.1-V5-His plasmid (Invitrogen) to generate *Pdzrn3-V5*. The *Pdzrn3-V5* sequence was subcloned into the lentiviral vector pRRLsin-MND-MCS-WPRE. Lentivirus preparations were produced at the Bordeaux 2 lentivirus platform. The *MUPP1-Flag* cDNA was provided by T. Miller (55).

### Immunofluorescence staining

For immunostaining, P7 and adult brains were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS, embedded in OCT/paraffin or agarose, and sectioned in 10- $\mu$ m/7- $\mu$ m or 100- $\mu$ m sections, respectively. Endothelial cells were fixed in 4% formalin. Immunofluorescence staining was



performed as previously described (20, 35), with antibodies specific for CD31 (PharMingen), ZO1 (Invitrogen), aquaporin 4 (Millipore), PKC $\zeta$  (Santa Cruz Biotechnology), V5 (Invitrogen), PAR3 (Millipore), and F-actin (Molecular Probes). Images were taken with a confocal microscope (Olympus FSV 1000). Visualization was obtained after digitized image multichannel deconvolution by AutoDeblur (Media Cybernetics Inc.), and three-dimensional projections were digitally reconstituted from stacks of confocal optical slices by Imaris software (Bitplane).

### Cell culture/DNA transfection and drug treatments

HUVECs and HMVECs were cultured in EGM-2 or in EGM-2MV medium, respectively. HeLa cells were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin. Primary endothelial cells from control (iEC WT) and *Pdzrn3*-deleted (iEC KO) mice were isolated from kidneys after magnetic separation with MACS MS columns (Miltenyi), as described previously (20). Plasmids were transfected using jetPRIME (Polyplus) following the manufacturer's protocol [final concentration of 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for human embryonic kidney (HEK) 293 cells and 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for HeLa cells]. siRNAs were transfected using interferin (Polyplus) at a final concentration of 30 nM. The oligonucleotides used were designed by Origene for *h-Pdzrn3* (SR307944A, 5'-CGGCACTAGAGTATACAATTCCTTC-3'; SR307944B, 5'-CGATCCAAATGACTACATTGGAGAC-3'; SR307944C, 5'-GCATGTACAGGAAAGTTGTGGATG-3'), for *hMUPP1* (04, 5'-GGAAUAAUUUGUGUAGGUGAtt-3'; 08, 5'-AUUGCCUAAAGGACUUGUGCUUtt-3') as previously reported (47), and for *hPKC $\zeta$*  Stealth RNAi (#HSS18348) as previously reported (19). Lentiviruses were transduced at a multiplicity of infection of 20. MG132 (Santa Cruz Biotechnology) at a concentration of 0.25 M was used. The efficacy of *Pdzrn3*, *MUPP1*, and *PKC $\zeta$*  knockdown was assessed by immunoblotting (fig. S6, A to C).

### Western blot, immunoprecipitation, ubiquitination analysis, and in vitro pulldown assay

Immunoprecipitation and immunoblotting were performed as described previously (20, 35). Antibodies against PKC $\zeta$  (Santa Cruz), Par3 (Millipore), V5 (Invitrogen), and MUPP1 (Abcam) were used for immunoprecipitation assays. Proteins were then resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted with antibodies specific for V5 (Invitrogen), PDZRN3 (Santa Cruz), phospho-c-Jun (Cell Signaling), c-Jun (Upstate), phosphorylated  $\beta$ -catenin (ABC, clone 8E7; Millipore),  $\beta$ -catenin (Sigma-Aldrich),  $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich), Ve-cadherin (Santa Cruz Biotechnology), claudin 5 (Millipore), ZO1 (Invitrogen), PKC $\zeta$  (Santa Cruz Biotechnology), and phospho-PKC $\zeta$  (Ozyme Cell Signaling). Binding of antibodies to the blots was detected using the Odyssey Infra-red Imaging System (LI-COR Biosciences).

### Cell fractionation

For cell fractionation, cell or tissue lysates were resuspended in a buffer [containing Pipes (pH 6.8), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, and 1 mM EDTA] and potterized 20 times on ice. After a centrifugation at 800g for 5 min, the pellet was reserved for nuclear extract preparation, and the supernatant was collected and spun at 100,000g for 1 hour. The pellet and supernatant were classified as the "cell membrane fraction" and "cytoplasmic fraction," respectively. The pellet obtained after the centrifugation at 800g was washed and placed as a cushion on top of a 1 M sucrose buffer. After a centrifugation at 2700g for 5 min, the pellet was resuspended in a buffer containing tris (pH 7.4),

10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, and 0.05% NP-40 and spun again at 2700g for 20 min. The pellet was then resuspended in a buffer containing Hepes (pH 7.9), 300 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.2 mM EDTA. After 20 min of incubation, the lysate was spun at 10,000g for 20 min. The pellet was classified as the "nuclear membrane fraction," and the supernatant was classified as the "soluble nuclear fraction."

### RNA preparation and quantitative PCR

Mouse tissues were homogenized in TRI Reagent (Euromedex), and RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed as described previously (20).

### Permeability assay

HUVECs were seeded on inserts with a pore size of 0.4  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences), cultured in medium, and assayed for permeability to FITC dextran (40 kDa), as previously described (56).

### Statistical analysis

The experimental results represent means  $\pm$  SEM. Each experiment was conducted at least three times. When multiple experiments using different numbers of animals were pooled for the statistical analysis, the range of number of animals was indicated in the figure legend. Comparison of continuous variables between two groups was performed using Mann-Whitney test. Comparison of triplicate data between four groups was performed by one-way ANOVA with post hoc Bonferroni test. Comparison of multiple measures was performed by two-way ANOVA with post hoc Bonferroni test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. All analyses were performed with appropriate software (GraphPad Prism 6, GraphPad Software). The statistical test is indicated for each data analysis.

### SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/10/464/eaag3209/DC1

Fig. S1. Ectopic expression of *Pdzrn3* in embryos.

Fig. S2. Immunostaining of PDZRN3 in vessels in brain sections.

Fig. S3. Analysis of *Pdzrn3* depletion in isolated endothelial cells.

Fig. S4. Analysis of mutant and control mouse brain vasculature by micro-CT.

Fig. S5. Quantitative RT-PCR analysis of *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt7a*, and *Wnt7b* expression after MCAO.

Fig. S6. Knockdown efficiency of siRNAs directed against *Pdzrn3*, *Pkc $\zeta$* , and *MUPP1*.

Fig. S7. Schematic figure.

### REFERENCES AND NOTES

1. D. Mehta, A. B. Malik, Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* **86**, 279–367 (2006).
2. G. Bazzoni, E. Dejana, Endothelial cell-to-cell junctions: Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* **84**, 869–901 (2004).
3. D. Günzel, A. S. L. Yu, Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* **93**, 525–569 (2013).
4. C. Ullmer, K. Schmuck, A. Figge, H. Lübbert, Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Lett.* **424**, 63–68 (1998).
5. Y. Hamazaki, M. Itoh, H. Sasaki, M. Furuse, S. Tsukita, Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* **277**, 455–461 (2002).
6. C. D. Wells, J. P. Fawcett, A. Traweger, Y. Yamanaka, M. Goudreaux, K. Elder, S. Kulkarni, G. Gish, C. Virag, C. Lim, K. Colwill, A. Starostine, P. Metalnikov, T. Pawson, A. Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* **125**, 535–548 (2006).
7. E. Assémat, E. Crost, M. Ponsere, J. Wijnholds, A. Le Bivic, D. Massey-Harroche, The multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) expression regulates cellular levels of the PALS-1/PATJ polarity complex. *Exp. Cell Res.* **319**, 2514–2525 (2013).

8. T. W. Hurd, L. Gao, M. H. Roh, I. G. Macara, B. Margolis, Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat. Cell Biol.* **5**, 137–142 (2003).
9. T. W. Hurd, S. Fan, C.-J. Liu, H. K. Kweon, K. Hakansson, B. Margolis, Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to the polarity protein Par3 regulates cell polarity in mammalian epithelia. *Curr. Biol.* **13**, 2082–2090 (2003).
10. Q. Wang, B. Margolis, Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney Int.* **72**, 1448–1458 (2007).
11. E. Dejana, The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ. Res.* **107**, 943–952 (2010).
12. R. van Amerongen, A. Mikels, R. Nusse, Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci. Signal.* **1**, re9 (2008).
13. J. A. Zallen, Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* **129**, 1051–1063 (2007).
14. A. Guillaubert-Gourgues, B. Jaspard-Vinassa, M.-I. Bats, R. N. Sewduth, N. Franzl, C. Peghaire, S. Jeanningros, C. Moreau, E. Roux, F. Larrieu-Lahargue, P. Dufourcq, T. Couffignal, C. Dupl a, Kif26b controls endothelial cell polarity through the Dishevelled/Daam1-dependent planar cell polarity–signaling pathway. *Mol. Biol. Cell* **27**, 941–953 (2016).
15. F. Tatin, A. Taddei, A. Weston, E. Fuchs, D. Devenport, F. Tissir, T. Makinen, Planar cell polarity protein Celsr1 regulates endothelial adherens junctions and directed cell rearrangements during valve morphogenesis. *Dev. Cell* **26**, 31–44 (2013).
16. L. V. Goodrich, D. Strutt, Principles of planar polarity in animal development. *Development* **138**, 1877–1892 (2011).
17. R. Habas, Y. Kato, X. He, Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* **107**, 843–854 (2001).
18. J. B. Wallingford, Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 627–653 (2012).
19. C. Artus, F. Glacial, K. Ganeshamoorthy, N. Ziegler, M. Godet, T. Guilbert, S. Liebner, P.-O. Couraud, The Wnt/planar cell polarity signaling pathway contributes to the integrity of tight junctions in brain endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 433–440 (2014).
20. R. N. Sewduth, B. Jaspard-Vinassa, C. Peghaire, A. Guillaubert, N. Franzl, F. Larrieu-Lahargue, C. Moreau, M. Fruttiger, P. Dufourcq, T. Couffignal, C. Dupl a, The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nat. Commun.* **5**, 4832 (2014).
21. S. Claxton, V. Kostourou, S. Jadeja, P. Chambon, K. Hodivala-Dilke, M. Fruttiger, Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis* **46**, 74–80 (2008).
22. S. Yousif, C. Marie-Claire, F. Roux, J.-M. Scherrmann, X. Decl ves, Expression of drug transporters at the blood–brain barrier using an optimized isolated rat brain microvessel strategy. *Brain Res.* **1134**, 1–11 (2007).
23. S. Liebner, M. Corada, T. Bangsow, J. Babbage, A. Taddei, C. J. Czupalla, M. Reis, A. Felici, H. Wolburg, M. Fruttiger, M. M. Taketo, H. von Melchner, K. H. Plate, H. Gerhardt, E. Dejana, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling controls development of the blood–brain barrier. *J. Cell Biol.* **183**, 409–417 (2008).
24. Y. Wang, A. Rattner, Y. Zhou, J. Williams, P. M. Smallwood, J. Nathans, Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell* **151**, 1332–1344 (2012).
25. A. Taddei, C. Giampietro, A. Conti, F. Orsenigo, F. Breviaro, V. Pirazzoli, M. Potente, C. Daly, S. Dimmeler, E. Dejana, Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* **10**, 923–934 (2008).
26. Y. Nagai-Tamai, K. Mizuno, T. Hirose, A. Suzuki, S. Ohno, Regulated protein–protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells* **7**, 1161–1171 (2002).
27. M. G. Lampugnani, F. Orsenigo, N. Rudini, L. Maddaluno, G. Boulday, F. Chapon, E. Dejana, CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *J. Cell Sci.* **123**, 1073–1080 (2010).
28. C. L. Willis, D. S. Meske, T. P. Davis, Protein kinase C activation modulates reversible increase in cortical blood–brain barrier permeability and tight junction protein expression during hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 1847–1859 (2010).
29. A. Suzuki, S. Ohno, The PAR-aPKC system: Lessons in polarity. *J. Cell Sci.* **119**, 979–987 (2006).
30. S. P. Ngok, P. Z. Anastasiadis, Rho GEFs in endothelial junctions: Effector selectivity and signaling integration determine junctional response. *Tissue Barriers* **1**, e27132 (2013).
31. L. Jakobsson, C. A. Franco, K. Bentley, R. T. Collins, B. Ponsioen, I. M. Aspalter, I. Rosewell, M. Busse, G. Thurston, A. Medvinsky, S. Schulte-Merker, H. Gerhardt, Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat. Cell Biol.* **12**, 943–953 (2010).
32. A. Cattelino, S. Liebner, R. Gallini, A. Zanetti, G. Balconi, A. Corsi, P. Bianco, H. Wolburg, R. Moore, B. Oreda, R. Kemler, E. Dejana, The conditional inactivation of the  $\beta$ -catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J. Cell Biol.* **162**, 1111–1122 (2003).
33. T. N. H. Masckauch n, D. Agalliu, M. Vorontchikhina, A. Ahn, N. L. Parmalee, C.-M. Li, A. Khoo, B. Tycko, A. M. C. Brown, J. Kitajewski, Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2. *Mol. Biol. Cell* **17**, 5163–5172 (2006).
34. P. Cirone, S. Lin, H. L. Griesbach, Y. Zhang, D. C. Slusarski, C. M. Crews, A role for planar cell polarity signaling in angiogenesis. *Angiogenesis* **11**, 347–360 (2008).
35. B. Descamps, R. Sewduth, N. Ferreira Tojais, B. Jaspard, A. Reynaud, F. Sohet, P. Lacolley, C. Allieres, J.-M. D. Lamazi re, C. Moreau, P. Dufourcq, T. Couffignal, C. Dupl a, Frizzled 4 regulates arterial network organization through noncanonical Wnt/planar cell polarity signaling. *Circ. Res.* **110**, 47–58 (2012).
36. K. Bartscherer, N. Pelte, D. Ingelfinger, M. Boutros, Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* **125**, 523–533 (2006).
37. C. Korn, B. Scholz, J. Hu, K. Srivastava, J. Wojtarowicz, T. Arnsperger, R. H. Adams, M. Boutros, H. G. Augustin, I. Augustin, Endothelial cell-derived non-canonical Wnt ligands control vascular pruning in angiogenesis. *Development* **141**, 1757–1766 (2014).
38. M. Simons, M. Mlodzik, Planar cell polarity signaling: From fly development to human disease. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 517–540 (2008).
39. J. M. Stenman, J. Rajagopal, T. J. Carroll, M. Ishibashi, J. McMahon, A. P. McMahon, Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* **322**, 1247–1250 (2008).
40. R. Daneman, D. Agalliu, L. Zhou, F. Kuhnert, C. J. Kuo, B. A. Barres, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 641–646 (2009).
41. C. A. Franco, S. Liebner, H. Gerhardt, Vascular morphogenesis: A Wnt for every vessel? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 476–483 (2009).
42. M. Reis, S. Liebner, Wnt signaling in the vasculature. *Exp. Cell Res.* **319**, 1317–1323 (2013).
43. G. M. Birdsey, A. V. Shah, N. Dufton, L. E. Reynolds, L. Osuna Almagro, Y. Yang, I. M. Aspalter, S. T. Khan, J. C. Mason, E. Dejana, B. Gottgens, K. Hodivala-Dilke, H. Gerhardt, R. H. Adams, A. M. Randi, The endothelial transcription factor ERG promotes vascular stability and growth through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Dev. Cell* **32**, 82–96 (2015).
44. R. G. Fahmy, A. Waldman, G. Zhang, A. Mitchell, N. Tedla, H. Cai, C. R. Geczy, C. N. Chesterman, M. Perry, L. M. Khachigian, Suppression of vascular permeability and inflammation by targeting of the transcription factor c-Jun. *Nat. Biotechnol.* **24**, 856–863 (2006).
45. P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard, The blood–brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* **16**, 1–13 (2004).
46. E. Kim, M. Sheng, PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 771–781 (2004).
47. M. Adachi, Y. Hamayaki, Y. Kobayashi, M. Itoh, S. Tsukita, M. Furuse, S. Tsukita, Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins. *Mol. Cell Biol.* **29**, 2372–2389 (2009).
48. M. Ernkvist, N. Luna Persson, S. Audebert, P. Lecine, I. Sinha, M. Liu, M. Schlueter, A. Horowitz, K. Aase, T. Weide, J.-P. Borg, A. Majumdar, L. Holmgren, The Amot/Patj/Syx signaling complex spatially controls RhoA GTPase activity in migrating endothelial cells. *Blood* **113**, 244–253 (2009).
49. R. T. Javier, Cell polarity proteins: Common targets for tumorigenic human viruses. *Oncogene* **27**, 7031–7046 (2008).
50. M. K. Garnaas, K. L. Moodie, M.-I. Liu, G. V. Samant, K. Li, R. Marx, J. M. Baraban, A. Horowitz, R. Ramchandran, Syx, a RhoA guanine exchange factor, is essential for angiogenesis in vivo. *Circ. Res.* **103**, 710–716 (2008).
51. L. Barandon, P. Dufourcq, P. Costet, C. Moreau, C. Allieres, D. Daret, P. Dos Santos, J.-M. D. Lamazi re, T. Couffignal, C. Dupl a, Involvement of FrzA/sFRP-1 and the Wnt/frizzled pathway in ischemic preconditioning. *Circ. Res.* **96**, 1299–1306 (2005).
52. B. W. McColl, N. J. Rothwell, S. M. Allan, Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J. Neurosci.* **28**, 9451–9462 (2008).
53. P. Oses, M.-A. Renault, R. Chauvel, L. Leroux, C. Allieres, B. Seguy, J. M. Lamazi re, P. Dufourcq, T. Couffignal, C. Dupl a, Mapping 3-dimensional neovessel organization steps using micro-computed tomography in a murine model of hindlimb ischemia–brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 2090–2092 (2009).
54. T. Honda, H. Yamamoto, A. Ishii, M. Inui, PDZRN3 negatively regulates BMP-2–induced osteoblast differentiation through inhibition of Wnt signaling. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3269–3277 (2010).
55. C. Wu, S. Agrawal, A. Vasanji, J. Drazba, S. Sarkaria, J. Xie, C. M. Welch, M. Liu, B. Anand-Apte, A. Horowitz, Rab13-dependent trafficking of RhoA is required for directional migration and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **286**, 23511–23520 (2011).
56. N. Ferreira Tojais, C. Peghaire, N. Franzl, F. Larrieu-Lahargue, B. Jaspard, A. Reynaud, C. Moreau, T. Couffignal, C. Dupl a, P. Dufourcq, Frizzled7 controls vascular permeability through the Wnt-canonical pathway and cross-talk with endothelial cell junction complexes. *Cardiovasc. Res.* **103**, 291–303 (2014).

**Acknowledgments:** We thank P. Couraud (Paris, France) for discussions, D. Massey-Harroche (Institut de Biologie du Développement de Marseille, Marseille, France) for her support with MUPP1 reagents, D. Vivien (GIP Cyseron, Caen, France) for discussions and his help in AVC training, and D. Daret (Inserm U1034, Bordeaux, France) for electron transmission technical expertise. We thank the SEAT-TAAM CNRS Phenomin mouse facility (France) for the generation of transgenic mice by DNA construct microinjection, M. Inui (Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan) for providing the human *Pdzr3* cDNA, and T. Miller (Case Western Reserve University, Cleveland, USA) for providing the FLAG-tagged MUPP1 plasmid. **Funding:** This work was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale (DVS20131228623) and from Region Aquitaine (20101301039MP). R.N.S. was supported by a grant from Region Aquitaine (20101301039MP) and from Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20130928208). V.J. was supported by a grant from Fondation pour la Recherche Médicale (DEA20130726937). **Author contributions:** R.N.S. conducted and designed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript; B.J.-V. conducted the initial experiments and analyzed and interpreted the data; B.J.-V., H.K., and S.J. conducted the biochemical experiments; V.J., T.W., and N.F. helped technically with the experiments;

M.P., E.R., and P.D. were involved in study design; T.C. and C.D. designed the experiments, analyzed and interpreted the data, and edited the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

Submitted 1 June 2016  
Resubmitted 9 June 2016  
Accepted 9 January 2017  
Published 31 January 2017  
10.1126/scisignal.aag3209

**Citation:** R. N. Sewduth, H. Kovacic, B. Jaspard-Vinassa, V. Jecko, T. Wavasseur, N. Fritsch, M. Pernot, S. Jeanningros, E. Roux, P. Dufourcq, T. Couffignal, C. Dupl a, PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKC -containing polarity complex to increase vascular permeability. *Sci. Signal.* **10**, eaag3209 (2017).

## PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKC $\zeta$ -containing polarity complex to increase vascular permeability

Raj N. Sewduth, H el ena Kovacic, B eatrice Jaspard-Vinassa, Vincent Jecko, Thomas Wavasseur, Nicolas Fritsch, Mathieu Pernot, Sylvie Jeaningros, Etienne Roux, Pascale Dufourcq, Thierry Couffinal and C ecile Dupla 

*Sci. Signal.* **10** (464), eaag3209.  
DOI: 10.1126/scisignal.aag3209

### Destabilizing endothelial cell connections

Interconnected endothelial cells that line blood vessels form a barrier between the circulatory system and tissues. The integrity of the intercellular junctions between endothelial cells regulates vascular permeability, which is the leakiness of blood vessels. In stroke patients, too much fluid can accumulate in the brain and cause irreparable damage. Sewduth *et al.* elucidated a signaling pathway mediated by the E3 ubiquitin ligase PDZRN3 that regulated endothelial intercellular junctions and vascular permeability. Developing mice that overexpressed *Pdzrn3* in endothelial cells died of hemorrhaging in multiple tissues, whereas genetic ablation of *Pdzrn3* in adult mice decreased the brain edema that occurred after stroke, an effect mimicked by a pharmacological inhibitor of PKC  $\zeta$ , a kinase that destabilizes endothelial intercellular junctions. Manipulating *Pdzrn3* abundance in endothelial cells affected the localization of PKC $\zeta$  to intercellular junctions, activation of PKC  $\zeta$ , and permeability. These results suggest that inhibiting PDZRN3 or its downstream effector PKC  $\zeta$  may prevent the pathological edema that occurs in conditions such as stroke.

#### ARTICLE TOOLS

<http://stke.sciencemag.org/content/10/464/eaag3209>

#### SUPPLEMENTARY MATERIALS

<http://stke.sciencemag.org/content/suppl/2017/01/27/10.464.eaag3209.DC1>

#### RELATED CONTENT

<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/9/425/ra42.full>  
<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/9/437/ra72.full>  
<http://science.sciencemag.org/content/sci/343/6171/649.full>  
<http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/7/304/304ra142.full>  
[file:/content  
http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/10/503/eaan3286.full](http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/10/503/eaan3286.full)

#### REFERENCES

This article cites 56 articles, 25 of which you can access for free  
<http://stke.sciencemag.org/content/10/464/eaag3209#BIBL>

#### PERMISSIONS

<http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

**Titre : L'inhibition de PDZRN3 est requise pour la maturation cardiomyocytaire post-natal et protège de l'insuffisance cardiaque.**

**Résumé :** Durant le développement myocardique, les cardiomyocytes s'allongent et se connectent entre eux grâce à une structure spécialisée, le disque intercalaire. Cette organisation des cardiomyocytes est essentielle pour le couplage mécanique et la conduction électrique. Un des éléments responsables de l'insuffisance cardiaque est la perturbation de ces sites de contact intercellulaire. Actuellement, aucun facteur n'est connu pour coordonner l'organisation polarisée des cardiomyocytes. Ici, nous présentons une augmentation importante de *Pdzrn3* dans des cardiomyopathies hypertrophiques humaines et dans des myocards murins, corrélée à une perte de l'élongation polarisée des cardiomyocytes. De plus la délétion spécifique intramyocardique de l'expression de *Pdzrn3*, dans un modèle murin, protège de la survenue d'une insuffisance cardiaque secondaire à une cardiomyopathie hypertrophique. Nos résultats révèlent une nouvelle voie de signalisation qui contrôle un programme génétique essentiel pour le développement myocardique, le maintien de la géométrie et de la fonction contractile des cardiomyocytes. Cette voie de signalisation implique PDZRN3 et cette molécule constitue une cible thérapeutique potentielle pour la protection de l'insuffisance cardiaque chez l'homme.

**Mots clés :** Voie de signalisation Wnt/Frizzled, cardiomyopathie hypertrophique, insuffisance cardiaque

**Title : Repression of *Pdzrn3* is required for heart maturation and protects against heart failure.**

**Abstract :** During heart maturation, individual cardiomyocytes stretch out and connect some with the others via their extremities by intercalated disk protein complexes. This planar and directional organization of the myocyte is crucial for the mechanical coupling and the anisotropic conduction of the electric signal in the heart. One of the hallmarks of heart failure concerns alterations in the contact sites between cardiomyocytes. Yet no factor on its own is known to coordinate cardiomyocyte polarized organization. Here we reported enhanced levels of *Pdzrn3* in the diseased hypertrophic human and mouse myocardium, correlated with the loss of cardiomyocyte polarized elongation. Furthermore, mouse cardiac *Pdzrn3* deficiency protected against heart failure in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. Our results reveal a novel signaling that controls a genetic program essential for heart maturation and for maintain of cardiomyocyte overall geometry and contractile function and implicates PDZRN3 as a potential therapeutic target for human heart failure protection.

**Keywords :** Wnt/Frizzled pathway, hypertrophic cardiomyopathy, heart failure.

**Unité de recherche :** Unité Inserm 1034, 1 avenue de Magellan 33600 Pessac.