



HAL
open science

Analyse d'un nouveau modèle de dystrophie valvulaire mitrale : le rat KI FlnA-P637Q : implication des cellules immunitaires

Constance Delwarde

► To cite this version:

Constance Delwarde. Analyse d'un nouveau modèle de dystrophie valvulaire mitrale : le rat KI FlnA-P637Q : implication des cellules immunitaires. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1012 . tel-03881532

HAL Id: tel-03881532

<https://theses.hal.science/tel-03881532>

Submitted on 1 Dec 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : BS – Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale

Par

Constance DELWARDE

**Analyse d'un nouveau modèle de dystrophie valvulaire mitrale :
le rat KI FlnA-P637Q.**

Implication des cellules immunitaires.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 19 Octobre 2022

Unité de recherche : UMR_S 1087 / UMR_C 6291 l'Unité de Recherche de l'Institut du Thorax

Rapporteurs avant soutenance :

Cécile OURY

Directrice de Recherche, GIGA Cardiovascular Sciences - Cardiology,
Liège, Belgique

Giuseppina CALIGIURI

Directrice de Recherche, LNTS UMRS1148, Paris, France

Composition du Jury :

Présidente : Cécile VINDIS

Directrice de Recherche, INSERM CIC 1436 / Center for Clinical
Investigation, CHU Rangueil, Toulouse, France

Dir. de thèse : Jean MEROT

Chargé de Recherche, l'institut du thorax UMR1087, Nantes, France

Co-dir. de thèse : Thierry LE TOURNEAU

Professeur des Universités Professeur Hospitalier, Nantes, France

Co-encadrement : Romain CAPOULADE

Chargé de Recherche, l'institut du thorax UMR1087, Nantes, France

Remerciements

Je tiens à remercier les Docteurs Giuseppina Caligiuri, Cécile Oury et Cécile Vindis d'avoir accepté d'être respectivement rapportrices et examinatrice de mon travail de thèse. J'adresse également mes sincères remerciements au Professeur Laurent Monassier et au Docteur Flavien Charpentier pour leurs conseils, leur aide et leur bienveillance lors de mes comités de suivi de thèse de ces trois années riches en apprentissages.

Je remercie Richard Redon de m'avoir permis de réaliser mes stages ainsi que mon doctorat au sein de l'Institut du Thorax, et Jean-Jacques Schott pour son accueil dans l'équipe 1.

Je tiens à remercier Thierry Le Tourneau, pour son enseignement sur la partie clinique et pour m'avoir permis de découvrir l'inclusion de patients et la chirurgie valvulaire.

Je remercie tout particulièrement Jean Mérot et Romain Capoulade pour leur accueil dans le groupe Valves, leur bienveillance et leurs précieux conseils. Cet accueil chaleureux n'était qu'un début, les prémices d'une belle histoire. Je suis très touchée de la manière dont vous m'avez fait évoluer pendant 4 années. Et mettre des mots sur ce que je ressens n'est pas tâche aisée tant je vais manquer de formules, de style, d'élégance et de beaux mots que vous méritez de recevoir. Si tout était à revivre, je n'hésiterais pas un instant et signerais de nouveau pour cette aventure vécue à vos côtés. De votre transmission de la science, aux GRRC, en passant par les viennoiseries et carrés de chocolat partagés, votre tolérance et votre gentillesse m'ont permis d'apprécier toutes les secondes de ma vie au laboratoire. Jean, vos mails de spam et votre groove sur antisocial vont me manquer. Romain, tes arrivées en trottinette, tes mails à 4 heures du matin (ou de la nuit...), tes expressions internationales vont être regrettés. Faites tout de même attention à vos maux de dos, à vos permis de conduire, et à ne pas déforester Maubreuil pour les nombreuses bûches tirées...just wait and see ;)

La Team Valves n'existerait pas sans Pascal Aumond, alias EEE, véritable pilier du groupe et travailleur acharné. Merci pour tout ce que tu m'as appris, techniquement mais également et surtout

humainement. Merci pour ton amabilité, tes blagues, ta rigueur, ton ingénierie, et surtout...pour les perruques de nos déguisements Jelly Belly. Merci pour les rires, les affiches, les vidéos youtube, les surnoms de rats...et les nombreuses situations desquelles tu m'as sortie, aussi variées qu'elles soient. Notre duo naturellement formé dès les premières semaines a tenu toutes ses promesses.

Et puis en Octobre dernier, notre équipe de choc s'est agrandie, Benjamin Le Vély fait son entrée. Je te remercie pour ta bonne humeur journalière, pour l'aide que tu m'as apportée autant sur des manips, que des posters, des présentations ou encore des manuscrits. Ton arrivée coïncide particulièrement avec une augmentation de notre apport calorique journalier, merci pour les goûters partagés. Je ne doute pas que tu prennes soin de Marine, qui a également bon goût pour les blagues et les cookies. Marine, merci pour la joie de vivre, ton insouciance et ta folie qui nous auront entraînés à quelques bonnes soirées.

Je remercie chaleureusement Claire Toquet, tu m'as fait découvrir l'anapath avec toute ta passion, nous avons partagé des moments privilégiés, des préparations de soutenance... tu as toujours été de bons conseils et avais toujours un mot gentil pour moi, merci.

Finalement la Team Valves, il ne s'est pas déroulé un jour sans que, me réveillant le matin, je n'ai envie de venir au laboratoire. C'est grâce à vous. Merci, vous allez terriblement me manquer.

Milène, Enora, Thomas, la Berlioz et Bianca Party m'aura apporté bien plus que je ne pourrai jamais vous rendre. Depuis le Master jusqu'à aujourd'hui, merci d'avoir été là pour moi, au laboratoire et en dehors. Votre soutien indéfectible a tellement de valeur à mes yeux. Une chose est certaine, vous êtes les meilleurs co-équipiers d'Escape-Game de ma vie, je vous aime les frérots (ps : faites attention à l'odeur que laisse le parmesan de Mimi dans les micro-ondes...).

Je tiens également à remercier les doctorants Koh-Lanta, sans qui cette expérience aurait été bien différente. Yoann, Bastien, Robin, Manon, je ne serai pas choquée d'apprendre que vous étiez à l'initiative de changer la programmation de TF1, tant cette réunion hebdomadaire du mardi soir fût un succès. Merci pour la qualité des apéros dinatoires (bien trop conséquents, Toto et Nono vous

aurez la médaille à tout jamais), pour le niveau sonore de ces soirées hors et durant les publicités, pour les récaps nécessaires pour Bastien... jusqu'aux poteaux.

Je suis reconnaissante pour les week-end doctorants, à Mesquer dans une maison hantée ou à Saint-Martin-des-Tilleuls dans je cite « une maison vendéenne datant du XVII^e siècle ». Thibaud, Adrien, Ludivine, Raphaël, Michelle, Cyrielle, Eléonore, la Berlioz et Bianca Party, Koh-Lanta... je garde bien au fond de ma mémoire les danses sur Jean petit, le tee-shirt du capitaine, les toboggan escaliers... les détails resteront bien gardés, juste MERCI !

Je tiens également à remercier et féliciter Louis Bérillon pour les bons moments que nous avons partagé alors que je commençais à écrire ce manuscrit et que tu ne comptais pas tes heures afin de faire avancer le plus rapidement possible les manip clodronate. Pour un « ptit Louis », j'ai été et je suis encore admirative de ta force de travail, de ton adaptabilité et de ta gentillesse. Merci.

Benjamin et Yannick, merci d'avoir été les responsables de Master les plus inspirants, conseillants et bienveillants que cette université n'a jamais connue. Si je suis capable d'écrire ce manuscrit c'est en grande partie grâce à vous.

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire avec lesquelles j'ai pu partager des sourires, échanger... Isabelle, Gildas, Flavien, Béa, Michel R, Ben, Antoine P, Antoine R, Gilliane, Jérôme, Céline Mainguy, Charlène, Valentin, Julien, Estelle, Martine, Marie-France, Maud, Virginie, Vimla, Yolène, Lise, Aurore, Amandine, Victoria, Angélique, Corinne, Elise, Aurélie, Stéphanie, Dorian, Morgane, Lindsay, Corentin, Anne-Clémence, Angélique A.

Je suis reconnaissante d'avoir débuté mon expérience de laboratoire aux côtés de Céline Marionnaud et Sophie Burel qui m'ont indéniablement initiée à la recherche en cardiologie. Je remercie également Gilles Toumaniantz pour ce stage de Master 1 riche en apprentissages.

Je remercie Eric et Nathalie Thorin ainsi que Pauline Labbé et Pauline Mury pour leur accueil à l'institut de Cardiologie de Montréal. Cette belle expérience de quelques mois m'aura permis de gagner confiance et d'y voir plus clair quant à la voie que je souhaitais emprunter pour l'avenir.

Bien évidemment, pour boucler la boucle, je remercie de nouveau Jean Mérot et Romain Capoulade, parce que i) vous méritez amplement 2 vagues de remerciements et parce que ii) rien de tout cela n'aurait pu avoir lieu sans la confiance que vous m'avez accordée lorsque vous m'avez offert l'opportunité de réaliser cette thèse.

Finalement, ces années de doctorat auront été riches en, appelons-les « sorties extra-scolaires ». La rencontre de Marzino, être exceptionnel, au début de cette aventure, aura défié tous mes plans de vie de doctorante. Oublier les soirées devant Prism et les passer au Shaft, au PTM ou chez Ma Poule. Se confiner dans 30 mètres carré, aimer la techno. Regarder stade 2, apprendre à destroncher, à pêcher. Rencontrer les Marlou, mon amie Bounedoune, Camille, Julie, Thomas, également Alix, Inès et Ben. Passer plus de temps un verre à la main. Rigoler, encore et toujours, plus fort, plus longtemps. Prolonger les soirées jusqu'aux aurores. Merci pour tous ces moments partagés, je vous attends à Boston, pas Texas.

Clarisse, ton intelligence hors normes et ton chemin de pensées m'ont ouvert l'esprit sur beaucoup de sujets, variés, d'actualités. Merci infiniment pour ton soutien et cet amour débordant.

J'ai une pensée particulière pour le « Harem de Nicolas ». Chloé, Nicolas, Elina, Alexia et Anne-Claire, vous rythmez ma vie depuis presque 10 ans. Vous m'avez supportée dans toutes les situations possibles et imaginables, cul est à qui, les Max Boubilil, les soirées Ciné qui se passent au Hangar, le serveur du 1 cette année... Vous me connaissez mieux que personne et je ne peux que vous remercier pour cette amitié, mes frères et sœurs d'une autre mère.

Pour terminer, je tiens évidemment à remercier ma famille, pour tout votre amour. A aucune seconde je ne me suis sentie seule et ça c'est grâce à vous. Ghislaine et Sylvain, Coco et Laurence, Méli, Rod, Nany, Mamido, Papa et Maman, je ne saurais vous rendre ne serait-ce qu'un dixième de tout ce que vous m'avez apporté. Vous savez à quel point j'aime la vie ; mais je l'aime à vos côtés. Vous le savez mais on ne se le dit jamais assez, je vous aime de tout mon cœur !

Table des matières

REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIERES	VII
ABRÉVIATIONS.....	XI
TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....	XIII
AVANT-PROPOS.....	XV

INTRODUCTION	- 1 -
--------------------	-------

CHAPITRE 1 : PHYSIOLOGIE DE LA VALVE MITRALE.....	- 3 -
---	-------

1.1 L'appareil valvulaire mitral	- 3 -
--	-------

1.2 Fonction de la valve mitrale	- 4 -
--	-------

1.3 Structure de la valve mitrale	- 6 -
---	-------

1.3.1 Composition matricielle.....	- 9 -
------------------------------------	-------

1.3.2 Composition cellulaire	- 12 -
------------------------------------	--------

1.4 Embryogénèse et maturation valvulaire.....	- 19 -
--	--------

1.4.1 Embryogénèse	- 19 -
--------------------------	--------

1.4.2 Valvulogénèse mitrale	- 20 -
-----------------------------------	--------

1.4.3 Régulation de l'EMT.....	- 21 -
--------------------------------	--------

1.4.4 Maturation.....	- 23 -
-----------------------	--------

1.4.5 Cellules immunitaires dans le développement valvulaire	- 26 -
--	--------

CHAPITRE 2 : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DYSTROPHIE VALVULAIRE MITRALE	- 29 -
---	--------

2.1 Présentation clinique de la DVM	- 29 -
---	--------

2.1.1 Epidémiologie	- 29 -
---------------------------	--------

2.1.2 Etiologie.....	- 30 -
----------------------	--------

2.1.3 Diagnostic	- 32 -
------------------------	--------

2.2 Bases génétiques de la dystrophie valvulaire mitrale	- 37 -
--	--------

2.2.1 DVM syndromiques	- 37 -
------------------------------	--------

2.2.2 DVM non syndromique.....	- 39 -
--------------------------------	--------

2.3 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans les valvulopathies	- 46 -
--	--------

2.3.1 TGF- β	- 46 -
--------------------------	--------

2.3.2 Sérotonine	- 49 -
------------------------	--------

2.3.3 Cils	- 52 -
------------------	--------

2.3.4 L'EMT	- 53 -
-------------------	--------

2.3.5 Cellules immunitaires	- 54 -
-----------------------------------	--------

2.3.6 Mécanobiologie et Relations entre les différentes voies	- 56 -
---	--------

2.4 Physiopathologie du prolapsus valvulaire mitral lié à la Filamine-A	- 61 -
---	--------

2.4.1 Présentation clinique du PVM lié à la Filamine-A.....	- 61 -
---	--------

2.4.2 La Filamine-A	- 65 -
---------------------------	--------

2.4.3 Mécanismes et modèles animaux du PVM lié à la Filamine-A	- 71 -
--	--------

CHAPITRE 3 : HYPOTHESES ET OBJECTIFS	- 75 -
--	--------

CHAPITRE 4 : PAPIER 1 – CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET MOLECULAIRE DU MODELE DE RAT KI FLNA-P637Q.....	- 77 -
---	--------

4.1 Introduction	- 77 -
------------------------	--------

4.2 Manuscrit : Multimodality imaging and transcriptomics to phenotype mitral valve dystrophy in a unique knock-in Filamin-A rat model	- 77 -
--	--------

CHAPITRE 5 : PAPIER 2 – IMPLICATION DES CELLULES IMMUNITAIRES DANS LE PROCESSUS DE DEVELOPPEMENT DE LA DYSTROPHIE VALVULAIRE MITRALE.....	- 119 -
---	---------

5.1 Introduction	- 119 -
------------------------	---------

5.2 Manuscrit	- 119 -
---------------------	---------

CHAPITRE 6 : ETUDE COMPLEMENTAIRE - IDENTIFICATION DES MARQUEURS MOLECULAIRES DES CIVS, CEVS ET CELLULES MYELOÏDES	- 151 -
--	---------

6.1 Matériel et Méthodes	- 151 -
--------------------------------	---------

6.1.1 Tri cellulaire	- 151 -
----------------------------	---------

6.1.2 Reverse transcription et qPCR.....	- 152 -
--	---------

6.2 Résultats	- 153 -
---------------------	---------

6.3 Conclusion.....	- 155 -
---------------------	---------

CHAPITRE 7 : ETUDE COMPLEMENTAIRE - DEPLETION DES CELLULES MYELOÏDES PAR INJECTIONS DE LIPOSOMES-CLODRONATE	- 157 -
---	---------

7.1 Matériel et Méthodes	- 157 -
--------------------------------	---------

7.1.1 Déplétion des macrophages	- 157 -
---------------------------------------	---------

7.1.2 Suivi de la DVM.....	- 158 -
----------------------------	---------

7.2 Résultats	- 162 -
---------------------	---------

7.2.1 Développement des animaux.....	- 162 -
--------------------------------------	---------

7.2.2 Efficacité de la déplétion	- 163 -
--	---------

7.2.3 Caractérisation du phénotype cardiaque et mitral	- 165 -
--	---------

7.3 Conclusion.....	- 168 -
---------------------	---------

CHAPITRE 8 : DISCUSSION GENERALE.....	- 171 -
8.1 Avantages et inconvénients d'un modèle de rat.....	- 171 -
8.2 Mécanismes impliqués dans la DVM	- 172 -
8.3 Implication des cellules immunitaires dans la DVM.....	- 175 -
8.4 Perspectives	- 177 -
BIBLIOGRAPHIE.....	- 179 -

Abréviations

ATAC-seq: “Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing”

AH : Acide Hyaluronique

BA : Bleu Alcian

BPM : Battement Par Minute

CCL: “CC Chemokine Ligand” / Chimiokine ligand

CEV: Cellule Endothéliale Valvulaire

CIV : Cellule Interstitielle Valvulaire

CSPG : “Chondroitin Sulfate Proteoglycan” / Protéoglycane de sulfate de chondroïtine

DVM : Dystrophie Valvulaire Mitrale

EMT: “Endothelial to Mesenchymal Transition” / Transition Endothélio-Mésenchymateuse

FE : Fraction d'Ejection

FLNA: Filamine-A

FVA : Fermeture Valve Aortique

FVM : Fermeture Valve Mitrale

GAG : GlycosAminoGlycan

GTP: Guanosine Triphosphate

HABP : “Hyaluronic Acid Binding Protein” / Protéine de liaison à l'Acide Hyaluronique

HARE « HA Receptor for Endocytosis » / Récepteur à l'acide hyaluronique pour son endocytose

HPS: “Hematoxyline Phloxine Safran”

IM : Insuffisance Mitrale

KD: “Knock-Down”

KI: “Knock-In”

KO: “Knock-Out”

MicroCT : “Micro-Computed Tomography”

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MMP: Métalloprotéinase

NO : “Nitric Oxyde” / Oxyde Nitrique

OG : Oreillette Gauche

OVA : Ouverture Valve Aortique

OVM : Ouverture Valve Mitrale

hiPSC : « human induced Pluripotent Stem Cell » / Cellule souche humaine pluripotente induite

qPCR : « quantitative Polymerase Chain Reaction »

PTD : Pression TéléDiastolique

PTS : Pression TéléSystolique

SEM: “Standard Error to the Mean” / Erreur standard à la moyenne

TGF- β : “Transforming Growth Factor β ” / Facteur de croissance transformant β

TIMP : “Tissue Inhibitor of Metallo Proteinase” / Inhibiteur Tissulaire de métalloprotéinases

VA : Valve Aortique

VD : Ventricule Droit

VEGF : Facteur de Croissance Endothélial

VES : Volume d'Ejection Systolique

VG : Ventricule Gauche

VM : Valve Mitrale

VTD : Volume TéléDiastolique

VTS : Volume TéléSystolique

WT: “Wild Type” / Sauvage

Table des illustrations et tableaux

Figures

Figure 1 : Schéma du cœur en vue frontale.....	- 1 -
Figure 2: Anatomie macroscopique de la valve mitrale.....	- 3 -
Figure 3: Courbe de Pression-Volume du ventricule gauche, en condition physiologique.	- 5 -
Figure 4 : Forces appliquées à la valve mitrale en diastole et en systole	- 6 -
Figure 5 : Schéma de l'organisation en couches d'un feuillet valvulaire mitral	- 8 -
Figure 6 : Schéma des différents types cellulaires au sein des feuillets mitraux de souris à 30 jours post-natal	- 16 -
Figure 7 : EMT, remodelage et élongation de la valve mitrale.....	- 21 -
Figure 8 : Voies de signalisation impliquées dans l'EMT et la maturation de la valve mitrale..	- 22 -
Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'impact du flux sanguin sur le développement valvulaire..	- 23 -
Figure 10 : Composition des feuillets valvulaires chez la souris saine de 7 jours..	- 25 -
Figure 11 : Pourcentage des différents sous-types cellulaires immunitaires au sein des feuillets valvulaires de souris au cours du développement à J7 et J30.....	- 25 -
Figure 12 : Présentation du prolapsus valvulaire mitral et de la dystrophie valvulaire mitrale..	- 29 -
Figure 13 : Classification de l'insuffisance mitrale selon Carpentier.	- 31 -
Figure 14 : Anatomie des valves mitrales dans la dégénérescence fibro-élastique et la maladie de Barlow.	- 31 -
Figure 15 : Prise en charge des patients avec une IM primaire chronique sévère.....	- 34 -
Figure 16 : Schéma de procédure de plastie mitrale.....	- 35 -
Figure 17 : Prothèses utilisées dans le remplacement valvulaire mitral.....	- 36 -
Figure 18 : Différentes approches génétiques pour identifier des variants	- 40 -
Figure 19 : Voies de signalisation décrites comme impliquées dans la DVM.....	- 47 -
Figure 20 : Rôle de la superfamille du TGF- β dans la DVM myxoïde.....	- 48 -
Figure 21 : Effets pathologiques de la sérotonine dans l'organisme.....	- 50 -
Figure 22 : Activation des intégrines selon le stimulus.....	- 57 -
Figure 23 : Modèle de l'activation du TGF- β 1 médiée par la contraction des myofibroblastes.-	- 59 -
Figure 24 : Mécanomodulation et sérotonine impliquées dans la DVM	- 60 -
Figure 25 : Aspects échocardiographiques et histologique du PVM et de la dégénérescence myxoïde des patients FLNA.....	- 63 -
Figure 26 : Schéma résumant la morphologie de l'appareil valvulaire mitral.	- 64 -

Figure 27 : Taux global de chirurgie valvulaire chez les patients mutés comparativement aux contrôles.	- 65 -
Figure 28 : Structure et interaction de la Filamine-A avec l'actine-F	- 66 -
Figure 29 : Principales interactions de la Filamine-A avec ses protéines partenaires.....	- 67 -
Figure 30 : Effet de la déformation du réseau d'actine sur les interactions FLNA-FilGAP.....	- 70 -
Figure 31 : Dimère de Filamine-A et localisation des mutations.	- 71 -
Figure 32 : Impact des mutations FLNA liées au PVM sur les voies de signalisation.	- 72 -
Figure 33 : Expression des transcrits chez les animaux WT, selon le type cellulaire.....	- 154 -
Figure 34 : Expression des transcrits selon le génotype et le type cellulaire.	- 155 -
Figure 35 : Protocole expérimental de la déplétion des cellules myéloïdes chez les rats.	- 158 -
Figure 36 : Exemples d'images et d'analyse des échocardiographies des rats à J21.....	- 159 -
Figure 37 : Evolution du poids des animaux entre J5 et J21.	- 163 -
Figure 38 : Analyse immunohistologique du contenu en macrophages dans le foie et la rate des animaux KI injectés aux liposomes-PBS ou liposomes-clodronate.	- 164 -
Figure 39 : Analyse immunohistologique du contenu en macrophages dans les valves mitrales des animaux WT et KI injectés aux liposomes-PBS ou liposomes-clodronate.	- 164 -
Figure 40 : Evaluation de la structure mitrale et du rythme cardiaque chez les rats à J21.....	- 166 -
Figure 41 : Evaluation macroscopique de la morphologie du feuillet antérieur chez les animaux WT et KI, injectés au PBS ou clodronate.	- 167 -
Figure 42 : Evaluation histologique des animaux WT et KI, injectés au PBS ou clodronate ..	- 167 -

Tableaux

Tableau 1 : Principaux modèles animaux de DVM non syndromique et le phénotype associé. -	42 -
Tableau 2 : Liste des amorces utilisées en qPCR et leurs séquences respectives.	- 152 -
Tableau 3 : Protocole d'inclusion des échantillons en paraffine.....	- 160 -
Tableau 4 : Etapes de déparaffinage, réhydratation, coloration et déshydratation nécessaires à la réalisation d'une coloration histologique.	- 161 -
Tableau 5 : Etapes spécifiques aux colorations histologiques HPS et Bleu Alcian.	- 161 -
Tableau 6 : Etapes des protocoles d'immunofluorescence sur lames paraffine.....	- 162 -

Avant-propos

Ce travail de doctorat a été réalisé dans l'équipe 1 « *Human Genetics* » de l'institut du thorax, dirigée par Jean-Jacques Schott et Richard Redon. La pluridisciplinarité de notre groupe, portée par la mixité de cliniciens, généticiens, bioinformaticiens et physiologistes, permet de suivre la recherche de l'inclusion des patients jusqu'à la recherche fondamentale, en passant par l'étude génétique. Un des programmes de recherche de l'équipe porte sur les pathologies valvulaires cardiaques. Au sein de ce groupe, mes directeurs de thèse Jean Mérot, Romain Capoulade et Thierry Le Tourneau se concentrent sur la physiopathologie des valvulopathies, aortiques et mitrales.

Le prolapsus valvulaire mitral (PVM) est une des valvulopathies majeures, touchant 2 à 3% de la population générale et 10% des plus de 75 ans aux Etats-Unis.¹ Le substrat pathologique du PVM est la dystrophie valvulaire mitrale (DVM) de type myxoïde.²

Malgré l'expansion de sa prévalence, notamment due à l'augmentation de l'espérance de vie, aucun traitement pharmacologique n'est actuellement disponible. Le manque de modèles animaux pertinents pour étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le PVM a dirigé la prise en charge des patients vers des approches chirurgicales. Ces protocoles, bien qu'efficaces, sont lourds pour les patients et coûteux pour le système de santé.

Cependant, en 2007, mon équipe a mis en évidence la causalité du gène *FLNA* codant pour la protéine Filamine-A, dans le PVM.^{3,4} Tirant profit de cette découverte, le rat exprimant la mutation *FLNA*-P637Q préalablement identifiée, a été généré.⁵

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse qui a visé à caractériser ce nouveau modèle animal, dans le but d'apporter des pistes quant aux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la DVM.

Introduction

Le cœur compte quatre valves : deux valves semi-lunaires à l'interface des ventricules et des grosses artères, et deux valves atrio-ventriculaires entre les oreillettes et les ventricules. La valve pulmonaire est située entre le ventricule droit (VD) et l'artère pulmonaire, et la valve aortique (VA) entre le ventricule gauche (VG) et l'aorte. La valve tricuspide se trouve entre l'oreillette et le ventricule droit et la valve mitrale (VM) entre l'oreillette et le ventricule gauche. Ces structures assurent le passage unidirectionnel du sang afin d'irriguer tous les tissus et organes (Figure 1).

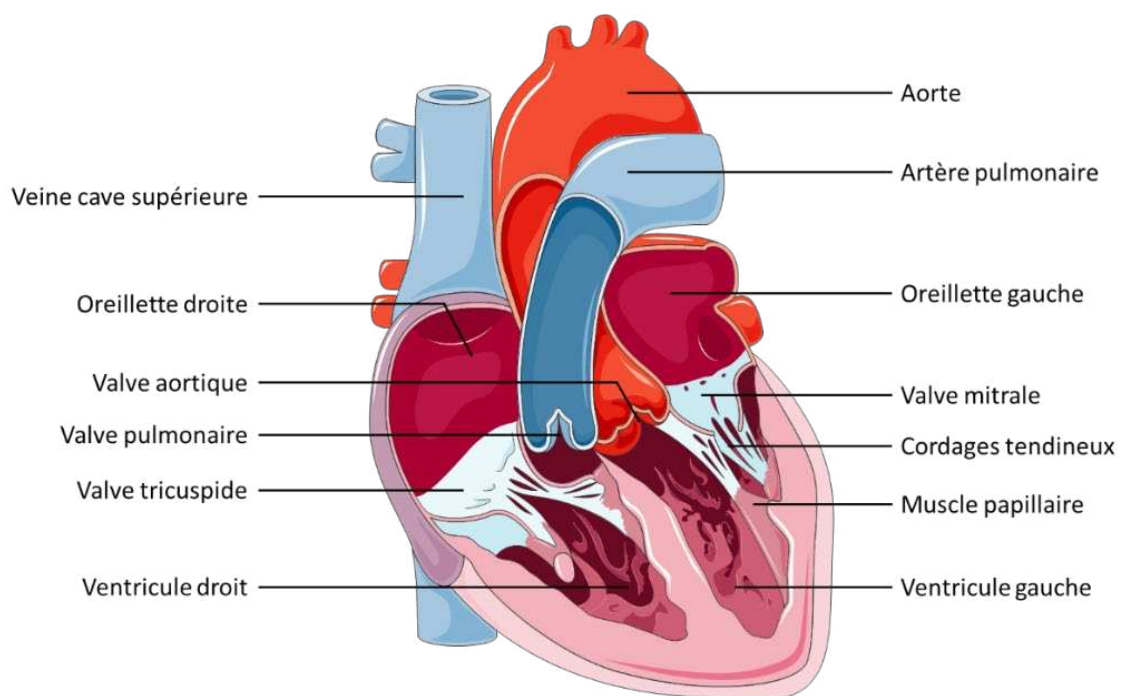


Figure 1 : Schéma du cœur en vue frontale. D'après Medical Servier, fourni par Servier, sous licence Creative Commons Attribution 3.0 unported license.

Des défauts de structure et de fonction valvulaire tels que la sténose et la régurgitation valvulaire sont responsables d'insuffisance cardiaque, pouvant parfois entraîner une mort subite.^{1,6,7} Principalement rhumatismales dans les pays en développement, les valvulopathies les plus courantes dans les pays développés sont désormais dégénératives.⁷ La sténose, qui définit une réduction de la surface d'ouverture valvulaire et la régurgitation, qui définit le reflux de sang dans

une cavité cardiaque, sont les affectations valvulaires les plus fréquentes.¹ Mes travaux de doctorat ont porté sur l'étude d'une de ces pathologies valvulaires : le prolapsus valvulaire mitral (PVM), qui se caractérise par le développement d'une dystrophie valvulaire mitrale (DVM) pouvant entraîner une régurgitation de cette même valve, et ainsi être la source d'insuffisance cardiaque et de morbi-mortalité.⁸⁻¹²

Chapitre 1 : Physiologie de la valve mitrale

1.1 L'appareil valvulaire mitral

L'appareil valvulaire mitral regroupe la valve mitrale, les muscles papillaires et les cordages.

La VM est constituée de deux feuillets, l'un appelé feuillet postérieur et l'autre feuillet antérieur, pour lesquels on définit trois segments (P1, P2, P3 séparés par deux scissures, et A1, A2, A3 par homologie bien que le feuillet antérieur ne présente pas normalement de segmentation anatomique), selon la Classification de Carpentier (Figure 2). Les deux feuillets sont ancrés à leur base sur l'anneau mitral fibreux et ils sont reliés aux muscles papillaires par des cordages tendineux (Figures 1 et 2). Comme présenté Figure 2, le feuillet antérieur est plus important (4 à 7 cm² vs 2 à 3 cm² pour le postérieur), plus long (18 à 24 mm vs 11 à 14 mm pour le postérieur) et plus épais que le feuillet postérieur.^{13,14} Les cordages tendineux partent des muscles papillaires (antéro-latéral et postéro-médial) qui sont eux-mêmes une protrusion du myocarde.¹⁵ Les cordages primaires s'attachent au bord libre des feuillets, sont fins et ont une extensibilité limitée due à leur forte densité en fibres de collagène.¹⁶ Les cordages secondaires s'insèrent dans la partie centrale des feuillets (corps des feuillets), sont plus épais et plus extensibles que les cordages primaires.¹⁷

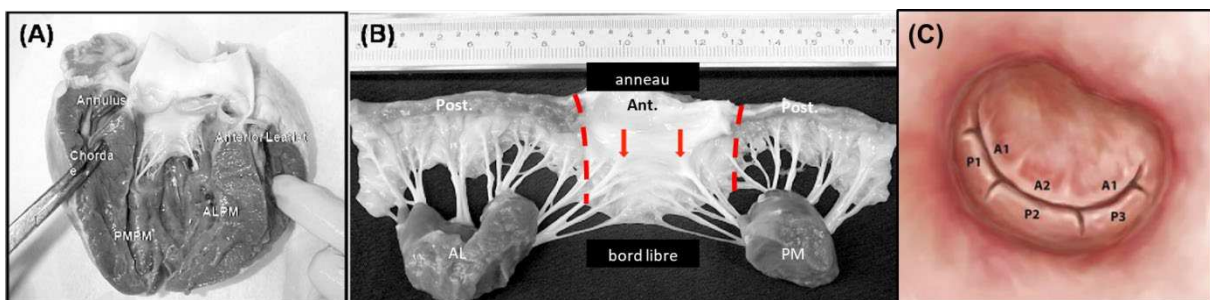


Figure 2: Anatomie macroscopique de la valve mitrale. A) Valve mitrale native (feuillet antérieur visible) dans un cœur humain sain. B) Valve mitrale excisée, feuillet postérieur ouvert. Les feuillets sont reliés aux muscles papillaires par des cordages tendineux. Les tirets rouges délimitent les feuillets. Les flèches rouges montrent des points d'insertion de cordages secondaires. C) Représentation des segments mitraux (P1, P2, P3 et A1, A2, A3). Post : feuillet postérieur, Ant : feuillet antérieur, AL : antéro-latéral, PM : postéro-médial. Modifié, d'après ^{18,19}.

Cet appareil sous-valvulaire permet la bonne coaptation des feuillets et prévient leur prolapsus. Ainsi, la valve qui s'ouvre et se ferme au cours du cycle cardiaque en suivant les changements de pressions dans les cavités cardiaques, empêche le retour du sang dans l'oreillette gauche.

1.2 Fonction de la valve mitrale

La valve mitrale permet le passage unidirectionnel du sang de l'OG vers le VG lors de la diastole ventriculaire et empêche le reflux du sang dans l'OG lors de la systole ventriculaire (lorsque la VM est en position fermée). La valve mitrale participe également à la contractilité du VG (*via* la continuité anneau mitral-myocarde) et à l'orientation du flux d'éjection vers la chambre de chasse du VG.

Les cycles d'ouverture et de fermeture de la valve mitrale sont déterminés par les variations de pression dans l'OG et le VG au cours du cycle cardiaque qui comprend quatre phases (Figure 3) :

- **Remplissage ventriculaire** : après la phase de relaxation iso-volumétrique durant laquelle les valves aortique et mitrale sont fermées, la pression ventriculaire devient inférieure à la pression atriale, induisant l'ouverture de la VM et donc le passage du sang. Le remplissage est divisé en deux phases, le remplissage passif qui comporte le remplissage rapide protodiastolique puis lent ou diastasis médiastolique, et enfin le remplissage actif qui est dû à la contraction atriale. Le remplissage engendre l'augmentation du volume ventriculaire sans grande augmentation de la pression ventriculaire.
- **Contraction iso-volumétrique** : la contraction ventriculaire induit l'augmentation rapide de la pression ventriculaire qui dépasse alors la pression atriale et entraîne la fermeture de la VM, empêchant tout reflux de sang dans l'OG. La contraction iso-volumétrique constitue les premiers centièmes de seconde de la systole ventriculaire, lorsque le ventricule débute sa contraction alors que les valves mitrale et aortique sont fermées.

- Lorsque la pression ventriculaire gauche dépasse celle de l'aorte, engendrant l'ouverture de la VA, débute alors la **phase d'éjection** où le volume de sang, appelé volume d'éjection systolique (VES) est éjecté dans l'aorte. Le volume restant dans le ventricule est appelé volume résiduel, utilisable pour augmenter le débit cardiaque lors de cycle subséquent.
- **Relaxation iso-volumétrique** : première phase de la diastole ventriculaire, après la fermeture de la VA, la pression ventriculaire décroît rapidement jusqu'à devenir inférieure à celle de l'OG, ce qui va entraîner l'ouverture de la VM.

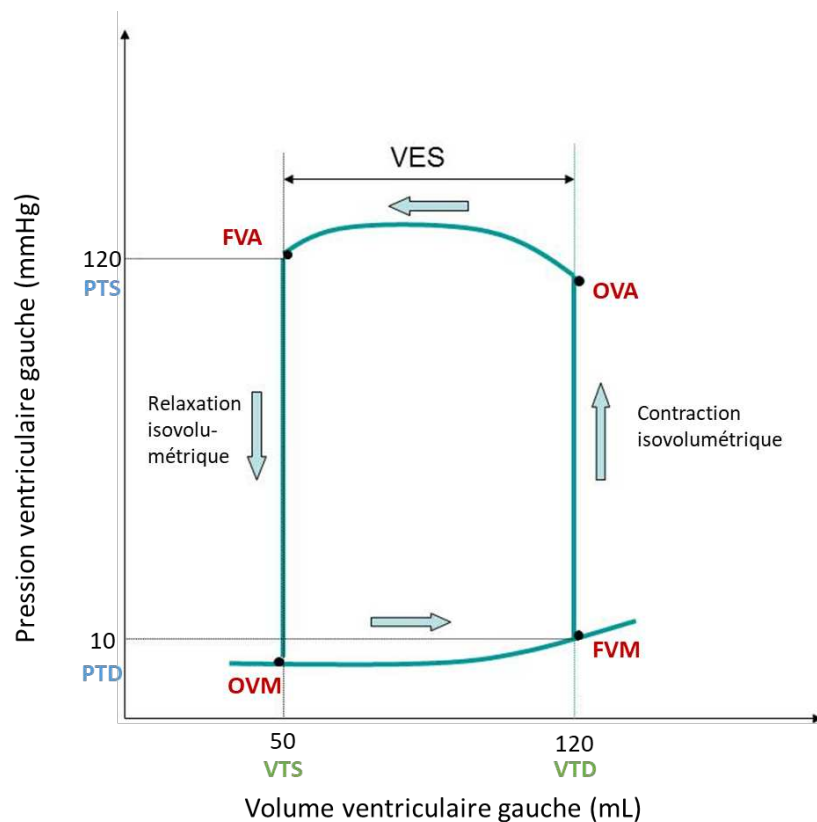


Figure 3: Courbe de Pression-Volume du ventricule gauche, en condition physiologique. FVA: fermeture valve aortique, OVM: ouverture valve mitrale, FVM: fermeture valve mitrale, OVA: ouverture valve aortique, VES: volume d'éjection systolique, PTS: pression télésystolique, PTD: pression télédiastolique, VTS: volume télésystolique, VTD: volume télédiastolique.

Durant ces cycles, la valve mitrale est exposée à un environnement de fortes pressions intermittentes (120 mmHg). La VM est soumise à des contraintes diverses, de tension, de flexion, de pression et

de cisaillement présentées Figure 4. Les forces de cisaillement sont dues au flux sanguin, laminaire ou turbulent, et cela tout le long du cycle cardiaque. Ainsi, la valve qui s'ouvre et se referme plus de 3×10^9 fois en moyenne au cours de la vie, subit un stress physiologique important et démontre une aptitude intrinsèque à s'adapter à la fatigue mécanique en remodelant et réparant constamment sa matrice extracellulaire (MEC).²⁰

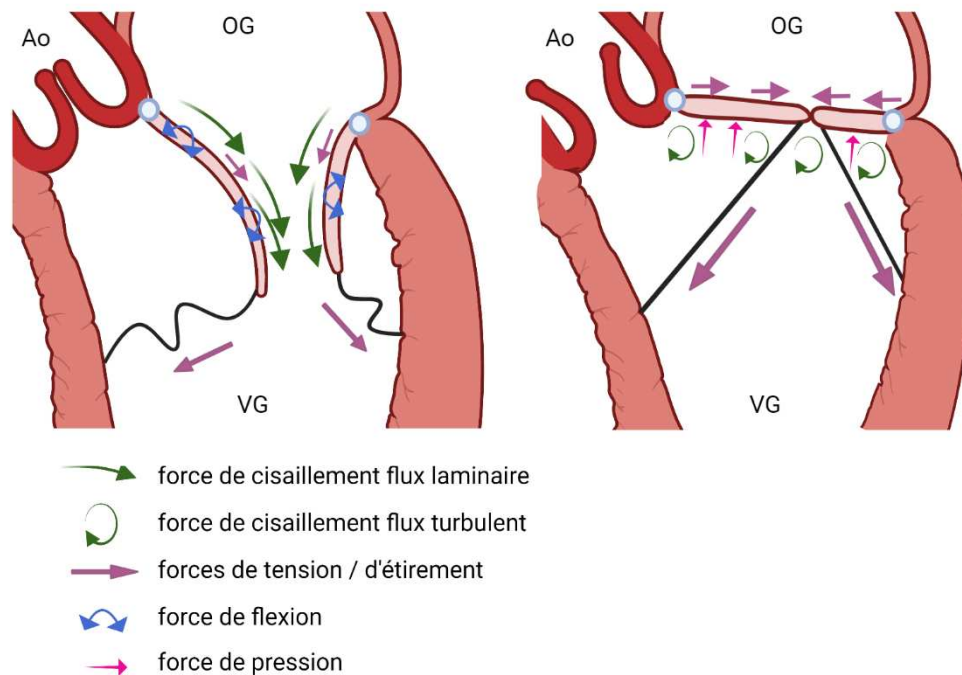


Figure 4 : Forces appliquées à la valve mitrale en diastole (gauche) et en systole (droite). Créé avec Biorender.com

1.3 Structure de la valve mitrale

Chaque feuillet mitral est constitué de trois couches distinctes (Figure 5) dans lesquelles on retrouve des cellules endothéliales valvulaires (CEVs), des cellules interstitielles valvulaires (CIVs) et de la matrice extracellulaire (MEC). La MEC, décrite section 1.3.1, inclut principalement du collagène, majoritairement de type III, de l'élastine et des protéoglycanes.^{10,21-23} Néanmoins, chaque couche présente une ultrastructure, une composition cellulaire, une composition matricielle et des propriétés biomécaniques spécifiques :²⁴

- **L'atrialis** : située côté atrial de la valve et tapissée d'un endothélium (continu depuis l'OG²⁵), elle se compose principalement de fibres d'élastine qui lui procurent une grande capacité d'étirement et de rétractation offrant à la valve la plasticité nécessaire pour s'adapter aux forces de traction et aux déformations subies lors de chaque cycle cardiaque.^{10,26}

- **La spongiosa** : localisée au milieu du feuillet, elle est constituée d'un lâche réseau de collagène et majoritairement composée de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes (GAG) tels que le versican, biglycan, décorine ou l'acide hyaluronique qui lui confèrent les capacités d'absorber les forces de tension et de pression subies par la valve et ainsi de maintenir l'intégrité de la structure.^{10,21,27}

- **La fibrosa** : située au niveau de la face ventriculaire de la valve soumise à de fortes pressions liées à la systole du ventricule gauche, elle est majoritairement composée d'un réseau dense de fibres de collagène de type I²³ orientées parallèlement au bord libre, dont le rôle est de résister aux forces d'étirement et de pression et de maintenir la stabilité du tissu.²⁸⁻³¹

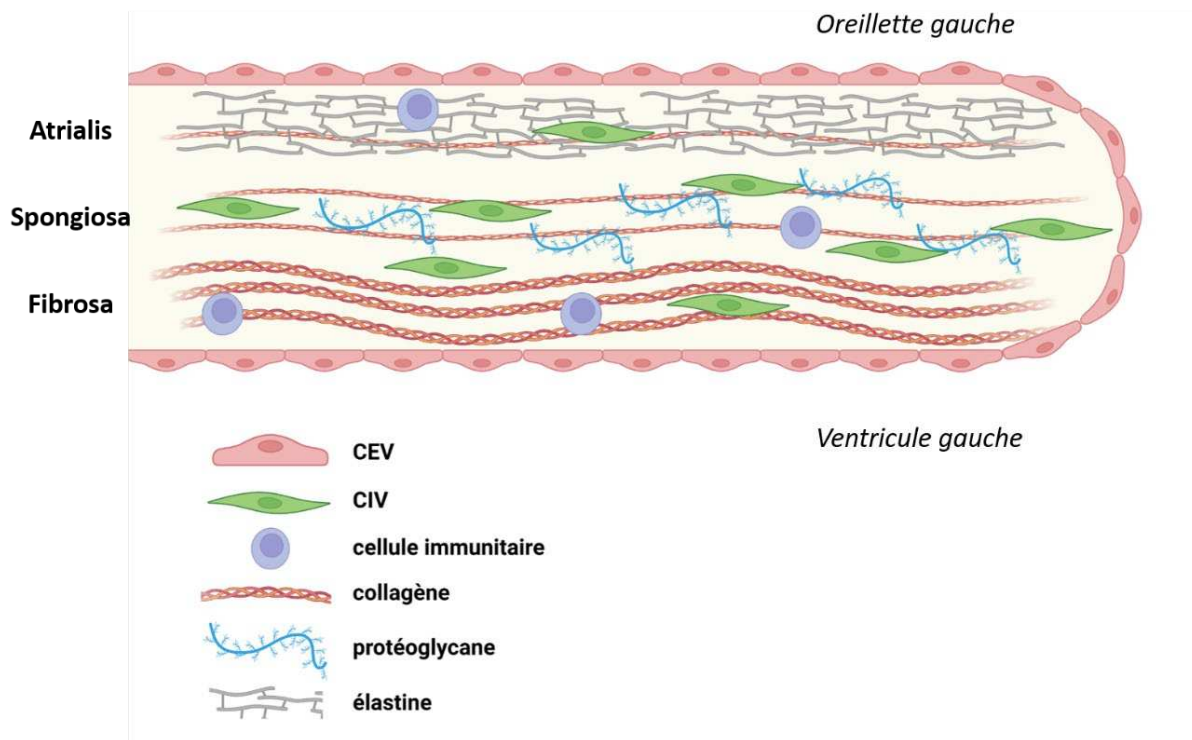


Figure 5 : Schéma de l'organisation en couches d'un feuillet valvulaire mitral. Créé avec Biorender.com.

Aux sites d'insertion des cordages sur la face ventriculaire des feuillets, une modification graduelle de la fibrosa collagénique plane vers une matrice collagénique cylindrique permet une transition des forces entre les cordages et le feuillet.¹⁸ Les cordages sont en effet composés d'un noyau de fibres de collagène cylindriques, entouré d'une gaine élastique qui leur confère des propriétés viscoélastiques variables selon la taille et la localisation des cordages.^{32,33}

Pour conclure, la structure valvulaire physiologique qui regroupe différentes couches est indispensable à la bonne dynamique de la valve, tout comme la composition de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que la composition et la localisation cellulaire.^{28,34} L'homéostasie de la MEC est maintenue par les différentes cellules présentes dans les feuillets, décrites section 1.3.2.

1.3.1 Composition matricielle

La matrice extracellulaire de la valve est composée principalement de collagène, élastine, glycosaminoglycane et acide hyaluronique (AH).^{21,27} Les paragraphes qui suivent décrivent ces différents composants.

Collagène

Les collagènes sont des molécules trimériques, dans lesquelles chaque chaîne comprend un motif répété Gly-X-Y où X et Y sont majoritairement la proline et l'hydroxyproline respectivement.³⁵ Ce motif permet une organisation du collagène en hélice qui peut être homo ou hétérotrimérique selon les types de collagène. Actuellement, 27 types de collagène ont été identifiés. Au sein des valves, le réseau de collagène est le composant structurel principal. Les collagènes fibrillaires I et III sont les types majoritaires, le type III est trouvé dans tout le feuillet et le type I plus spécifiquement dans la fibrosa.²⁷ Les molécules de collagène s'organisent en fibrilles grâce à la perte protéolytique de propeptides.³⁶ Les fibres de collagène sont organisées en trois dimensions de manière à procurer au tissu la résistance nécessaire pour lutter contre les forces de compression du ventricule. Les fibres sont synthétisées par les fibroblastes et l'assemblage en réseau se fait principalement dans le milieu extracellulaire, même si quelques études démontrent un début de processus dès la sécrétion à la membrane plasmique.³⁷

In vivo, la fibrillogénèse du collagène est un processus développemental complexe qui implique des protéines associées au collagène telles que les péricollagènes et les protéoglycanes.^{37,38} Certaines protéines de la MEC comme la ténascine, sparc, la fibronectine, la thrombospondine et des protéoglycanes (décorine, byglycane, lumicane, fibromoduline) régulent la fibrillogénèse et ainsi les propriétés mécaniques des tissus conjonctifs. Au cours du développement, la matrice de collagène est renforcée par l'augmentation de la taille des fibres de collagène et par la formation de liaisons intra- et inter-moléculaires au sein des fibres.³⁹

Glycosaminoglycanes

Les GAGs sont des mucopolysaccharides qui peuvent être sulfatés ou non sulfatés. Les GAGs sulfatés sont liés à des protéines pour former des complexes appelés protéoglycanes. Il existe quatre types de GAGs sulfatés : les chondroïtines-sulfate (CSPG), les dermatanes-sulfate, les kératanes-sulfate et les héparanes-sulfate/héparines. L'unique GAG non sulfaté est l'acide hyaluronique (AH) (décrit plus en détail dans la section suivante). Les GAGs participent à de nombreuses fonctions biologiques. Par exemple, la décorine et le biglycane régulent le diamètre des fibres de collagène et l'organisation tissulaire ^{40,41} alors que l'AH participe à la régulation de la motilité et l'adhésion cellulaire.

Au sein des feuillets mitraux, trois protéoglycanes et l'AH sont présents à des abondances variables selon la région du feuillet et le stress subi.²¹ Les données provenant de VM humaines indiquent que les régions soumises principalement aux forces de compression telles que les zones de coaptation des feuillets sont enrichies en versican et AH, alors que les régions soumises majoritairement aux forces de traction sont riches en décorine et biglycan.²¹ La **décorine** et le **biglycan** sont des petits protéoglycanes riches en leucines qui participent à la fibrillogénèse ^{42,43} du collagène et séquestrent le « transforming growth factor β » (TGF- β) ⁴⁴. Ils sont trouvés dans les régions de feuillets riches en collagène et dans les régions riches en élastine.

Le **versican** est un protéoglycane plus gros, qui s'agrège à l'AH ^{45,46} pour conférer au tissu des propriétés de résistance à la compression. Le versican co-localise avec les fibres élastiques et de nombreuses molécules cellulaires pour réguler l'adhésion, la prolifération et la migration cellulaire ^{45,46}. Pour des raisons encore inexplicées, le versican est plus abondant dans les valves mitrales des femmes que dans celles des hommes ²⁷. De tous les protéoglycanes présents dans la valve, c'est le seul qui a montré une relation au genre. Cependant, l'abondance de tous les protéoglycanes cumulés est supérieure dans les VM des hommes.

- *Acide hyaluronique*

L'acide hyaluronique est un GAG anionique, non sulfaté, hautement hydrophile, présent de manière ubiquitaire dans les tissus et fluides (tissus conjonctifs, moelle osseuse...) ^{47,48}. L'AH est donc libre dans les tissus, néanmoins il peut se lier de manière non covalente à des protéoglycanes via la protéine de liaison de l'acide hyaluronique (HABP). L'AH se compose d'une répétition disaccharide d'acide glucoronique et de N-acétyl-glucosamine. Synthétisé par les protéines HAS1-3, ses récepteurs sont i) CD168, aussi appelé RHAMM, impliqué dans la motilité cellulaire, ii) stabiline-2 (ou HARE « HA receptor for endocytosis ») ²⁷ et iii) CD44, une glycoprotéine transmembranaire sur-exprimée dans de nombreux cancers ⁴⁹⁻⁵¹. Lorsque l'AH se lie à CD44, il est clivé en deux segments de plus faible poids moléculaire par l'enzyme Hyal-2 afin d'être internalisé ⁵². Une fois dans la cellule, l'AH dégradé est pris en charge dans des endosomes puis des lysosomes où il est de nouveau digéré, par l'enzyme Hyal-1 ^{48,52}. Présent dans la MEC, l'AH joue un rôle fondamental dans la motilité, l'adhésion, la prolifération et l'inhibition de la différenciation cellulaire ^{51,52}. L'AH participe également au développement embryonnaire, à la morphogénèse, la cicatrisation et l'inflammation ⁵². Il procure à la VM une résistance à la compression ²⁷, notamment grâce à sa répartition au sein de la valve.

Des dérégulations de composants de la MEC ont été rapportées dans les valves mitrales myxoïdes, décrites section 2.1. L'homéostasie tissulaire est entretenue par les cellules qui composent la valve, décrites ci-dessous.

1.3.2 Composition cellulaire

Les cellules interstitielles valvulaires

Les cellules interstitielles valvulaires (CIVs) sont le type cellulaire le plus représenté au sein de la valve mitrale (environ 80%)²². Ces cellules sont cruciales pour le maintien de l'homéostasie et la fonction valvulaire⁵³. Les CIVs qui dérivent de cellules progénitrices embryologiques, entretiennent l'homéostasie tissulaire, notamment grâce à la sécrétion des protéines matricielles et d'enzymes (métalloprotéinases (MMP), inhibiteurs de MMP (TIMP))⁵⁴. Bien qu'elles en partagent certaines caractéristiques, les CIVs ne sont pas des cellules musculaires lisses car elles présentent une membrane basale incomplète^{54,55}.

Dès 1988, des études décrivaient l'existence de différentes populations de CIVs au sein de la valve mitrale^{54,56-58}. En 2007, Liu et collaborateurs décrivent trois types de CIVs dans les valves matures humaines⁵⁴ :

- **Les CIVs quiescentes (CIVs-q)** : comparables à des fibroblastes, elles maintiennent la structure ainsi que la fonction des valves. Ces cellules non contractiles n'expriment pas l'actine musculaire lisse (α -sma) mais expriment la vimentine et contribuent à l'homéostasie de la MEC⁵⁴. Ces cellules sont considérées quiescentes mais leur activité mitotique reste inconnue dans les valves humaines *in vivo*. Les CIVs communiquent par le biais de jonctions adhérentes (expression de desmogléine et N-cadhérine) et de jonctions communicantes (expression de connexines-26 et -45)⁵⁵. Ces jonctions permettraient aux CIVs de former un réseau serré afin de répondre au stress mécanique, facilitant ainsi la fonction valvulaire ; mais des études spécifiques sur ce sujet restent nécessaires⁵⁹. De plus, l'activité métabolique et l'organisation cellulaire au sein des couches des feuillets valvulaires ne sont pas bien décrites. Les CIVs-q pourraient inhiber l'angiogénèse et ainsi maintenir les valves saines avasculaires.

- **Les CIVs activées (CIVs-a)** : les cellules quiescentes ont la capacité de s'activer de manière transitoire afin de répondre aux conditions de stress hémodynamique et mécanique auxquelles sont soumises les valves. Les CIVs-a ont des propriétés myofibroblastiques, elles sont capables de contractilité accrue, de sécrétion et expriment des fibres de stress proéminentes²⁰. Ces CIVs-a sont caractérisées et différenciées des CIVs-q par l'expression d' α -sma⁶⁰. Les CIVs activées sont une population hétérogène, qui présente des morphologies, capacités de prolifération et de motilité variables dans les cultures *in vitro*⁶¹. L'activation des CIVs-q est stimulée dans un environnement de CEVs activées, de macrophages, des chimiokines, de facteurs de croissance ou de stimulation mécanique^{20,62,63}. Cette activation est associée à un turnover élevé de la MEC, à une prolifération et une migration augmentée, à l'expression de MMP et d'inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs)⁶³. Cette activation permet de réguler l'homéostasie tissulaire mais peut, si elle devient chronique, induire un phénotype pathologique dans la valve. Les processus et voies de signalisation principaux impliqués dans l'activation des CIVs sont présentés section 2.3.
- **Les CIVs progénitrices (CIVs-p)** : ces cellules souches valvulaires sont dérivées de la moelle osseuse, de la circulation et de cellules progénitrices valvulaires résidentes. Deux sous-populations ont été identifiées, les progéniteurs endothéliaux (CD133+ CD34+) et les cellules dendritiques (qui expriment la protéine de liaison au calcium S100). La colocalisation de ces cellules suggère un progéniteur commun, les cellules souches hématopoïétiques CD34+. Les mécanismes par lesquels les CIVs-p deviennent des CIVs activées restent méconnus.

Par ailleurs, plus récemment, une étude transcriptomique de single-cell sur un pool de valves aortiques et mitrales de souris C57BL/6J saines réalisée par Hulin et collaborateurs, décrit trois sous-types de CIVs dans les valves de 30 jours ²² (Figure 6). Les trois populations de CIVs n'ont pas de rôle fonctionnel bien décrit, mais leur profil transcriptomique permet de définir des classes de CIVs :

- **Les fibrosa-CIVs** : ces cellules constituent environ 50% des CIVs et présentent les caractéristiques typiques de fibroblastes : elles expriment des gènes impliqués dans l'organisation de la MEC tels que la périostine et la vimentine, dans la prolifération des cellules souches et dans la régulation de la sécrétion d'interleukine- β .
- **Les Tcf21-CIVs** : caractérisées par l'expression des gènes du complément impliqués dans des processus de réponse, de défense, de cicatrisation et d'adhésion cellulaire, ces cellules sont localisées préférentiellement dans les régions de VM pauvres en collagène.
- **Les CIVs présentatrices d'antigènes** : elles expriment des gènes impliqués dans des processus antigéniques, de présentation peptidique via CMH-II et de régulation de la phosphorylation de la tyrosine.

De plus, la localisation des CIVs sur le feuillet semble déterminer un phénotype spécifique. En effet, l'étude de CIVs porcines provenant de trois zones différentes de la valve démontrent un profil métabolique, d'adhésion, de maturation et de synthèse de la MEC spécifique ⁶⁴. Les CIVs du centre du feuillet antérieur semblent stimulées par les forces de tension et la matrice collagénique qui les entoure, pour exprimer des quantités plus importantes de composants cytosquelettiques ⁶⁴. En comparaison, les CIVs du bord libre du feuillet antérieur sont plutôt soumises aux forces de compression. Elles sont riches en protéoglycanes et moins rigides ⁶⁵, ce qui correspondrait à une expression plus faible des marqueurs cytosquelettiques ⁶⁴.

Les cellules endothéliales valvulaires

Les CEVs recouvrent en monocouche les feuillets mitraux, du côté atrial et ventriculaire. Ces cellules peuvent s'activer en condition physiologique, selon l'environnement et les changements de MEC^{53,66}. Les CEVs ont été principalement étudiées *in vitro*. Ces cellules ont la capacité d'organiser leur filaments d'actine et leurs complexes focaux d'adhésion de manière à s'aligner perpendiculairement au flux sanguin mais parallèlement aux fibres de collagène du feuillet^{28,67,68}. Toutefois, l'alignement *in vivo* n'est pas clairement caractérisé. Par ailleurs, les CEVs sécrètent des agents vasoactifs tels que l'oxyde nitrique (NO) ou les prostaglandines.

Trois populations de CEVs ont été identifiées dans les feuillets valvulaires de souris saines âgées de 30 jours, elles se différencient principalement par leur localisation au sein du feuillet valvulaire (Figure 6)²². L'hétérogénéité endothéliale est en effet liée aux forces de cisaillement subies par différentes parties de la valve^{66,69} :

- **Les CEVs-lymph** : représentant 28% des cellules endothéliales valvulaires, elles sont caractérisées par l'expression de *Prox1*, gène spécifique des CEVs lymphatiques et impliqué dans le développement des vaisseaux lymphatiques. Les CEVs-lymph sont situées du côté de la fibrosa, à distance du flux sanguin laminaire (Figure 5).
- **Les CEVs** : elles expriment des marqueurs typiques de cellules endothéliales (gènes de l'endomucine, endothéline, facteur de Von Willebrand, molécule d'adhésion intercellulaire) mais également des facteurs de croissance (*Bmp4*, *Tgfb2*) et des gènes de la MEC. Elles sont localisées au niveau proximal, côté atrial.
- **Les CEVs-coapt** : comptabilisant 45% des cellules endothéliales valvulaires, elles expriment fortement *Hapln1* (Hyaluronan and proteoglycan link protein 1) et les gènes de la signalisation Wnt/ β -caténine comme *Wnt9b* et *Dkk2*. Les cellules qui expriment *Hapln1*

ont été identifiées dans les zones de coaptation des feuillets où 29% des CEVs expriment *Hapln1*.

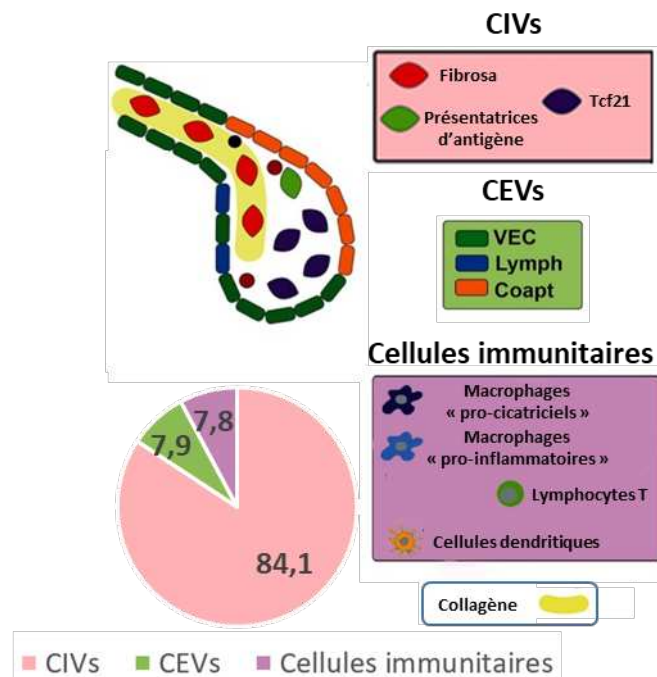


Figure 6 : Schéma des différents types cellulaires au sein des feuillets mitraux de souris à 30 jours post-natal (Modifié d'après ²²).

Les cellules immunitaires valvulaires

La découverte des cellules immunitaires dans les valves a été précédée par leur identification dans les vaisseaux ⁷⁰ qui présentent des similitudes avec les valves. Les travaux sur l'athérosclérose et la calcification de la valve aortique ⁷¹⁻⁷³ ont fait émerger l'importance de ces cellules dans l'homéostasie tissulaire. De ce fait, les études portant sur les cellules immunitaires dans la valve mitrale ont vu le jour plus récemment, mais l'intérêt suscité par le sujet est grandissant. L'infiltration de cellules immunitaires dans les valves adultes a été démontrée par Visconti et collaborateurs grâce à des expériences de transplantation de moelle osseuse dans un modèle de souris ⁷⁴. Par la suite, d'autres études ont validé ces données ⁷⁵ et il est maintenant reconnu que des cellules hématopoïétiques sont recrutées dans les valves saines. D'autre part, une partie des cellules immunitaires valvulaires proviennent du développement (détaillé section 1.4.5). Néanmoins, leur

fonction dans les valves, commence juste à être étudiée dans le développement et les pathologies ^{76,77}.

Les **cellules dendritiques** ont été identifiées dans les valves grâce à l'intégrine CD11c qu'elles expriment fortement ⁷¹. De manière intéressante, ces cellules sont localisées dans les zones de flux turbulent, indiquant une potentielle implication dans la mécanobiologie ⁷¹.

Les **mastocytes** sont connus pour leur rôle dans l'allergie, mais des études ont démontré leur effet dans la physiologie cardiaque ^{78,79}. Les mastocytes sont décrits dans les valves aortiques humaines (notamment dans les cas de sténose où la quantité de mastocytes est associée à la sévérité de l'atteinte ⁸⁰), canines et de souris et leur rôle dépend de leur localisation. En effet, le microenvironnement tissulaire recrute et différencie ces cellules ^{79,81}.

Les **macrophages** ont été décrits dans le développement cardiaque ⁸², et dans les valves, en premier lieu aortiques ^{76,83}. Le marqueur F4/80 est utilisé pour identifier les macrophages chez la souris ⁸⁴. Les fonctions et l'origine des populations hétérogènes de macrophages varient selon le contexte ^{85,86}. A l'âge adulte, l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse et les monocytes circulants sont à l'origine de macrophages ⁸⁷. Pour maintenir l'homéostasie tissulaire, l'expansion des macrophages peut donc survenir par le recrutement de macrophages dérivés de monocytes, ou par la prolifération de macrophages dits résidents ⁷⁶. Ces macrophages de deux origines distinctes sont différenciés par l'expression du marqueur CCR2 ⁸⁸. Bien que la fonction des macrophages recrutés CCR2⁺ dans un cœur sain ne soit pas entièrement connue, ces cellules expriment des gènes de l'inflammation (*Ccl7*, *Ccl9*, *Cxcl2*, *IL10*, *IL1β*) ^{89,90}. Une autre population de macrophages, les macrophages dits résidents (CD206⁺), sont également décrits dans les valves mitrales murines ⁹¹. Une communication macrophages-CIVs permettrait l'activation des CIVs pour maintenir l'homéostasie tissulaire. En effet, différentes études réalisées sur des valves aortiques démontrent l'infiltration des monocytes dans la valve, où ces cellules se différencient alors en macrophages ^{92,93}.

et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. Dans des valves aortiques porcines, le shear stress accroît l'expression des molécules d'adhésion endothéliales ICAM1 et VCAM1, augmentant le recrutement des leucocytes⁹⁴, qui sécrètent du TNF- α et TGF- β , stimulant l'activation des CIVs qui remodelent alors la MEC^{95,96}.

Identifiés par l'expression du cluster de différenciation CD45, cinq types de cellules immunitaires ont été identifiés dans une étude transcriptomique en single-cell d'un mélange de cellules valvulaires aortiques et mitrales et qui représentent 8 à 10% de la population valvulaire^{22,91,97} (Figure 6) : les lymphocytes T (*Cd24a*⁺), les mastocytes (*Kit*⁺), les cellules dendritiques (*Klrbl*⁺) et deux sous-types de macrophages (*Cx3cr1*⁺). Les récentes études portent un intérêt particulier aux macrophages, notamment car leur rôle dans l'homéostasie tissulaire est lui, déjà connu⁹⁸. Les deux populations de macrophages identifiées dans les valves du cœur gauche sont les suivantes :

- **Les macrophages « pro-cicatriciels »** : expriment des gènes impliqués dans la différenciation en macrophages tels que *Dab2*, *Maf*, *Csf1r* et *Mrc1* (CD206). La quantité relative de ces macrophages diminue au cours du développement pour atteindre 6% des cellules immunitaires présentes au sein des valves à 30 jours. L'hétérogénéité des cellules myéloïdes et l'existence d'une population de macrophages cicatriciels CD206+ au sein des feuillets avaient été révélées en 2018 *in vivo* par le même groupe⁹¹.
- **Les macrophages « pro-inflammatoires »** : expriment fortement les chimiokines *Ccl7*, *Ccl2*, *Ccl4*, *Tnf*, *Cxcl2* et *CD74*. Ces cellules représentent 73% des cellules immunitaires dans la valve à 30 jours.

En conclusion, bien que différents travaux aient permis la caractérisation des cellules au sein de la valve mitrale il est important de rappeler que la limite majeure à l'étude cellulaire de la valve mitrale humaine est la disponibilité de tissu sain. Ainsi, la plupart des prélèvements proviennent de chirurgies valvulaires, par conséquent les études histologiques sur tissu humain⁵⁴ représentent un

stade pathologique ou un stade de vieillissement avancé. Par ailleurs, la disparité des résultats des études *in vivo*, *in vitro* et *in situ* peut trouver ses origines dans les différentes approches expérimentales utilisées telle que l'isolement des cellules pour leur culture, limitant la fiabilité des résultats ²⁰. Des modèles animaux, notamment murins, permettant l'analyse des valves au cours du développement, de la maturation et du vieillissement, ont de ce fait été étudiés ²².

1.4 Embryogénèse et maturation valvulaire

1.4.1 Embryogénèse

Au cours de l'embryogénèse, le cœur est le premier organe à fonctionner ⁹⁹ car il est indispensable au développement du fœtus. Le premier signe visible de développement des valves cardiaques est la formation des coussins endocardiques, qui apparaît au stade embryonnaire E9.5 chez la souris ^{100,101} et E28 chez l'Homme ¹⁰². Au cours de cette phase, les cellules myocardiques et endocardiques du tube primitif sont séparées par une MEC spécifique sécrétée par le myocarde et appelée gelée cardiaque, riche en glycosaminoglycanes tels que l'acide hyaluronique ^{101,103-105}. L'inflexion, l'élongation et les courbures du tube primitif permettent l'apparition des différentes cavités du cœur. Le canal atrio-ventriculaire sépare les ventricules et oreillettes en développement, dont la septation donnera un cœur à quatre cavités.

Au stade E15-E17 chez le rat, les muscles papillaires et les cordages se forment à partir d'une crête trabéculaire musculaire émergente de la paroi ventriculaire gauche ¹⁰⁶. Toutefois, peu d'études portent sur le développement de l'appareil sous valvulaire mitral.

1.4.2 Valvulogénèse mitrale

La valvulogénèse est un processus complexe qui apparaît conjointement à des variations de morphologie cardiaque et hémodynamiques ¹⁰¹. Les études pionnières de Markwald et collaborateurs des 30 dernières années ont permis d'élucider les processus de formation des valves ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Lors de la formation des coussins endocardiques, à la jonction entre le canal atrio-ventriculaire et le tractus d'éjection, une partie des cellules myocardiques sécrètent des facteurs d'activation de l'endocarde (TGF β 2,3 ; BMP-2,4 ; VEGF) ¹⁰¹. Les cellules endocardiques ainsi stimulées expriment alors les récepteurs et effecteurs de signalisation Vefg-R, Notch1 et β -caténine ^{101,110-114}. Les cellules endocardiques adjacentes aux coussins transitent vers un profil de cellules mésenchymateuses et migrent dans la gelée cardiaque : c'est la transition endothélio-mésenchymateuse (EMT) (Figure 7) ¹¹⁵. Afin de former les deux valves atrio-ventriculaires, les protrusions myocardiques se forment des côtés latéraux droit et gauche du bourgeon endocardique du canal atrio-ventriculaire ^{116,117}. Par ailleurs, les valves semi-lunaires proviennent du tractus d'éjection et non du canal atrio-ventriculaire ¹⁰¹. L'EMT apparaît à E9.5 chez la souris et des études ont démontré que les cellules endocardiques activées acquièrent des marqueurs d'adhésion (intégrines) et de mésenchyme (α -sma) et perdent leurs marqueurs de jonctions cellulaires épithéliales tels que PECAM1. Conjointement à leur migration et leur transition, les cellules digèrent l'acide hyaluronique de la gelée cardiaque, alors remplacée par une matrice plus dense composée de collagènes I, II, III, de versican et d'autres protéoglycanes ¹¹⁷. L'expansion de cette population mésenchymateuse et l'augmentation du contenu matriciel forment les structures valvulaires qui maintiennent le passage unidirectionnel du sang dans l'embryon ^{112,116}.

Les cellules endocardiques ne sont pas les seules à être impliquées dans le processus d'invasion, des cellules de la crête neurale migrent également dans la gelée cardiaque ¹⁰¹, et les cellules immunitaires sont indispensables dans le processus de valvulogénèse (détaillé section 1.4.5) ⁷⁷.

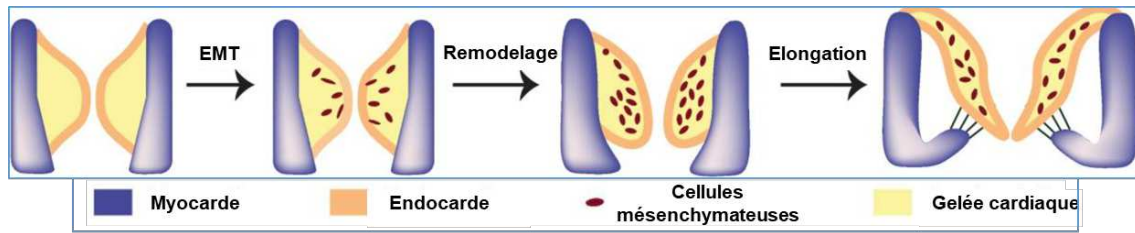


Figure 7 : Transition épithélio-mésenchymateuse, remodelage et élongation de la valve mitrale. D'après ¹⁰¹.

1.4.3 Régulation de l'EMT

La spécificité spatio-temporelle des mécanismes de l'initiation de l'EMT est largement décrite. Ces mécanismes mettent en jeu un large spectre de facteurs et d'effecteurs de l'endocarde et du myocarde, les principaux étant les membres de la superfamille des TGF tels que le TGF- β /SMAD, Notch, Wnt/ β -caténine, VEGF ^{10,28,101,118,119} (Figure 8).

Les « bone morphogenic proteins » (**BMPs**) sont des membres de la superfamille TGF- β et leur signalisation implique l'activation des SMAD1/5/8 ¹²⁰. Le BMP-2 myocardique active l'expression de l'acide hyaluronique synthase 2 (Has2) qui produit la MEC nécessaire à l'EMT ¹¹³. Des données *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'initiation de l'EMT implique la stimulation de l'endocarde par le BMP-2 sécrété par le myocarde ^{121,121-123}. Les **SMADs** sont les médiateurs intracellulaires de l'EMT induite par le TGF β /BMP ^{124,125}.

La stimulation des cellules endocardiques implique également les voies canoniques Wnt et TGF β (TGF β 1,3 et BMP2,4) qui activent la prolifération et la transition des cellules endocardiques mésenchymateuses ^{121,126}. Le TGF β 2 est un effecteur des voies Notch1 et Bmp2 qui active la signalisation **Wnt/ β -caténine** et promeut alors l'EMT ^{114,127-129}.

Certaines cellules endothéliales expriment NFATc1 qui supprime des facteurs de transcription (Snail1,2 et Slug) ¹³⁰, indispensables à leur processus d'EMT. Aussi, ces cellules endocardiques prolifèrent et participent à l'élongation des feuillets valvulaires ¹³¹.

La signalisation **Notch** est également nécessaire à l'EMT, Notch1 exprimé par les cellules endocardiques induit l'expression du TGFβ2 qui active l'expression de Snail1,2 qui à leur tour répriment l'expression de la VE-cadhérine, perturbant les contacts cellulaires et permettant la délamination des cellules ^{128,129,132}. De plus, une récente étude in vivo a démontré que la signalisation Notch1 spécifique des CEVs régule le développement des valves post-EMT en induisant l'apoptose des CIVs pour structurer les bourgeons endocardiques en feuillets matures ¹¹⁹.

La régulation du développement valvulaire implique également le facteur de croissance endothélial vasculaire (**VEGF**), qui a différents rôles. Il peut agir comme i) un inhibiteur de l'EMT, ii) un facteur de croissance pour la prolifération des cellules endocardiques et iii) un promoteur de l'élongation valvulaire ^{111,133-135}. Ainsi, l'expression des récepteurs au VEGF est finement régulée.

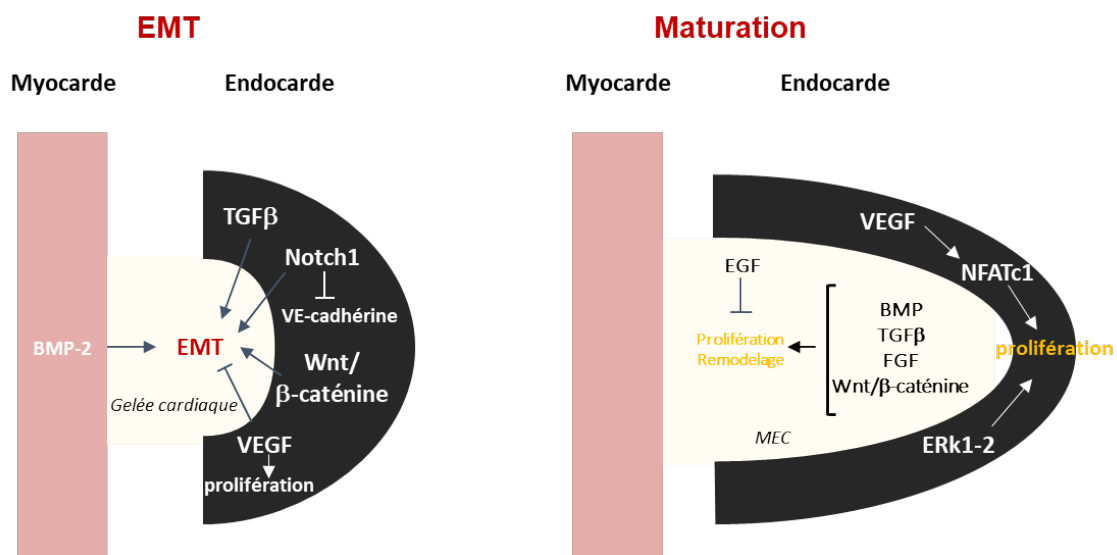


Figure 8 : Voies de signalisation impliquées dans l'EMT et la maturation de la valve mitrale. D'après Combs et Yutzey, 2009.

Les événements post-EMT sont complexes et peu connus, le contrôle du remodelage valvulaire par les cellules mésenchymateuses est encore à étudier ¹⁰¹.

1.4.4 Maturation

Au cours de la maturation, les progéniteurs embryologiques décrits ci-dessus continuent leur prolifération et leur remodelage sous contrôle de facteurs de croissance ^{121,136,137} (Figure 8). Il en résulte un allongement et un amincissement des bourgeons valvulaires qui donneront naissance aux feuillets valvulaires matures. Le développement et la polarisation valvulaire sont également soumis à une régulation par les forces hémodynamiques. En effet, des analyses chez le zébrafish démontrent que le flux sanguin est nécessaire à la maturation valvulaire ^{115,138}. Répondant aux forces de cisaillement, les mécano-senseurs tels que les cils ou les canaux ioniques comme Piezo exprimés par les cellules endothéliales permettent le remodelage des valves en induisant l'expression du facteur de transcription Klf2 qui régule le ligand Wnt9b (Figure 9) ^{69,139-141}.

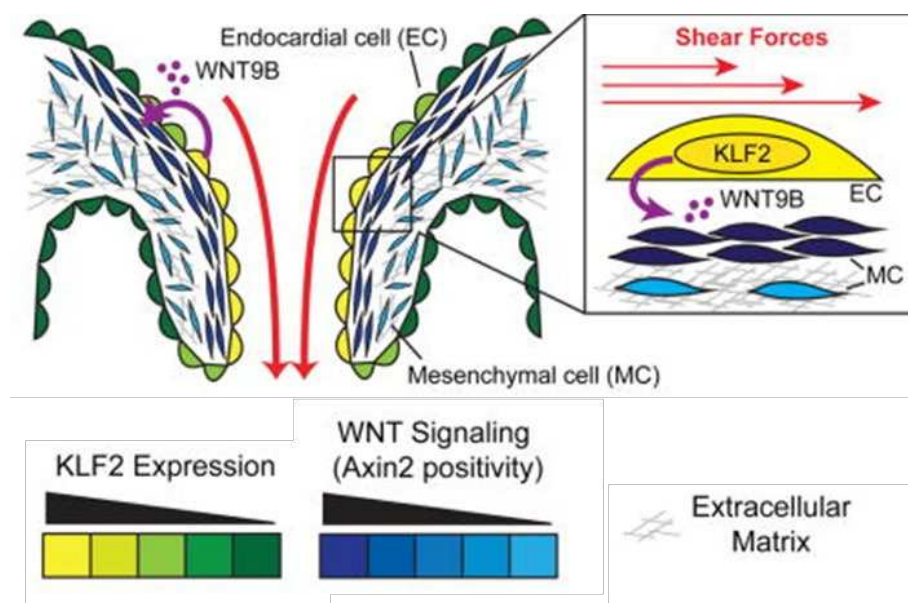


Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'impact du flux sanguin sur le développement valvulaire ⁶⁹.

Les forces de cisaillement liées au flux activent la voie Notch spécifiquement du côté atrial (là où le flux est présent) ^{69,100,142}.

Une des hypothèses de la maturation des feuillets soutenue par des observations microscopiques, est que la prolifération cellulaire engendre une polarisation et un alignement des cellules qui migrent collectivement dans le lumen : c'est le processus d'extension convergente¹³⁰. Afin de résister aux forces hémodynamiques croissantes, la MEC devient plus organisée et fibreuse, ce qui confère une rigidité à la valve¹⁴³.

A la fin de la gestation, les feuillets sont alors constitués des CIVs quiescentes résidentes entourées de la MEC qu'elles continuent de remodeler afin de former les 3 couches de la valve : l'atrialis, la spongiosa et la fibrosa⁵⁴.

L'analyse transcriptomique en single-cell réalisée à 7 jours post-natal sur les feuillets mitraux et aortiques de souris²², a permis d'identifier deux sous-types de CIVs (différentes des CIVs identifiées dans les valves matures à 30 jours mais en proportion relative similaire, 75%). Elles se caractérisent par une forte activité de synthèse et sont impliquées dans la stratification de la matrice durant le remodelage valvulaire (Figure 10):

- **Les CIVs liées aux glycosaminoglycanes** (CIVs-GAG), trouvées au niveau du bord libre des feuillets et absentes de la région d'insertion, ont un profil transcriptomique en lien avec la synthèse de GAG et expriment notamment le *Versican*.
- **Les CIVs liées au collagène** (CIVs-Col), situées dans la fibrosa, expriment le *Coll1a1* et jouent un rôle dans l'organisation et la maturation de la MEC.

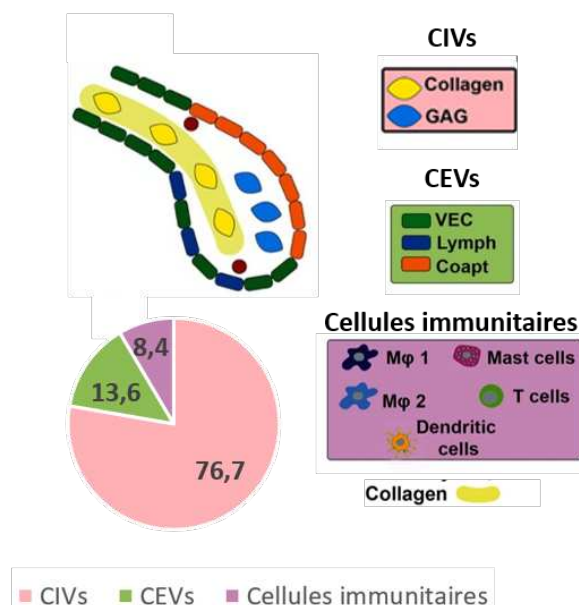


Figure 10 : Composition des feuillets valvulaires chez la souris saine de 7 jours. D'après²².

Par ailleurs, le reste des types cellulaires identifiés à 7 jours sont identiques à ceux identifiés au cours du développement, de même qu'à 30 jours post-natal : cellules dendritiques, mastocytes, lymphocytes et macrophages⁹¹. Les proportions relatives, excepté des cellules dendritiques, varient avec la maturation des feuillets (Figure 11), indiquant un rôle des cellules immunitaires dans l'homéostasie tissulaire.

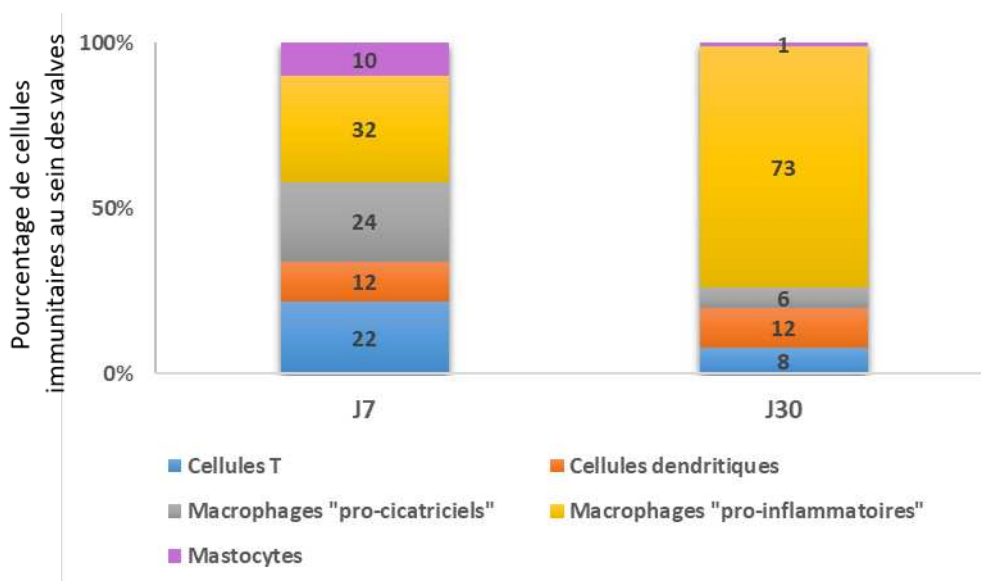


Figure 11 : Pourcentage des différents sous-types cellulaires immunitaires au sein des feuillets valvulaires de souris au cours du développement à J7 et J30. Repris d'après²².

1.4.5 Cellules immunitaires dans le développement valvulaire

Au cours de l'embryogénèse, l'hématopoïèse apparaît de manière transitoire dans différents sites : dans le sac vitellin à E7.5, juste après dans l'endocarde hémogénique (qui a la capacité de générer des cellules hématopoïétiques) et à E8.5 dans l'aorte primitive ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Les cellules endocardiques hémogéniques provenant du tube cardiaque en développement contribuent à l'hématopoïèse et produisent 4 à 12% des cellules érythroïdes et myéloïdes circulantes ^{76,147-149}. Les cellules endocardiques ont des origines et des fonctions variées mais l'activité hémogénique de ces dernières apparaît principalement dans les coussins endocardiques au stade E9.5-E11.5 chez la souris ^{147,148}, coïncidant spatio-temporellement à la valvulogénèse. Ainsi, il a été démontré récemment par Shigeta et collaborateurs que l'endocarde hémogénique est une source de macrophages tissulaires *de novo* durant l'embryogénèse ⁷⁷. Ces macrophages tissulaires dérivés de l'endocarde ont une activité de phagocytose supérieure aux macrophages d'une origine différente ⁷⁷. De plus, l'ablation génique des macrophages endocardiques induit un défaut de valvulogénèse, ce qui indique leur rôle indispensable dans le développement embryonnaire, probablement dû au manque d'activité phagocytaire dans la valve, nécessaire au remodelage physiologique. En effet, l'absence de ces macrophages n'est pas compensée par l'expansion d'un autre type de macrophages (par exemple les macrophages CCR2+ dérivés des monocytes) ⁷⁷. Cependant, une étude récente contredit le fait que l'endocarde soit hémogénique et suggère que la contribution de ce dernier dans la génération des macrophages cardiaques reste faible ¹⁵⁰.

Quoi qu'il en soit, ces données inédites viennent réfuter les connaissances actuelles selon lesquelles tous les macrophages embryologiques proviennent directement du sac vitellin ou du foie fœtal, et des recherches devront être menées pour élucider ce point, de nouveau discuté dans des cas pathologiques, chapitre suivant ^{82,84,85,150-155}.

Pour finir, la présence de leucocytes CD45+ a été identifiée dans des valves de souris néonatales où ils représentent environ 5% des cellules de la VM. La majorité de ces leucocytes sont des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes^{22,91}, qui ne semblent pas se différencier en CEVs ou CIVs⁹¹. Ainsi, les cellules immunitaires participent au développement, à la maturation et au vieillissement de la valve mitrale. Leur implication dans les pathologies valvulaires, en particulier mitrales, est discutée actuellement et la deuxième partie de mon manuscrit s'y intéresse particulièrement.

Chapitre 2 : Physiopathologie de la dystrophie valvulaire mitrale

2.1 Présentation clinique de la DVM

2.1.1 Epidémiologie

Les valvulopathies sont un problème de santé publique, qui touche 12% des plus de 75 ans aux Etats-Unis ^{1,156}. Le prolapsus valvulaire mitral (PVM) touche 2 à 3% de la population générale, 10% des plus de 75 ans aux Etats-Unis ¹. Le PVM est défini comme le déplacement d'un ou des deux feuillets mitraux de plus de 2 mm dans l'oreillette gauche par rapport au plan de l'anneau en systole ¹⁹ (Figure 12A,B).

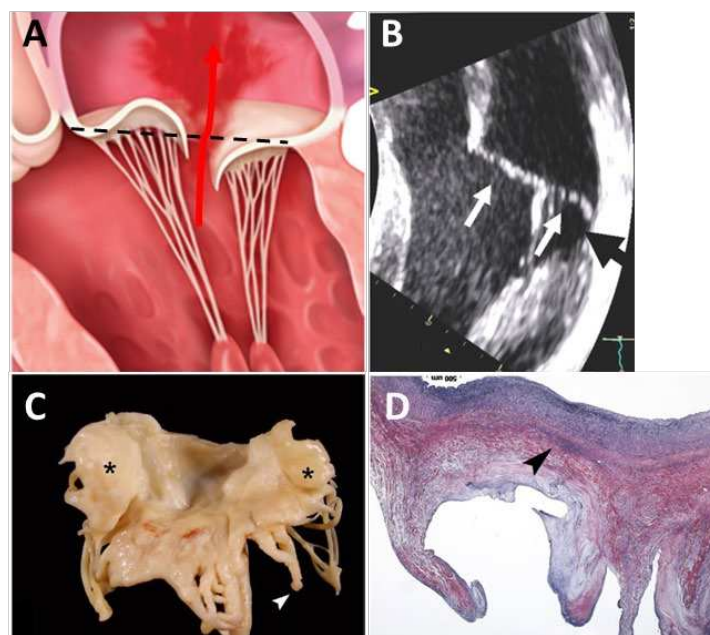


Figure 12 : Présentation du prolapsus valvulaire mitral et de la dystrophie valvulaire mitrale. A) Schéma du PVM avec régurgitation (flèche rouge). Les pointillés définissent le plan de l'anneau mitral. B) Echocardiographie d'une valve myxoïde ¹⁵⁷. C) Photographie d'un feuillet antérieur mitral myxoïde, face atriale. Le feuillet est redondant, présente un épaissement diffus et des boursouflures focales (*). D) Coloration de la valve au Pentachrome de Movat. Le stroma myxoïde apparaît en bleu pâle. Les fibres élastiques sont indiquées par la flèche ¹⁵⁸.

Il est diagnostiqué par échocardiographie. L'insuffisance mitrale (IM) causée par le PVM est la 2^{ème} valvulopathie la plus fréquente en Europe ^{6,159}. Le substrat pathologique du PVM est la dystrophie valvulaire mitrale (DVM) de type myxoïde ² (Figure 12C,D), caractérisée par un épaissement

des feuillets, une accumulation de MEC riche en protéoglycanes et une rupture des fibres de collagène.

2.1.2 Etiologie

L'insuffisance mitrale (IM) a différentes étiologies, responsables d'un défaut de fermeture en systole avec persistance d'un orifice régurgitant. Les IM se distinguent selon le degré de mobilité des feuillets valvulaires dans la classification de Carpentier présentée Figure 13 ^{160,161} :

- **Type I** : La mobilité des feuillets est normale. L'IM relève donc d'une dilatation annulaire éloignant les berges des feuillets, ou de la présence de défauts de morphologie des feuillets mitraux.
- **Type II** : La mobilité des feuillets est excessive. Le PVM ou la rupture de cordages sont les causes principales de ce type d'IM.
- **Type IIIa** : La rigidité anormale des feuillets restreint les mouvements de la valve en diastole et en systole, souvent d'origine rhumatismale.
- **Type IIIb** : Une dilatation du VG induit un déplacement apical des muscles papillaires et donc une restriction à la fermeture de la valve. Ainsi, le mouvement des feuillets en systole est restreint. Cette IM est fréquemment secondaire à un infarctus du myocarde.

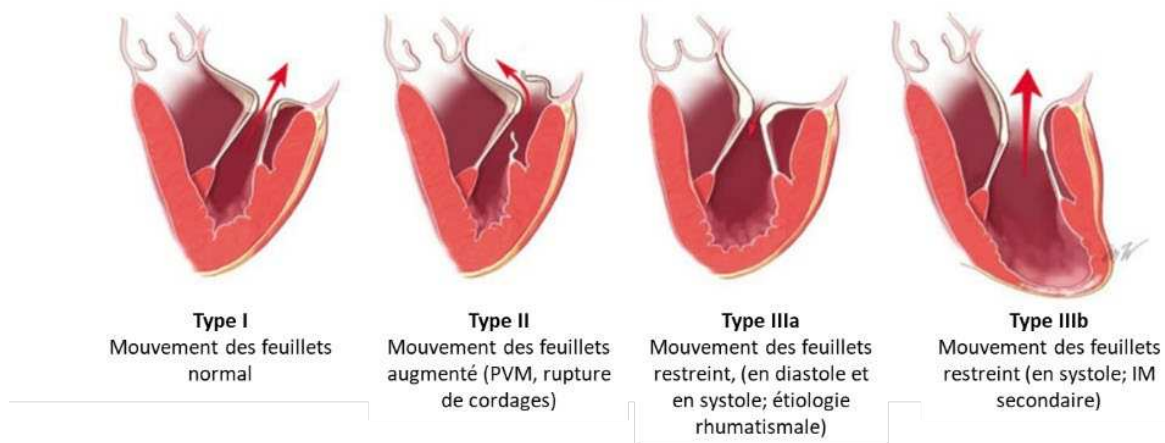


Figure 13 : Classification de l'insuffisance mitrale selon Carpentier. Selon Delhomme et al. 2019.

Le PVM (IM de type II) est décrit selon deux formes distinctes (Figure 14) ^{162,163} : i) la **dégénérescence fibro-élastique (FED)**, caractérisée par des feuillets fins, transparents, de longueur normale, une matrice déficiente en collagène, protéoglycanes et élastine, un anneau peu dilaté et des cordages fins, où l'IM est la conséquence d'une rupture de cordages et ii) la **dégénérescence myxoïde ou maladie de Barlow**, caractérisée par une matrice riche en protéoglycanes, présentant des fibres de collagènes discontinues, des feuillets allongés, épaissis, fibrotiques, et un anneau mitral dilaté.

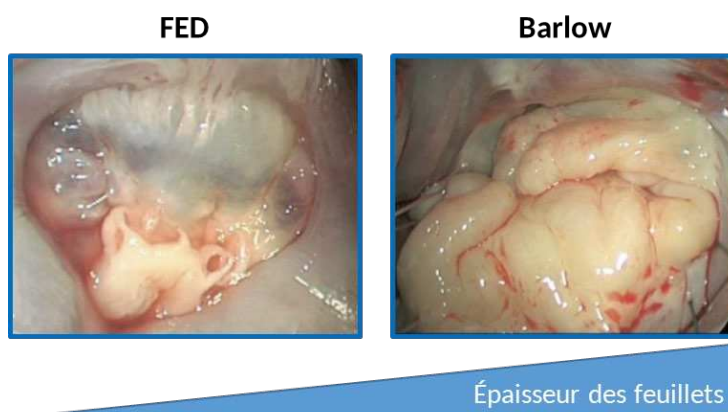


Figure 14 : Anatomie des valves mitrales dans la dégénérescence fibro-élastique et la maladie de Barlow (Modifié d'après Anyanwu and Adams, 2007).

2.1.3 Diagnostic

Le diagnostic est réalisé suivant les guides de pratique de la prise en charge des pathologies valvulaires, publiés par la Société Européenne de Cardiologie (ESC) et l'Association Américaine de Cardiologie (AHA) ^{7,164}. L'échocardiographie est l'imagerie de choix pour diagnostiquer, grader et suivre le PVM. Une approche intégrative est recommandée, basée sur des critères de régurgitation qualitatifs, semi-quantitatifs et quantitatifs. La morphologie de la valve, les critères de sévérité de l'IM, i.e. l'aire de l'orifice régurgitant, le volume régurgitant, la fraction régurgitante, la *vena contracta* (la portion la plus étroite du jet régurgitant qui se trouve à l'orifice ou juste en aval de celui-ci) ainsi que les paramètres de statut ventriculaire gauche sont mesurés en routine par échocardiographie transthoracique ^{7,164}. Les critères quantitatifs et la classification de l'atteinte valvulaire permettent de déterminer le type de prise en charge nécessaire ^{7,164,165}. Actuellement, l'échocardiographie transoesophagienne (ETO) est la technique qui permet la meilleure inspection de la valve, facilitant les prises de décision des équipes hospitalières en vue d'une intervention. Depuis quelques années, l'ETO en trois dimensions est utilisée, car elle permet notamment une localisation et quantification fiable et précise du prolapsus et du volume régurgitant ¹⁶⁶. Comparativement à l'ETO en 2D et comme l'ETO en 3D, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a fait ses preuves quant à sa valeur ajoutée et sa complémentarité vis à vis de l'échocardiographie ^{167,168}, notamment dans l'évaluation des volumes du VG, de l'OG et de la fibrose myocardique, pouvant être associée aux arythmies ventriculaires et au syndrome de mort subite dans cette population ¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

L'échocardiographie à l'effort est utilisée chez les patients qui présentent une symptomatologie discordante de leur grade d'insuffisance mitrale au repos ^{7,164}.

2.1.4 Traitement et suivi

Actuellement, les thérapies médicales disponibles ciblent uniquement la symptomatologie ¹⁷². Les patients peuvent être traités par nitrates ou diurétiques pour réduire les pressions de remplissage, ou encore par nitroprussiate de sodium, un vasodilatateur pourvoyeur de NO dans les cellules vasculaire pour réduire la précharge et la fraction régurgitante ^{7,164}. Un suivi par ETT est réalisé chez les patients diagnostiqués avec une IM afin de détecter les évolutions de la valvulopathie ¹⁶⁴. Les patients asymptomatiques avec une IM sévère sont sous surveillance par ETT tous les 6 à 12 mois afin de déterminer le timing optimal pour l'intervention ¹⁶⁴. La mesure de biomarqueurs tels que le BNP (« Brain Natriuretic Peptide »), la mesure en échocardiographie du « strain » longitudinal, la capacité d'exercice et les pressions ventriculaires droites sont des facteurs pronostics importants, dont l'évaluation est nécessaire pour tout suivi de patient ainsi que pour guider l'intervention ¹⁶⁴. Lorsque le patient est symptomatique et présente une dysfonction valvulaire mitrale sévère, une opération rapide est nécessaire pour prévenir le remodelage du VG, source d'une importante morbi-mortalité ^{8,9,173}

Ainsi des interventions chirurgicales de réparation ou de remplacement, ou des opérations non chirurgicales par approche percutanée sont possibles (selon les recommandations internationales, Figure 15) ^{7,164,174} :

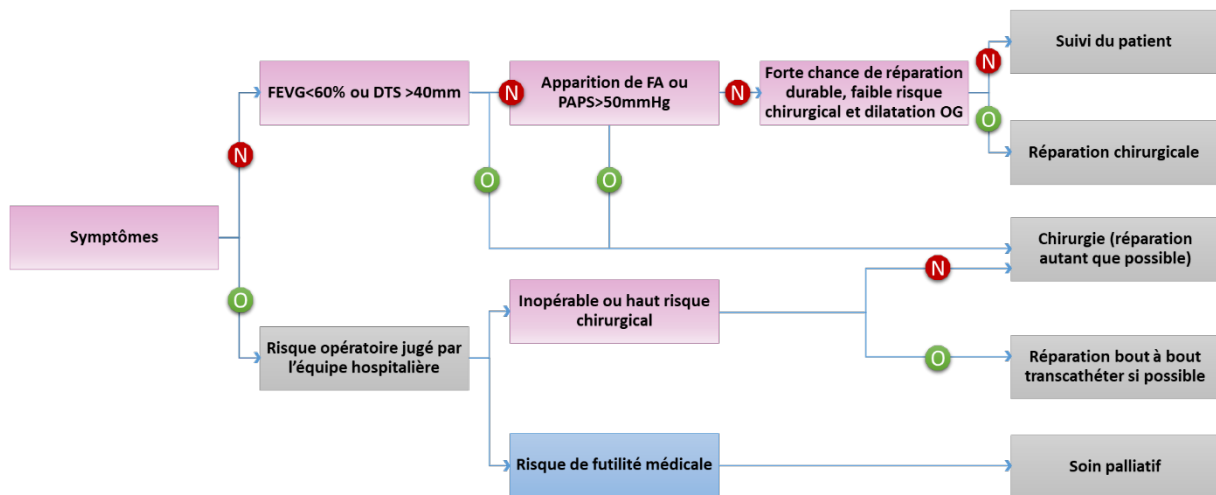


Figure 15 : Prise en charge des patients avec une insuffisance mitrale primaire chronique sévère. Selon le guide de conduite de l'ESC 2021 ⁷.

- **Approches chirurgicales :**

- **Réparation :** consiste en une plastie mitrale (Figure 16), c'est-à-dire soit une résection d'une partie d'un feuillet (fréquemment le segment P2), soit la mise en place de néo-cordages, associée à une annuloplastie permettant de diminuer le diamètre de l'anneau ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Cette intervention peut être réalisée par sternotomie classique ou par chirurgie « mini-invasive » (vidéo-chirurgie). Les guides de pratique de la prise en charge des patients indiquent que la réparation mitrale est préférable au remplacement dans le cas d'une IM primaire sévère chronique pour laquelle la réparation durable peut être réalisée ^{7,175,178}. Le PVM est l'indication la plus commune et grandissante pour la réparation chirurgicale de l'IM ^{179,180}.

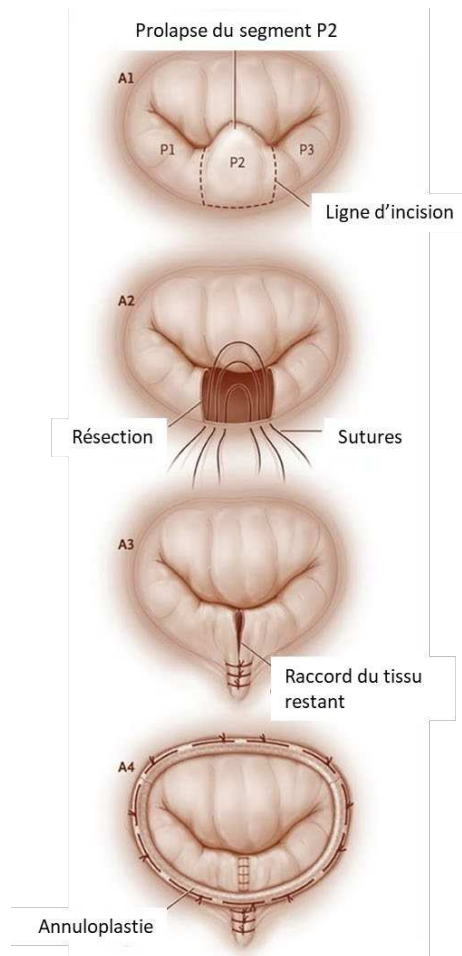


Figure 16 : Schéma de procédure de plastie mitrale. Il y a d'abord résection du segment prolapsant (fréquemment P2), puis suture pour raccorder les segments restants, avant de réaliser une annuloplastie qui vise à réduire le diamètre de l'anneau mitral. Modifié d'après ¹⁸¹, Copyright Massachusetts Medical Society.

- **Remplacement** : pour les patients inéligibles à la réparation, un remplacement valvulaire est préconisé ^{6,7,174}. Des prothèses mécaniques ou biologiques peuvent être implantées. Dans le cas d'une chirurgie avec prothèse mécanique, désormais à double ailettes (Figure 17), les patients sont placés sous anti-coagulants (anti-vitamine K) à vie. En effet, alors que la durabilité de la valve est à priori sans limite, il est nécessaire de prévenir le risque de thrombose et la formation de caillots ¹⁸². L'utilisation de bioprothèses (provenant de péricarde bovin ou valve porcine) (Figure 17) est plus récente, ne nécessite pas de traitement de fond post-implantation et devient l'option thérapeutique de choix malgré une durabilité limitée (10 à 15

ans) ¹⁸². La méthode de remplacement valvulaire nécessite de couper les cordages, une limite à cette approche.

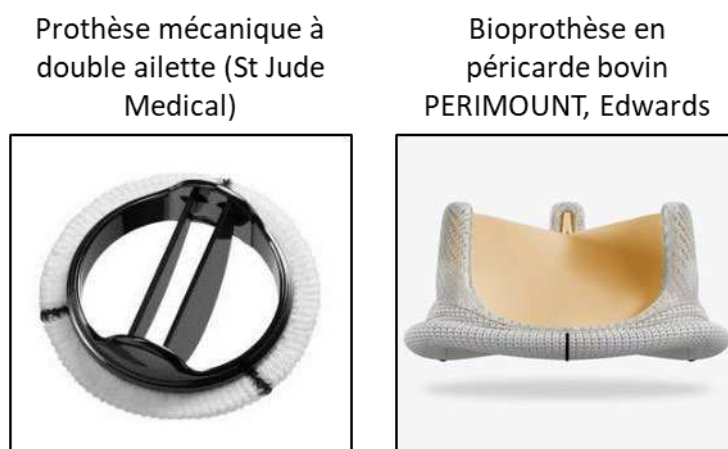


Figure 17 : Prothèses utilisées dans le remplacement valvulaire mitral. Prothèse mécanique à double ailette et bioprothèse en péricarde bovin.

- **Approche transcathéter** : lorsque le risque chirurgical est trop élevé pour les patients, les alternatives percutanées développées ces dernières années semblent apporter un gain réel pour le patient. Elles ont donc toute leur place dans le spectre thérapeutique des insuffisances mitrales ¹⁸³⁻¹⁸⁵, mais des études de suivi à long terme restent nécessaires ^{164,172,183,186}. En effet, ce type d'approche ne nécessite pas la mise en place de circulation extra-corporelle, le patient est en sédation médicamenteuse profonde uniquement. Les premières études montrent que l'approche transcathéter est moins risquée pour le patient et entraîne une réduction de la ré-hospitalisation pour insuffisance cardiaque avec une réversion du remodelage du VG ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Plusieurs dispositifs ont été testés ces dernières années, tels que la réparation « bord-à-bord » (notamment par MitraClip® (Abbott Vascular, Menlo Park, California, USA) mais aussi le système PASCAL (Edwards Lifesciences)), et plus récemment l'implantation percutanée d'une prothèse (approche dérivée du TAVI pour la valve mitrale), ou les neo-cordages. Les premiers résultats disponibles sont convaincants et de nombreux développements sont en cours ¹⁸⁹⁻¹⁹⁵.

Vingt ans après une réparation chirurgicale, 12,5% des patients présentent une IM modérée ou sévère ¹⁹⁶. Ce taux est à 20% cinq ans après une réparation transcathéter, ce qui suggère la nécessité d'un suivi annuel par échocardiogramme chez les patients ayant bénéficié de cette approche ^{197,198}. Malgré les progrès constants des traitements chirurgicaux ou percutanés des IM, une forte morbi-mortalité résiduelle est due notamment à la prise en charge tardive des patients qui présentent une atteinte myocardique non réversible ^{1,7,199}. En effet, les guides de pratique les plus récents étendent la chirurgie aux patients asymptomatiques ayant une FEVG entre 30% et 60% ^{7,174}. Plus de 90 000 chirurgies valvulaires mitrales ont lieu chaque année en Amérique du Nord, ces interventions sont en grande expansion et constant développement ¹⁸⁰. Néanmoins, avec une espérance de vie grandissante, il est nécessaire de déceler les mécanismes impliqués dans ces pathologies dans le but de développer les traitements préventifs pharmacologiques.

2.2 Bases génétiques de la dystrophie valvulaire mitrale

2.2.1 DVM syndromiques

Les dystrophies valvulaires mitrales ont été décrites dans plusieurs pathologies syndromiques dont les plus fréquentes sont les suivantes ²⁰⁰ :

Syndrome de Marfan

Ce syndrome rare (1/5000), majoritairement induit par des mutations sur le gène *FBNI* codant pour la Fibrilline-1, touche les tissus conjonctifs (oculaires, squelettiques, cardiovasculaires) ²⁰¹. La Fibrilline est une glycoprotéine des microfibrilles, des complexes de protéines matricielles comme l'élastine qui apportent aux tissus conjonctifs des propriétés mécaniques et élastiques. 50% des patients présentant un syndrome de Marfan développent une dégénérescence valvulaire myxoïde similaire à un phénotype « Barlow ». Les mutations de la *fibrilline* dérégulent les interactions de la

protéine avec le TGF- β . Ce défaut d'interaction entraîne une signalisation excessive des voies canonique et non canonique du TGF- β , induisant alors l'activation et la prolifération des CIVs²⁰²⁻²⁰⁴. La signalisation du TGF- β a été caractérisée comme un acteur majeur dans le développement d'une DVM dans le contexte de syndrome de Marfan, et le traitement par l'inhibition de cette signalisation grâce à des anticorps a été testé chez la souris et permet de stopper la progression du PVM²⁰². Pour le moment, l'utilisation de ce type de traitement dans la DVM doit être étudiée plus en détail avant de prétendre à un essai chez l'Homme. Plus récemment, l'implication des monocytes dans la pathologie a été mise en exergue chez des souris Marfan *Fbn1*^{C1039G/+}. Ces monocytes pourraient ainsi être une cible thérapeutique intéressante²⁰⁵ (partie développée section 2.3.5).

Syndrome de Loeys-Dietz

Ce syndrome causé le plus fréquemment par des mutations sur les gènes codants pour les récepteurs au TGF- β et des effecteurs de sa voie de signalisation intracellulaire (*TGF β R1*, *TGF β R2*, *SMAD3*) est une pathologie des tissus conjonctifs impliquant une signalisation accrue des voies du TGF- β ^{206,207}. Les formes intermédiaires du syndrome ressemblent au syndrome de Marfan mais les formes sévères engendrent une létalité infantile causée par des anévrismes artériels²⁰⁸. 60 à 75% des patients qui présentent un syndrome de Loeys-Dietz développent une atteinte mitrale (DVM, PVM, régurgitation)²⁰⁹⁻²¹¹. La sévérité du syndrome est supérieure dans la pathologie de Loeys-Dietz que dans celle de Marfan, mais aucune étude n'a su expliquer la plus faible prévalence de PVM dans ce syndrome comparativement au syndrome de Marfan.

Syndrome d'Ehlers-Danlos

Ce syndrome est un groupe hétérogène de pathologies du tissu conjonctif qui partagent des phénotypes cliniques tels que l'hyper-mobilité articulaire, la fragilité tissulaire ou l'hyper-élasticité

cutanée ²¹². Bien que la plupart des formes du syndrome n'ont pas de cause génétique identifiée, des mutations associées à la biosynthèse, la transformation et le turnover de composés de la MEC tel que le collagène ont été identifiées (*COL3A1* ²¹³). Dans ce syndrome faiblement associé au PVM (6,5% des patients Ehlers-Danlos développent un PVM) ²¹⁴, l'hypothèse serait que les mutations associées au collagène diminuent la rigidité et augmentent la flexibilité des feuillets ce qui induirait une augmentation des tensions biomécaniques dans la valve, en réponse aux fortes pressions durant la contraction systolique du VG ²¹⁵. La stimulation biomécanique des CIVs entraînerait une production accrue de glycosaminoglycanes et autres protéines de la MEC, régulée par la voie du TGF- β ^{214,216,217}.

En conclusion, les formes syndromiques démontrent l'implication de voies communes dans la DVM d'origine génétique, notamment impliquant le TGF- β et l'homéostasie de la MEC. Néanmoins, tous les patients qui présentent l'un de ces syndromes (Marfan, Loeys-Dietz, Ehlers-Danlos) ne développent pas de PVM, reflétant la complexité de la pathologie qui ne semble ainsi pas induite par une voie de signalisation unique.

2.2.2 DVM non syndromique

Durant de nombreuses années, la DVM a été considérée comme une pathologie purement dégénérative, liée à l'âge et à l'environnement mécanique complexe incluant des forces de pression, flexion et traction. Deux approches génétiques sont disponibles pour identifier les origines génétiques d'une pathologie (Figure 18). L'approche familiale permet de détecter des gènes rares qui induisent un effet fort et l'approche populationnelle permet d'identifier des gènes fréquents qui induisent un effet faible. Ces deux approches complémentaires (screening familial et populationnel) ont ainsi permis de caractériser la génétique, complexe et hétérogène, du PVM.

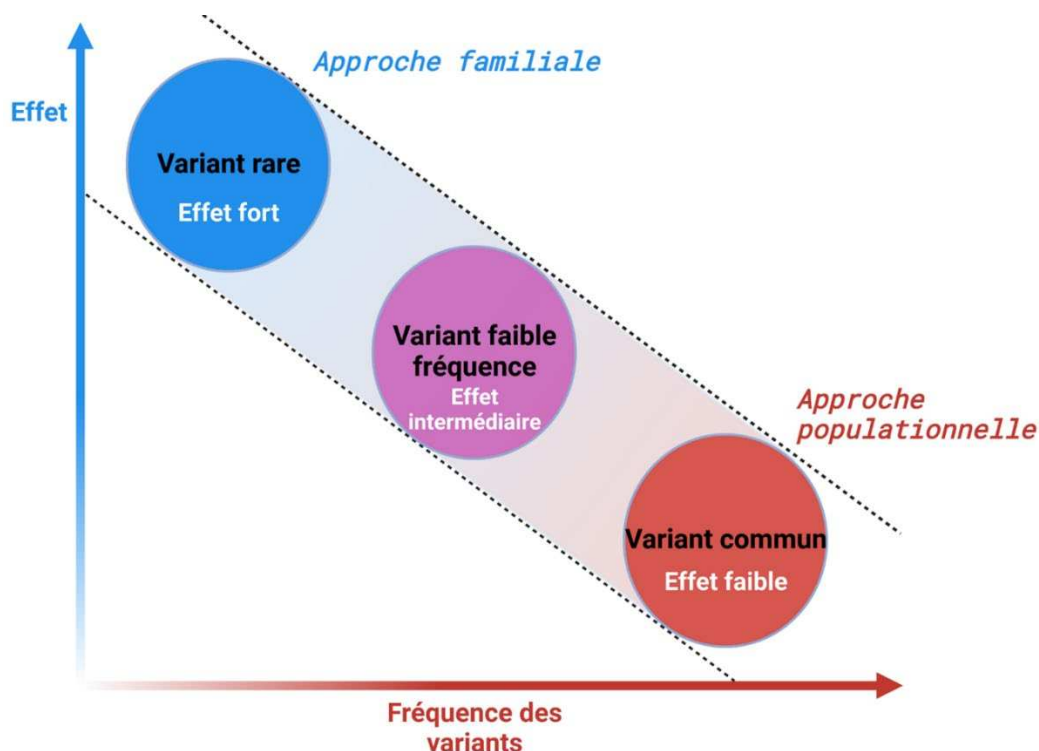


Figure 18 : Différentes approches génétiques pour identifier des variants selon leur fréquence et leur effet.

Approche familiale

En 1981, la première étude sur l'hérabilité du PVM a été publiée par Devereux et collaborateurs, rapportant une transmission autosomale dominante ²¹⁸. Plus récemment, une étude sur 186 individus descendant d'un parent affecté et 3493 contrôles sans parent affecté, a validé le substrat génétique du PVM ²¹⁹. Au cours du temps, des loci situés sur les chromosomes 11, 13, 16 et X à transmission autosomique dominante, associés au PVM de type myxoïde, ont été identifiés ^{3,220-222}.

- *FLNA*

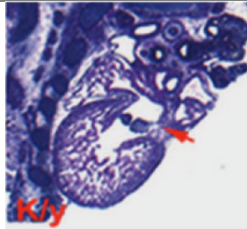
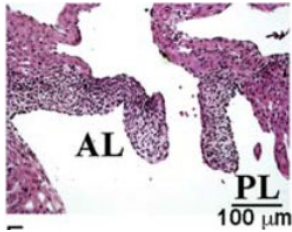
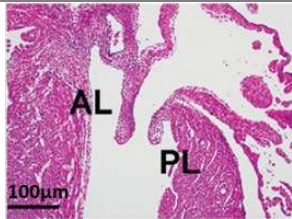
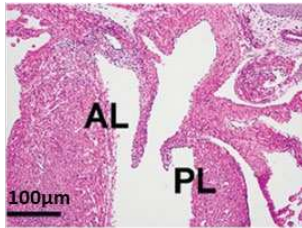
Le PVM myxoïde lié au chromosome X a été décrit pour la première fois par Monteleone et Fagan en 1969 ²²³. En 1998, notre groupe a mis en évidence le locus Xq28 dans une famille Vendéenne. Quelques années plus tard, en 2007, le gène *FLNA* codant pour la protéine Filamine-A et la mutation faux-sens p.P637Q ont été identifiés dans une famille de plus de 300 individus ⁴. Dans trois autres familles étudiées, les mutations faux-sens p.G288R, p.V711D, p.H743P et une délétion

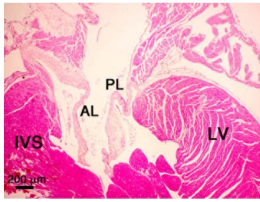
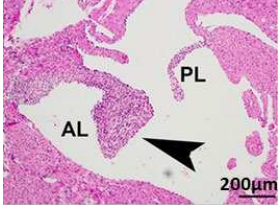
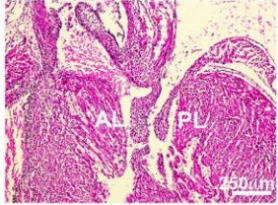
de 182 acides aminés (quatrième famille) ont été répertoriées ^{4,224}. Des modèles murins KO et KO conditionnel ont été générés afin d'étudier l'implication de la FLNA dans la pathologie (Tableau 1).

- *DCHS1*

Après la découverte de ces premières mutations liées à l'X, l'étude par séquençage d'exome du locus du chromosome 11 a permis de caractériser deux mutations faux-sens perte de fonction sur le gène *DCHS1* codant pour la protéine DCHS1 (p.P197L et p.R2513H) ²²⁵, un membre de la famille des cadhérines ²²⁶. L'étude de zébrafish Knock-Down (KD) et de souris *Dchs1*^{-/-} (Tableau 1) ont permis de démontrer la causalité des mutations DCHS1 dans le développement du PVM myxoïde via un défaut de migration des cellules dérivées de l'épicarde dans le feuillet postérieur au stade embryonnaire E15.5-E17.5 ²²⁵.

Tableau 1 : Principaux modèles animaux de DVM non syndromique et le phénotype associé.

Gène	Modèle	Phénotype	Images	Références
	Souris KO	Défaut de septation du tractus d'éjection et des ventricules Létalité des mâles au stade E14.5		227
<i>FLNA</i>	Souris cKO	DVM myxoïde, épaissement des feuillets, accumulation de protéoglycanes et dérégulation du collagène Enrichissement en cellules immunitaires Perturbation des voies sérotonine/filamineA Défaut de cordages tendineux		228, 296
	Zébrafish KD	Défaut canal atrioventriculaire		
	Souris <i>Dchs1</i> ^{-/-}	Atteinte sévère des feuillets mitraux Létalité néonatale		
<i>DCHS1</i>	Souris <i>Dchs1</i> ^{+/-}	DVM myxoïde, épaissement des feuillets, accumulation de protéoglycanes et dérégulation du collagène Altération de l'organisation et de l'orientation des CIVs Pas d'altération de la fonction cardiaque		225

Gène	Modèle	Phénotype	Images	Références
	Zébrafish KD	Régurgitation valve aortique		
<i>TNS1</i>	Souris <i>Tensin1</i> ^{-/-}	DVM myxoïde, épaissement des feuillets, accumulation de protéoglycanes, défaut de stratification de la MEC		229
<i>LMCD1</i>	Zébrafish KD	Régurgitation valve aortique		229
<i>DZIP</i>	Souris <i>Dzip</i> ^{S14R/+}	DVM myxoïde PVM fonctionnel		230
	Souris cKO	DVM myxoïde		

- *DZIP*

Plus récemment, le gène *DZIP1* situé sur le chromosome 13, codant pour « DAZ-Interacting Zinc Finger Protein 1 », une protéine ciliaire qui régule la ciliogénèse²³¹⁻²³³ et/ou la signalisation ciliaire²³⁴⁻²³⁷, a été identifié dans des familles présentant un PVM. Grâce à la génération d'un modèle de souris homozygote, Toomer et collaborateurs ont démontré la pathogénicité de mutations *DZIP1* (Tableau 1)²³⁰, confirmant un rôle des cils primaires dans le développement du PVM, que ce groupe avait mis en avant quelques années plus tôt²³⁸.

Pour conclure, trois gènes sur quatre ont été identifiés dans les loci précédemment décrits dans le PVM myxoïde. Seul le loci du chromosome 16 reste à ce jour non élucidé.

Approche populationnelle

La première méta-analyse d'association génome entier (GWAS, genome-wide association study)²²⁹ réalisée sur un total de 2864 cas (i.e. patients ayant subi une intervention chirurgicale pour le traitement d'un PVM) et 9218 contrôles a mis en exergue l'implication de 6 loci de prédisposition au PVM, et plus particulièrement les gènes candidats *TNSI* (chromosome 2) et *LMCD1* (chromosome 3).

▪ *Tensine-1*

Le gène *TNSI* code pour la Tensine-1, une protéine localisée aux points focaux d'adhésion qui interagit avec l'actine et les régions cytoplasmiques des intégrines afin de les relier aux fibres de stress. Elle joue un rôle dans la migration et la prolifération cellulaire. Préférentiellement trouvée du côté atrial lors de la valvulogénèse, la Tensine-1 est exprimée par les cellules endothéliales et interstitielles valvulaires. Chez le zébrafish, le KD entraîne une diminution de l'agrégation des cellules endothéliales dans la valve en développement ainsi qu'une désorganisation de l'expression du marqueur de développement *bmp4*, bien que *notch1b* ne soit pas impacté. Les souris Tensine-1^{-/-} développent une DVM de type myxoïde, caractérisée par une hausse du contenu matriciel en protéoglycanes et une perte de la stratification matricielle physiologique (Tableau 1). Des données préliminaires chez le zébrafish semblent indiquer une atteinte mitrale fonctionnelle légère, sans retentissement hémodynamique.

▪ *LMCD1*

Le gène *LMCD1* code pour le facteur de transcription LMCD1 (« LIM And Cysteine Rich Domains 1 »), aussi appelé Dyxine, membre de la famille des protéines « zinc finger », co-régulateurs de transcription impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire. LMCD1 est un répresseur direct de GATA6, régulateur important du développement cardiaque²³⁹ et un activateur de la voie calcineurine/NFAT, impliquée dans le développement cardiaque¹¹¹. Chez le zébrafish, alors que l'expression de *lmc1l* est pan-cardiaque, le KD de *lmc1l* n'affecte pas les profils d'expression des marqueurs de développement valvulaire *notch1b* et *bpm4*, ni la localisation des cellules

endothéliales. Néanmoins, l'analyse microscopique chez le zébrafish KD démontre une augmentation de la régurgitation aortique comparativement aux WT (Tableau 1) ²²⁹. Pour le moment, il n'est pas encore déterminé si la régurgitation est engendrée par un défaut développemental général ou spécifiquement cardiaque ²²⁹.

La deuxième méta-analyse de GWAS, parue en 2021 ²⁴⁰, présente une nouvelle analyse de l'étude GWAS de 2015 d'une part, et complète la recherche de loci associés au PVM par l'analyse de nouveaux cas (notamment de la base de données « UK Biobank ») d'autre part. L'implication de *TNSI* et *LMCD1* dans le PVM a été confortée et de nouveaux loci ont été décrits, avec des gènes candidats tels que *CYT2*, *MSRA* et *FBXO26*, *GLIS1*, *TGFB2*, *ID2*, *TBX5*.

Cette année, une nouvelle méta-analyse de 6 GWAS incluant 4884 cas et 434 649 contrôles ²⁴¹ a identifié 14 loci associés au PVM, la plupart étant des loci nouvellement décrits. Deux loci retrouvés correspondaient aux gènes *TNSI* et *LMCD1*, décrits dans la première GWAS PVM de Dina et collaborateurs en 2015 ²²⁹. Le premier score de risque polygénique pour le PVM créé dans cette étude de Roselli et collaborateurs, a démontré l'augmentation de la prédiction du risque pour les loci donnés. Ce risque pourrait donc être utile dans la stratification des patients PVM selon leur profil de risque génétique. Les gènes candidats provenant de cette étude comportent *LTBP2* et *TGFB2*, la voie du TGF- β semble une fois de plus impliquée dans le PVM, comme c'était le cas dans les analyses GWAS précédentes ^{229,240,241}. De plus, cette méta-analyse a permis de déceler de nouveaux gènes candidats tels que *SPTBNI* (codant pour une protéine de liaison au cytosquelette d'actine) ou *ALPK3* (codant pour une protéine à activité tyrosine/kinase impliquée dans le développement cardiaque) ²⁴¹.

Même si les gènes décrits ci-dessus n'expliquent qu'une petite proportion des PVM non-syndromiques myxoïdes, il est maintenant reconnu que le PVM i) a une origine génétique, ii) est hérité, et iii) s'exprime par des phénotypes variés ¹⁵⁷. Les découvertes génétiques font émerger des

hypothèses physiopathologiques nouvelles et concordantes entre les différentes approches (i.e. syndromiques, non syndromiques, familiales et populationnelles), telles que la mécanotransduction, la voie du TGF- β ou des cils, décrites dans la section ci-dessous ¹⁵⁷.

2.3 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans les valvulopathies

2.3.1 TGF- β

Chez les mammifères, la superfamille TGF- β comprend 33 membres dont 3 isoformes de TGF- β (TGF- β 1, 2 et 3), 20 protéines de la famille des BMPs (« Bone Morphogenic Proteins »). Les ligands TGF- β se fixent à un complexe récepteur (TGF- β R), c'est la voie TGF- β /activine/nodal alors que la signalisation du BMP est médiée par le récepteur au BMP de type II (BMPRII), c'est la voie BMP/GDF (« growth differentiation factor ») ²⁴². Les réponses à l'activation de ces deux branches (Figure 19), classées en signalisation canonique mettant en jeu la phosphorylation de SMADs et en voie non canonique dans laquelle différentes MAPKs sont activées selon les conditions cellulaires et environnementales ²⁴². La signalisation TGF- β /activine/nodal active la phosphorylation des SMAD2/3 alors que la signalisation BMP/GDF active celle des SMAD1/5/8 (Figure 19). Dans les fibroblastes et les myofibroblastes, le TGF- β 1 sécrété fait partie, avec la protéine associée à la forme latente (LAP, « Latency Associated Protein ») et la protéine LTBP-1 (« Latent TGF- β binding protein 1 »), d'un large complexe latent (LLC, « Large Latent Complex ») ^{243,244}. Le LLC est un réservoir de TGF- β 1 latent dans la MEC ²⁴³⁻²⁴⁵. L'activation de la forme latente est médiée par la protéolyse de LLC qui entraîne la dissociation de LAP et libère la forme latente du TGF- β 1 ^{246,247}. L'étude des mutations de la fibrilline-1 associées au syndrome de Marfan, a mis en évidence le rôle prépondérant de la voie du TGF- β dans le PVM ^{203,204}. La Fibrilline-1 séquestre un complexe de

liaison au TGF- β qui contrôle les niveaux de TGF- β et donc l'activité qui en découle dans la MEC. Le TGF- β est un acteur majeur de la valvulogénèse et de la physiopathologie valvulaire. Des études transcriptomiques comparant l'expression génique canine ²⁴⁸ et humaine ^{249,250} des acteurs de la voie du TGF- β entre des valves mitrales dystrophiques et contrôles ²⁵¹ ont rapporté l'augmentation de l'expression de TGF- β 2 et de BMP4. Concernant la voie canonique, la fixation du ligand sur le TGF- β R induit la phosphorylation des protéines SMAD2 et 3 cytoplasmiques, qui forment alors un complexe en liant SMAD4 pour transloquer dans le noyau et induire la transcription de gènes de remodelage matriciel, différenciation et migration cellulaire, fibrose et EMT (Figure 19) ^{252,253}. La voie non-canonique met en jeu différentes MAPkinases (MAPK) comme ERK, p38MAPK, c-JUN N-terminal kinases (JNK) ^{252,253}.

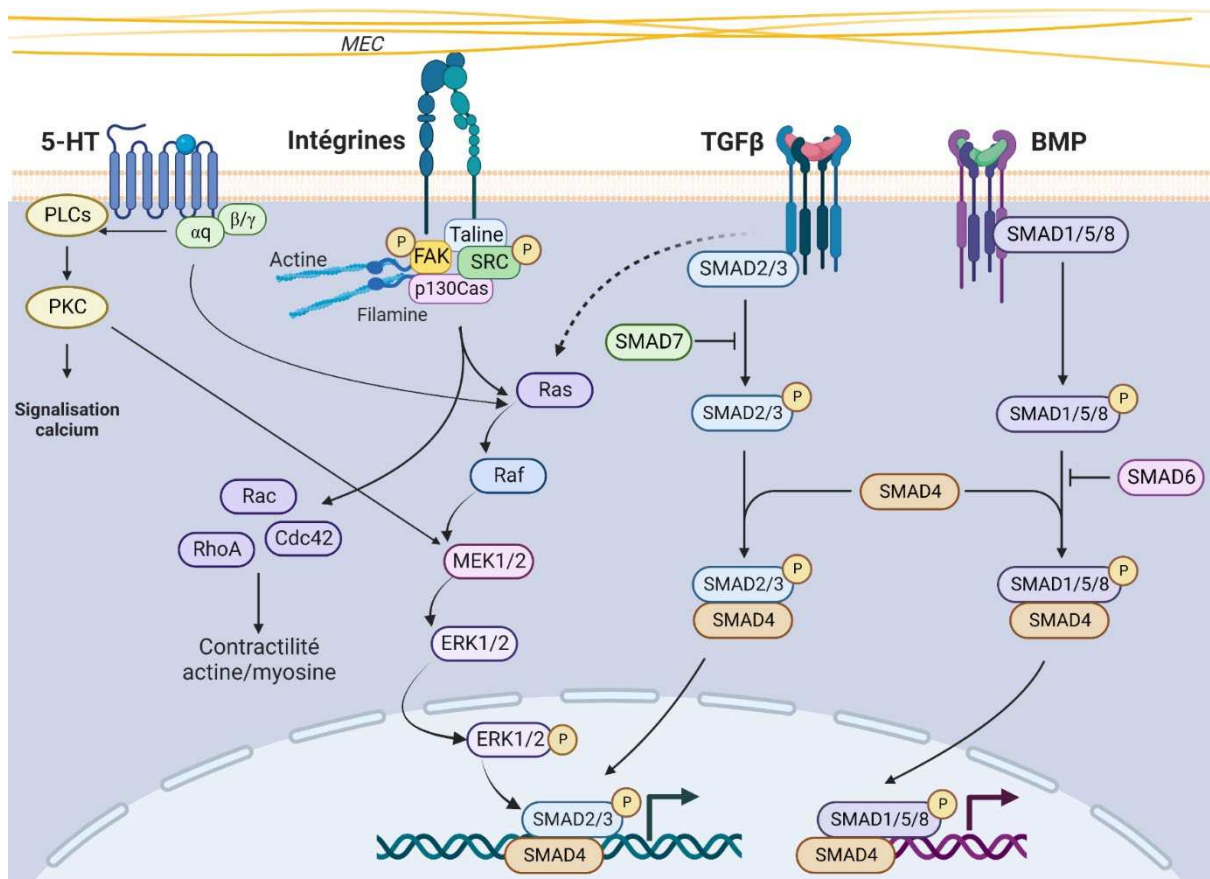


Figure 19 : Voies de signalisation décrites comme impliquées dans la DVM : sérotonine, intégrines, TGF- β , BMPs. La flèche en pointillée correspond à la voie non canonique du TGF- β . Créé avec BioRender.com.

Différentes études mettent en évidence une signalisation excessive des membres de la superfamille du TGF- β (Endothéline-1, BMPs, ...) dans la DVM du syndrome de Marfan, sur tissus humain et murin, où les CIVs activées sont le type cellulaire majoritaire, probablement responsables du remodelage matriciel^{2,202-204,249}. De plus, le TGF- β active les CIVs-q *in vitro* et l'inhibition du TGF- β RII induit la transition des CIVs-a vers un phénotype quiescent²⁵⁴. L'isoforme longue du TGF- β , LTBP1L, qui a la capacité de lier le TGF- β , est impliquée dans la régulation de la voie au cours de la valvulogénèse²⁵⁵. Différents modèles murins KO pour des isoformes de Smad (Smad4, 6, 7) développent des dysfonctions cardiaques et des défauts de la valvulogénèse²⁵⁶. Les données dans ce domaine démontrent un rôle de la voie du TGF- β dans l'EMT mais aussi dans le remodelage des valves²⁵⁷, résumé Figure 20.

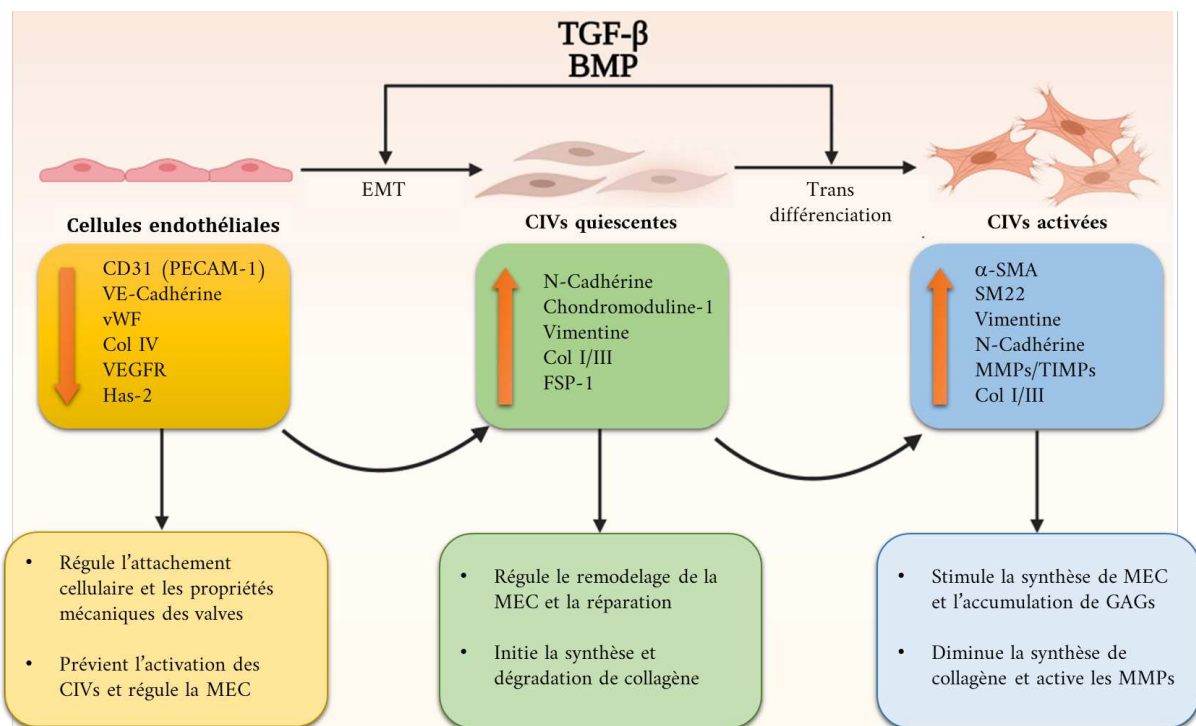


Figure 20 : Rôle de la superfamille du TGF- β dans la dégénérescence valvulaire mitrale myxoïde. Reproduit d'après²⁵⁸.

Cette implication n'est pas surprenante tant les voies du TGF- β régulent de nombreux mécanismes cellulaires : prolifération, différenciation, migration, apoptose, dans différentes pathologies

cardiovasculaires ²⁵⁹. Néanmoins, les mécanismes précis par lesquels le TGF- β participe à la DVM sont encore peu connus.

2.3.2 Sérotonine

La sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) est un neurotransmetteur synthétisé majoritairement par les cellules entérochromaffines intestinales à partir de tryptophane et de tryptophane hydroxylase-1 (THP1). Ensuite, elle est internalisée dans les plaquettes par son transporteur SERT ²⁶⁰ (Figure 22) et stockée dans des granules denses avec du calcium et de l'adénosine triphosphate. La sérotonine peut alors être libérée par les plaquettes sanguines et agit via sa fixation sur ses récepteurs 5-HTR (15 récepteurs répertoriés), couplés à la protéine Gq (à l'exception du 5-HT₃R). Les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} sont les types majoritaires dans les valves cardiaques ²⁶¹ (Figure 22).

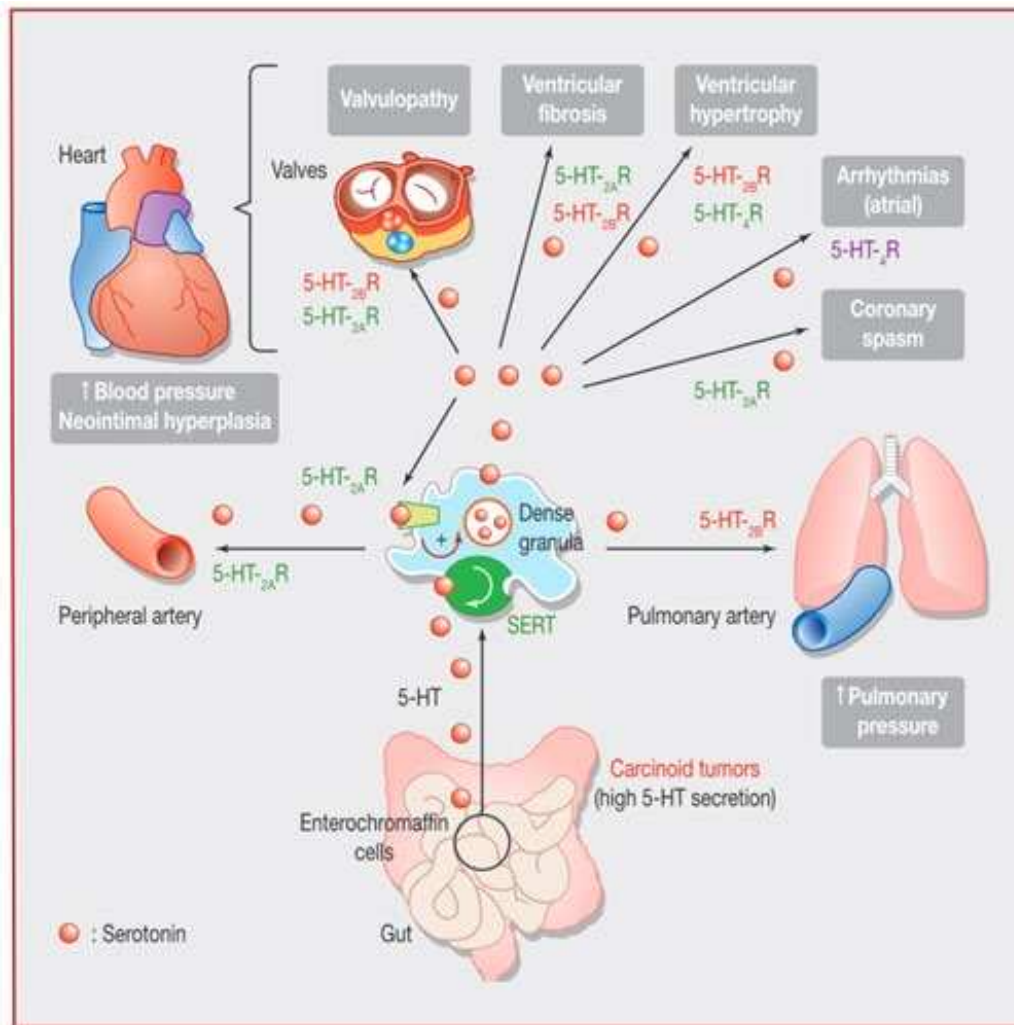


Figure 21 : Effets pathologiques de la sérotonine (5-HT) dans l'organisme. SERT : 5-HT transporteur, R : récepteur ²⁶².

La fixation de la 5-HT sur le 5-HT_{2B}R active la phospholipase C (PLC), augmente le niveau de calcium intracellulaire et active la protéine kinase C (PKC), ce qui stimule la voie des MAP-kinases/ERK1/2 (Figure 19) ^{251,263} et est nécessaire à la régulation de la production du TNF- α et de l'IL-1 β *in vivo* ²⁶⁴. De même, le 5-HT_{2B}R induit l'activation de la protéine Ras et la phosphorylation de Src, impliquées également dans la voie ERK1/2 dans l'activation des CIVS mitrales ^{265,266}.

La sérotonine peut aussi agir via des mécanismes intracellulaires impliquant la génération de stress oxydatif, qui fait suite à la métabolisation de la 5-HT par l'oxydase monoamine mitochondriale

(MAO-A) et l'enzyme transglutaminase-2 (TG2). Le métabolite majeur généré par MAO-A est l'acide acétique 5-hydroxyindole (5-HIAA).

La voie de la 5-HT joue un rôle majeur dans la physiopathologie cardiovasculaire, participe à la valvulogénèse et est impliquée dans le remodelage cardiaque, notamment dans l'hypertrophie myocardique sous forme endogène, mais aussi dans le remodelage valvulaire ²⁶⁷. Des valvulopathies en lien avec la 5-HT sous forme endogène (dans le cas de tumeurs carcinoïdes) ²⁶⁸ mais aussi exogène ^{265,269} sont décrites. Des médicaments agonistes des récepteurs à la sérotonine (5-HTR), tels que le benfluorex (Mediator®), stimulent les voies sérotoninergiques conduisant notamment à une dégénérescence valvulaire caractérisée par une prolifération accrue de CIVs-a, des lésions endocardiques et une accumulation de MEC ²⁶⁹.

Dans les valvulopathies induites par des agonistes de la sérotonine, il semblerait que les récepteurs 5-HT_{2B} soient stimulés préférentiellement ²⁶¹. Des modèles canins de DVM spontanée, tels que les Cavalier Kings Charles, ont démontré une augmentation de l'abondance de THP1 ^{270,271} et de 5-HT_{2BR}, une diminution de SERT, une augmentation de la phosphorylation ERK1/2 (Figure 19) ^{270,272} et une augmentation du taux de 5-HT circulante ^{251,273,274}. L'augmentation de sérotonine sérique serait due aux plaquettes qui en transportent : chez le chien présentant une DVM, l'augmentation de la concentration en 5-HT dans les plaquettes et les valves mitrales d'animaux a été décrite ²⁷⁵.

L'administration chronique de sérotonine exogène induit une DVM chez le rat ²⁷⁶ et les souris déficientes pour SERT développent une DVM de type myxoïde ²⁷⁷. Un modèle de souris développé plus récemment par Ayme-Dietrich et collaborateurs, par l'infusion sous-cutanée continue de nordexfenfluramine, démontre une DVM après 28 jours de protocole ²⁶². Une augmentation de la densité des progéniteurs endothéliaux provenant de la moelle osseuse (CD34⁺/CD31⁺) a été observée ²⁶². De plus, ces lésions n'apparaissent pas chez les souris transgéniques 5-HT_{2BR}^{-/-} et

HT_{2A/2B}^{-/-}, ni chez les souris recevant un antagoniste des récepteurs²⁶². Concernant le transporteur, le modèle de souris KO pour SERT développe une fibrose valvulaire²⁷⁸.

Par ailleurs, la 5-HT peut activer des mécanismes *via* un effet intracellulaire, après son internalisation par SERT et sa métabolisation par l'enzyme transglutaminase-2 (TG2). La sérotonylation par la TG2 participe au remodelage matriciel, et donc à la DVM. L'étude de souris développant une DVM rapporte que la maturation et le remodelage matriciel durant l'embryogénèse sont dépendants des interactions 5-HT/TG2/FLNA²²⁸.

2.3.3 Cils

Les cils sont des structures formées de microtubules qui s'étendent du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Deux types de cils sont caractérisés : les cils mobiles, qui permettent la propulsion des gamètes ou le mouvement de fluides, présents par centaine par cellule, et les cils primaires ou immobiles, typiquement trouvés seuls sur une cellule, qui possèdent des fonctions sensorielles. Il est connu que la longueur de ces structures est prédictive de leur bonne fonctionnalité²⁷⁹⁻²⁸².

Les cils primaires ont longtemps été considérés comme un vestige de l'évolution, sans fonction persistante, mais la découverte de désordres syndromiques rares liés à des défauts de gènes de cils, les ciliopathies, a révoqué ces croyances. La co-existence des ciliopathies, telle que la Polykystose Rénale Autosomique Dominante (PKRAD) et de troubles valvulaires tel que la bicuspidie aortique ou le PVM^{283,284} ont mis les chercheurs sur la piste d'une origine génétique moléculaire commune à ces pathologies. De plus, la PKRAD et le PVM étant deux pathologies caractérisées par une accumulation de protéoglycanes et une désorganisation du collagène, l'hypothèse d'un défaut de cils primaires à l'origine du PVM est apparue.

Les cils primaires transmettent des signaux mécaniques, électriques et chimiques selon le contexte spatio-temporel. Par ce biais, ils coordonnent des signaux de voies de signalisation diverses : des

facteurs de croissance (TGF- β , PDGF), Wnt, Notch1, Hedgehog et de la MEC depuis leur microenvironnement vers la cellule, pour influencer sur la survie et la différenciation cellulaire ainsi que l'organisation tissulaire.

Depuis quelques années, les cils primaires sont reconnus pour jouer un rôle central dans la biomécanique et la régulation moléculaire du développement cardiaque, mais les mécanismes impliqués restent peu connus. Les cils primaires sont présents à la surface des cellules interstitielles du « developing outflow tract cushion » à E11.5 et E13.5, mais sont rarement observés sur l'endocarde valvulaire adulte ²³⁸. Durant le développement fœtal, les cils s'allongent pour atteindre une taille moyenne maximale de 2,5-3,0 μm au stade E17.5. La longueur de ces cils va ensuite diminuer au cours du développement post-natal, à l'âge adulte les CIVs n'expriment plus que très rarement ces structures.

L'analyse immunohistologique des souris KO *Dchs1* et KO *FLNA* a montré une réduction significative de la longueur des cils primaires valvulaires mitraux ²³⁰, en accord avec un rôle de ces organelles dans l'étiologie moléculaire du PVM.

La régulation de la production de MEC par les cils primaires est encore un sujet débattu mais des évidences obtenues chez le zébrafish et la souris semblent montrer une régulation transcriptionnelle des metalloprotéinases (Adamts, cibles de la signalisation des cils) ²⁸⁵ et du collagène ²⁸⁶ par les cils dans le rein et les os.

2.3.4 L'EMT

Le processus d'EMT a été décrit dans la section 1.4. Les premières implications de l'EMT post-natale dans un contexte pathologique ont été démontrées dans les cancers et l'hypertension artérielle pulmonaire ¹⁰⁴. L'implication de ce processus dans les pathologies fibrotiques reste en questionnement ¹⁰⁵. En effet, la réactivation de la signalisation de l'EMT caractérisée par

l'augmentation de Snail dans des cellules épithéliales rénales induit une fibrose ²⁸⁷, mais ces résultats n'ont pas été retrouvés *in vivo* ²⁸⁸. Au sein des valves dystrophiques, la ré-activation de l'EMT est un phénomène très controversé. Des études *in vitro* et histologiques sur des VM de moutons qui présentaient une régurgitation ont rapporté une implication de l'EMT dans la pathogénicité ^{202,289-291}. Cependant, ces recherches ont été menées *in vitro* et par marquage histologique alors que la conversion *in vivo*, dans un contexte physiopathologique, de CEVs en CIVs n'a pu être détectée ²⁹². Ainsi, le traçage de lignée cellulaire a permis de caractériser l'origine des cellules interstitielles dans des VM de souris adultes. Aucune évidence d'EMT valvulaire n'a été détectée (en histologie ou ARNm), ni dans les souris saines, ni dans les souris présentant une DVM liée au syndrome de Marfan ²⁹². En revanche chez ces souris, une infiltration de cellules CD45+ a été rapportée dans les valves pathologiques, suggérant que des leucocytes contribuent à la DVM ²⁹².

2.3.5 Cellules immunitaires

Des cellules hématopoïétiques CD45+ ont été détectées dans les VM myxoïdes chez l'Homme ²⁰², le mouton ^{293,294} et les souris ^{205,292,295,296} alors que la pathologie était considérée comme « non-inflammatoire » durant des années ²⁵⁸. La conservation inter-espèces du recrutement de leucocytes suggère l'importance de ce processus dans la physiopathologie. Dans la DMV, la nature des différentes populations immunitaires et leur rôle spécifique ne sont pas encore élucidés mais l'intérêt pour le sujet est grandissant. L'étude la plus récente, réalisée par Kim et collaborateurs sur des valves de patients, des souris et des cochons développant un syndrome de Marfan, démontre le rôle prépondérant des macrophages dérivés de monocytes et de l'environnement pro-inflammatoire associé, dans le développement de la DVM myxoïde ²⁰⁵. Les macrophages dérivés de monocytes, positifs pour le récepteur à chimiokine de type 2 (CCR2⁺) identifiés dans les VM dans cette étude

sont localisés dans les régions de remodelage de la MEC. Un autre type de macrophages, dits « résidents », négatifs pour le marqueur CCR2 et positifs pour le marqueur CD206, sont localisés du côté du flux dans la région sous-endothéliale le long de la VM ²⁰⁵.

De plus, la déficience en récepteur à chimiokine de type 2 (CCR2) est protecteur contre la progression de la pathologie : les VM des animaux qui développent un syndrome de Marfan sans CCR2 étaient peu épaisses et leur MEC était préservée ²⁰⁵. Par ailleurs, l'étude transcriptomique sur souris, Hommes et chiens démontre une augmentation de la réponse inflammatoire dans les VM pathologiques, suggérant une implication de l'activité immunitaire dans la progression de la pathologie. L'activation et le recrutement des cellules immunitaires dans la DVM pourraient être liés au remodelage et à l'accumulation de composants de la MEC, notamment de l'acide hyaluronique et du versicane connus pour leurs rôles dans le chimiotactisme et l'attraction des cellules circulantes du système immunitaire ^{205,297}. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déceler précisément les mécanismes reliant les cellules immunitaires à la DVM. Dans la sténose aortique par exemple, la différenciation des CIVs peut être dirigée par des stimuli inflammatoires provenant de différents types cellulaires immunitaires tels que les macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes et mastocytes ²⁹⁸. La communication entre ces cellules et les CIVs joue un rôle important dans la physiopathologie de la sténose aortique ²⁹⁸.

L'utilisation clinique de médicaments anti-inflammatoires reste risquée due au caractère pan-tissulaire de ces mécanismes. Néanmoins, des inhibiteurs spécifiques de CCR2 ^{299,300} sont actuellement en phase d'essai clinique dans différentes pathologies et pourraient être testés en recherche pour prévenir ou ralentir la progression de la DVM ²⁰⁵. Ainsi, il est nécessaire de continuer les recherches sur les mécanismes moléculaires sous-jacents impliqués dans la DVM.

2.3.6 Mécanobiologie et Relations entre les différentes voies

Les différents mécanismes exposés précédemment illustrent la diversité des processus physiopathologiques potentiellement impliqués dans la physiopathologie de la DVM. Une complexité supplémentaire dans la compréhension de ces mécanismes est liée à leurs nombreuses interrelations (« cross-talk »), que ce soit dans le partage d'effecteurs de signalisation, dans la co-activation ou dans l'inter-régulation.

Mécanobiologie

La spécificité des stress mécaniques subit par la valve (intensité, fréquence, durée) et la reconnaissance des voies du TGF- β dans le remodelage de la MEC valvulaire ont stimulé l'étude du cross-talk des voies du stress mécanique et de signalisation, notamment du TGF- β , sur la biologie valvulaire. La valve mitrale est soumise à différentes forces mécaniques au cours de son développement, de sa maturation puis durant toute la vie de l'individu (expliquées section 1.2 et 1.4). Dans le cas de la DVM, la valve est plus épaisse et la MEC remodelée répond moins bien à ces forces.

Les réponses cellulaires aux stimuli mécaniques dépendent principalement des protéines sensorielles et des mécanorécepteurs tels que les canaux ioniques mécanosensibles, l'annexine V et les intégrines ³⁰¹.

En connectant la MEC au cytosquelette *via* les adhésions focales, les intégrines détectent et régulent les réponses cellulaires aux stress mécaniques. Composées de deux sous-unités α et β ^{302,303}, les intégrines fixent différentes protéines matricielles et interagissent avec des ligands de surface, des protéines transmembranaires, des kinases (FAK et SRC), et des facteurs de croissance ³⁰⁴. Ainsi, elles reçoivent et transmettent des signaux des 2 côtés de la membrane plasmique ^{305,306} (Figure 22).

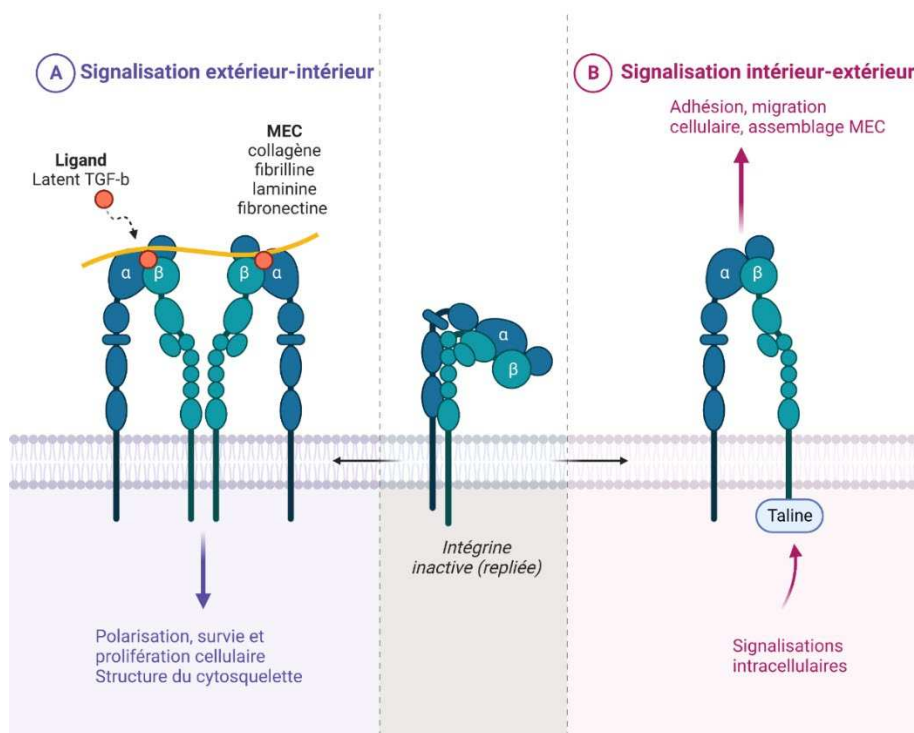


Figure 22 : Activation des intégrines selon le stimulus. Créé avec BioRender.com.

Dans les CIVs, les intégrines lient le collagène, la fibrilline, la laminine et fibronectine ^{307,308}. La forme latente du TGF- β a la capacité de lier les intégrines. Le collagène de type I lie les intégrines $\alpha 2\beta 1$ (les plus exprimées dans les CIVs) et promeut l'adhésion et la production de MEC par les CIVs ²³. L'activation des intégrines permet le recrutement de nombreuses protéines (notamment les kinases FAK et SRC) dans le but de renforcer les points focaux d'adhésion et d'activer, *via* leur phosphorylation subséquente, les voies de signalisation associées (Figure 19) ³⁰⁹. La protéine FAK (« Focal Adhesion Kinase ») est une tyrosine kinase sans activité de récepteur mais qui joue un rôle dans les connexions entre les cellules et la MEC, et dans la fibrose, atriale et myocardique (discuté section 2.4.3) ³¹⁰.

Dans des cultures de CIVs canines et humaines, l'étirement cyclique induit un phénotype fibroblastique avec l'augmentation de l'expression de vimentine sans augmentation d' α -sma ³¹¹. Dans des cultures de CIVs humaines, l'étirement cyclique induit cette fois une augmentation de l'expression de TGF- $\beta 2$, α -sma et d'une protéine matricielle impliquée dans la fibrose, CTGF ³¹².

Cette réponse au stress médiée par le TGF- β varie d'une réponse au TGF- β 1 classique (mécanismes décrits section 2.3.1) qui induit un phénotype myofibroblastique caractérisé par l'augmentation de l'expression d' α -sma mais pas de vimentine ³¹¹.

Les stimuli mécaniques et le TGF- β 1 sont des acteurs majeurs dans la différenciation myofibroblastique. *In vitro*, en absence de TGF- β 1 actif, le stress mécanique seul ne permet pas d'activer les fibroblastes ^{313,314}. L'étirement extracellulaire ainsi que l'augmentation des tensions intracellulaires de myofibroblastes en culture activent la forme latente du TGF- β 1 dans la MEC, *via* les intégrines ²⁴⁴. En effet, l'ajout d'inhibiteurs spécifiques des intégrines diminue l'activation du TGF- β 1 dépendante du stress. Cette activation par le stress n'a pas lieu sur des supports de culture souples, indiquant que la rigidité de la MEC pourrait être modulée par les cellules afin de contrôler l'activité du TGF- β ²⁴⁴. Enfin, les myofibroblastes activent le TGF- β 1 cellulaire et le TGF- β 1 stocké dans la MEC, par des mécanismes de contraction cellulaire. Trois éléments sont nécessaires à cette libération du TGF- β 1 de la MEC : i) la génération d'une contraction par les fibres de stress exprimant l' α -sma ; ii) la transmission du stress entre LAP et le TGF- β 1 via les intégrines ; et iii) l'intégration du LLC dans une MEC mécano-résistante. Ce modèle d'activation est présenté Figure 23.

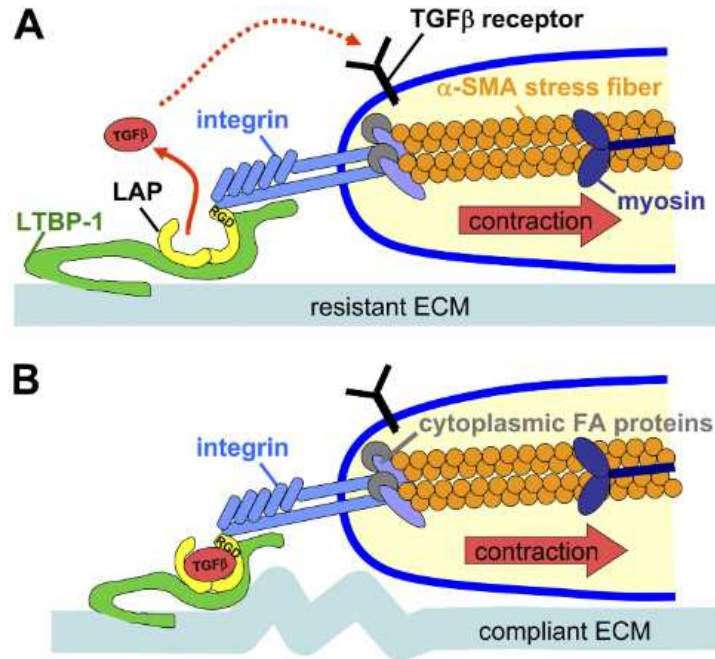


Figure 23 : Modèle de l'activation du TGF- β 1 médiée par la contraction des myofibroblastes. A) Le LLC est fixé à une MEC rigide, le stress cellulaire peut induire des changements de conformation de LTBP-1 et/ou LAP afin de libérer TGF- β 1. B) Dans le cas d'une MEC compliant, plus souple, le LLC est tiré par la contraction cellulaire mais le manque de résistance de la MEC ne permet pas de changement conformationnel du LLC et le TGF- β 1 reste latent ²⁴⁴.

De plus, une activation des petites protéines RhoGTPases (RhoC mais pas RhoA) et de la voie MEK/ERK a été rapportée dans ces cellules étirées. Néanmoins, les Smad2/3, effecteurs de la voie TGF- β , n'ont pas répondu au stress. L'augmentation du TGF- β 2 dans la DVM en réponse à un stress mécanique a également été observée dans d'autres études ^{315,316}.

Grâce à des études de la déformation membranaire induite par une aspiration *in vitro*, il a été démontré que les CIVs aortiques et mitrales sont plus rigides que les CIVs pulmonaires et tricuspides, suggérant qu'elles répondent au stress tissulaire local en jouant sur leur rigidité *via* le remodelage valvulaire ²⁰. Par ailleurs, l'endothélium valvulaire qui est en contact direct avec les forces de cisaillement dues au flux sanguin, répond aux changements locaux de ces forces ⁶⁷. De plus, les zones de remodelage sont plus généralement situées du côté du flux, ce qui appuie l'importance de la réponse au stress dans les DVM.

Il est probable que la mécanotransduction dans le remodelage valvulaire soit en fait un processus faisant intervenir toutes les voies de signalisation décrites précédemment, selon une organisation spatio-temporelle propre à la pathologie ³⁰⁷.

Cross-talk

Au-delà de l'implication du stress mécanique dans la biologie valvulaire, différentes relations entre des voies décrites au sein des sections précédentes existent.

Ainsi, dans des CIVs aortiques de mouton, la sérotonine induit l'expression de TGF- β 1, associée à un remodelage de la MEC par la production de GAGs et d'acide hyaluronique ²⁶⁷. Dans ces mêmes cellules, l'activation de 5-HT_{2A}R entraîne l'augmentation de l'activité de TGF- β 1 via la voie canonique G α q-phospholipase C-protéine kinase C ²⁶⁷. La culture de CIVs aortiques porcines a mis en évidence l'implication de la 5-HT dans l'activation des myofibroblastes induite par la voie TGF- β 1-P38-Src ³¹⁷.

Dans les VM de mouton *ex vivo*, la sérotonine participe à l'activation des fibroblastes et la synthèse de GAGs en réponse au stress cyclique ³¹⁸ (Figure 24).

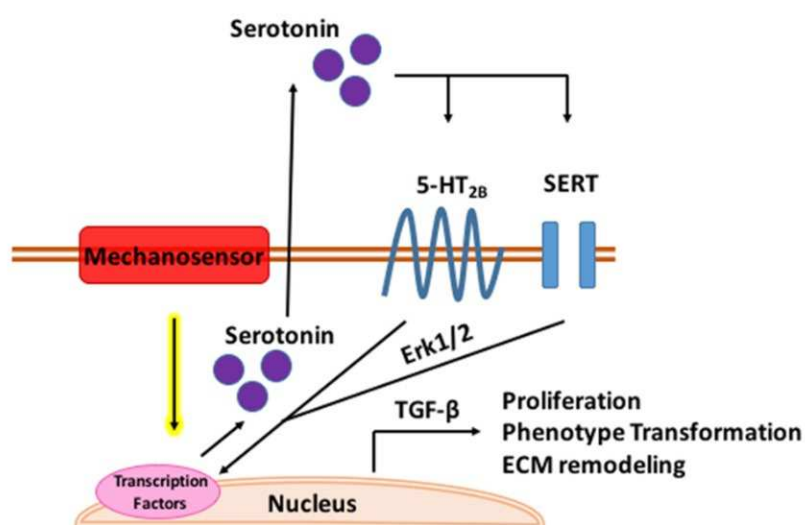


Figure 24 : Mécanomodulation et sérotonine impliquées dans la DVM ³⁰⁷.

Par ailleurs, l'interaction potentielle entre l'Angiotensine II (Ang II) et le TGF- β pourrait jouer un rôle dans la DVM. En effet, cette interaction active les voies canoniques et non canoniques du TGF- β et est régulée par l'inhibition des récepteurs à l'angiotensine II ²⁰². L'activation de la signalisation médiée par les SMADs et la signature d'une réponse TGF- β ont été observées dans les VM de souris traitées à l'Ang II, avec une modification de l'activité des voies BMP et Wnt/ β -caténine suggérant leur implication dans la DVM humaine ³¹⁶.

Les mécanismes discutés ci-dessus représentent des pistes dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la DVM. Cependant, le manque de modèles animaux couplé au manque de marqueurs moléculaires pour cibler les cellules valvulaires complexifient le développement de traitements adaptés à la pathologie. En effet, ces voies de signalisation ont des actions larges, en terme de tissus et type cellulaire. Néanmoins, les récentes études génétiques impliquant notamment la FLNA ont permis la génération de modèles animaux indispensables à la compréhension de ces mécanismes et à la recherche de marqueurs.

2.4 Physiopathologie du prolapsus valvulaire mitral lié à la Filamine-A

L'implication de la Filamine-A dans le PVM non-syndromique a été décrite par mon équipe d'accueil ^{3,4}. L'étude clinique des patients, également réalisée par mon équipe d'accueil, est présentée dans la section suivante ³¹⁹⁻³²¹.

2.4.1 Présentation clinique du PVM lié à la Filamine-A

Les caractéristiques cliniques du PVM lié à l'X ont été décrites par mon équipe en 2000 ³²¹, alors que l'implication de la FLNA n'avait pas été décelée. L'hospitalisation du propositus de 16 ans

pour une régurgitation aortique sévère, a initié le recrutement de membres de la famille, sur 5 générations. Tous les hommes affectés présentaient une dystrophie mitrale avec une élongation et un élargissement des feuillets mitraux, associés dans deux tiers des cas à une régurgitation aortique ³²¹.

L'identification des mutations *FLNA* ⁴, a permis le recrutement de nombreux autres patients et l'étude phénotypique rétrospective a été réalisée sur 246 patients (72 patients mutés et 174 non mutés) provenant de 4 familles. Au sein de ces dernières, trois mutations *FLNA* ont été identifiées : p.P637Q (famille Française), p.H743P et p.G288R (familles Européennes) ³²⁰. Au sein des 246 patients, les données d'échocardiographie étaient disponibles chez 162 patients (65 mutés et 97 non mutés). L'étude de l'appareil valvulaire mitral s'est intéressée au diamètre de l'anneau, la longueur et l'épaisseur des feuillets, la position des feuillets, la longueur des cordages et la position des muscles papillaires. Le phénotype est sévère chez les hommes et modéré chez les femmes ³²⁰, ce qui peut être expliqué par la localisation du gène *FLNA* sur le chromosome X ⁴. 53% des patients présentaient un PVM (Figure 25A) (en général modéré mais qui ressemble au PVM non lié à la *FLNA* ^{222,322}), plus fréquent chez les hommes (70%) que chez les femmes (44%) et 53% des hommes adultes développaient une régurgitation mitrale secondaire à ce PVM (Figure 25B). L'unique analyse histologique de l'étude, sur un feuillet mitral obtenu après une réparation valvulaire mitrale, a révélé la nature myxoïde de la dégénérescence (Figure 25D).

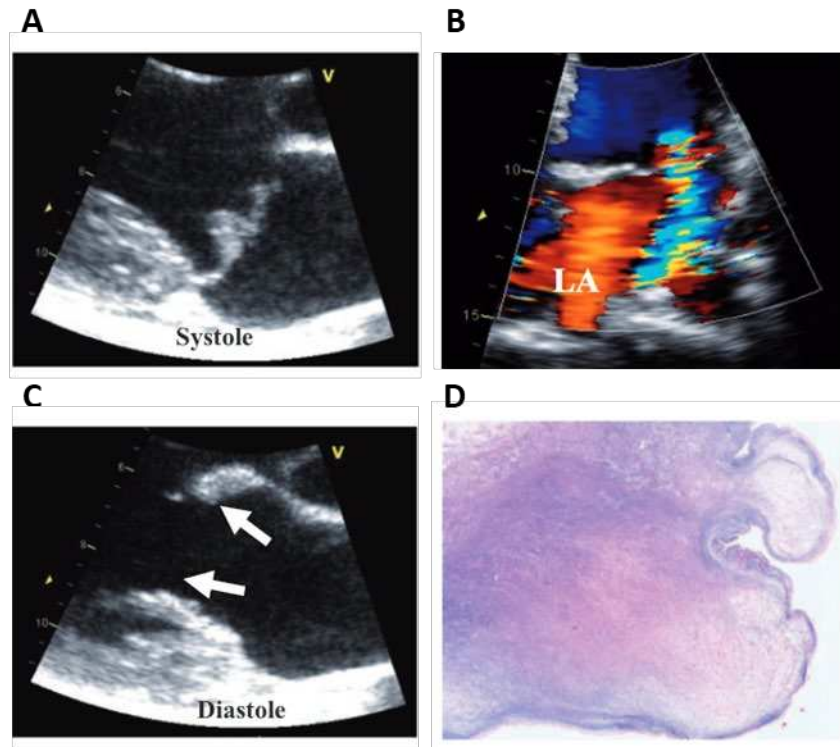


Figure 25 : Aspects échocardiographiques et histologique du PVM et de la dégénérescence myxoïde des patients FLNA. A) Prolapse en systole. B) Régurgitation mitrale typique, en P2. C) Restriction à l'ouverture en diastole. D) Coloration HPS d'un feuillet myxoïde. D'après ³²⁰.

Chez les patients, âgés de 5 mois à 87 ans, l'atteinte mitrale apparaît dès les premiers stades de développement (la pathologie a pu être détectée chez un fœtus) et s'aggrave avec le vieillissement (similaire au PVM non lié à la FLNA ³²³). Conjointement à la DVM, 84% des patients présentaient des feuillets « en dôme » ou une restriction à l'ouverture, prédominant sur le feuillet postérieur (Figure 25C). Commun à toutes les familles FLNA, indépendamment du genre et de l'âge, la restriction à l'ouverture est un trait inhabituel typique du phénotype de PVM associé à la FLNA.

Concernant l'appareil valvulaire mitral, les cordages sont plus courts et l'extrémité des muscles papillaires est rapprochée de l'anneau mitral (Figure 26). Cette réduction de longueur de cordages est peu commune dans le PVM. Cependant, elle concorde avec les observations cliniques initiales ²²³ puis sur des animaux ²²⁸. Une atteinte polyvalvaire, sur deux valves au minimum, a été identifiée chez 23 des 65 patients FLNA dont 20 hommes (80%) ^{4,324}.

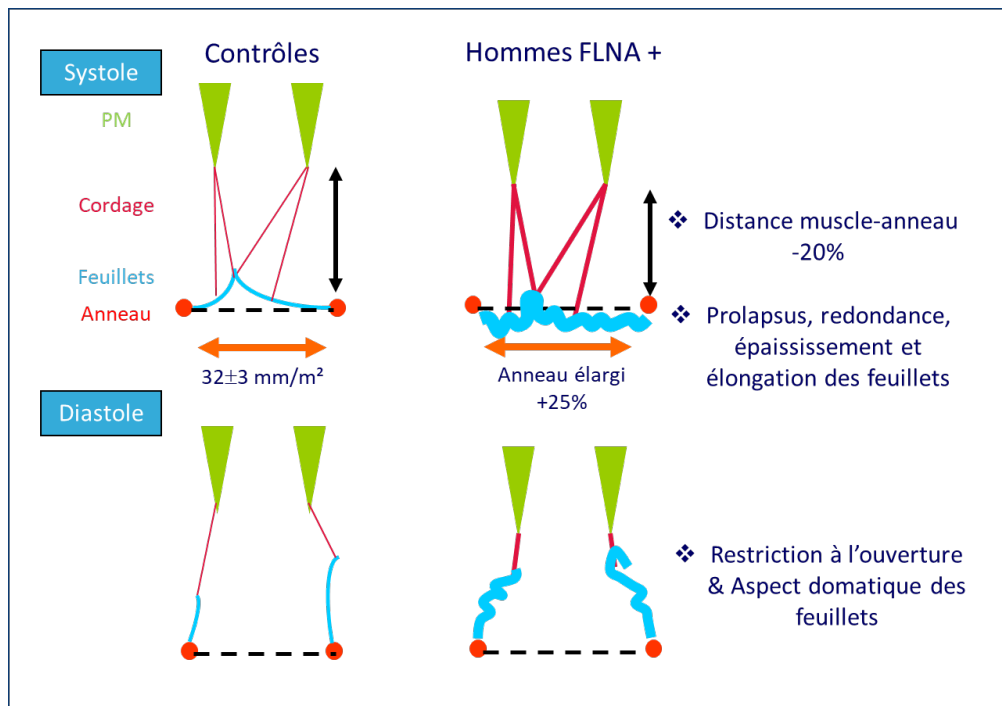


Figure 26 : Schéma résumant la morphologie de l'appareil valvulaire mitral en systole (haut) et en diastole (bas), chez les contrôles (gauche) et les hommes exprimant une FLNA mutée (droite). D'après ³²⁰.

Les atteintes valvulaires semblaient plus sévères chez les patients exprimant les mutations p.H743P et p.G288R, mais ces patients étaient sous-représentés dans l'étude comparativement aux patients *FLNA*-P637Q, ce qui ne permet pas de conclure réellement quant à la sévérité de l'atteinte mitrale selon la mutation. Néanmoins, cela coïncide avec l'impact des mutations sur la structure de la protéine (détaillé section 2.4.3), plus sévère pour p.H743P que p.P637Q.

Le taux de chirurgie valvulaire (mitrale, aortique ou les deux) était plus important chez les patients mutés que chez les contrôles (Figure 27). De plus, la survie globale tendait à décroître comparativement aux contrôles.

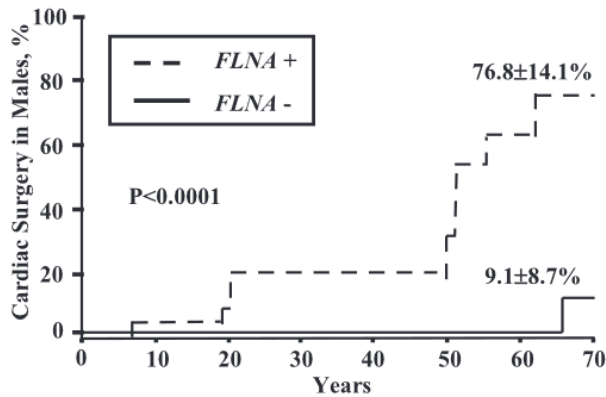


Figure 27 : Taux global de chirurgie valvulaire chez les patients mutés comparativement aux contrôles ³²⁰.

En résumé, le PVM lié à la FLNA est caractérisé par une élongation et un épaissement de type myxoïde des deux feuillets, paradoxalement associés à une ouverture restreinte de la valve en diastole.

2.4.2 La Filamine-A

Structure de la FLNA

Les Filamines sont des protéines de liaison à l'actine impliquées notamment dans la formation et le maintien de la morphologie cellulaire en réponse à des stimuli provenant des tissus conjonctifs adjacents ³²⁵⁻³²⁷. Trois isoformes protéiques ont été identifiées : FLNA, FLNB et FLNC, dont les gènes sont situés respectivement sur les chromosomes X, 3 et 7 chez l'Homme (X, 14 et 6 chez la souris) ³²⁸. Les FLNA et FLNB sont relativement ubiquitaires et la FLNC est exprimée par les muscles squelettiques et cardiaques ³²⁸. La Filamine-A, identifiée en 1975 ³²⁹ est l'isoforme la plus décrite dans la littérature ^{325,330,331}. Elle se structure en homo- ou hétéro-dimère avec la Filamine-B (Figure 28).

Chaque monomère (280 kDa) est composé d'un domaine de liaison à l'actine-F situé dans la partie N-terminale et un segment « Rod » constitué de 24 répétitions « immunoglobuline-like » (Igl) homologues, d'environ 96 acides aminés, séparé en 2 domaines « Rod » par un site de clivage pour

la Calpaïne, protéase dépendante du calcium^{326,327,331,332}. La dimérisation des protéines s'effectue au niveau du dernier segment Igl.

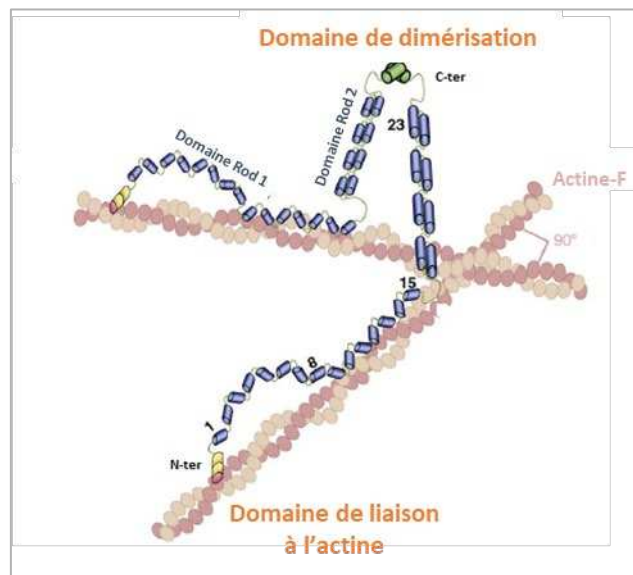


Figure 28 : Structure et interaction de la Filamine-A avec l'actine-F³²⁶.

Localisation et interactions de la FLNA

Au niveau cellulaire, la FLNA est localisée le long des fibres de stress d'actine-F, au niveau cortical du réseau d'actine et notamment sur le front de migration cellulaire³³⁰. Ainsi, elle est trouvée préférentiellement au niveau des lamellipodes, filipodes, fibres de stress et adhésions focales où elle est recrutée lors de l'adhésion et de la migration cellulaires ou lors d'un stress mécanique appliqué à la cellule³³³. La FLNA interagit avec plus de 100 partenaires et pour la plupart *via* le domaine Rod 2 : des protéines d'adhésion (intégrines) et de migration cellulaire (des protéines liées aux GTPases Cdc42, Rac, Rho et FilGAP (« Filamin-A GTPase-activating protein »), des facteurs de transcription SMADs, la Filamine-B et l'actine (Figure 29).

FilGAP (encodée par *ARGHAP24*) est une protéine partenaire de la FLNA localisée au niveau des adhésions focales et de la membrane plasmique. Elle diminue l'activité de la petite GTPase Rac1, ce qui diminue la formation des protrusions membranaires³³⁴. In vivo, l'activité de FilGAP est dépendante de sa co-expression avec la FLNA : l'activité de Rac est largement réduite quand les

deux protéines sont présentes, l'activité de FilGAP étant limitée par sa fixation à la FLNA, tandis que l'activité de Rac n'est pas modifiée en l'absence de FLNA³³⁴. La phosphorylation de FilGAP par la protéine kinase associée aux protéines Rho (ROCK) module son activité dans la régulation de la protrusion et de l'étalement cellulaire³³⁵.

L'homologie importante entre les répétitions d'immunoglobulines crée des sites de fixation multiples pour une même protéine partenaire³³⁰ (Figure 29). A ce jour, peu de partenaires ont été identifiés dans les régions ciblées par les mutations associées à la DVM (présentées section 2.2.2).

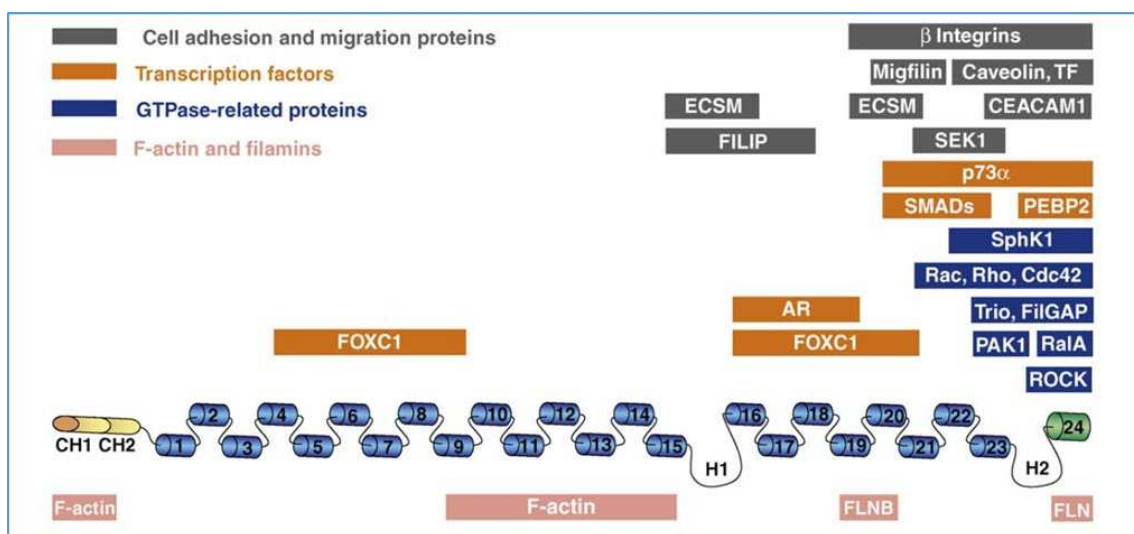


Figure 29 : Principales interactions de la Filamine-A avec ses protéines partenaires³²⁶.

Fonctions de la FLNA

La FLNA stabilise le réseau de filaments d'actine-F et le lie aux membranes cellulaires conférant aux cellules une intégrité membranaire ainsi qu'une protection contre les stress mécaniques³²⁵⁻³²⁷.

La FLNA est capable de se lier à environ 9 à 12 filaments d'actine³³⁶, mais il suffit d'un seul dimère de FLNA et d'une fibre d'actine pour observer une réticulation du réseau d'actine³³⁷. Le ratio

FLNA/Actine détermine le type d'organisation du réseau d'actine, avec un ratio optimal entre 1/80 et 1/140.

En réponse aux forces mécaniques, la cellule réorganise son cytosquelette d'actine et renforce ses points focaux d'adhésion, en régulant les voies de signalisation associées ^{325,331}. Dans un modèle cellulaire de mélanome humain dépourvu de FLNA (lignée M2), le réseau d'actine est instable et des bulles (« blebs ») sont présentes à la membrane plasmique ³³⁸. La réexpression de la FLNA sauvage dans cette lignée restaure le cytosquelette d'actine et entraîne la disparition des « blebs », indiquant le rôle prépondérant de la FLNA dans la stabilisation de la membrane plasmique. De plus, la FLNA est impliquée dans la migration, prolifération, adhésion, signalisation, protrusion, rétraction cellulaire, et dans la translocation des facteurs de transcription dans le noyau ^{325,326}. Au sein des lamellipodes et des fibres de stress, régions dans lesquelles la polymérisation d'actine est intense, les concentrations en FLNA sont plus élevées ³³⁹. La FLNA est impliquée dans la régulation de l'étalement cellulaire *via* les intégrines- β 1 ³⁴⁰, qui la recrutent et où elle participe à la maturation des points focaux d'adhésion et à la stabilisation des fibres d'actine. Le KO FLNA cellulaire démontre une diminution de l'étalement *in vitro* ³⁴⁰.

La FLNA est exprimée dans les macrophages, où elle joue un rôle dans les fonctions de migration et de recrutement ³⁴¹. Chez la souris *Flna^{0/fl}/LC*, la perte d'expression de la FLNA dans les macrophages diminue la réponse inflammatoire, traduite par une diminution de la prolifération et de la migration ³⁴¹. Comparativement aux WT, les macrophages déficients pour la FLNA expriment moins de RAC1, cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-12 et « monocyte chemoattractant protein 1 » MCP-1 ³⁴¹. De plus, la forme nucléaire phosphorylée de STAT3 est diminuée dans les macrophages en absence de FLNA. Il a été démontré que la FLNA est nécessaire au contrôle de la migration des monocytes *via* les petites GTPases Rho qui régulent le cytosquelette d'actine ³⁴². En effet, la perturbation de l'activation des protéines Rac1, Cdc42 et RhoA serait le processus responsable du phénotype cellulaire ³⁴².

La FLNA est également exprimée dans les plaquettes, produites par la fragmentation cytoplasmique des mégacaryocytes (MC). Les souris exprimant une délétion de la FLNA spécifique des lignées plaquettaires-mégacaryocytaires ont des saignements augmentés et une macrothrombocytopenie sévère due à une clearance accélérée des plaquettes ³⁴³. La FLNA lie des récepteurs comme l'intégrine α IIb β 3 et la glycoprotéine GPIb α , protéines essentielles à l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Une compétition entre la FLNA et Taline pour la fixation de l'intégrine- β 3 a été observée et la fixation de la FLNA stabiliserait l'intégrine dans un état inactif ³⁴⁴. Dans les plaquettes, la régulation négative de β 3 par la FLNA a été démontrée dans un rare cas d'hétérotopie périventriculaire où le patient présentait une mutation FLNA gain de fonction plaquettaire ³⁴⁵. Le mutant FLNA augmentait l'activation de β 3 en facilitant le recrutement de Taline à l'intégrine ³⁴⁵. L'hypothèse serait que la mutation induit un défaut d'affinité de la FLNA pour β 3 ³⁴⁶. Néanmoins, l'interaction FLNA- β 3 n'a pas été observée dans des plaquettes.

La FLNA régule de façon positive l'activité des intégrines. En effet, la déplétion de la FLNA diminue l'activité des intégrines et, par conséquent réduit le nombre de point focaux ³⁴⁷.

Régulation de la FLNA

Les interactions de la FLNA avec ses partenaires sont régulées par la phosphorylation, la protéolyse, la compétition entre les partenaires, et les forces mécaniques ^{346,348-350}.

Les Caspases, des cystéines protéases, et les Calpaïnes, des enzymes protéolytiques dépendantes du calcium, dégradent la FLNA en formant un fragment C-terminal de 90 kDa et un fragment N-terminal de 200 kDa ³⁴⁸. Le fragment C-terminal se lie alors aux facteurs de transcription, et le complexe transmigre dans le noyau pour réguler la transcription ³⁵⁰⁻³⁵².

La phosphorylation de la FLNA sur la sérine 2152 par PAK1, un effecteur de Rac, empêche la dégradation de la protéine par la Calpaïne, renforçant donc les lamellipodes ³⁵³.

Par ailleurs, la fixation de Filamine-A à l'Actine-F est régulée par le complexe Calcium/Calmoduline qui rentre en compétition avec la FLNA pour lier l'actine ³⁴⁹, néanmoins le mécanisme de fixation sélective de la Calmoduline n'est pas encore déterminé ³⁵⁴.

Le stress mécanique est une voie importante de régulation des interactions de la FLNA avec ses partenaires ^{334,355,356}. Cette régulation serait due au changement de conformation des domaines Igl C-terminaux, régulant l'accessibilité des sites de liaisons de la FLNA à ses partenaires ^{355,356}. Des études *in vitro* ont démontré que les forces de tension augmentent la fixation des β -intégrines à la FLNA afin de renforcer le cytosquelette et ses liens à la membrane plasmique, et dissocient FilGAP (la protéine régulatrice de Rac1) de la FLNA ³⁵⁵. C'est le changement de conformation des Igl qui découvre des sites de haute affinité pour les intégrines et permet alors un switch de l'affinité de la FLNA pour FilGAP vers les intégrines (Figure 30).

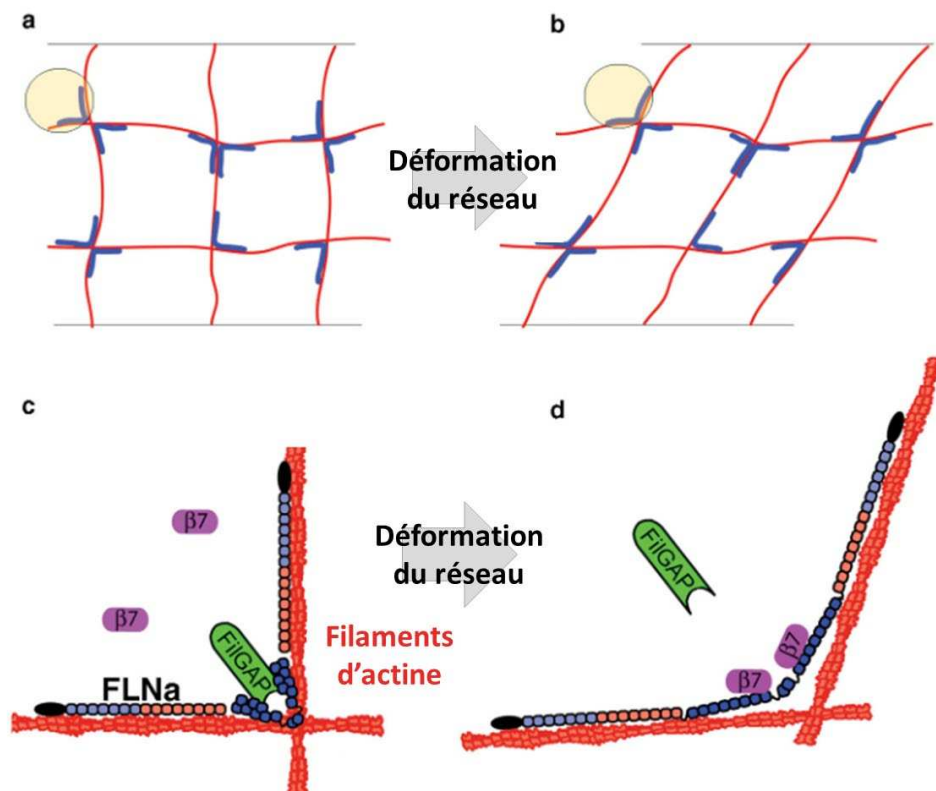


Figure 30 : Effet de la déformation du réseau d'actine sur les interactions FLNA avec FilGAP. ³⁵⁵.

La FLNA étant impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires, les mutations de la FLNA sont à l'origine de pathologies variées. Les mécanismes impactés par ces mutations, identifiées dans les familles qui développent un PVM, sont présentés ci-dessous.

2.4.3 Mécanismes et modèles animaux du PVM lié à la Filamine-A

A

L'ensemble des mutations G288R, P637Q, V711D, H743P, Δ 761-943, identifiées chez des patients présentant un PVM, sont localisées dans la partie N-terminale de la protéine, respectivement dans les domaines Igl-1, Igl-4, Igl-5, Igl-5 et Igl-6-7 (Figure 31) ^{4,224}.

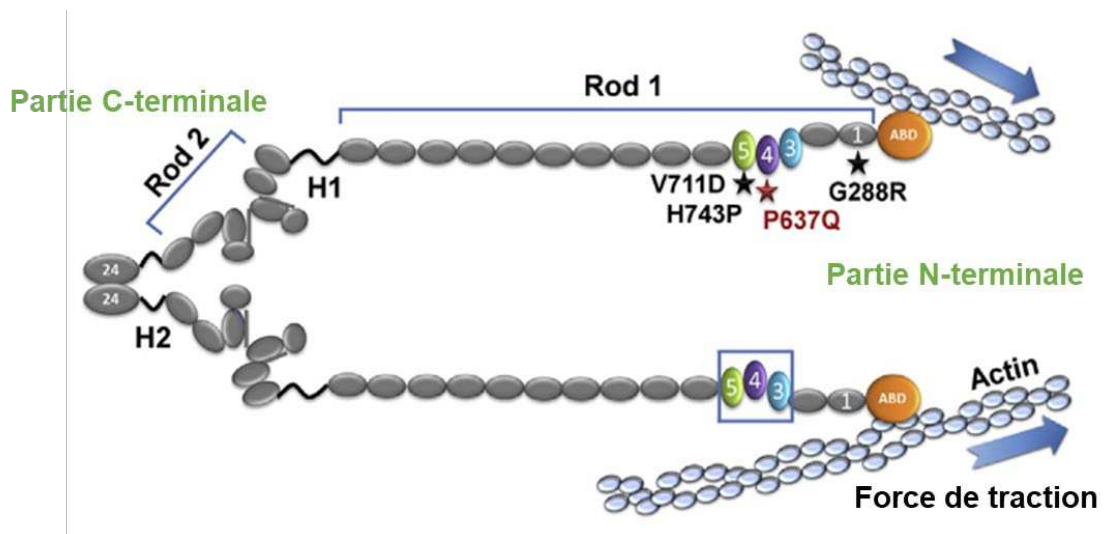


Figure 31 : Dimère de Filamine-A et localisation des mutations.³⁵⁷

L'impact de ces mutations sur la biologie cellulaire a été étudié *in vitro* au sein du laboratoire. L'étude de la lignée cellulaire M2 (déficientes en FLNA ³³⁸) a permis de démontrer que les mutations p.G288R et p.P637Q ne perturbent pas la fonction première de la FLNA ³⁵⁸. En effet, les réexpressions des formes mutées de FLNA restaurent le réseau d'actine et suppriment les « blebs » membranaires dûs à l'absence de FLNA dans les cellules M2. Cependant, des défauts d'adhésion,

de migration et d'étalement cellulaire ont été caractérisés dans ces cellules exprimant les FLNA mutées ³⁵⁸. Ces processus sont liés à la dérégulation de la balance des GTPases RhoA/Rac1 en faveur de RhoA, faisant intervenir la protéine d'activation des GTPases spécifiques de Rac, FilGAP (Figure 32). Ainsi, la partie N-terminale de la FLNA joue un rôle dans la régulation des petites GTPases, qui pourrait être impliquée dans le remodelage valvulaire en réponse au stress mécanique ³⁵⁸.

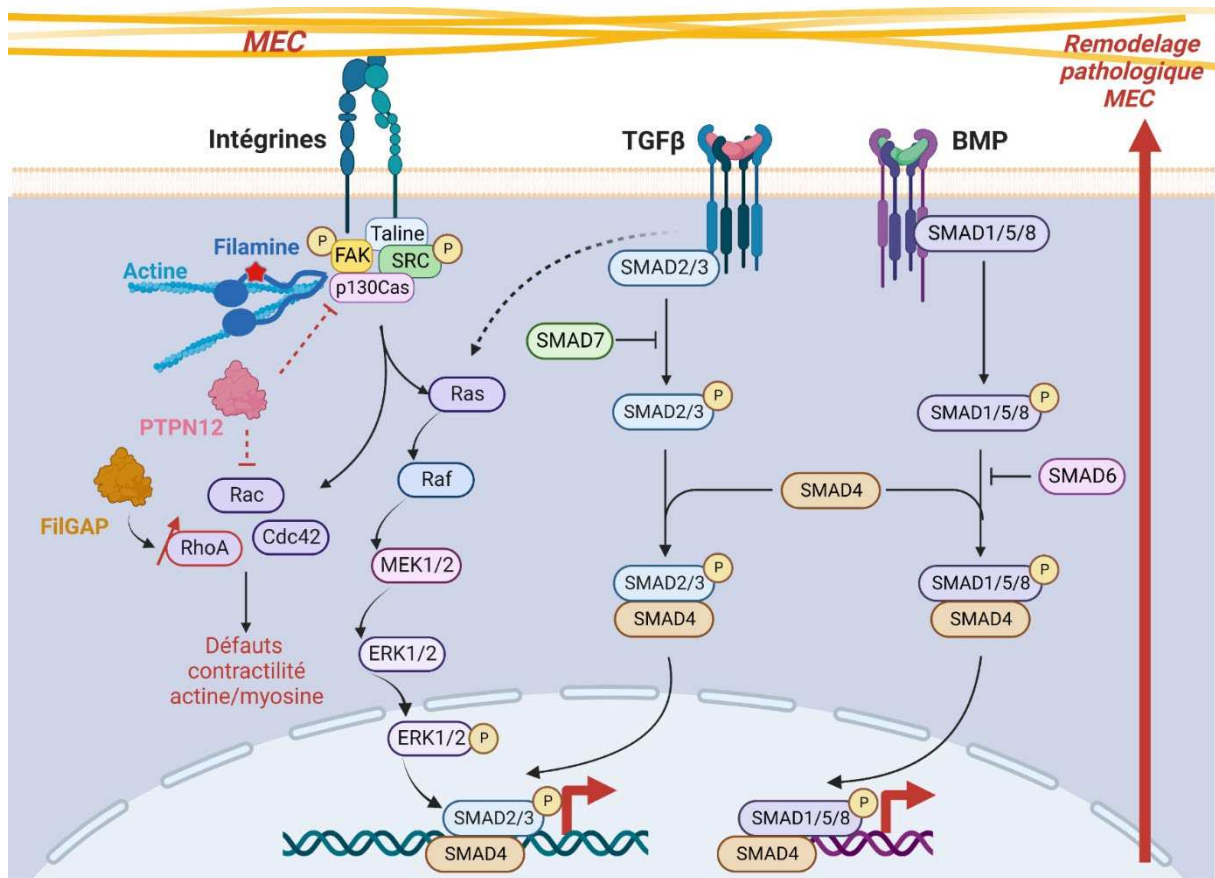


Figure 32 : Impact des mutations FLNA liées au PVM sur les voies de signalisation intracellulaires. Créé avec BioRender.com

La recherche de partenaires interagissant avec la région de la FLNA ciblée par les mutations, par l'approche de double hybride, a permis d'identifier PTPN12 (PTP-PEST), une tyrosine phosphatase ²²⁴. De façon intéressante, PTPN12 est connue pour déphosphoryler de nombreuses protéines impliquées dans les réponses cellulaires au stress mécanique (FAK, p130Cas SRC, SOS, GRB2)

224,359,360 (Figure 32). Elle est aussi en cause dans la biologie des cellules hématopoïétiques^{361,362}, notamment dans la fusion des macrophages³⁶³. La protéine FAK est activée par les intégrines *via* la protéine intracellulaire Taline et est régulée par PTPN12. Son auto-phosphorylation permet son interaction avec SRC qui s'auto-phosphoryle à son tour pour activer des effecteurs tels que p130Cas et adapte alors la réponse cellulaire à l'engagement des intégrines. L'inhibition pharmacologique de FAK supprime l'expression d' α -sma dans des fibroblastes myocardiques de souris stimulés au TGF- β 1³⁶⁴. Ces données sont corroborées *in vivo*, où l'inhibition de FAK diminue la fibrose myocardique chez la souris, *via* la diminution de l'expression d' α -sma et de vimentine³¹⁰. *In vitro*, l'induction de stress mécanique sur des cellules souches mésenchymateuses entraîne l'activation de la voie TGF- β /Activine/Nodal et la suppression de la voie BMP/GDP³⁶⁵.

Il a aussi été démontré que les antagonistes de 5-HT_{2B} préviennent la signalisation de la kinase associée aux points focaux d'adhésion, SRC, substrat de PTPN12, dans les CIVs aortiques³¹⁷.

Des approches biochimiques (double hybride, « pulldown », « surface plasmon resonance ») et structurale de cristallographie ont montré que les mutations déstabilisent les interactions FLNA-PTPN12 de la forme WT de la FLNA³⁶⁶ et modifient à des degrés divers la structure des domaines Igl mutés (Figure 32). Par ailleurs, les mutations FLNA p.P637Q et p.H743P ou p.V711D ne semblent pas avoir la même conséquence sur la structure de la protéine^{357,367}. En effet, alors que les mutations p.H743P et p.V711D localisées dans la région Igl-5 entraînent la perte totale de la conformation des Igl-4 et 5, la mutation p.P637Q située dans la région Igl-4, a une répercussion minimale sur la structure du domaine et donc sur la conformation de la protéine au repos. Néanmoins, la prédiction *in silico* de l'impact de la mutation FLNA-P637Q sur la dynamique moléculaire de la protéine, indique une sensibilité plus importante de la structure du domaine Igl-4 à la tension suggérant que le stress mécanique pourrait induire un changement conformationnel du domaine et modifier son interaction avec ses partenaires, notamment avec la protéine PTPN12³⁵⁷.

En plus de ces données moléculaires, l'implication de la FLNA dans la DVM a été documentée par des études sur des modèles animaux.

La Filamine-A est fortement exprimée au cours de l'embryogénèse cardiaque ³⁶⁸, majoritairement dans l'endocarde et dans le mésenchyme du canal atrioventriculaire et du tractus d'éjection à E9.5 chez la souris. Par la suite, la FLNA est trouvée dans les coussins endocardiques à l'origine de la formation des valves. Au stade E17.5, la FLNA est exprimée dans tous les feuillets valvulaires ³⁶⁸.

Un modèle de souris KO total pour la FLNA ²²⁷, induisant une malformation du tractus d'éjection, a permis de confirmer le rôle majeur de la FLNA dans le développement valvulaire mitral ²²⁷. Néanmoins, la létalité embryonnaire engendrée chez les mâles limitait l'utilisation de ce modèle pour étudier la physiopathologie du PVM ²²⁷. Ainsi, un KO conditionnel où la FLNA est spécifiquement absente des cellules endothéliales et des cellules qui en dérivent, notamment les CIVs, a permis d'asoir l'origine développementale de la DVM myxoïde observée chez les souris adultes ²²⁸. De plus, la voie sérotonine-Transglutaminase2-FLNA a été identifiée comme potentiel mécanisme régulateur de l'organisation de la MEC valvulaire. Pour finir, une augmentation de l'infiltration des cellules extracardiaques comme les cellules hématopoïétiques et une activation de la voie Erk ont été observées, permettant d'étendre les connaissances sur les mécanismes impliqués dans le PVM ²⁹⁶.

Encore peu de mécanismes ont été identifiés dans la physiopathologie du PVM, mais ces données sur le PVM lié à la FLNA mettent en avant des voies de signalisation concordantes avec celles décrites dans le PVM non syndromique, non lié à la FLNA. Ainsi, l'étude du PVM lié à la FLNA apparaît comme l'outil pertinent pour étendre les connaissances sur la physiopathologie du PVM. Pour cela, un modèle de rat KI a été généré en 2017 par la plateforme Nantaise TRIP : le rat KI FLNA-P637Q ⁵, mon modèle d'étude.

Chapitre 3 : Hypothèses et Objectifs

Associé à l'augmentation de l'espérance de vie, la prévalence de la dystrophie valvulaire mitrale, substrat du prolapsus valvulaire mitral, est en expansion. Cependant, la prise en charge du PVM, bien qu'efficace, présente de nombreuses limites. En effet, l'âge avancé des patients au moment de l'intervention de remplacement ou de réparation valvulaire est source de morbi-mortalité. Dans le but de proposer une meilleure prise en charge aux patients, ainsi qu'un potentiel traitement pharmacologique permettant de ralentir l'évolution de la maladie, l'étude des mécanismes physiopathologiques associés à la DVM est nécessaire.

Les améliorations techniques des outils d'analyse génétique ont permis l'identification de différents gènes dans le PVM (*FLNA*, *DZIP*, *DCHSI*, *TNSI*, *LMCDI*). La plupart de ces gènes codent des protéines impliquées dans la mécanotransduction, suggérant qu'il existe une voie physiopathologique commune dans le PVM : la réponse au stress mécanique. La causalité de la *FLNA* dans le PVM a été démontrée par mon équipe en 2007⁴. Les mutations identifiées sont spécifiquement localisées dans la partie N-terminale de la protéine. Elles engendrent uniquement des altérations valvulaires chez les patients alors que l'expression de la protéine est quasi ubiquitaire et que des mutations dans d'autres parties de la protéine causent des anomalies congénitales larges : hétérotopie périventriculaire, syndrome Melnick-Needles...³²⁶. Ainsi, l'hypothèse au centre de mon travail de thèse est que la mutation *FLNA*-P637Q perturbe la régulation de la réponse au stress mécanique que subit la valve, ce qui entraîne l'apparition et le développement de la valvulopathie mitrale.

Cependant, le manque de modèles animaux pertinents reproduisant la physiopathologie associée à la DVM limitait les études. Ainsi en 2017, le rat KI *FLNA*-P637Q a été généré⁵. Il exprime la mutation identifiée dans la famille vendéenne quelques années plus tôt par mon équipe et est mon modèle d'étude.

Dans un premier temps, l'objectif de ma thèse a donc été de valider la pertinence du modèle de rat pour l'étude de la DVM par une approche d'imagerie multimodale, avant de réaliser une analyse des voies de signalisation impliquées dans le développement de cette pathologie par RNA-sequencing. Le deuxième objectif a été d'étudier plus spécifiquement le rôle des cellules immunitaires et plus particulièrement des macrophages dans le développement de la pathologie.

Chapitre 4 : Papier 1 – Caractérisation phénotypique et moléculaire du modèle de rat KI FLNA-P637Q






4.1 Introduction

La caractérisation du modèle de rat KI FLNA-P637Q a fait l'objet d'une publication en 1^{er} auteur dans le journal *Cardiovascular Research* ³⁶⁹.

Dans ce papier, l'analyse du phénotype des animaux âgés de 3 semaines à 6 mois permet de valider la pertinence de ce modèle pour l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la DVM. L'étude transcriptomique a permis de mettre en évidence l'implication de différents mécanismes. En effet, le chimiotaxisme, la régulation de la matrice extracellulaire, la transition endothélio-mésenchymateuse ou encore le stress mécanique sont autant de voies de signalisation prenant part à la physiopathologie de la DVM.

4.2 Manuscrit : Multimodality imaging and transcriptomics to phenotype mitral valve dystrophy in a unique knock-in Filamin-A rat model

Multimodality imaging and transcriptomics to phenotype mitral valve dystrophy in a unique knock-in Filamin-Arat model

Constance Delwarde ¹, Claire Toquet¹, Pascal Aumond¹, Amir Hossein Kayvanjoo², Adrien Foucal¹, Benjamin Le Vely¹, Manon Baudic ¹, Benjamin Lauzier¹, Stéphanie Blandin³, Joëlle Véziers⁴, Perrine Paul-Gilloteaux ^{1,3}, Simon Lecointe¹, Estelle Baron¹, Ilaria Massai⁵, Paolo Poggio⁵, Séverine Rémy⁶, Ignacio Anegon⁶, Hervé Le Marec¹, Laurent Monassier⁷, Jean-Jacques Schott¹, Elvira Mass², Julien Barc ¹, Thierry Le Tourneau¹, Jean Merot^{1*}†, and Romain Capoulade ^{1*}†

¹Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France; ²Developmental Biology of the Immune System, Life & Medical Sciences (LIMES) Institute, University of Bonn, 53115 Bonn, Germany; ³Nantes Université, CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, Inserm UMS 016, CNRS UAR 3556, F-44000 Nantes, France; ⁴INSERM, UMR 1229, RMeS, CHU Nantes PHU4 OTONN, Nantes Univ, Nantes, France; ⁵Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano, Italy; ⁶INSERM UMR 1064-CR2TI, Transgenic Rats ImmunoPhenomic, Nantes, France; and ⁷Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie NeuroCardiovasculaire UR7296, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Received 23 May 2022; revised 29 June 2022; accepted 26 July 2022; online publish-ahead-of-print 24 August 2022

Aims

Degenerative mitral valve dystrophy (MVD) leading to mitral valve prolapse is the most frequent form of MV disease, and there is currently no pharmacological treatment available. The limited understanding of the pathophysiological mechanisms leading to MVD limits our ability to identify therapeutic targets. This study aimed to reveal the main pathophysiological pathways involved in MVD via the multimodality imaging and transcriptomic analysis of the new and unique knock-in (KI) rat model for the FilaminA-P637Q (FlnA-P637Q) mutation associated-MVD.

Methods and results

Wild-type (WT) and KI rats were evaluated morphologically, functionally, and histologically between 3-week-old and 3-to-6-month-old based on Doppler echocardiography, 3D micro-computed tomography (microCT), and standard histology. RNA-sequencing and Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC-seq) were performed on 3-week-old WT and KI mitral valves and valvular cells, respectively, to highlight the main signalling pathways associated with MVD. Echocardiographic exploration confirmed MV elongation (2.0 ± 0.1 mm vs. 1.8 ± 0.1 , $P = 0.001$), as well as MV thickening and prolapse in KI animals compared to WT at 3 weeks. 3D MV volume quantified by microCT was significantly increased in KI animals (+58% vs. WT, $P = 0.02$). Histological analyses revealed a myxomatous remodelling in KI MV characterized by proteoglycans accumulation. A persistent phenotype was observed in adult KI rats. Signalling pathways related to extracellular matrix homeostasis, response to molecular stress, epithelial cell migration, endothelial to mesenchymal transition, chemotaxis and immune cell migration, were identified based on RNA-seq analysis. ATAC-seq analysis points to the critical role of transforming growth factor- β and inflammation in the disease.

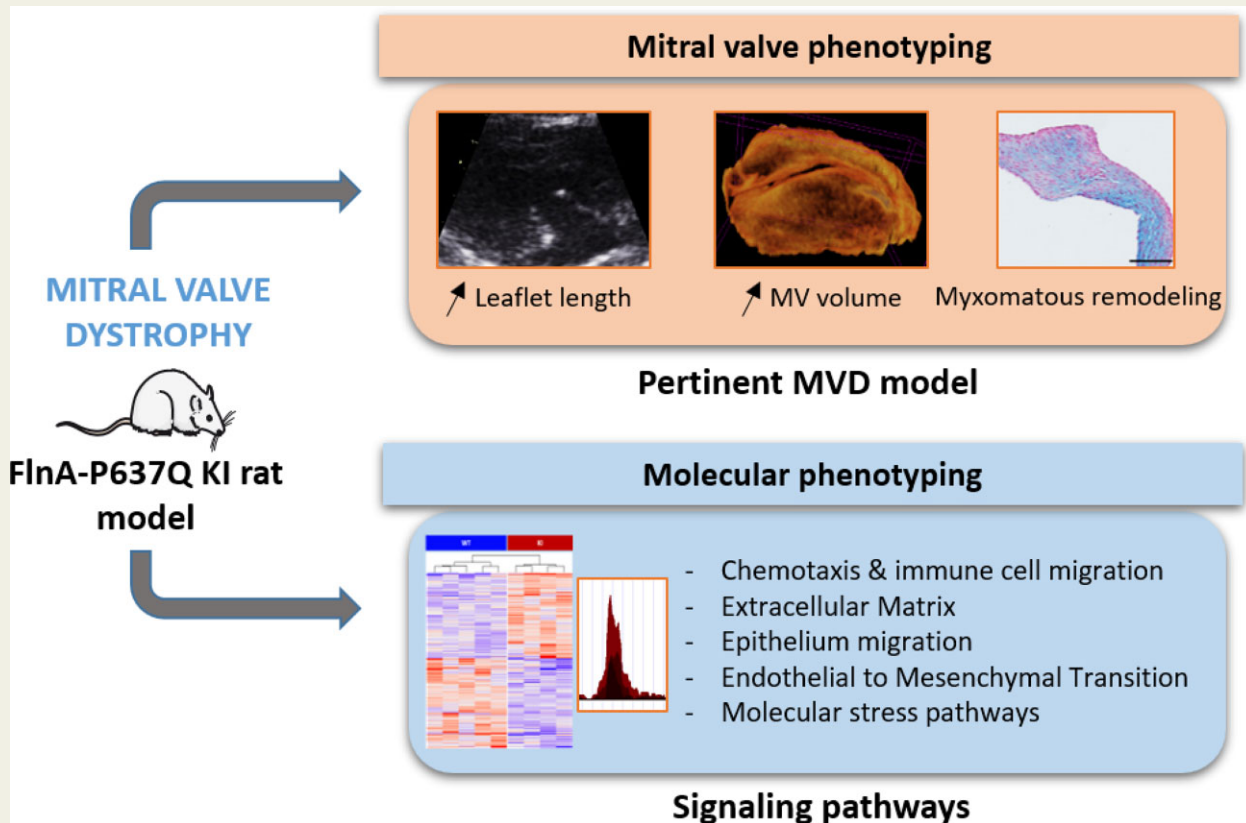
Conclusion

The KI FlnA-P637Q rat model mimics human myxomatous MVD, offering a unique opportunity to decipher pathophysiological mechanisms related to this disease. Extracellular matrix organization, epithelial cell migration, response to mechanical stress, and a central contribution of immune cells are highlighted as the main signalling pathways leading to myxomatous MVD. Our findings pave the road to decipher underlying molecular mechanisms and the specific role of distinct cell populations in this context.

* Corresponding authors. E-mails: romain.capoulade@univ-nantes.fr (R.C.); jean.merot@univ-nantes.fr (J.M.)

† The last two authors contributed equally to the study.

Graphical Abstract

**Keywords**

Mitral valve dystrophy • Filamin A • RNA-seq • ATAC-seq • Multimodal imaging

1. Introduction

Mitral valve (MV) pathologies are a major cause of cardiovascular morbidity and mortality worldwide.¹ Structural MV alterations lead to the development of MV prolapse (MVP), the most frequent form of degenerative MV disease affecting 2 to 3% of the population. MVP is characterized by an excessive systolic displacement of the MV leaflets into the atrium associated with an alteration of the layered architecture of the leaflets, including collagen fibres fragmentation and accumulation of extracellular proteoglycans content. Limited by the knowledge of the pathophysiological mechanisms involved in the development and progression of the disease, no pharmacological treatment is currently available to treat MVP, and patients presenting the most severe and symptomatic forms are referred to surgery.²

For years, researchers thought that MVP mainly involved a degenerative process linked to aging and a ‘wear and tear’ phenomenon related to the complex mechanical environment, including pulsatile flow, cyclic pressure, bending, and tensile stresses under which MV operates. In the last decade, familial and population genetic screenings have changed this paradigm by identifying genes related to either MVP or myxomatous MV dystrophy (MVD). Our team uncovered the first causal gene associated with MVD by identifying the P637Q mutation in the *FLNA* gene segregating in a large MVD family.^{3,4} *FLNA* gene is located in the X-chromosome and encodes for filamin A (FlnA), an actin cytoskeleton binding protein. Then, the *DCHS1*

gene encoding a member of the cadherin superfamily and the cilia gene *DZIP1* were identified.^{5,6} Furthermore, additional genetic loci, such as the *TNS1* gene encoding the focal adhesion protein Tensin1, were also associated with MVD.⁷⁻⁹ Interestingly, all these genes highlight a common pathway related to mechanosensing and stress responses as the main pathophysiological mechanisms involved in the development of MVD/MVP.¹⁰ Thus, studying molecular processes that regulate mechanotransduction arises as the most promising way to determine the underlying processes leading to MVD and opens new avenues to identify potential therapeutic targets. However, there is still a persisting gap linking these genetic mutations to specific and targetable molecular mechanisms.

Our recent works focusing on FlnA-related MVD families revealed a concordant MV phenotype, including classical features of Barlow disease such as the presence of a myxomatous remodelling of the valve with thickened and elongated leaflets, associated with a unique phenotype of restrictive leaflet motion in diastole.¹¹ At the molecular level, FlnA protein is involved in the response to mechanical stress, interacts with more than a hundred proteins and, thus, plays a role in mechanotransduction, migration, proliferation, morphology, and cell adhesion pathways.¹²⁻¹⁵ Using conditional *Flna* knock-out (KO) mice developing MVD, we firstly highlighted an interplay between serotonin, transglutaminase 2 and FlnA that regulates the embryonic valve development, as well as an activation of Erk signalling in these processes leading to MVD.^{16,17} We also showed *in vitro* that *FLNA*-MVD mutations alter the interaction of FlnA with

small-GTPase proteins (i.e. RhoA/Rac1 unbalance) and a tyrosine-protein phosphatase (i.e. PTPN12), modifying the F-actin network and, therefore, the stress response.^{18,19} We have recently confirmed these results *in silico*.^{18–20} Together these findings suggest that MVD-associated FlnA mutations are loss of function mutations. However, they remain limited by the lack of representative models with endogenous expression of mutated proteins. To overpass these limitations, we generated a unique rat model knock-in (KI) for the FlnA-P637Q mutation.²¹

The current study aimed to phenotype our novel KI rat model developing MVD and, thereby, constituting a valuable model to decipher the MVD-associated pathophysiological pathways. We established the relevance of our model that closely mimicked the disease observed in patients and performed a transcriptomic analysis. We revealed the involved signalling pathways, such as extracellular matrix (ECM) organization, epithelial cell migration, and molecular stress, as hypothesized based on our previous works. Additionally, we identified a central contribution of immune cells in the pathological process leading to MVD.

2. Methods

Detailed procedures and protocols are provided in the [Supplementary material online](#).

2.1 Rats

Sprague-Dawley FlnA-P637Q KI rats were engineered using Crispr/Cas9 methods and founders were characterized at the Transgenic Rats and ImmunoPhenomic (TRIP) facility in Nantes (France).^{21,22} All the analyses between KI and wild-type (WT) were performed on littermates.

Rats were anaesthetized with isoflurane (1000 mg/g, Iso-Vet 100%, Piramal; induction at 4% and maintain at 2%). Rats were euthanized by cervical dislocation under isoflurane anaesthesia or by pentobarbital injection (EUTHASOL® VET 400 mg/mL, Dechra, 0.5 mL/kg adjusted as needed, i.p.).

2.2 MV phenotyping

Multimodal and complementary imaging approaches were used to phenotype the MV of 3-week-old and 3-to-6-month-old rats. 2D Doppler-echocardiography was used to assess MV morphology and function, micro-computed tomography (microCT) provided a 3D quantification of the MV volume, and standard histological stainings the composition and remodelling of the leaflets' ECM. Anterior and posterior MV leaflets were also separately analyzed.

2.3 RNA-sequencing data generation and bioinformatic analysis

5 WT and 5 KI MV leaflets (i.e. anterior + posterior) from 3-week-old rats were harvested for RNA-seq analysis. After RNA extraction (Qiagen miRNeasy micro kit) and quantification, the library was generated *via* SmartSeq 2 (SS2). For statistical analysis, the raw read counts were imported into DESeq2 (v. 1.30.1) using R (v. 4.0.4).²³ To identify the differentially expressed genes (DEGs) of particular interest to the development of MVD, we selected genes with a *P*-value < 0.05 and Fold Change (FC) > 1.2 or FC < 0.8. Enrichment analysis was done on these genes using clusterProfiler package (v. 4.0.0).²⁴ Significant GO-terms (*P* < 0.05) parts of similar pathways were grouped under 3 metaclusters (MCs) (i.e. hypothesis-free analysis). We finally designed specific MCs that encompass pathways described in the literature as involved in the MVD (i.e. hypothesis-driven analysis).

2.4 qPCR data generation to assess anterior vs. posterior MV leaflet transcriptomics

RNA extraction was performed separately on anterior and posterior MV leaflets from 12 WT and 12 KI 3-week-old rats using the miRNeasy mini kit (Qiagen). Reverse transcription was done using the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystem). The qPCR reaction was performed using the Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems), targeting *Gapdh*, *Has1*, *Esm1*, *Cspg4*, and *Ccl7* genes (see [Supplementary material online, Table S1](#)). A comparison of relative expression was conducted between genotypes, and leaflets (i.e. anterior vs. posterior).

2.5 Assay for transposase-accessible chromatin-sequencing and computing analysis

We performed an open chromatin assay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-seq) to detect differences in active profile in chromatin between three samples (50 000 cells/samples; pool of MV from 8 animals/sample) of 3-week-old WT and KI rats. Differentially opened regions between the KI and WT conditions were selected based on a log₂ FC of 1 and False Discovery Rate (FDR) of 10% using edgeR quantile-adjusted conditional maximum likelihood (qCML) analysis.²⁵ Motif enrichment analysis was performed using MEME-Chip, using all called peaks between conditions as a background.

2.6 Statistical analysis

Data are expressed as means ± standard deviation (SD) or median (IQR), as appropriate. Images presented throughout the manuscript are representative of analyzed samples for each genotype. Non-parametric Mann–Whitney test or Wilcoxon test were used as appropriate.

Data were analyzed using GraphPrism software, v8. A *P*-value < 0.05 was considered significant.

2.7 Study approval

All rat experiments were carried out following European Union Directive 2010/63/EU about the protection of animals used for scientific purposes and were authorized by the French Ministry of Higher Education and Research after approval by the Ethics Committee on Animal Experimentation from the Région Pays de la Loire (approval numbers: APAFIS 6687 & 33433).

Animals were housed in a controlled environment (under a 12 h light/dark cycle with ad libitum access to food and water) in the specific pathogen-free animal facilities at the Unité Thérapeutique Expérimentale in Nantes (France), an animal care facility endorsed by French Ministry.

3. Results

3.1 Transgenic KI FlnA-P637Q rat model: breeding and anthropometric data

The proportion of genotypes of male and female rats coming from either heterozygous ♀^{+/-} × KI ♂^{-/-} (*n* = 59 matings) or heterozygous ♀^{+/-} × WT ♂^{+/+} (*n* = 45 matings) crossings follow a Mendelian genetic scheme according to *FLNA* gene location on the X chromosome (see

Supplementary material online, Figure S1A). The anthropometric data at the weaning (3-week-old) were recorded in male WT ($n=5-6$) and KI rats ($n=11-12$): body weight and tibial length were similar in both genotypes (see Supplementary material online, Figure S1B and S1C). No difference in terms of anthropometric data was also observed between WT and KI in females and in adult rats from 3-to-6-month old (all $P > 0.05$).

3.2 MV phenotype in the 3-week-old KI rats

Based on the morphological and functional echocardiographic evaluation of the MV apparatus, blinded for genotype, the genotype/phenotype correlation turned out to be fully concordant: all animals classified with MVD were KI. Although MV regurgitation was not detected in these 3-week-old rats, the restrictive leaflet motion in diastole specifically reported in FlnA families, as well as leaflet prolapse, were observed in KI rats (Figure 1A and 1B). Moreover, KI rats had a longer anterior MV leaflet compared to WT (2.0 ± 0.1 vs. 1.8 ± 0.1 mm, $P = 0.001$; Figure 1C), and a trend for larger annulus diameter in KI animals (2.3 ± 0.17 vs. 2.1 ± 0.12 mm; $P = 0.06$; Figure 1D). Overall, Doppler-echocardiographic examinations of the MV apparatus, that were performed on the same hemodynamic environment (i.e. equivalent heart rate in KI vs. WT animal; Figure 1E), support the presence of a MV dystrophy in the transgenic rat model mimicking the phenotype observed in FLNA mutated patients. The indices of LV morphology and function were similar in KI and WT 3-week-old rats (see Supplementary material online, Table S2).

To overpass the potential bias related to the 2D assessment of a 3D structure such as the MV and the heterogeneous expression of the MV dystrophy over each leaflet, we developed an innovative approach based on microCT to quantify the volume of each MV leaflets. Following manual segmentation and semi-automated thresholding, we showed that KI rats had significantly higher MV volume than WT littermates (+58%; $P = 0.02$; Figure 2G). Noteworthy, there was no difference between the increase of anterior vs. posterior MV leaflet volume in KI rats (+66 vs. +71%, respectively; $P > 0.90$; Supplementary material online, Figure S2). These data confirm the presence of a dystrophic MV, affecting both leaflets, in transgenic rats and highlight the heterogeneous nature of the remodelling along the leaflets, mostly observed in the distal sections (Figure 2H).

We performed a qualitative and quantitative analysis of the macroscopic and microscopic features of MV from KI ($n=10$) and WT ($n=5$) animals (Figure 3). Macroscopically, anterior and posterior MV leaflets from WT rats were translucent as compared to KI rats, in which MV tissue appeared white and opaque (Figure 3A). Of note, the subvalvular apparatus was significantly remodelled with fewer but thicker chordae tendinae in KI animals compared to WT (15 ± 4 vs. 24 ± 4 ; $P < 0.0001$; Figure 3A). Histological analysis of the anterior and posterior MV leaflets of 3-week-old WT rats showed thin and well-organized leaflets: the fibrosa layer was continuous all along the leaflet, displaying a dense collagen strip (Figure 3B, D, H, and L). According to the light alcian blue staining, the ECM was poorly charged with mucopolysaccharides (Figure 3C–J). Overall, the leaflets were mostly covered by flat endothelial cells (Figure 3H) and exhibited minimal free edge enlargement (Figure 3B). As opposed, KI animals presented thickened and mucopolysaccharides-rich MVs, supporting the myxomatous remodelling of their ECM (Figure 3E, F, G, I, K, and M). No sign of calcification was detected in either WT or KI animal MV (negative Alizarin Red staining; data not shown).

Histological abnormalities were observed in 9 out of 10 KI rats. Among these 9 rats, 6 (66%) had both leaflets affected, 1 had only the anterior leaflet affected while the 2 others exhibited remodelled posterior leaflet only. In 50% of the KI rats, thickening and diffuse disorganization were mostly observed in the distal two-thirds of the leaflets (Figure 3E–G), whereas heterogeneous remodelling was observed in the other half of the KI rats. Only 2 KI rats exhibited a well-defined and collagen-rich fibrosa layer. Compared to the WT, KI MVs appeared immature and displayed mucopolysaccharides enrichment (hyaluronan, glycosaminoglycan) (Figure 3F, K) with very little collagens (Figure 3G, M). Noteworthy, in most of the cases, KI leaflets presented swollen endothelial cells compared to WT (Figure 3I). In addition, two cases presented a focal remodelling (see Supplementary material online, Figure S3).

We developed a histological-related image processing approach to quantify MV remodelling. This analysis confirmed the global thickening of both the anterior and posterior MV leaflets (MV thickness: +53%; $P = 0.002$) coupled with enrichment of mucopolysaccharides (Alcian Blue signal: +217%; $P = 0.027$) in KI animals compared to WT. Furthermore, the quantitative analysis highlighted the regionalized nature of the remodelling along the leaflets. We quantified a 4-fold and 2-fold increase of their thickness in the second and last thirds of the leaflets ($P = 0.002$ and $P = 0.049$, respectively; Figure 3N) whereas the content in mucopolysaccharides was persistently increased in KI MVs by 4-fold in these distal sections ($P = 0.037$ and $P = 0.027$, respectively; Figure 3O).

Importantly, homozygous 3-week-old female KI rats exhibited myxomatous MV dystrophy with similar features as those observed and quantified in males (see Supplementary material online, Figure S4A and B).

Overall, all these phenotypic data, from the functional to the macroscopic tissue analysis, confirmed that the KI rat model for the FlnA-P637Q mutation exhibits a myxomatous MV dystrophy, as early as 3-week-old, and is thus a pertinent model opening new avenues to study pathophysiological mechanisms related to MVD.

3.3 Evolution of MVD in adult KI rats

To analyze the evolution of MVD with aging, quantitative echocardiographic, microCT and histological analyses were performed on 3-to-6-month-old rats. These studies revealed that the increase of the anterior leaflet length and width measured by echocardiography, as well as the increase in MV volume (microCT), were retained in KI adult rats as compared to WT littermates (all $P < 0.05$; Supplementary material online, Figure S5A–C). As opposed to the WT adult rats where MV regurgitation was never recorded, we observed minimal MV regurgitation in KI animals (i.e. \leq mild regurgitation) that did not yet determine myocardial remodelling or dysfunction (see Supplementary material online, Table S2).

Histological analysis at later stages confirmed the presence of a myxomatous MV remodelling in adult KI rats with similar features, in both anterior and posterior leaflets, as observed in 3-week-old animals (see Supplementary material online, Figure S5D).

These data on the evolution of the MV dystrophy in adult KI rats emphasized the persistence of the phenotype and then strengthen the pertinence of the FlnA-P637Q KI rat model to decipher pathophysiological mechanisms leading to this frequent human disease.

3.4 Molecular phenotyping to identify the signalling pathways related to MVD

To determine the pathogenic mechanisms that contribute to the MV remodelling in the 3-week-old KI rats, the transcriptome of pooled

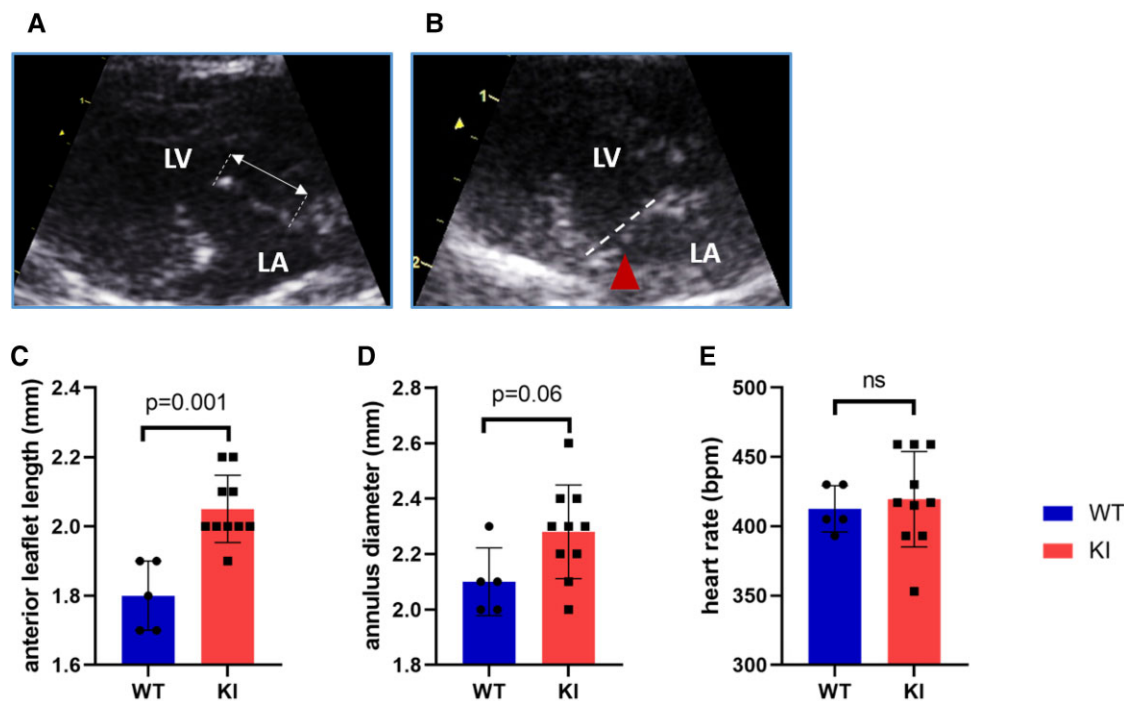


Figure 1 Echocardiographic assessment of the mitral valve in 3-week-old KI FlnA-P637Q rats. Mitral valve apparatus has been assessed by qualitative and quantitative approaches in 3-week-old WT and KI rats. (A) Shows the anterior MV leaflet in the open position: we observed a restrictive motion of the leaflet in diastole and measured the leaflet's length (double-headed arrow). (B) Shows anterior and posterior MV leaflets in the closed position, where MV prolapse is visualized (dash line: annulus plan; arrow head: prolapse of the posterior leaflet). Anterior leaflet length (C), annulus diameter (D), and heart rate (E) were compared between KI and WT rats. All the analyses (C–E) were performed on 5 WT and 10 KI littermate rats (all as biological replicates). *P*-values are from the Mann–Whitney test. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). LA, left atrium; LV, left ventricle; ns, not significant.

anterior plus posterior MV leaflets has been analyzed by RNA-sequencing. After quality control, 4 KI and 5 WT samples were compared.

15 102 gene transcripts were identified and aligned. RNA-seq analysis of the 524 gene transcripts differentially expressed between WT and KI animals ($P < 0.05$) revealed that they clearly segregate in up ($FC > 1.2$) and down-regulated ($FC < 0.8$) gene clusters (257 and 268 transcripts, respectively) (Figure 4A).

The enrichment of these DEGs in GO-terms and GO-terms MCs created on both hypothesis-free (MC1–3) and hypothesis-driven analyses (MC4, 5) are presented in Figure 4B. The GO-term analysis identified one major pathway related to chemotaxis and immune cell migration that encompassed 30% of the significant GO-terms (10/34 GO-terms): the first MC (MC1), called 'chemotaxis and immune cell migration', was built accordingly. The two most significant GO-terms in the MC1 were 'cell chemotaxis' and 'leukocyte migration' (GO:0060326, $P = 2.31 \times 10^{-5}$ and GO:0050900, $P = 3.77 \times 10^{-8}$, respectively). Upregulated genes from MC1 included chemokines *Cd28*, *Cd17*, pro-inflammatory proteins *S100a8* and *S100a9*, *Il16*, *Itgax*, *Itga9*, or endothelial cell adhesion molecule *Madcam1* (all $P < 0.05$; Table 1). The second family of significant GO-terms was related to the ECM and grouped under the MC2, 'ECM'. The most significant GO term in the MC2 was 'ECM organization' (GO:0030198, $P = 9.85 \times 10^{-6}$). Genes coding for metalloproteinases (*Mmp12*, *Mmp17*, *Adamts7*) and hyaluronic acid synthase (*Has1*) were upregulated in the KI condition compared to WT (Table 1). The GO-term 'epithelial cell migration'

(GO:0010631, $P = 1.47 \times 10^{-5}$) was found in this unbiased analysis together with the 'epithelium migration' GO-term, two GO-terms used to create the MC3 'epithelial cell migration'. Genes such as *Klf4*, and *Hbegf* were upregulated in KI compared to WT animals (Table 1).

Because endothelial to mesenchymal transition (EMT) has been described in the literature as a potential contributor to the development of MVD,^{10,26} we built the MC4 related to 'endothelial to mesenchymal transition'. In this hypothesis-driven analysis, KI and WT samples consistently clustered, and the association was driven by genes such as *Wnt2* and *Tmem100* (Table 1). Similarly, to test the implication of molecular stress pathways, we built the MC5 comprising mechanotransduction-related GO-terms: genes such as *Bmp7*, proteoglycan *Cspg4*, secreted glycoprotein *Slit2*, the mediator of transforming growth factor (TGF)- β transduction *Smad4*, BMP-antagonist *Grem1* were found upregulated in this second hypothesis-driven analysis (Figure 4B; Table 1).

The sensitivity analysis confirmed the involvement of these pathways, grouped under MCs, in the development of MVD (see Supplementary material online, Figure S6). The complete list of genes in each MC is included in Table S3 (Supplementary material online).

qPCR experiments confirmed the upregulated expression of key genes in KI compared to WT MV (i.e. *Has1*, *Esm1*, *Cspg4*, and *Ccl7*; see Supplementary material online, Figure S7). Furthermore and concordant with the comparable phenotypic remodelling observed in the anterior and posterior MV leaflets, similar increases in the expression

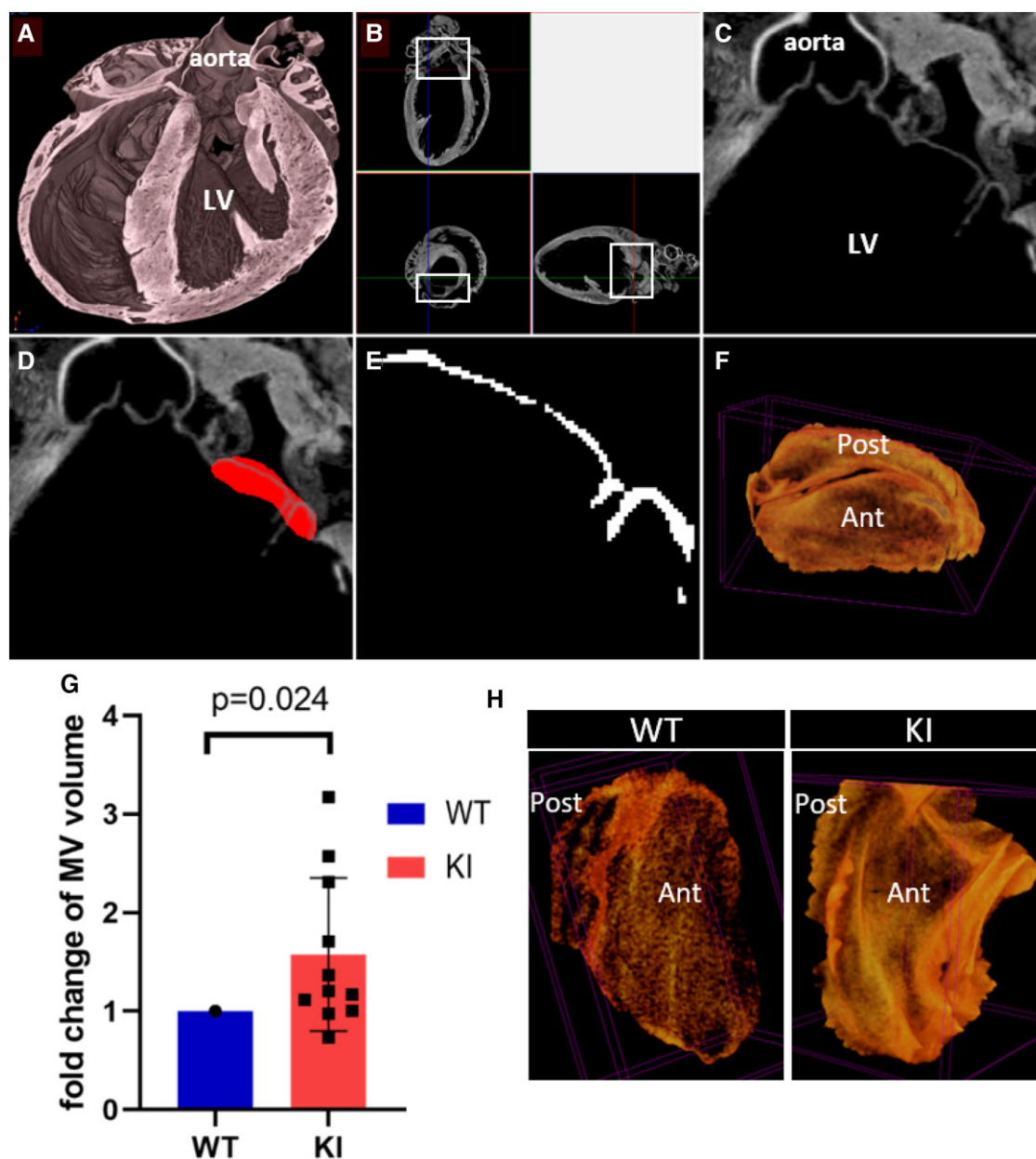


Figure 2 3D mitral valve volume assessed by micro-computed tomography. (A–F) Describe the protocol for MV volume quantification. (A) shows the reconstructed full heart. Three-plan full heart views were used to crop the region of interest containing the mitral valve (B). (C) Shows the cropped 2D view from (B) focused on the mitral valve. Manual segmentation of the mitral valve on 2D images is presented in (D). Otsu three-level thresholding method is applied to the valve (E) allowing us to get a 3D reconstructed volume of the valve (atrial view, F). (G) Represents the increase in microCT-derived MV volume defined as the fold-change between KI and WT littermate animals; these fold-changes were calculated for 11 KI animals (all as biological replicates). The ventricular view of the representative 3D reconstruction of MV from WT and KI rats is presented in (H). *P*-value is from the Wilcoxon test. Error bar represents the standard error of the mean (SEM). Ant, anterior leaflet; Post, posterior leaflet.

levels of these genes were detected in both leaflets (see [Supplementary material online, Figure S7](#)).

3.5 Regulome remodelling in MVD

Next, using ATAC-seq, we analyzed the differential chromatin opening between MV cells from KI and WT rats to uncover key transcription factors (TFs) driving MVD and potentially those that account for the differential gene expression patterns we highlighted. After quality control, 2 KI

and 2 WT samples were analyzed. 373 differently opened regions were identified between KI and WT conditions. Gene proxy annotation of these 373 regions highlighted an enrichment for the ‘Wnt signalling’ (Wikipathway 2021) and the ‘actin binding’ (GO molecular function) pathways, that were not statistically significant after adjustment (data not shown).

Whole genome foot-printing analysis revealed a differential TF binding dynamic for 21 TFs on the chromatin of KI and WT cells. As illustrated on the

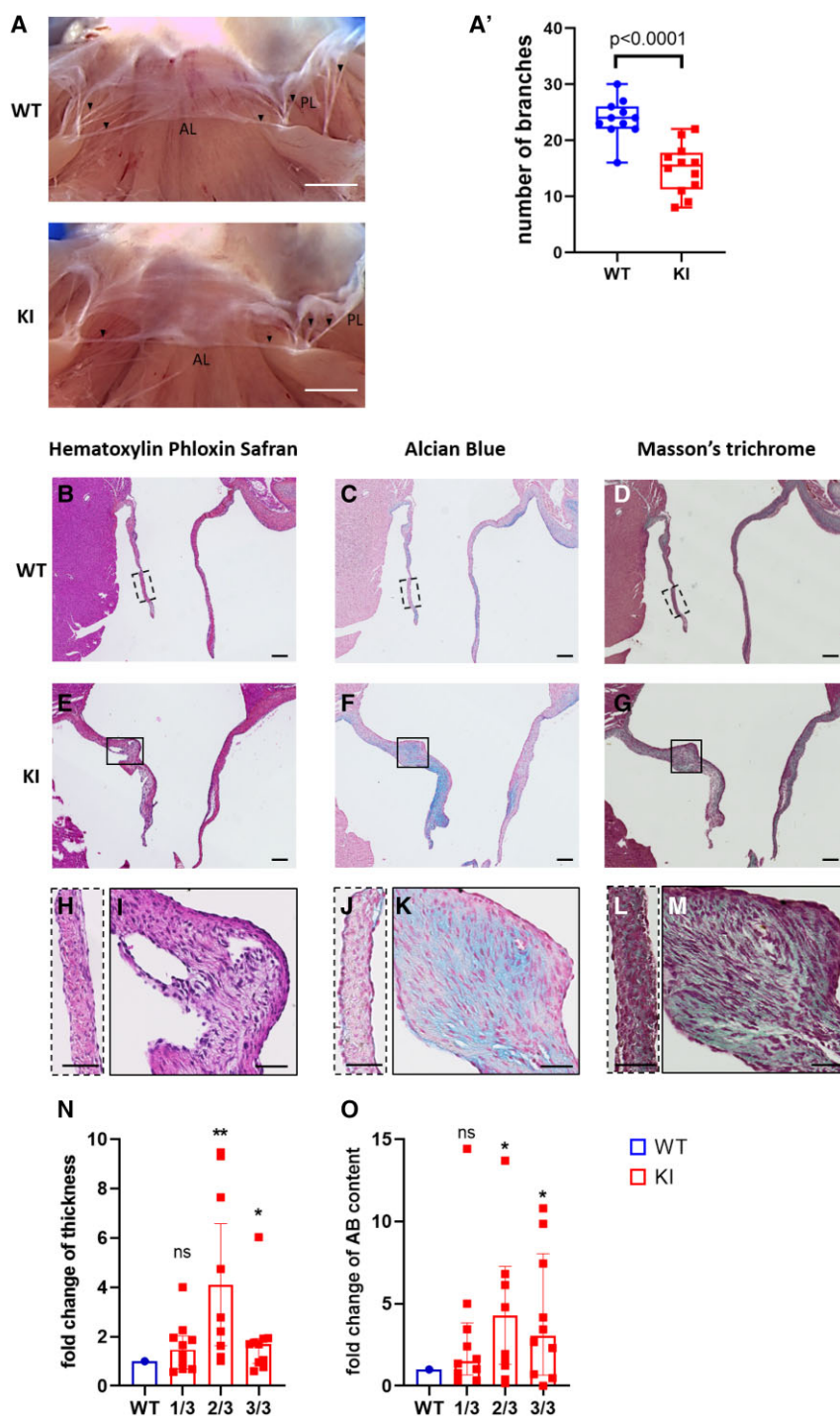


Figure 3 Macroscopic remodelling and histological evaluation of WT and KI mitral valves. (A) Presents captions of the macroscopic aspect of the MV, highlighting the thickened (opaque) areas on the KI anterior and posterior leaflets. Note the thickened and less branched nature of the MV chordae (arrowheads) in KI rats. (A') Refers to the number of branches of chordae tendinae in KI animals compared to WT ($n = 11$ WT vs. $n = 12$ KI). Standard Haematoxylin Phloxin Eosin (B, E, H, I), Alcian Blue (C, F, J, K) and Masson's trichrome (D, G, L, M) histological stainings performed in consecutive slides on the MV of WT (B–D and H, J, L) and KI (E–G and I, K, M) rats. (H–M) Are area magnifications of the posterior leaflets. WT rats presented thin leaflets (B, H) with very few proteoglycans (C, J) and dense collagen strips (D, L). KI rats presented an accumulation of proteoglycans (F, K) and disrupted collagen (G, M). These images are representatives of the cohort of 5 WT and 10 KI rats (all as biological replicates). (N and O) Present the quantitative analysis of the thickness and the alcian blue signal respectively, for each third of the leaflet (i.e. normalized by the length of the leaflet) and presented as a fold change for each KI vs. its WT littermate ($n = 5$ WT and $n = 10$ KI). Scale bars = 2 mm for (A and A'). Scale bars = 250 μ m for (B–G). Scale bars = 50 μ m for (H–M). *: $P < 0.05$ from WT. AB, alcian blue; AL, anterior leaflet; PL, posterior leaflet; ns, non-significant P -value from WT. P -values are from the Wilcoxon test or Mann–Whitney test, as appropriate. Error bar represents the standard error of the mean (SEM).

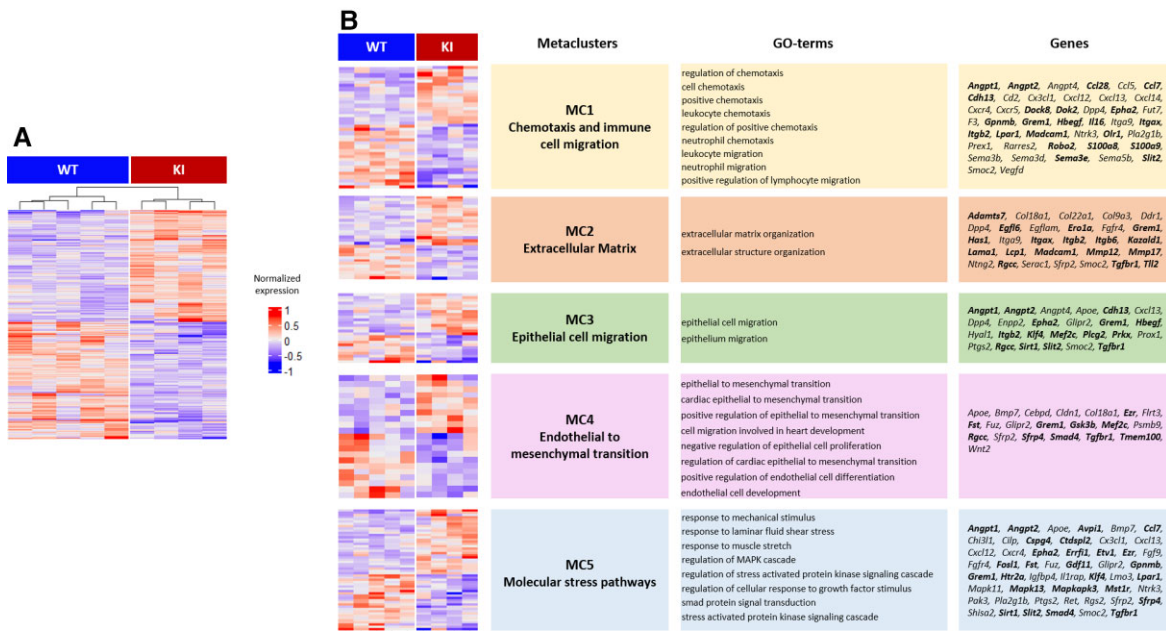


Figure 4 Molecular phenotyping for the identification of signalling pathways related to MVD. Transcriptomic analysis of WT vs. KI mitral valves. (A) Represents a heatmap of the 524 differentially expressed genes (i.e. as defined by $P < 0.05$ and $FC > 1.2$ or $FC < 0.8$) highlighting genotype clusterization. (B) Shows the metaclusters analysis. Heatmaps on the left present normalized expression values for individual genes according to biological conditions on a normalized scale (from -1 to 1). The 5 metaclusters (MC1–5) were created based on the biological process of a GO enrichment analysis. Metaclusters represent groups of genes associated with similar biological functions and corresponding GO-terms are listed in the second column. All the differentially expressed genes for each metacluster are listed on the right (upregulated genes are in bold). The analysis was performed on 5 WT and 4 KI mitral valves (all as biological replicates).

volcano plot and the aggregated imprint of FOSL1 and JUND in Figure 5A, 17 TFs exhibited higher chromatin binding signal in KI valvular cells compared to WT (BACH1, BACH2, BATF, ETV6, FOSB, FOS, FOSL1, FOSL2, JDP2, JUN, JUNB, JUND, MAF, MAFK, NFE2, NFE2L2 and SPI1). On the other hand, E2F4, HINFP, NRF1, TFDP1 revealed lower binding dynamics in KI cells' chromatin (Figure 5A and see Supplementary material online, Table S3). Enrichment analyses for these TFs with differential binding imprint, using the Panther and Wikipathway databases, pointed to the TGF- β signalling pathway (adjusted P -value: 3×10^{-5} and 6.5×10^{-9} , respectively; Figure 5B), known to be involved in MVD development. Additionally, the significant association for inflammation and interleukin pathways in Panther (adjusted P -value: 7.2×10^{-3} and 1×10^{-2} respectively) and haematopoietic stem cell differentiation pathways in Wikipathway (adjusted P -value: 7.6×10^{-6}) are in line with molecular mechanisms and signalling pathways highlighted by our RNA-seq analysis as involved in the development of MVD.

Interestingly, differential chromatin opening was observed in the loci of DEGs identified in RNA-seq analysis. As illustrated in Figure 5C, *Cspg4* and *Cilp* exhibit differentially opened binding site for the TF ETV6 in KI compared to WT. A differentially open binding site for FOSL2 in *Wnt2* gene locus was also identified. *Cep83* gene also exhibited differential chromatin opening (Figure 5C).

4. Discussion

This study reports the first rat animal model of myxomatous MVD observed in MVP patients; the FlnA-P637Q KI rat. The molecular analyses performed on the MV validate stated hypotheses and open new ones regarding pathophysiological mechanisms involved in the disease.

Indeed, we confirm that ECM regulation and mechanotransduction play a central role in the process leading to MVD. Our findings also pointed out the activation of EMT and epithelial cell migration in the disease and the central role of immune cells in MVD.

4.1 The FlnA-P637Q KI rat as a new and unique model to study MVD

Relevant animal models are essential to unravel the pathophysiological mechanisms leading to complex diseases, such as MVD. Although small-breed dogs and rodent-based KO animal models offer important benefits to decipher the molecular mechanisms leading to MVD, considerable limitations restrain their usefulness.^{16,17,27,28}

To overpass these limitations and improve our ability to image the MV, we have created the FlnA-P637Q KI rat, a model which also appears to better mimic several human diseases than mouse model.²⁹ Our findings show that the FlnA-P637Q rat develops MVD with a myxomatous feature by 3 weeks of age. Interestingly, the phenotypic data we reported are consistent with clinical data described by our team in patients with FlnA-MVP mutations.¹¹ Indeed, we observed an elongation and thickening of MV leaflets with the presence of a billowing/prolapse. Furthermore, rat MV leaflets also exhibited the typical restrictive motion in diastole as well as some dystrophic features on the subvalvular apparatus. Thanks to the development of a new and innovative microCT approach we quantified a 58% increase in FlnA-P637Q MV leaflets volume compared to controls which is in agreement with the 53% increased thickness quantified by histological analysis of the 3-week-old KI animals. Noteworthy, both anterior and posterior MV leaflets, in males and

Table 1 Relevant differentially expressed genes from metaclusters transcriptomic analysis

Gene	FC	P-value
Chemotaxis and immune cell migration		
<i>Ccl28</i>	1.53	0.047
<i>Ccl7</i>	2.95	4.76E-07
<i>Il16</i>	1.25	2.81E-03
<i>Itgax</i>	1.73	0.010
<i>Itga9</i>	0.78	0.023
<i>Madcam1</i>	5.70	0.039
<i>S100a8</i>	8.40	5.12E-03
<i>S100a9</i>	2.67	0.015
Extracellular matrix		
<i>Adams7</i>	1.22	9.69E-03
<i>Has1</i>	3.04	3.37E-09
<i>Mmp12</i>	2.44	6.38E-07
<i>Mmp17</i>	1.68	0.013
Epithelial cell migration		
<i>Hbegf</i>	1.48	0.013
<i>Hyal1</i>	0.70	0.020
<i>Klf4</i>	1.31	1.62E-03
Endothelial to mesenchymal transition		
<i>Mef2c</i>	1.34	4.92E-03
<i>Tmem100</i>	1.39	1.17E-03
<i>Wnt2</i>	0.71	0.023
Molecular stress pathways		
<i>Bmp7</i>	0.69	0.035
<i>Cspg4</i>	1.27	3.72E-03
<i>Fosl1</i>	3.40	1.79E-04
<i>Grem1</i>	2.87	3.41E-03
<i>Htr2a</i>	2.17	9.65E-03
<i>Jund</i>	0.85	0.055
<i>Robo2</i>	1.75	6.04E-04
<i>Slit2</i>	1.24	0.015
<i>Smad4</i>	1.25	0.036
<i>Smoc2</i>	0.37	0.026
<i>Tgfb1</i>	1.21	0.038
<i>Tll2</i>	10.36	0.019
<i>Vegfd</i>	0.70	0.035

Fold change (FC) and P-value of each differentially expressed gene presented in the metacluster analysis.

females, were remodelled and displayed similar regionalized ECM disorganization with an accumulation of proteoglycans in their distal two-thirds.^{30,31} In adult rats, valve dystrophy persisted and presented similar structural remodelling as observed in juvenile rats and human MVD. At this later stage, we also reported the presence of mild regurgitation in KI animals (i.e. regurgitation without significant hemodynamic consequence for the heart) that did not translate to LV remodelling and function impairment. Nonetheless, we reported significant alterations of the subvalvular apparatus, with thicker chordae and less chordae branching, that in turn could lead to the modification of applied forces on the MV and thus modulate the underlying pathophysiological mechanisms leading to MVD. Indeed, recent evidences pointed out the remarkable ability of the MV to adapt to the changes in mechanical and

hemodynamic conditions, especially in the context of ischaemic MV disease related to LV remodelling.^{32,33}

In the present model, MV thickening and elongation could not be related to LV dilatation nor papillary muscle displacement. These data emphasize the recognized evolutive nature of MVD and suggest LV remodelling is not yet engaged at this adult stage. Future studies are needed to clarify this point and investigate the evolution and consequences of the morphologically and functionally impaired MV on older and/or hemodynamically challenged animals, which would be concordant with the increased incidence of significant MVD/MVP with aging in human.¹

Together, our observations validated the relevance of the FlnA-P637Q KI rat to model MVD and to study the pathophysiological mechanisms leading to the disease.

4.2 ECM, molecular stress pathways, epithelial cell migration, EMT and chemotaxis and immune cell recruitment are associated with MVD

Despite the high frequency of MVD, there is still a lack of knowledge concerning the mechanisms associated with the disease. Consistent with genetic findings on MVD, we identified ECM homeostasis (i.e. MC2 'ECM'), response to mechanical stress (i.e. MC5 'Molecular stress pathways'), and Wnt and TGF- β molecular signatures in FlnA-MVD rats.⁴⁻⁸ These findings are concordant with the observed myxomatous ECM remodelling in the KI MVs and the well-recognized role of FlnA as a scaffolding network protein, a sensor and a regulator of cellular response to mechanical stress.¹²

Accordingly, in KI MV, we specifically detected the upregulation of a key enzyme involved in glycosaminoglycans production; the hyaluronan synthase 1 (*Has1*). In addition, the increased expression of metalloproteinases (*Mmp12*, *Mmp17*, *Adams7*) as well as modulators (*Grem1*) or actors (*Tgfb1*, *Smad4*) of key cytokines signalling pathways involved in valvular ECM remodelling highlight the interrelation between genes involved in ECM remodelling (i.e. MC2) and those related to the response to mechanical stress (i.e. MC5). Both transcriptomic and regulomic analyses point to specific activation of TGF- β and Wnt pathways in our model with also a role for the BMP pathway highlighted in the transcriptomic analysis.^{10,31,34-36} This notion is consistent with the previously described crosstalk between mechanical stress and TGF- β signalings that participates in the establishment of this vicious circle which, in the context of MVD, leads to maintain the activation of MV valvular interstitial cells (VICs), and feeds the pathological degenerative process over time. This finding provides a pivotal molecular target related to the development of the MVD phenotype.

Epithelial cell migration (i.e. MC3) and processes related to EMT (i.e. MC4) were also highlighted in the RNA-seq analysis. Valvular endothelial cells (VECs) actively participate in valvulogenesis and MV homeostasis via their crosstalks with interstitial cells, and their functions and activities are known to be modulated by mechanical stress.^{10,37-40} Accordingly to a central role of VEC in MVD, swollen VECs were more frequently observed in KI rats. Although controversy regarding the involvement of EMT in MVD persists in the literature, our data suggest that the activation of EMT would be important in the pathophysiological processes, at least in the early stages of the disease.^{10,37,41} Further studies are needed to confirm this finding.

Finally, we identified a transcriptomic and regulomic signature related to chemotaxis and leukocyte recruitment in MV from KI animals (MC1).

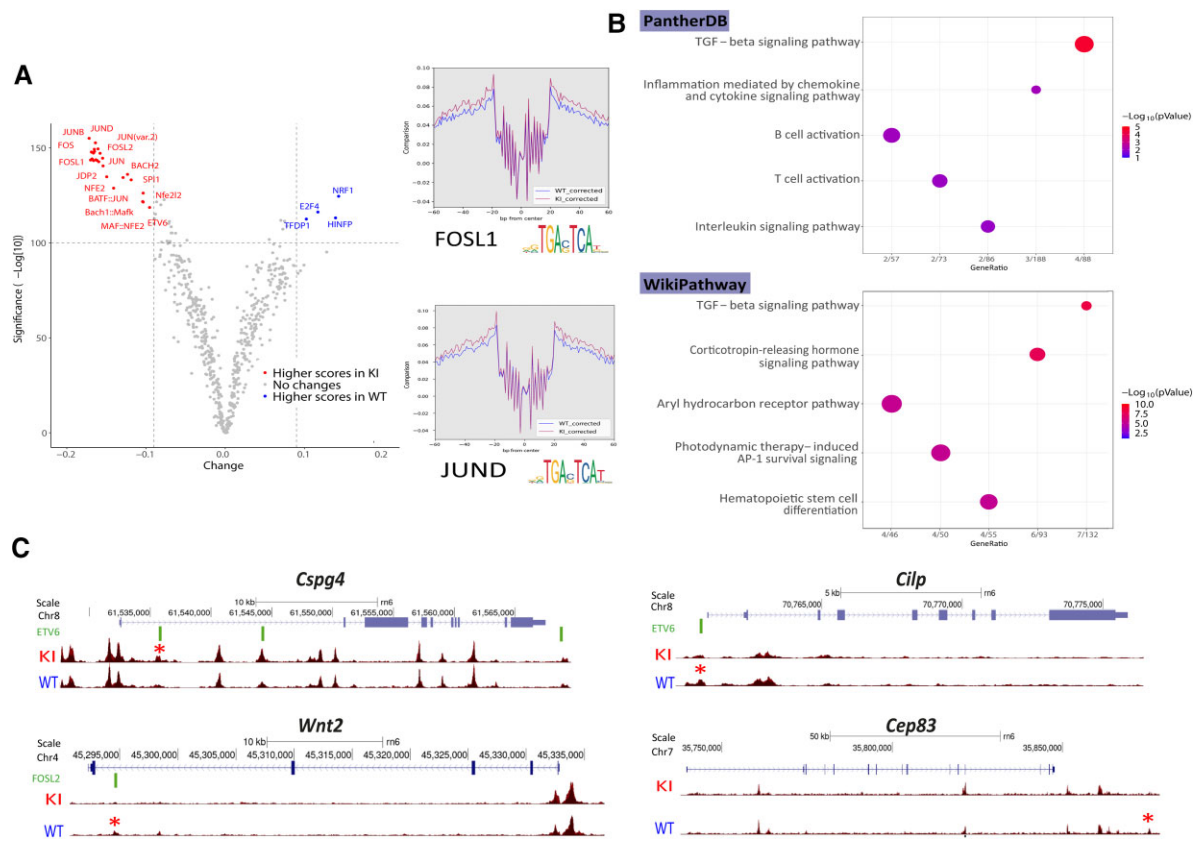


Figure 5 Chromatin opening analysis by ATAC-seq between KI and WT conditions. ATAC-seq has been performed on WT and KI mitral valve cells from 3-week-old rats. The volcano plot (A) shows the 21 significant transcription factors with a differential transcription factors binding dynamic. Significant transcription factors with differential binding dynamic [defined with the threshold $> \text{abs}(0.09)$ and $\log_{10}(P\text{-value}) > 100$] are depicted on the left side of the plot in red when a transcription factor foot-printing is over-represented in KI than in WT and on the right side of the plot in blue for the opposite. Aggregated footprints between bound sites are shown for FOSL1 and JUND, two of the most differentially binding transcription factors between KI and WT. (B) Shows the Enrichr enrichment analysis tool results using the Panther DB 2016 and WikiPathway 2021 with a \log_{10} corrected P -value (Bonferroni). (C) UCSC browser screenshot represents example regions for four genes found both in differentially opened regions between KI and WT and genes identified in the MC analysis. Differentially opened regions (peaks) are indicated with a red asterisk. Footprinting of the 21 transcription factors identified by TOBIAS is indicated in green when overlapping a differentially opened region. The analysis was performed on two samples of 50 000 cells from WT and KI mitral valves (all as biological replicates).

Enrichment in bone marrow-derived cells, essentially macrophages, has been previously observed in mice and human MV.^{31,42–44} These macrophages, including resident and recruited cells, are described to participate in valvulogenesis, in the maturation of the valve after birth and in the pathophysiological processes leading to myxomatous MV (i.e; FlNA-MVD, syndromic MVD, drug-induced MVD, as well as model of myxomatous aortic valve disease).^{17,31,42–46} All together, these data coupled with both our RNA-seq and ATAC-seq support a pivotal role of bone marrow-derived cells, and particularly macrophages, in MVD. The specific role of resident and/or recruited macrophages in MVD will require additional investigations.

All together, this study provides new hypotheses into the pathophysiological mechanisms involved in the early stages of MVD with the interrelation of ECM regulation, mechanotransduction, immune cells, and potentially EMT processes (Figure 4). Protein-protein association networks, based on the RNA-seq and ATAC-seq analyses, depict a complex and interrelated crosstalk between cells (endothelial, interstitial and immune) and molecular signalling pathways involved in ECM homeostasis to promote MV tissue remodelling in MVD (Figure 6).

4.3 Limitations

The main limitation of this study is inherent to any animal study and refers to the translation of findings from animal model to human disease.⁴⁷ Notably, whereas structural remodelling differentially affecting anterior and posterior leaflets and functional MV disabilities (i.e. MVP, MV regurgitation and LV remodelling) depict MVD in patients, the FlNA-P637Q rat model analyzed until 6 months does not recapitulate the whole spectrum of these pathological traits. Both technical and conceptual limitations participate to this discrepancy. For example, the poor spatial and temporal resolution of our echograph limited the quantitative assessment of MV thickening, MVP and mitral regurgitation. Also, even if we used fold-changes between littermate rats, the contrasting solution used for microCT scanning could result in differences between scans.

Transcriptomic analyses also suffer from some limitations. The small number of replicates in RNA-seq limited the statistical power for this analysis. In addition, even if optimal sample quality to perform ATAC-seq analysis was indubitably reached and the findings corroborated RNA-seq analysis, the number of biological replicates used ($n =$

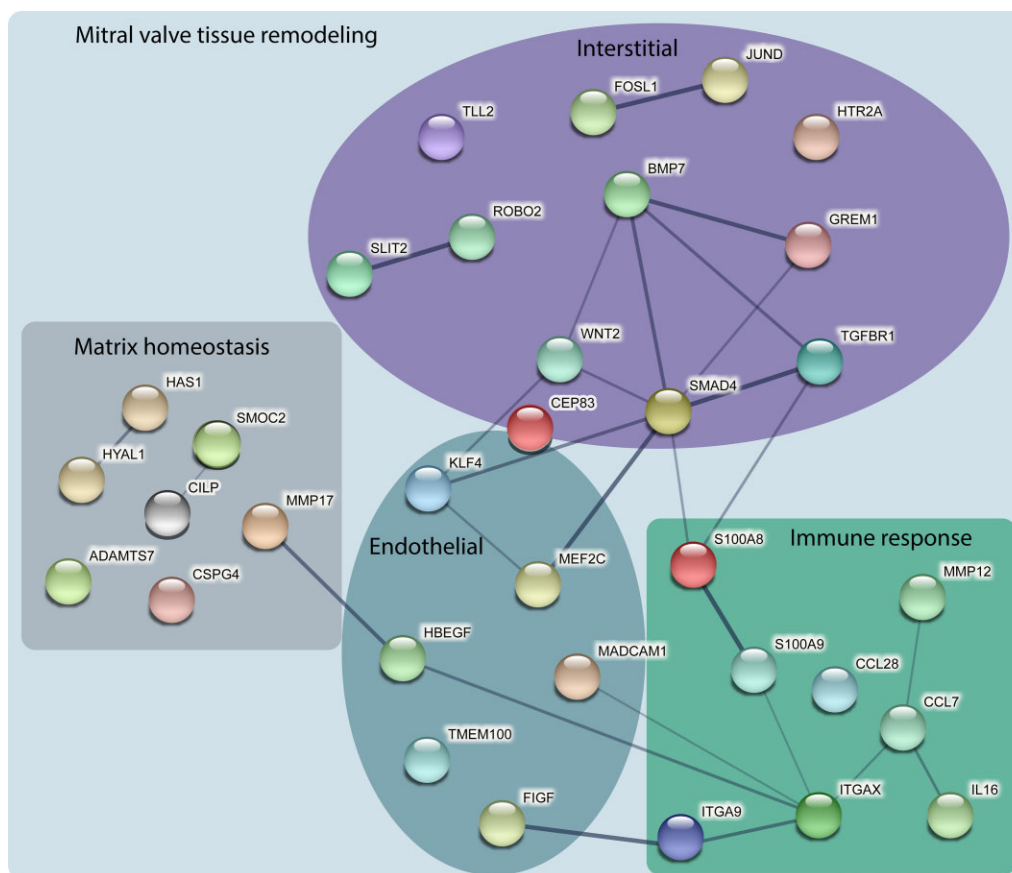


Figure 6 Protein–protein association network based on selected genes associated with MVD. Representation of the crosstalk between valvular cells (i.e. endothelial, interstitial and immune cells) and signalling actors of ECM homeostasis. Known and predicted functional and physical protein associations of the most relevant genes associated with MV tissue remodelling identified in both RNA-seq and ATAC-seq analysis (Table 1; Figure 5; see [Supplementary material online, Table S4](#)) using STRING database are presented. Active interaction sources are textmining, experiments, databases, co-expression, neighbourhood, gene fusion and co-occurrence. Line thickness indicates the strength of data support.

2) remains small and interpretation should be done with caution. Moreover, biological material recovery (i.e. cells for ATAC-seq and RNA for RNA-seq and qPCR) cannot be definitively assessed but we made sure that the digestion of tissue was complete and RNA recovery was proportional to the amount of tissue used. In any case, because RNA-seq analysis was performed on pooled anterior and posterior leaflets we could not detect gene expression differences between them. However, qPCR performed on key selected genes did not show significant differences between MV leaflets but, on the other hand, we cannot exclude that RNA-seq performed on separated anterior vs. posterior leaflets would have identified potential differences in signalling pathways between them. Here again, the analysis of older animals and haemodynamically challenging conditions may alleviate these discrepancies. In this context, our study should be considered as hypothesis generating. However, the observed concordance in signalling pathways identified in both RNA-seq and ATAC-seq supports the robustness of our data and reinforces our findings. This MC-based analysis performed on a hypothesis-free approach could also mask pathways that will merit further attention: the response to mechanical stress, our central mechanistic hypothesis, was only highlighted by hypothesis-driven analysis but we could also consider an overlap with the MC2 ‘ECM remodelling’.

Finally, the aortic valve phenotype has not been evaluated and would require further investigations.

5. Conclusion

The KI FlnA-P637Q rat model mimics human myxomatous MVD and opens new avenues to decipher molecular mechanisms associated with the development of this disease. We revealed that ECM organization, epithelial cells migration, response to mechanical stress, as well as a central contribution of immune cells response are important signalling pathways in the processes leading to MVD in both males and females. Our data pave the road to decipher underlying molecular mechanisms and the specific role of each cell subpopulation in the development and progression of myxomatous MV disease.

Supplementary material

[Supplementary material](#) is available at *Cardiovascular Research* online.

Authors' contributions

C.D., J.M., and R.C. contributed to the conception and experimental design of the study. C.D., C.T., P.A., A.H.M., A.F., B.L.V., M.B., B.L., S.B., J.V., P.P.G., S.L., E.B., E.M., J.B., J.M., and R.C. collected data and participated to their analysis. S.R. and I.A. generated the rat model. CD drafted the original version of the manuscript. J.M. and R.C. reviewed, validated and approved the final version. All authors critically reviewed the manuscript and contributed to editing the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We acknowledge the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), a member of the national infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04). We also acknowledge the Therassay, SC3M and the UTE facilities of the Structure Fédérative de Recherche François Bonamy (Nantes, France) for technical assistance. We thank Bastien Cimarosti for his precious help in R programming. We are grateful to the Genomics and Bioinformatics Core Facility of Nantes GenoBiRD, a member of Biogenouest, Institut Français de Bioinformatique (IFB) (ANR-11-INBS-0013) for the use of its resources and for its technical support.

Conflict of interest: None declared.

Funding

The present study has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 846291 and from the French Society of Cardiology and AstraZeneca France under the 'Alain Castaigne' scientific prize, both awarded to RC. RC is also supported by a 'Connect Talent' research chair from Région Pays de la Loire and Nantes Métropole. Biogenouest and the Région Pays de la Loire supported the TRIP facility. EM and AHK are funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy—EXC2151—390873048. JB and AF are supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR JCJC LEARN, R21006NN, RPV21014NNA). MB is supported by IRP-VERACITIES—New Mechanisms for VEntricular ARrhythmia And CardlomeTabolic DlseasES, an I-SITE NExT health and engineering initiative (Ecole Centrale & Nantes University) and by the IRP- GAINES—Genetic Architecture IN cardiovascular disEaSes funded by INSERM and CNRS. PPG is supported by the Agence Nnationale de la Recherche (ANR CROCOVAL, ANR-18-CE45-0015).

Data availability

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* 2006;**368**:1005–1011.
- Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, Lung B, Lancellotti P, Lansac E, Rodriguez Muñoz D, Rosenhek R, Sjögren J, Tornos Mas P, Vahanian A, Walther T, Wendler O, Windecker S, Zamorano JL, ESC Scientific Document Group. 2017 ESC/EACTS guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J* 2017;**38**:2739–2791.
- Kyndt F, Schott JJ, Trochu JN, Baranger F, Herbert O, Scott V, Fressinaud E, David A, Moisan JP, Bouhour JB, Le Marec H, Bénichou B. Mapping of X-linked myxomatous valvular dystrophy to chromosome Xq28. *Am J Hum Genet* 1998;**62**:627–632.
- Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, Toquet C, Roy E, McGregor L, Lynch SA, Newbury-Ecob R, Tran V, Young I, Trochu JN, Le Marec H,

- Schott JJ. Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation* 2007;**115**:40–49.
- Durst R, Sauls K, Peal DS, deVlaming A, Toomer K, Leyne M, Salani M, Talkowski ME, Brand H, Perrocheau M, Simpson C, Jett C, Stone MR, Charles F, Chiang C, Lynch SN, Bouatia-Naji N, Delling FN, Freed LA, Tribouilloy C, Le Tourneau T, LeMarec H, Fernandez-Friera L, Solis J, Trujillano D, Ossowski S, Estivill X, Dina C, Bruneval P, Chester A, Schott JJ, Irvine KD, Mao Y, Wessels A, Motiwala T, Puceat M, Tsukasaki Y, Menick DR, Kasiganesan H, Nie X, Broome AM, Williams K, Johnson A, Markwald RR, Jeunemaitre X, Hagege A, Levine RA, Milan DJ, Norris RA, Slaughaupt SA. Mutations in DCHS1 cause mitral valve prolapse. *Nature* 2015;**525**:109–113.
- Toomer KA, Yu M, Fulmer D, Guo L, Moore KS, Moore R, Drayton KD, Glover J, Peterson N, Ramos-Ortiz S, Drohan A, Catching BJ, Stairley R, Wessels A, Lipschutz JH, Delling FN, Jeunemaitre X, Dina C, Collins RL, Brand H, Talkowski ME, del Monte F, Mukherjee R, Awgulewitsch A, Body S, Hardiman G, Hazard ES, da Silveira WA, Wang B, Leyne M, Durst R, Markwald RR, Le Scouarnec S, Hagege A, Le Tourneau T, Kohl P, Rog-Zielinska EA, Ellinor PT, Levine RA, Milan DJ, Schott J-J, Bouatia-Naji N, Slaughaupt SA, Norris RA. Primary cilia defects causing mitral valve prolapse. *Sci Transl Med* 2019;**11**:eaax0290.
- Dina C, Bouatia-Naji N, Tucker N, Delling FN, Toomer K, Durst R, Perrocheau M, Fernandez-Friera L, Solis J, Le Tourneau T, Chen M-H, Probst V, Bosse Y, Pibarot P, Zelenika D, Lathrop M, Herberg S, Roussel R, Benjamin EJ, Bonnet F, Lo SH, Dolmatova E, Simonet F, Lecoince S, Kyndt F, Redon R, Le Marec H, Froguel P, Ellinor PT, Vasan RS, Bruneval P, Markwald RR, Norris RA, Milan DJ, Slaughaupt SA, Levine RA, Schott JJ, Hagege AA, Jeunemaitre X, Schott JJ, Hagege AA, Jeunemaitre X. Genetic association analyses highlight biological pathways underlying mitral valve prolapse. *Nat Genet* 2015;**47**:1206–1211.
- Yu M, Kyryachenko S, Debette S, Amouyel P, Schott JJ, Le Tourneau T, Dina C, Norris RA, Hagege AA, Jeunemaitre X, Bouatia-Naji N. Genome-wide association meta-analysis supports genes involved in valve and cardiac development to associate with mitral valve prolapse. *Circ Genom Prec Med* 2021;**14**:e003148.
- Roselli C, Yu M, Nauffal V, Georges A, Yang Q, Love K, Weng LC, Delling FN, Maurya SR, Schrölkamp M, Tfelt-Hansen J, Hagege A, Jeunemaitre X, Debette S, Amouyel P, Guan W, Muehlschlegel JD, Body SC, Shah S, Samad Z, Kyryachenko S, Haynes C, Rienstra M, Le Tourneau T, Probst V, Roussel R, Wijdh-Den Hamer JJ, Siland JE, Knowlton KU, Jacques Schott J, Levine RA, Benjamin EJ, Vasan RS, Horne BD, Muhlestein JB, Benfari G, Enriquez-Sarano M, Natale A, Mohanty S, Trivedi C, Shoemaker MB, Yoneda ZT, Wells QS, Baker MT, Farber-Eger E, Michelenia HI, Lundby A, Norris RA, Slaughaupt SA, Dina C, Lubitz SA, Bouatia-Naji N, Ellinor PT, Milan DJ. Genome-wide association study reveals novel genetic loci: a new polygenic risk score for mitral valve prolapse. *Eur Heart J* 2022;**43**:1668–1680.
- Levine RA, Hagege AA, Judge DP, Padala M, Dal-Bianco JP, Aikawa E, Beaudoin J, Bischoff J, Bouatia-Naji N, Bruneval P, Butcher JT, Carpentier A, Chaput M, Chester AH, Clusel C, Delling FN, Dietz HC, Dina C, Durst R, Fernandez-Friera L, Handschumacher MD, Jensen MO, Jeunemaitre XP, Marec HL, Tourneau TL, Markwald RR, Mérot J, Messas E, Milan DP, Neri T, Norris RA, Peal D, Perrocheau M, Probst V, Puceat M, Rosenthal N, Solis J, Schott JJ, Schwammenthal E, Slaughaupt SA, Song JK, Yacoub MH, Yacoub MH. Mitral valve disease—morphology and mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 2015;**12**:689–710.
- Le Tourneau T, Le Scouarnec S, Cuff C, Bernstein D, Albers JJJ, Lecoince S, Mérot J, Bernstein JA, Oomen T, Dina C, Karakachoff M, Desal H, Al Habash O, Delling FN, Capoulade R, Saurmeijer AJH, Milan D, Norris RA, Markwald R, Aikawa E, Slaughaupt SA, Jeunemaitre X, Hagege A, Roussel JC, Trochu JN, Levine RA, Kyndt F, Probst V, Le Marec H, Schott JJ. New insights into mitral valve dystrophy: a filamin-A genotype–phenotype and outcome study. *Eur Heart J* 2018;**39**:1269–1277.
- Bandaru S, Ala C, Zhou AX, Akyürek LM. Filamin A regulates cardiovascular remodeling. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:6555.
- Ketebo AA, Park C, Kim J, Jun M, Park S. Probing mechanobiological role of filamin A in migration and invasion of human U87 glioblastoma cells using submicron soft pillars. *Nano Converg* 2021;**8**:19.
- Washington RW, Knecht DA. Actin binding domains direct actin-binding proteins to different cytoskeletal locations. *BMC Cell Biol* 2008;**9**:10.
- Misra S, Ghatak S, Moreno-Rodriguez RA, Norris RA, Hascall VC, Markwald RR. Periostin/filamin-A: a candidate central regulatory axis for valve fibrogenesis and matrix compaction. *Front Cell Dev Biol* 2021;**9**:649862.
- Sauls K, de Vlaming A, Harris BS, Williams K, Wessels A, Levine RA, Slaughaupt SA, Goodwin RL, Pavone LM, Merot J, Schott JJ, Le Tourneau T, Dix T, Jesinkey S, Feng Y, Walsh C, Zhou B, Baldwin S, Markwald RR, Norris RA. Developmental basis for filamin-A-associated myxomatous mitral valve disease. *Cardiovasc Res* 2012;**96**:109–119.
- Sauls K, Toomer K, Williams K, Johnson A, Markwald R, Hajdu Z, Norris R. Increased infiltration of extra-cardiac cells in myxomatous valve disease. *J Cardiovasc Dev Dis* 2015;**2**:200–213.
- Duval D, Lardeux A, Le Tourneau T, Norris RA, Markwald RR, Sauzeau V, Probst V, Le Marec H, Levine R, Schott JJ, Merot J. Valvular dystrophy associated filamin A mutations reveal a new role of its first repeats in small-GTPase regulation. *Biochim Biophys Acta* 2014;**1843**:234–244.
- Duval D, Labbé P, Bureau L, Tourneau T, Norris R, Markwald R, Levine R, Schott JJ, Mérot J. MVP-associated filamin A mutations affect FlNA-PTPN12 (PTP-PEST) interactions. *J Cardiovasc Dev Dis* 2015;**2**:233–247.

20. Haataja TJK, Bernardi RC, Lecointe S, Capoulade R, Merot J, Pentikäinen U. Non-syndromic mitral valve dysplasia mutation changes the force resilience and interaction of human filamin A. *Structure* 2019;**27**:102–112.e4.
21. Remy S, Chenouard V, Tesson L, Usal C, Ménoret S, Brusselle L, Heslan JM, Nguyen TH, Bellien J, Merot J, De Cian A, Giovannangeli C, Concordet JP, Anegon I. Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci Rep* 2017;**7**:16554.
22. Chenouard V, Brusselle L, Heslan JM, Remy S, Ménoret S, Usal C, Ouisse LH, Nguyen TH, Anegon I, Tesson L. A rapid and cost-effective method for genotyping genome-edited animals: a heteroduplex mobility assay using microfluidic capillary electrophoresis. *J Genet Genomics* 2016;**43**:341–348.
23. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;**15**:550.
24. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS J Integr Biol* 2012;**16**:284–287.
25. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;**26**:139–140.
26. von Gise A, Pu WT. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res* 2012;**110**:1628–1645.
27. Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ, Walsh CA. Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2006;**103**:19836–19841.
28. Oyama MA, Elliott C, Loughran KA, Kossar AP, Castillero E, Levy RJ, Ferrari G. Comparative pathology of human and canine myxomatous mitral valve degeneration: 5HT and TGF- β mechanisms. *Cardiovasc Pathol* 2020;**46**:107196.
29. Chenouard V, Remy S, Tesson L, Ménoret S, Ouisse LH, Cherifi Y, Anegon I. Advances in genome editing and application to the generation of genetically modified rat models. *Front Genet* 2021;**12**:615491.
30. Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Schoen FJ. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation* 2001;**104**:2525–2532.
31. Geirsson A, Singh M, Ali R, Abbas H, Li W, Sanchez JA, Hashim S, Tellides G. Modulation of transforming growth factor- signaling and extracellular matrix production in myxomatous mitral valves by angiotensin II receptor blockers. *Circulation* 2012;**126**:S189–S197.
32. Dal-Bianco JP, Aikawa E, Bischoff J, Guerrero JL, Hjortnaes J, Beaudoin J, Szymanski C, Bartko PE, Seybolt MM, Handschumacher MD, Sullivan S, Garcia ML, Mauskopf A, Titus JS, Wylie-Sears J, Irvin WS, Chaput M, Messas E, Hagège AA, Carpentier A, Levine RA. Myocardial infarction alters adaptation of the tethered mitral valve. *J Am Coll Cardiol* 2016;**67**:275–287.
33. Marsit O, Clavel MA, Côté-Laroche C, Hadjadj S, Bouchard MA, Handschumacher MD, Clisson M, Drolet MC, Boulanger MC, Kim DH, Guerrero JL, Bartko PE, Couet J, Arsenault M, Mathieu P, Pibarot P, Aikawa E, Bischoff J, Levine RA, Beaudoin J. Attenuated mitral leaflet enlargement contributes to functional mitral regurgitation after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2020;**75**:395–405.
34. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC. Dysregulation of TGF- β activation contributes to pathogenesis in marfan syndrome. *Nat Genet* 2003;**33**:407–411.
35. Ng CM, Cheng A, Myers LA, Martinez-Murillo F, Jie C, Bedja D, Gabrielson KL, Hausladen JMW, Mecham RP, Judge DP, Dietz HC. TGF- β -dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 2004;**114**:1586–1592.
36. Schroer AK, Merryman WD. Mechanobiology of myofibroblast adhesion in fibrotic cardiac disease. *J Cell Sci* 2015;**128**:1865–1875.
37. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res* 2004;**95**:459–470.
38. Gee TW, Richards JM, Mahmut A, Butcher JT. Valve endothelial-interstitial interactions drive emergent complex calcific lesion formation in vitro. *Biomaterials* 2021;**269**:120669.
39. Hulin A, Hortells L, Gomez-Stallons MV, O'Donnell A, Chetal K, Adam M, Lancellotti P, Oury C, Potter SS, Salomonis N, Yutzey KE. Maturation of heart valve cell populations during postnatal remodeling. *Development* 2019;**146**:dev173047.
40. Butcher JT, Nerem RM. Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress. *Tissue Eng* 2006;**12**:905–915.
41. Kim AJ, Alfieri CM, Yutzey KE. Endothelial cell lineage analysis does not provide evidence for EMT in adult valve homeostasis and disease. *Anat Rec* 2019;**302**:125–135.
42. Hulin A, Anstine LJ, Kim AJ, Potter SJ, DeFalco T, Lincoln J, Yutzey KE. Macrophage transitions in heart valve development and myxomatous valve disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;**38**:636–644.
43. Visconti RP, Ebihara Y, LaRue AC, Fleming PA, McQuinn TC, Masuya M, Minamiguchi H, Markwald RR, Ogawa M, Drake CJ. An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential: hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells. *Circ Res* 2006;**98**:690–696.
44. Hajdu Z, Romeo SJ, Fleming PA, Markwald RR, Visconti RP, Drake CJ. Recruitment of bone marrow-derived valve interstitial cells is a normal homeostatic process. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**51**:955–965.
45. Hulin A, Moore V, James JM, Yutzey KE. Loss of Axin2 results in impaired heart valve maturation and subsequent myxomatous valve disease. *Cardiovasc Res* 2017;**113**:40–51.
46. Kim AJ, Xu N, Umeyama K, Hulin A, Ponny SR, Vagnozzi RJ, Green EA, Hanson P, McManus BM, Nagashima H, Yutzey KE. Deficiency of circulating monocytes ameliorates the progression of myxomatous valve degeneration in marfan syndrome. *Circulation* 2020;**141**:132–146.
47. Leenaars CHC, Kouwenaar C, Stafleu FR, Bleich A, Ritskes-Hoitinga M, De Vries RBM, Meijboom FLB. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. *J Transl Med* 2019;**17**:223.

Translational perspective

Mechanisms leading to myxomatous mitral valve dystrophy (MVD) remain poorly understood, especially due to the lack of representative models to study this pathology. Thus, we have generated a unique Knock-In rat model for the P637Q mutation on the *FLNA* gene. In the present study, we established the relevance of this model that closely mimicked human disease. The multi-omics approach used revealed multiple pathways with a central role in the pathophysiological processes related to MVD, such as extracellular matrix organization, response to mechanical stress, and an important contribution of immune cells. These data provide mechanistic understandings related to the physiopathology of MV and open new avenues to decipher the underlying molecular mechanisms and identify potential therapeutic targets.

1 ONLINE SUPPLEMENTAL METHODS

2 2.1 Rats

3 Sprague-Dawley FlnA-P637Q Knock-In (KI) rats were engineered using Crispr/Cas9 methods and
4 founders were characterized at the Transgenic Rats and ImmunoPhenomic (TRIP) facility in Nantes
5 (France).^{1,2} All animals used in the current study were generated after, at least, 10 backcrosses to avoid
6 off-target recombinations from Crispr method. Tail snipping was performed and samples were used
7 for in-house genotyping using the Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific).
8 Primers are presented in Table S1 (Online Supplementary Material).

9 The rat litter size and male/female ratio were documented. Growth and weight were also recorded
10 from the weaning (3-week-old rat) to 3-to-6-month-old. All the analyses between KI and WT were
11 performed on littermates.

12 2.2 Mitral valve phenotyping

13 **Doppler-echocardiography**

14 Doppler-echocardiographies were performed using the Vivid 7 ultrasound system (GE Healthcare,
15 Chicago, IL, USA) with a 10S transducer (11-22 MHz). Anesthesia was induced using isoflurane 4% and
16 maintained at 2% during image recording to achieve constant and comparable heart rates during
17 examinations. Animals were laid in the supine position, and body temperature was maintained at 37°C
18 thanks to a heating pad and heat lamp. Electrocardiogram was monitored through subcutaneous
19 electrodes. Echocardiographic acquisitions were performed according to the current guidelines
20 recommendations from Zacchina and collaborators.³ M-mode, B-mode and color Doppler mode were
21 used and image analysis was performed offline on the EchoPAC software (GE Healthcare) by experts
22 blinded to rat genotype. 10 KI and 5 WT littermates were analyzed.

23 Qualitative analysis was based on the parameters we described in FlnA families.⁴ The main indices used
24 to characterize the presence or absence of MVD Barlow-like disease were focused on specific

25 alterations of MV apparatus and included: i) MV leaflet thickening (Figure 1A-B), ii) presence of MV
26 prolapse (i.e. systolic displacement of one or two leaflets above the annulus line towards the left
27 atrium in the long-axis view; Figure 1B), and iii) a restrictive motion of the leaflets in diastole (Figure
28 1A). A genotype-phenotype concordance was then determined. For the quantitative parameters, MV
29 leaflet elongation was assessed by anterior leaflet length measurement (i.e. distance between the
30 hinge point and tip of the anterior MV leaflet; Figure 1A), MV leaflet thickening was assessed by
31 anterior leaflet width measurement (only available for 3-to-6-month-old rats) and MV annulus
32 diameter was measured (i.e. the distance between the hinge points of both leaflets; Figure 1B). From
33 the parasternal long-axis and short-axis view using M-mode echocardiography, left ventricular (LV)
34 morphology and function were assessed based on: i) the LV internal diameter in diastole and systole
35 (LVIDs, LVIDd) and the corresponding volumes, ii) the septum and LV posterior wall thickness in
36 diastole and systole, iii) the calculated LV mass indexed for body weight (i.e. $LV\ mass = 0.8 [1.04 (PWTd$
37 $+ IVSd + LVIDd)^3 - LVIDd^3] + 0.6$), and iv) the LV ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS).
38 Mitral regurgitation was evaluated on parasternal short-axis view and/or apical 3-chamber view by
39 color Doppler imaging.

40 **Micro-computed tomography**

41 Because X-ray scan happens to suit imaging of electron-dense tissue, we implemented a staining
42 protocol before scanning to increase the contrast of the soft tissue such as the heart.⁵ Briefly, animals
43 were injected with pentobarbital (EUTHASOL® VET, 0.5mL/kg adjusted as needed, i.p.). Aorta was
44 cannulated and retrogradely perfused with cardioplegic solution (Plegisol) to limit heart ischemia.
45 Hearts were placed on the Langendorf-modified system and perfused with physiologic salt solution
46 (KREBS) to clean up heart chambers (i.e. beating heart protocol).⁶ After 10 minutes, hearts were
47 stopped with the same cardioplegic solution before starting the 30-min perfusion of the staining and
48 fixation solution with 10% formalin/3% Phosphotungstic Acid (PTA). Finally, hearts were incubated in
49 the same staining/fixation solution for 72 hours, before the scan.

50 MicroCT scans were performed at the SC3M facility (Nantes, France) using a Skyscan 1272 (Bruker,
51 Germany) microtomodensitometer at 18 μ m resolution, 80kV (filter Al 1mm,) or 90kV (filter Al 0.5 mm
52 + Cu 0.038mm), rotation step: 0.35°, binning: 4. Three-dimensional reconstructions of the raw
53 projections were obtained using Nrecon (Bruker) Smoothing: 0; Rig Artifact: 5; Beam Hardening: 10%
54 (Figure 2A).

55 Using dedicated software (CTvox, CTan, Data Viewer from Bruker), MV volume was quantified. To
56 obtain working images, the MV region from the full heart acquisition was manually cropped in Data
57 Viewer based on the 3 orthogonal heart plans (Figure 2B). The cropped images of the MV were then
58 generated and the complete stack was opened in CTan software for segmentation (Figure 2C).
59 Segmentation of both MV leaflets was manually performed on 2D images every 10-15 slides (Figure
60 2D), from the anterolateral to the posteromedial commissures. Automatic implementation of the
61 segmentation was applied to the slides in between. Otsu 3-level thresholding of grey images was
62 applied on this segmented MV to determine the 3D MV full volume (Figure 2F). Complete analysis of
63 the volume, including the segmentation protocol, was blinded for rat genotype and the same
64 thresholding method was applied for all samples. Data are presented as fold-change between the KI
65 rat with its WT littermate (n=11). In addition to the quantification of the full volume of the MV, anterior
66 and posterior leaflets were subsequently subdivided manually and specific fold-change for the volumes
67 from both leaflets were recorded.

68 **Histology**

69 Hearts were fixed in 10% formalin for 24 to 48 hours, dehydrated, cleared in xylene and embedded in
70 paraffin. 3- μ m paraffin slides were sectioned and serial slides were stained. HPS (Hematoxylin cp813,
71 Diapath; Phloxin pb-p-25, Biognost; Saffron 27481.105, VWR) staining was used for morphological
72 evaluation and consecutive slides were stained with Alcian Blue (c0053, Diapath; pH2.5) for
73 mucopolysaccharides evaluation, Masson Trichrome (F/010210, Microm) for ECM organization and

74 Alizarin red (TMS-008-C, Merck Millipore) for calcification; according to manufacturer's instructions.

75 The slides were examined under light microscopy and scanned using NanoZoomer Hamamatsu.

76 The histopathologic alterations were graded qualitatively by three investigators, who were blinded to

77 the genotype. Histological abnormalities are defined based on criteria such as layered organization,

78 thickness, length, cellularity, collagen and mucopolysaccharide content and spatial distribution on the

79 MV leaflets. We used these features to classify each specimen as KI or WT (n=10 and 5) and check the

80 genotype-phenotype concordance. To quantitatively assess the thickening and Alcian Blue signal (i.e.

81 Blue Alcian within the valve) (Figure 3), the virtual slides were first imported into the Qupath software.⁷

82 A region of interest was manually drawn around each leaflet of the mitral valves. After color

83 deconvolution of all slides, based on the staining of one of the slides, the same threshold was applied

84 in every region of interest (ROI) to determine the area of the leaflet stained with Alcian Blue, rendered

85 as a Qupath annotation. Each leaflet was then exported in tiff using the export to ImageJ functionality

86 of Qupath, keeping the original color scheme and exporting the rough leaflet ROI and the accurate

87 Alcian blue staining annotation in the tiff.

88 A Fiji macro was then created using the MorpholibJ plugin to normalize and quantify both the thickness

89 and Alcian Blue signal.^{8,9} For each leaflet, a geodesic distance map (following the shape of the leaflet)

90 was computed from the annulus to the free edge. In this geodesic distance map, all points equidistant

91 to the annulus edge had the same distance value. The maximum distance value was then the length of

92 the valve. Its length was normalized to 1 for each leaflet. By iteratively thresholding equidistant values

93 for values sampled uniformly for every leaflet, the thickness of the leaflet, as well as its part covered

94 with Alcian Blue annotation from Qupath, was then automatically measured all along the leaflet and

95 summed up to get a comparable thickness between leaflet whatever its length. Fold-changes were

96 computed for each KI rat against its WT littermate for anterior and posterior leaflets, and averaged to

97 get one value per KI rat (n=10). A One sample Wilcoxon signed rank test on the KI fold value was then

98 performed.

Sub-valvular apparatus investigation

11 WT and 12 KI 3-week-old male hearts were harvested for chordae tendinae characterization. The number of chords attached to the leaflets was reported for chordae branching evaluation.

2.3 RNA-sequencing data generation and bioinformatics analysis

5 Wild-Type (WT) and 5 Knock-In (KI) mitral valve leaflets (i.e. both anterior + posterior leaflets) were harvested, placed in liquid nitrogen and stored at -80°C for RNA extraction. Snap frozen tissue samples were homogenized using the bead-based Precellys system at 3x 15s in 1ml of QIAzol (Qiagen). Total RNA was extracted using the miRNeasy micro kit (Qiagen) and quantified via RNA assay on a tapestation 4200 system (Agilent). 5 ng total RNA was used as an input for library generation via SmartSeq 2 (SS2) RNA library production protocol as described in Picelli et al.¹⁰ Pre-amplification PCR was performed with 14 cycles for the rat tissue. Libraries were quantified using the Qubit HS dsDNA assay (Invitrogen) and fragment size distribution was analyzed via D1000 assay on a tapestation 4200 system (Agilent).

SS2 libraries sequenced single-end with 75 cycles on a NextSeq500 system using the high-output v2.5 chemistry (Illumina). Samples were demultiplexed and fastq files generated using bcl2fastq2 v2.20 before alignment and quantification using Kallisto v0.44.0 based on the NCBI Rnor_6.0 (GCA_000001895.4) reference genome.

For statistical analysis, the raw read counts were imported into DESeq2 (v. 1.30.1) using R (v. 4.0.4).¹¹ To identify the differentially expressed genes (DEGs) of particular interest to the development of mitral valve dystrophy, we performed pairwise comparisons (Wald test) between KI and control samples. Genes with a p-value <0.05 and Fold Change (FC) >1.2 or FC <0.8 were selected as DEGs. Enrichment analysis was done on these genes using clusterProfiler package (v. 4.0.0).¹² Significant GO-terms (p<0.05) parts of similar pathways were grouped under 3 Metaclusters (MC) (i.e. hypothesis-free

122 analysis). We finally designed specific MCs that encompass pathways described in the literature as
123 involved in the MVD (i.e. hypothesis-driven analysis).

124 Sensitivity analyses, based on different p-values (i.e. p-value <0.01 & <0.10) and FC (i.e. >1.3 or <0.7 &
125 >1.4 or <0.6) thresholds, were also performed to corroborate our finding.

126 2.4 qPCR data generation to assess anterior versus posterior MV leaflet transcriptomics

127 MV total RNA was isolated from 3-week-old anterior and posterior MV leaflets, separately, using the
128 miRNeasy mini kit (Qiagen). The quantity and quality of the RNA samples were assessed using the
129 NanoDrop with a 260/280 ratio of 1.8-2.2 considered acceptable. Total RNA was transcribed to cDNA
130 using the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) at 25°C for 10 min, 37°C
131 for 120 min, 85°C for 5 min, then cooled to 4°C. cDNA samples were stored at -80°C until amplification
132 by real-time quantitative PCR (qPCR).

133 Primers were designed for Gapdh, Has1, Esm1, Cspg4, and Ccl7 using Primer 3 plus to span over an
134 intron (Table S1, Online Supplementary Material). The qPCR reaction was performed using the Power
135 SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 times at
136 95°C for 15 sec. followed by 60°C for 1 min. Melting curve (95°C for 15 sec and 60°C for 15 sec) at the
137 end of the last cycle to assess the amplification specificity was performed. Results of gene expression
138 were processed under SDS2.2 software. Ct raw data were adjusted between runs thanks to an
139 interplate calibrator. For each marker, delta Ct was calculated on the housekeeping gene Gapdh. Log2
140 transformation was applied to transform the data to a linear scale.

141 2.5 ATAC-sequencing and computing analysis

142 We performed an open chromatin assay for transposase-accessible chromatin using sequencing
143 (ATAC-seq) to detect differences in active profile in chromatin between 3 samples of 3-weeks old WT
144 and KI rats. From each sample, 50 000 cells were collected from KI and WT mitral valves (i.e. pool of 8
145 MV for each genotype), then digested using a solution of 1.2U/mL dispase II (Merk) and 2mg/ml
146 collagenase IV (Worthington) for 45 minutes at 37°C. Cells were then washed by centrifugation in cold

147 PBS. Pelleted cells were resuspended in the transposase reaction mix supplemented with digitonin
148 (25µl 2x TD buffer, 5µl TDE1 (Illumina), 1µl digitonin 0.5% (Promega) and 19µl of nuclease-free water).
149 The transposition reaction was carried out for 30 minutes at 37°C. The samples were immediately
150 purified using the DNA Clean and Concentrator-5 kit (Zymo Research). Following purification, each
151 sample was dual indexed with i7 and i5 primers from the Nextera Index Kit (Illumina) and amplified
152 using Nextera DNA Library Prep Kit (Illumina) using the following PCR conditions: 72°C for 3 minutes,
153 98°C for 30 seconds, followed by 11 cycles at 98°C for 10 seconds, 63°C for 30 seconds and 72°C for 3
154 minutes.

155 Libraries were double size selected with Beckman Coulter™ Agencourt AMPure XP (0.5X and 1.3X
156 ratios). Library quality was assessed using TapeStation and libraries were quantified using NEBNext®
157 Library Quant Kit for Illumina® (New England Biolabs).

158 Sequencing was performed on an Illumina NovaSeq6000 platform in 2x51 paired-end mode. Trimming
159 and demultiplexing were done using Illumina bcl2fastq2. Read mapping was done using bowtie2 with
160 paired-end settings and “-X 2000” on hg19.¹³ Only properly mapped reads were kept, duplicated reads
161 were filtered using samblaster. Bams were converted into bedpe format and coordinate shifted using
162 deeptools (--ATACshift option). Broad peak calling was carried out with MACS2 using bedpe options
163 and default p-value and qvalue for broad cutoff.^{14,15} Quality control was done by computing the
164 fraction of reads in peaks (FRiP) with subread feature counts using peaks called MACS2 narrowPeak.¹⁶
165 Complexity of the library was evaluated according to standards defined by the ENCODE consortium
166 with the NRF (nonredundant fraction), PCB1 and PCB2 (PCR bottleneck 1 and 2) computed for all
167 samples.¹⁷ TSS enrichment was also checked using ENCODE methods as defined in the ENCODE ATAC-
168 seq pipeline.¹⁸ Correlation between samples was evaluated with deeptools plotCorrelation on all
169 filtered reads of chromosome 1. Samples were filtered if the number of reads was < 35 million or if the
170 average fraction of reads in peaks (FRiP) was below 30% or if the TSS enrichment was below 15. Out
171 of the 6 samples, we excluded 2 samples (1 WT and 1 KI) processed in the same batch but with QC

172 metrics out of the range defined above. The remaining 4 samples (i.e. 2 replicates for both genotypes)
173 combined more than 80 million reads per condition with an average FRiP score of 36,5, well above the
174 ENCODE recommendations for ATAC-seq data assuring proper footprint calling.¹⁸

175 Differential analyses were performed using the Diffbind package keeping.¹⁹ EdgeR TMM normalization
176 was performed and only peaks present in all samples from one condition were kept as consensus
177 peaks. Differentially opened regions between the KI and WT conditions were selected based on a log2
178 fold change of 1 and FDR of 10% using edgeR quantile-adjusted conditional maximum likelihood
179 (qCML) analysis.²⁰ Functional annotation was done using HOMER annotatePeaks.pl with Rnor6
180 annotation file.^{21,22} Motif enrichment analysis was performed using MEME-Chip, using all called peaks
181 between conditions as a background. For the footprinting analysis, TOBIAS with default parameters
182 was used.^{23,24} Gene enrichment profiles were done using the R package clusterProfiler with the
183 enrichGO function.²⁵ Plots were done in R with ggplot2 and assembled with Inkscape.²⁶ Pathway
184 enrichment analysis has been performed using the Enrichr enrichment analysis tool.²⁷⁻²⁹

185

188 **TABLE S1:** Primer sequences used for model genotyping and molecular phenotyping.

Detection	Name of primer	Sequence (5' to 3')	Product size (pb)
GENOTYPING			
Presence of the mutation	P637Q_F	GTCCGCTATTGGCAGCAA	313
	WT_R	GGCCAATAGCGCACAT	
Absence of the mutation	WT-FLNA_F	AACATTGGCCGCAAGTAAG	476
	WT-FLNA_R	GACCAAGGTAAGGCCACCA	
Gender	rSRY_F	TCAGCCTCATCGAAGGGTTA	153
	rSRY_R	GAGGACTGGTGTGCAGCTCT	
MOLECULAR PHENOTYPING			
Ccl7	Ccl7_F	GTGTCCCTGGGAAGCTGTTA	53
	Ccl7_R	CACAGACTTCCATGCCCTTT	
Cspg4	Cspg4_F	ACCCTCAGCACTTTCTCCTG	60
	Cspg4_R	ATCATGCACGTATCGGATCA	
Esm1	Esm1_F	TGATTCGGTGACGAGTTTG	132
	Esm1_R	AAGGGGAAGTCCAGACACCT	
Has1	Has1_F	CAGGGCGTTGTATAGCCACT	116
	Has1_R	AGTATACCTCGCGCTCCAGA	
Gapdh	Gapdh_F	TCATACTTGGCAGGTTTCTCC	98
	Gapdh_R	CTGAACGGGAAGCTCACTG	

191 **Legend:** *SRY*: Sex-determining Region of the Y chromosome; *F*: Forward; *R*: Reverse.

193 **TABLE S2:** Left ventricular and mitral valve echocardiographic characteristics of the WT and KI rats.

	3-week-old			3-to-6-month-old		
	WT (n=5)	KI (n=10)	P value	WT (n=8)	KI (n=18)	P value
Heart rate (b.p.m)	405[399-430]	417[393-459]	0.69	344[313-362]	344[328-367]	0.55
Left Ventricle						
LVIDd (mm)	5.0[5.0-5.1]	4.9[4.8-5.1]	0.46	9.3[8.9-9.5]	8.7[8.2-9.4]	0.07
LVIDs (mm)	2.6[2.4-2.7]	2.9[2.7-3.1]	0.07	5.4[4.6-5.6]	4.9[4.2-5.7]	0.66
LV mass index (mg/g)	10.9[9.9-11.7]	12.0 [11.2-12.7]	0.06	2.7[2.6-3.1]	2.6[2.5-2.9]	0.69
EF (%)	84[83-89]	80[78-84]	0.03	78[77-84]	80[74-83]	0.79
FS (%)	48[46-54]	43[41-47]	0.02	42[41-49]	44[39-47]	0.70
Mitral Valve						
Anterior leaflet length (mm)	1.8[1.7-1.9]	2.0[2.0-2.1]	0.004	3.1[2.7-3.4]	3.4[3.2-3.7]	0.003
Anterior leaflet thickness (mm)	-	-	-	0.31[0.28-0.34]	0.50[0.45-0.53]	0.001
Annulus diameter (mm)	2.1[2.0-2.2]	2.3[2.2-2.4]	0.90	3.9[3.7-4.2]	3.9[3.8-4.2]	0.71

194 **Legend:** b.p.m: beats per minute; LV: left ventricle; LVIDd: left ventricle internal diameter in diastole,
195 LVIDs: left ventricle internal diameter in systole; EF: ejection fraction; FS: fractional shortening. LV mass
196 was calculated using the formula: $0.8 [1.04 (PWTd + IVSd + LVIDd)^3 - LVIDd^3] + 0.6$, normalized to body
197 weight. P-values are from the Mann-Whitney test. Data are presented as median [1st interquartile
198 range – 3rd interquartile range].

TABLE S3: List of the differentially expressed genes presented in the metacluster analysis

Gene	FC	p-value
<i>Adamts7</i>	1.22	9.69E-03
<i>Angpt1</i>	1.51	4.88E-03
<i>Angpt2</i>	1.61	5.54E-03
<i>Angpt4</i>	0.46	1.72E-04
<i>Apoe</i>	0.68	6.29E-03
<i>Avpi1</i>	1.28	0.033
<i>Bmp7</i>	0.69	0.035
<i>Ccl28</i>	1.53	0.047
<i>Ccl5</i>	0.07	1.21E-10
<i>Ccl7</i>	2.95	4.76E-07
<i>Cd2</i>	0.32	0.030
<i>Cdh13</i>	1.32	0.031
<i>Cebpd</i>	0.78	0.031
<i>Chi3l1</i>	0.68	6.56E-03
<i>Cilp</i>	0.56	0.022
<i>Cldn1</i>	0.50	2.01E-04
<i>Col18a1</i>	0.80	7.93E-03
<i>Col22a1</i>	0.38	1.36E-06
<i>Col9a3</i>	0.69	5.20E-04
<i>Cspg4</i>	1.27	3.72E-03
<i>Ctdspl2</i>	1.54	7.86E-03
<i>Cx3cl1</i>	0.68	6.64E-03
<i>Cxcl12</i>	0.63	4.78E-04
<i>Cxcl13</i>	0.46	0.016
<i>Cxcl14</i>	0.28	3.43E-03
<i>Cxcr4</i>	0.79	0.019
<i>Cxcr5</i>	0.45	3.61E-03
<i>Ddr1</i>	0.79	0.044
<i>Dock8</i>	1.22	0.040
<i>Dok2</i>	1.32	9.48E-03
<i>Dpp4</i>	0.66	1.23E-03
<i>Egfl6</i>	2.02	1.39E-05
<i>Egflam</i>	0.73	1.86E-03
<i>Enpp2</i>	0.79	0.013
<i>Epha2</i>	1.25	0.023
<i>Ero1a</i>	1.20	0.029
<i>Errfi1</i>	1.52	2.25E-05
<i>Etv1</i>	1.23	0.018
<i>Ezr</i>	1.34	5.20E-04
<i>F3</i>	0.65	1.78E-03
<i>Fgf9</i>	0.71	0.023
<i>Fgfr4</i>	0.67	0.026
<i>Flrt3</i>	0.68	9.83E-03
<i>Fosl1</i>	3.40	1.79E-04

<i>Fst</i>	1.29	0.014
<i>Fut7</i>	0.42	0.028
<i>Fuz</i>	0.74	1.48E-03
<i>Gdf11</i>	1.39	6.82E-03
<i>Glipr2</i>	0.68	0.036
<i>Gpnmb</i>	1.39	0.033
<i>Grem1</i>	2.87	3.41E-03
<i>Gsk3b</i>	1.22	0.025
<i>Has1</i>	3.04	3.37E-09
<i>Hbegf</i>	1.48	0.013
<i>Htr2a</i>	2.17	9.65E-03
<i>Hyal1</i>	0.70	0.020
<i>Igfbp4</i>	0.74	0.037
<i>Il16</i>	1.25	2.81E-03
<i>Il1rap</i>	0.68	7.29E-04
<i>Itga9</i>	0.78	0.023
<i>Itgax</i>	1.73	0.010
<i>Itgb2</i>	1.30	5.87E-03
<i>Itgb6</i>	1.85	0.043
<i>Kazald1</i>	1.28	2.23E-03
<i>Klf4</i>	1.31	1.62E-03
<i>Lama1</i>	1.41	7.60E-03
<i>Lcp1</i>	1.25	0.043
<i>Lmo3</i>	0.75	0.019
<i>Lpar1</i>	1.29	2.20E-04
<i>Madcam1</i>	5.70	0.039
<i>Mapk11</i>	0.36	4.68E-03
<i>Mapk13</i>	1.60	3.12E-03
<i>Mapkapk3</i>	1.26	0.020
<i>Mef2c</i>	1.34	4.92E-03
<i>Mmp12</i>	2.44	6.38E-07
<i>Mmp17</i>	1.68	0.013
<i>Mst1r</i>	2.16	0.021
<i>Ntng2</i>	0.41	7.77E-04
<i>Ntrk3</i>	0.63	0.011
<i>Olr1</i>	1.62	0.014
<i>Pak3</i>	0.66	0.012
<i>Pla2g1b</i>	0.25	9.29E-07
<i>Plcg2</i>	1.39	0.049
<i>Prex1</i>	0.71	6.64E-03
<i>Prkx</i>	1.23	0.031
<i>Prox1</i>	0.61	0.028
<i>Psmb9</i>	0.74	0.017
<i>Ptgs2</i>	0.70	8.72E-03
<i>Rarres2</i>	0.77	2.81E-03
<i>Ret</i>	0.56	0.013
<i>Rgcc</i>	1.92	0.033

<i>Rgs2</i>	0.75	0.014
<i>Robo2</i>	1.75	6.04E-04
<i>S100a8</i>	8.40	5.12E-03
<i>S100a9</i>	2.67	0.015
<i>Sema3b</i>	0.75	0.014
<i>Sema3d</i>	0.74	0.020
<i>Sema3e</i>	3.21	0.048
<i>Sema5b</i>	0.53	2.77E-03
<i>Serac1</i>	0.71	0.043
<i>Sfrp2</i>	0.66	9.56E-06
<i>Sfrp4</i>	1.65	1.33E-06
<i>Shisa2</i>	0.58	0.020
<i>Sirt1</i>	1.28	0.018
<i>Slit2</i>	1.24	0.015
<i>Smad4</i>	1.25	0.036
<i>Smoc2</i>	0.37	0.026
<i>Tgfbr1</i>	1.21	0.038
<i>Tll2</i>	10.36	0.019
<i>Tmem100</i>	1.39	1.17E-03
<i>Vegfd</i>	0.70	0.035
<i>Wnt2</i>	0.71	0.023

200

201 **Legend:** Fold Change (FC) and p-value of each differentially expressed gene presented in the

202 metacluster analysis (FC is <0.8 or >1.2 and p-value < 0.05).

203 **Table S4:** Differential transcription factor binding dynamic results from TOBIAS BINDetect tool

output_prefix	name	motif_id	cluster	total_tfbs	WT_mean_score	WT_bound	KI_mean_score	KI_bound	WT_KI_change	WT_KI_p-value
JUNB_MA0490.1	JUNB	MA0490.1	C_FOSL1::JUN	34124	0.3756	6041	0.39576	6662	-0.1718	9.389E-156
JUND_MA0491.1	JUND	MA0491.1	C_FOSL1::JUN	31483	0.37996	5650	0.39958	6238	-0.16382	2.234E-153
FOS_MA0476.1	FOS	MA0476.1	C_FOSL1::JUN	33348	0.37346	5838	0.39258	6409	-0.16055	3.491E-150
JUNvar.2_MA0489.1	JUN(var.2)	MA0489.1	C_FOSL1::JUN	34200	0.36755	5819	0.38662	6427	-0.15797	7.352E-148
FOSL2_MA0478.1	FOSL2	MA0478.1	C_FOSL1::JUN	34373	0.36802	5837	0.38604	6435	-0.15476	2.85E-145
FOSBJUNB_MA1135.1	FOSB	MA1135.1	C_FOSL1::JUN	29400	0.37923	5291	0.39876	5809	-0.16324	1.846E-144
FOSL1_MA0477.1	FOSL1	MA0477.1	C_FOSL1::JUN	32897	0.38166	5976	0.40184	6570	-0.16998	2.643E-144
JUNJUNB_MA1132.1	JUN	MA1132.1	C_FOSL1::JUN	25041	0.37965	4456	0.39831	4867	-0.15967	2.086E-143
BACH2_MA1101.1	BACH2	MA1101.1	C_BACH2	33365	0.35656	5250	0.37036	5706	-0.12334	9.284E-137
JDP2_MA0655.1	JDP2	MA0655.1	C_FOSL1::JUN	22765	0.35872	3735	0.3759	4114	-0.14958	1.711E-135
BATFJUN_MA0462.1	BATF::JUN	MA0462.1	C_FOSL1::JUN	30975	0.33718	4514	0.35257	4974	-0.12895	4.189E-135
SPI1_MA0080.4	SPI1	MA0080.4	C_SPI1	34501	0.2864	3390	0.29437	3553	-0.11872	7.039E-134
NFE2_MA0841.1	NFE2	MA0841.1	C_FOSL1::JUN	19676	0.35554	3186	0.37197	3499	-0.14088	1.633E-129
Nfe2l2_MA0150.2	Nfe2l2	MA0150.2	C_BACH2	26060	0.3433	3842	0.35448	4153	-0.10359	6.711E-127
NRF1_MA0506.1	NRF1	MA0506.1	C_NRF1	16640	0.72992	7243	0.70509	6994	0.14308	3.033E-125
Bach1Mafk_MA0591.1	Bach1::Mafk	MA0591.1	C_BACH2	27574	0.36837	4658	0.37973	4915	-0.10426	1.835E-122
MAFNFE2_MA0501.1	MAF::NFE2	MA0501.1	C_BACH2	26962	0.33263	3795	0.34358	4092	-0.1036	3.274E-122
ETV6_MA0645.1	ETV6	MA0645.1	C_ETV4	24202	0.4718	5481	0.47639	5625	-0.09547	2.383E-119
E2F4_MA0470.1	E2F4	MA0470.1	C_E2F6	16760	0.60246	5729	0.58431	5574	0.11696	6.406E-117
HINFP_MA0131.2	HINFP	MA0131.2	C_HINFP	6807	0.59463	2285	0.5729	2218	0.13919	7.386E-114
TFDP1_MA1122.1	TFDP1	MA1122.1	C_E2F6	17779	0.61385	6161	0.59697	6021	0.10236	3.098E-113

204

205 **Table S5:** Enrichment pathways of differential transcription factors.

Panther 2016

Term	Overlap	p-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
TGF-beta signaling pathway Homo sapiens P00052	4/88	1.98E-06	2.97E-05	55.73	731.92	<i>Fosl1; Jun; Jund; Junb</i>
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway Homo sapiens P00031	3/188	9.60E-04	7.20E-03	17.83	123.92	<i>Jun; Jund; Junb</i>
B cell activation Homo sapiens P00010	2/57	1.62E-03	8.09E-03	38.13	245.05	<i>Jun; Fos</i>
T cell activation Homo sapiens P00053	2/73	2.64E-03	9.89E-03	29.52	175.25	<i>Jun; Fos</i>
Interleukin signaling pathway Homo sapiens P00036	2/86	3.64E-03	1.09E-02	24.93	140.01	<i>Spi1; Fos</i>

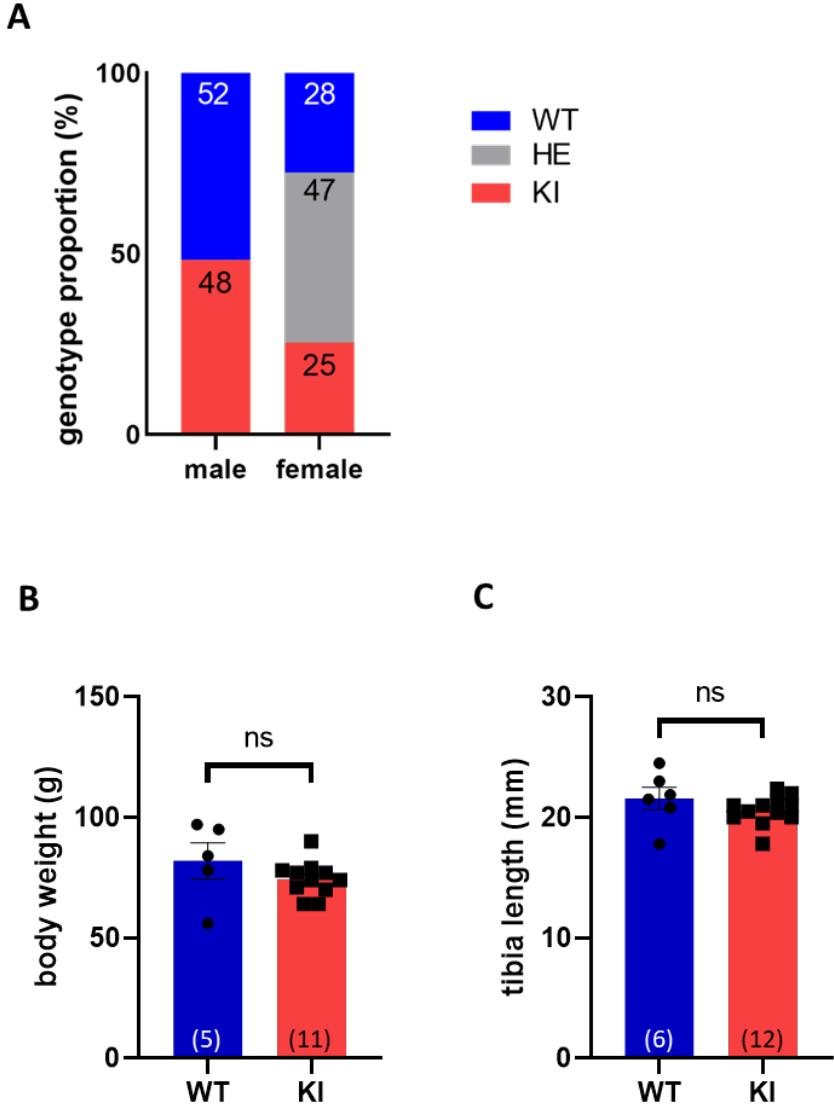
WikiPathway 2021 Human

Term	Overlap	p-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
TGF-beta Signaling Pathway WP366	7/132	5.00E-11	6.45E-09	79.4	1883.7	<i>Jun; Jund; Tfdp1; Fosb; Fos; E2f4; Junb</i>
Corticotropin-releasing hormone signaling pathway WP2355	6/93	4.40E-10	2.84E-08	91.5	1970.3	<i>Fosl1; Jund; Fosb; Fos; Junb; Fosl2</i>
Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway WP2873	4/46	1.42E-07	6.12E-06	111.7	1760.8	<i>Jun; Jund; Junb; Nfe2l2</i>
Photodynamic therapy-induced AP-1 survival signaling. WP3611	4/50	2.00E-07	6.46E-06	102.0	1572.5	<i>Jun; Fos; Junb; Nfe2l2</i>
Hematopoietic Stem Cell Differentiation WP2849	4/55	2.96E-07	7.63E-06	91.9	1382.2	<i>Nfe2; Spi1; Fosb; Fos</i>

206

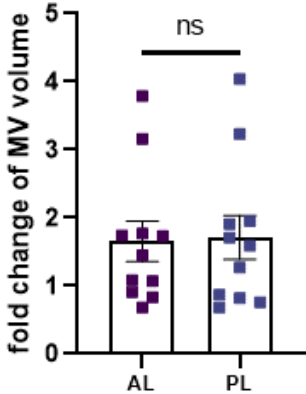
207 **Legend:** Panther 2016 (top) and WikiPathway 2021 Human (bottom) enrichment pathways analyses.

FIGURE S1: Breeding and anthropometric data for 3-week-old rats.



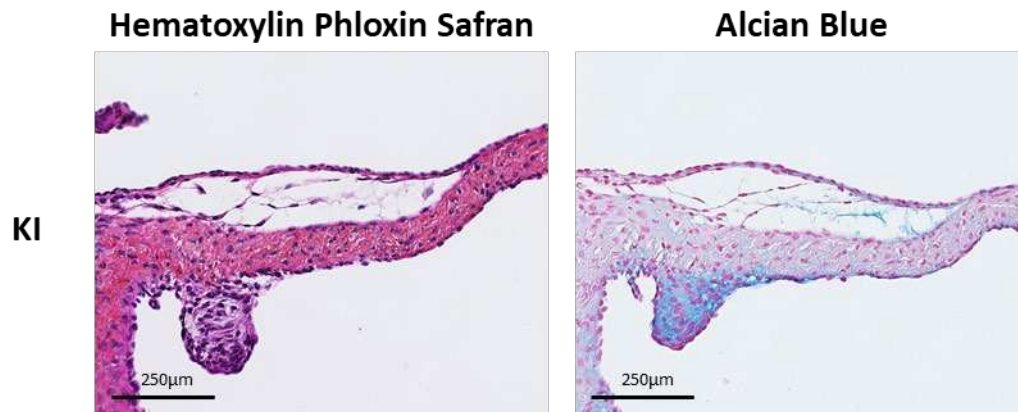
Legend: Panel A shows the proportion of genotype (i.e. KI vs WT) in both sex (n= 106 animal matings). Numbers within the bars are percentages. Body weight (Panel B) and tibia length (Panel C) at 3 weeks. P-values are from the Mann-Whitney test. The number of animals (all as biological replicates) per condition is presented in brackets. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). HE: heterozygous, 3w: 3 weeks, ns: not significant.

FIGURE S2: 3D Mitral valve volume of anterior and posterior leaflets assessed by microCT.



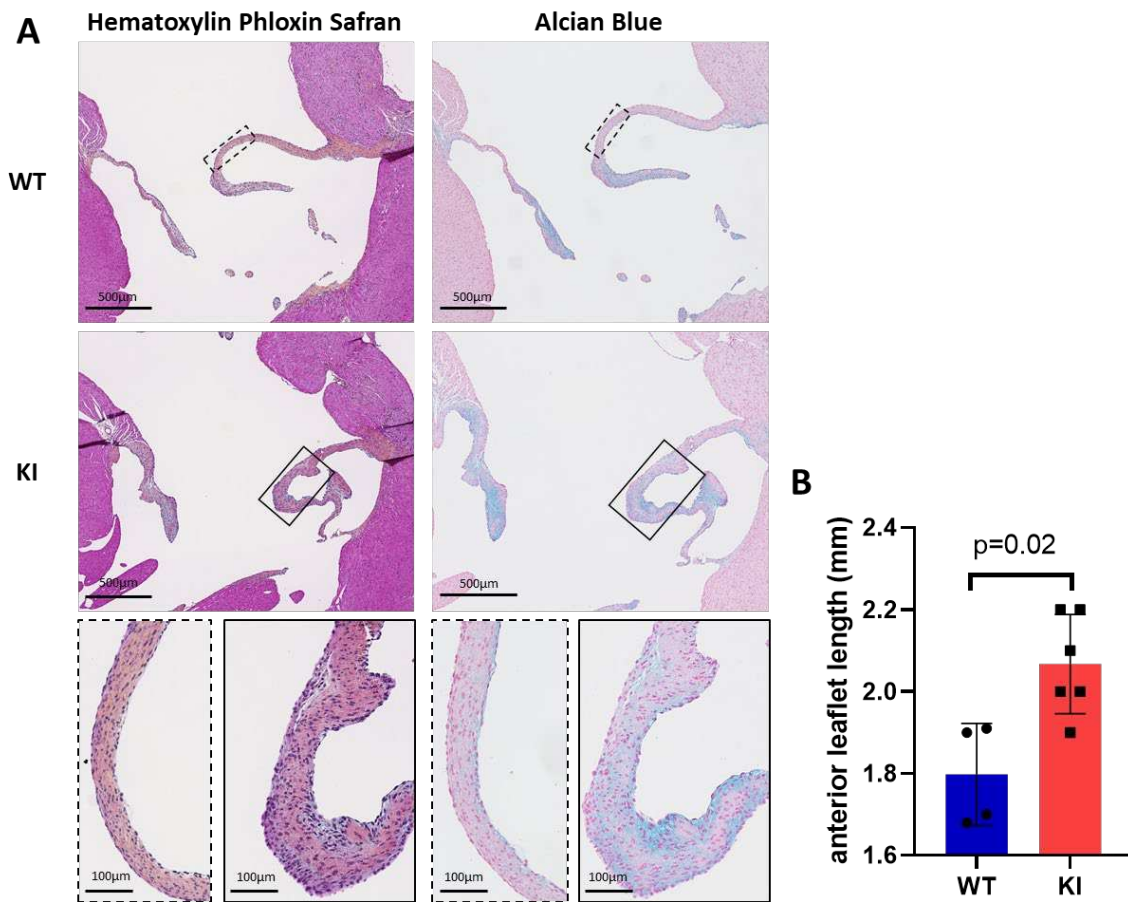
Legend: Increase in microCT-derived leaflet specific MV volume defined as the fold-change between KI and WT littermate animal; these fold-changes were calculated for 11 anterior and posterior leaflets from KI animals (all as biological replicates). P-value is from the Mann-Whitney test. Error bar represents the interquartile range of the median. AL: Anterior Leaflet; PL: Posterior Leaflet.

FIGURE S3: Atypical remodeling of 3-week-old male MV



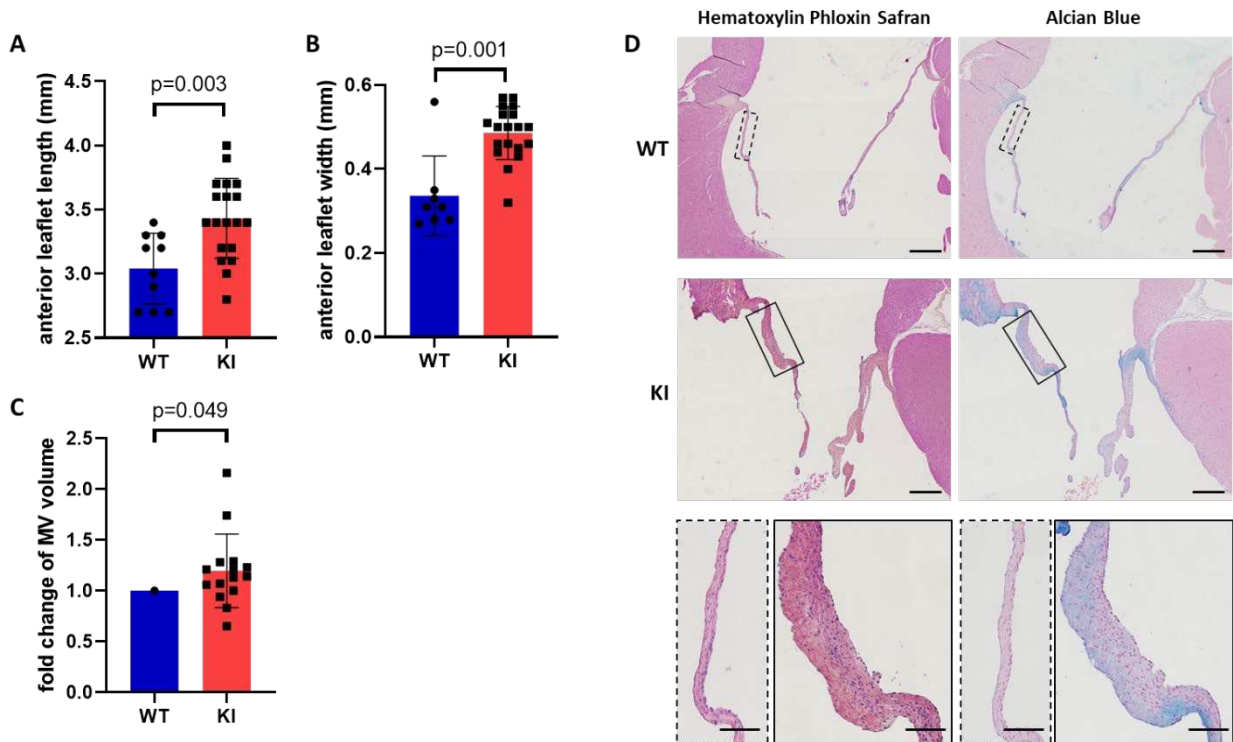
Legend: Standard Hematoxylin Phloxin Eosin and Alcian Blue histological stainings performed in consecutive slides on the MV of atypically remodeled male KI rats. Focal thickening is composed of a mucopolysaccharide-rich matrix of 3-week-old KI male rats. Similar observations were made on KI females.

FIGURE S4: Phenotypic evaluation of 3-week-old female MV.



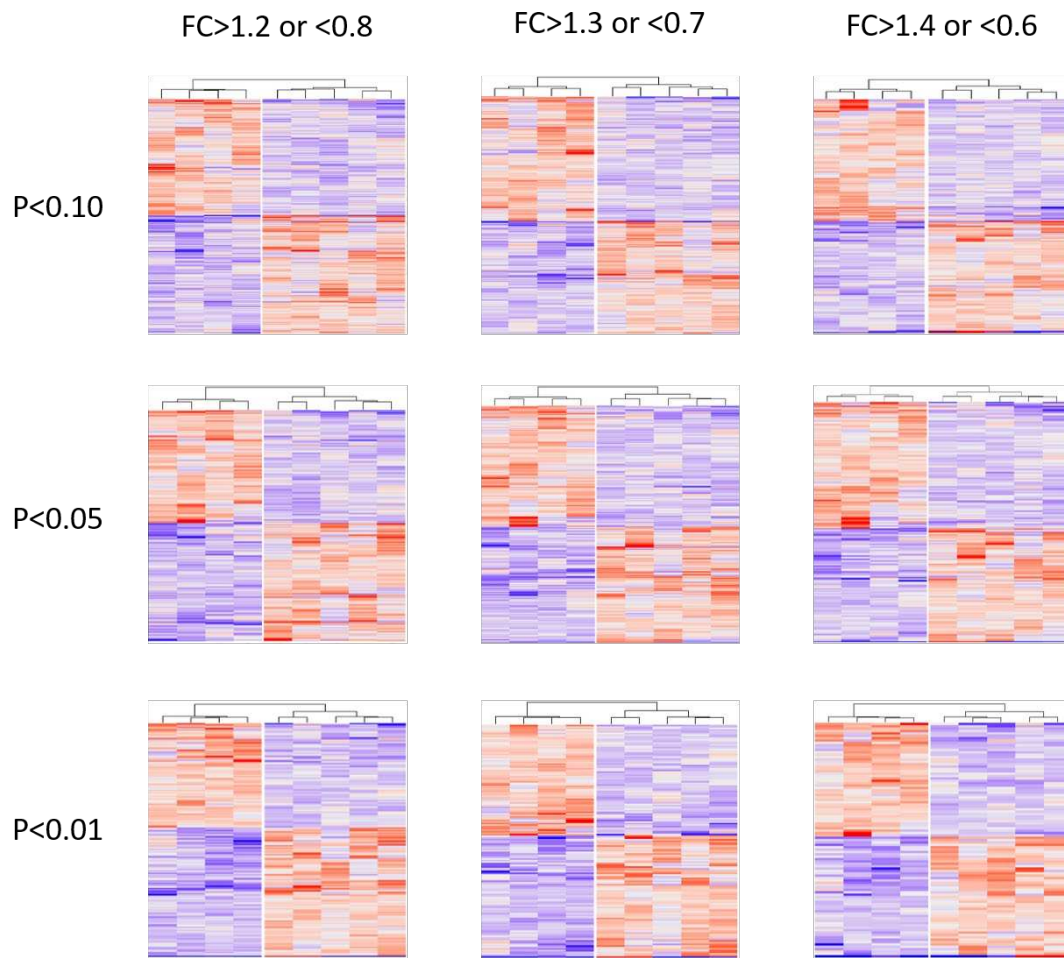
Legend: Standard Hematoxylin Phloxin Eosin and Alcian Blue histological stainings were performed in consecutive slides on the MV of WT and KI female rats. Panel A presents the histological analysis of 3-week-old WT and KI female rats. Female WT rats presented thin leaflets with very little proteoglycans. Female KI rats presented higher proteoglycans content than observed in WT animals. These images are representatives of the cohort of 6 WT and 6 KI rat females (all as biological replicates). Similar to males, echocardiographic measurement of female KI MV revealed longer anterior leaflet compared to WT (2.1 ± 0.12 mm *versus* 1.7 ± 0.12 mm respectively, $p=0.02$; Panel B).

FIGURE S5: Echocardiographic, volumic and histologic assessment of the mitral valve in 3-to-6-month-old WT and KI rats.



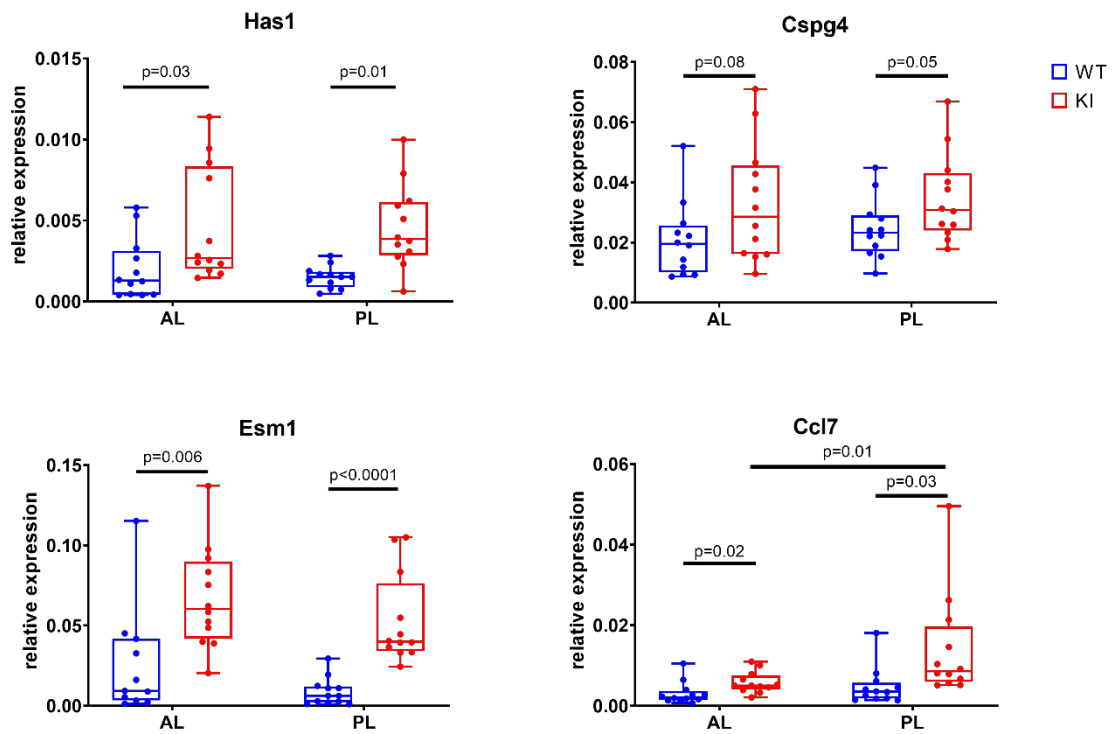
Legend: Mitral valve apparatus was assessed by qualitative and quantitative approaches in 3-to-6-month-old WT and KI rats. Anterior leaflet length and anterior leaflet width, were compared between KI and WT rats (3.43 ± 0.31 mm versus 3.04 ± 0.28 mm, $p=0.003$; and 0.49 ± 0.06 mm versus 0.34 ± 0.09 mm, $p=0.001$; respectively. $n=8-10$ WT and $n=19$ KI; all as biological replicates). Panel C shows the increase in microCT-derived MV volume defined as the fold-change between KI and WT littermate animals; these fold-changes were calculated for 15 KI animals (all as biological replicates, +20%, $p=0.05$). Standard Hematoxylin Phloxin Eosin, and Alcian Blue histological stainings were performed in consecutive slices on the MV of WT and KI rats (Panel D). Lower panel images are area magnifications of the anterior leaflets. WT rats presented very thin leaflets with very few proteoglycans. KI rats presented thick leaflets with an accumulation of proteoglycans. These images are representatives of the cohort of 10 WT and 20 KI rats (all as biological replicates). Four upper panels: scale bar= $500\mu\text{m}$. Two lower panels: scale bar= $100\mu\text{m}$.

FIGURE S6: Sensitivity analyses of the molecular phenotyping



Legend: Transcriptomic sensitivity analyses of n=5 WT *versus* n=4 KI mitral valves (all as biological replicates) at 3-week-old with variations of p-value and Fold Change (FC) thresholds. The heatmaps represent the most differentially expressed genes with $p < 0.10$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ with either i) $FC > 1.2$ or < 0.8 , ii) $FC > 1.3$ or < 0.7 , or iii) $FC > 1.4$ or < 0.6 .

FIGURE S7: Gene expression of selected markers in anterior and posterior MV leaflets from 3-week-old male KI and WT rats.



Legend: Transcript analysis of 12 WT and 12 KI anterior and posterior MV leaflets (all as biological replicates) showing a significant increase expression of *Has1*, *Cspg4*, *Esm1* and *Ccl7* transcripts in KI anterior and posterior MV leaflets as compared to WT. There was no statistical difference in gene expression between AL and PL in WT and KI animals ($p > 0.05$), except for *Ccl7*. AL: anterior leaflet; PL: posterior leaflet.

REFERENCES

1. Remy S, Chenouard V, Tesson L, Usal C, Ménoret S, Brusselle L, Heslan J-M, Nguyen TH, Bellien J, Merot J, De Cian A, Giovannangeli C, Concordet J-P, Anegon I. Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci Rep* 2017;**7**:16554.
2. Chenouard V, Brusselle L, Heslan J-M, Remy S, Ménoret S, Usal C, Ouisse L-H, NGuyen TH, Anegon I, Tesson L. A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. *J Genet Genomics* 2016;**43**:341–348.
3. Zacchigna S, Paldino A, Falcão-Pires I, Daskalopoulos EP, Dal Ferro M, Vodret S, Lesizza P, Cannatà A, Miranda-Silva D, Lourenço AP, Pinamonti B, Sinagra G, Weinberger F, Eschenhagen T, Carrier L, Kehat I, Tocchetti CG, Russo M, Ghigo A, Cimino J, Hirsch E, Dawson D, Ciccarelli M, Olivetti M, Linke WA, Cuijpers I, Heymans S, Hamdani N, Boer M de, Duncker DJ, Kuster D, Velden J van der, Beauloye C, Bertrand L, Mayr M, Giacca M, Leuschner F, Backs J, Thum T, on behalf of the Working Group on Myocardial Function of the European Society of Cardiology. Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function. *Cardiovasc Res* 2021;**117**:43–59.
4. Le Tourneau T, Le Scouarnec S, Cuffe C, Bernstein D, Aalberts JJJ, Lecointe S, Mérot J, Bernstein JA, Oomen T, Dina C, Karakachoff M, Desal H, Al Habash O, Delling FN, Capoulade R, Suurmeijer AJH, Milan D, Norris RA, Markwald R, Aikawa E, Slaughter SA, Jeunemaitre X, Hagege A, Roussel J-C, Trochu J-N, Levine RA, Kyndt F, Probst V, Le Marec H, Schott J-J. New insights into mitral valve dystrophy: a Filamin-A genotype–phenotype and outcome study. *Eur Heart J* 2018;**39**:1269–1277.
5. Kerckhofs G, Stegen S, Gastel N van, Sap A, Falgayrac G, Penel G, Durand M, Luyten FP, Geris L, Vandamme K, Parac-Vogt T, Carmeliet G. Simultaneous three-dimensional visualization of mineralized and soft skeletal tissues by a novel microCT contrast agent with polyoxometalate structure. *Biomaterials* 2018;**159**:1–12.
6. Lauzier B, Sicard P, Bouchot O, Delemasure S, Menetrier F, Moreau D, Vergely C, Rochette L. After Four Hours of Cold Ischemia and Cardioplegic Protocol, the Heart Can Still Be Rescued With Postconditioning. *Transplantation* 2007;**84**:1474–1482.
7. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017;**7**:16878.
8. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;**9**:676–682.
9. Legland D, Arganda-Carreras I, Andrey P. MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinforma Oxf Engl* 2016;**32**:3532–3534.
10. Picelli S, Faridani OR, Björklund ÅK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 2014;**9**:171–181.

11. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;**15**:550.
12. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS J Integr Biol* 2012;**16**:284–287.
13. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012;**9**:357–359.
14. Ramírez F, Dündar F, Diehl S, Grüning BA, Manke T. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:W187–W191.
15. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS. Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 2008;**9**:R137.
16. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 2014;**30**:923–930.
17. Landt SG, Marinov GK, Kundaje A, Kheradpour P, Pauli F, Batzoglou S, Bernstein BE, Bickel P, Brown JB, Cayting P, Chen Y, DeSalvo G, Epstein C, Fisher-Aylor KI, Euskirchen G, Gerstein M, Gertz J, Hartemink AJ, Hoffman MM, Iyer VR, Jung YL, Karmakar S, Kellis M, Kharchenko PV, Li Q, Liu T, Liu XS, Ma L, Milosavljevic A, Myers RM, Park PJ, Pazin MJ, Perry MD, Raha D, Reddy TE, Rozowsky J, Shores N, Sidow A, Slattery M, Stamatoyannopoulos JA, Tolstorukov MY, White KP, Xi S, Farnham PJ, Lieb JD, Wold BJ, Snyder M. ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome Res* 2012;**22**:1813–1831.
18. *ENCODE ATAC-seq pipeline*. ENCODE DCC; 2021.
19. Stark R, Brown G. *DiffBind: Differential Binding Analysis of ChIP-Seq Peak Data*. Bioconductor version: Release (3.14); 2021.
20. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;**26**:139–140.
21. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H, Glass CK. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* 2010;**38**:576–589.
22. Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Charkhchi M, Cummins C, Da Rin Fioretto L, Davidson C, Dodiya K, El Houdaigui B, Fatima R, Gall A, Garcia Giron C, Grego T, Guijarro-Clarke C, Haggerty L, Hemrom A, Hourlier T, Izuogu OG, Juettemann T, Kaikala V, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Gonzalez Martinez J, Marugán JC, Maurel T, McMahon AC, Mohanan S, Moore B, Muffato M, Oheh DN, Paraschas D, Parker A, Parton A, Prosovetskaia I, Sakthivel MP, Salam AIA, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Steed E, Szpak M, Szuba M, Taylor K, Thormann A, Threadgold G, Walts B, Winterbottom A, Chakiachvili M, Chaubal A, De Silva N, Flint B, Frankish A, Hunt SE, Ilesley GR, Langridge N, Loveland JE, Martin FJ, Mudge JM, Morales J, Perry E, Ruffier M, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Cunningham F, Yates AD, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res* 2020;**49**:D884–D891.
23. Machanick P, Bailey TL. MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 2011;**27**:1696–1697.

24. Bentsen M, Goymann P, Schultheis H, Klee K, Petrova A, Wiegandt R, Fust A, Preussner J, Kuenne C, Braun T, Kim J, Looso M. ATAC-seq footprinting unravels kinetics of transcription factor binding during zygotic genome activation. *Nat Commun* 2020;**11**:4267.
25. Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, Feng T, Zhou L, Tang W, Zhan L, Fu X, Liu S, Bo X, Yu G. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation* 2021;**2**:100141.
26. R: The R Project for Statistical Computing <https://www.r-project.org/> (25 November 2021)
27. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool | BMC Bioinformatics | Full Text <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-14-128> (25 November 2021)
28. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**:W90-97.
29. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, Clarke DJB, Evangelista JE, Jenkins SL, Lachmann A, Wojciechowicz ML, Kropiwnicki E, Jagodnik KM, Jeon M, Ma'ayan A. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr Protoc* 2021;**1**:e90.

Chapitre 5 : Papier 2 – Implication des cellules immunitaires dans le processus de développement de la dystrophie valvulaire mitrale

5.1 Introduction

L'étude transcriptomique réalisée sur des valves mitrales de rats âgés de 3 semaines a mis en évidence l'implication des cellules immunitaires dans la DVM. Plus de 30% des GO-terms associés à la pathologie se rapportaient à cet axe. Ainsi, j'ai focalisé la suite de mes travaux de doctorat sur le rôle des cellules immunitaires et particulièrement des cellules myéloïdes dans le processus physiopathologique associé au développement de la DVM.

Grâce à l'aide précieuse de la plateforme de cytométrie en flux et de tri cellulaire, Cytocell, j'ai développé un protocole permettant la caractérisation des populations cellulaires présentes au sein des feuillets mitraux. Les proportions de CIVs, CEVs et cellules myéloïdes, ainsi que la localisation de ces dernières ont été analysées à 21 jours (J21) et 7 jours (J7). Le phénotypage mitral à J7 a également été réalisé.

Ce deuxième papier en cours de finalisation fera l'objet d'une deuxième publication en 1^{er} auteur.

5.2 Manuscrit

Filamin-A Knock-In Rat Model: new insights into the contribution of macrophages in MVD

Constance Delwarde, MSc¹, Benjamin Le Vely, MSc¹, Claire Toquet, MD, PhD², Pascal Aumond, BSc¹,
Séverine Rémy, PhD³, Jean-Jacques Schott, PhD¹, Thierry Le Tourneau, MD, PhD², Elvira Mass, PhD⁴,
Jean Merot, PhD^{1*}, Romain Capoulade, PhD^{1*}

¹Nantes Université, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France

²Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France

³INSERM UMR 1064-CR2TI, Transgenic Rats ImmunoPhenomic, Nantes, France

⁴Developmental Biology of the Immune System, Life & Medical Sciences (LIMES) Institute, University of Bonn; 53115 Bonn, Germany

* senior authors contributed equally

Address for correspondence:

Romain Capoulade, PhD
L'institut du thorax, Inserm U1087/CNRS U6291
IRS-UN, 8 quai Moncousu, BP 70721
44007 Nantes Cedex 1
Email : romain.capoulade@univ-nantes.fr

Or,

Jean Mérot, PhD
L'institut du thorax, Inserm U1087/CNRS U6291
IRS-UN, 8 quai Moncousu, BP 70721
44007 Nantes Cedex 1
Email : jean.merot@univ-nantes.fr

ABSTRACT

Aims: Mitral valve dystrophy (MVD) is an outgrowing disease, however little is known regarding the involved pathophysiological mechanisms. We have previously generated a unique knock-in (KI) animal model bearing the FlnA-P637Q mutation associated with MVD in humans and demonstrated that 3-week-old (D21) KI rats develop MVD with similar features to those in humans. At D21, one of the main signaling pathways identified referred to immune cell recruitment. In order to get insight into the role of leukocytes and their recruitment in the pathophysiology of MVD, we assessed the presence of MVD at the earlier time point D7 (7-day post-natal) and quantified valvular immune cell population at both D7 and D21 to evaluate their contribution.

Methods and Results: WT and KI rats were studied at D7 and D21. Cytometry was performed to determine the nature and the proportion of cell subpopulation at each time-points. Macroscopic evaluation and classical histology were performed at D7 to evaluate the MV remodeling. Concordant with the RNA-seq data at D21, cytometry experiments revealed a 2-fold increase in the proportion of myeloid cells in MV from KI animals compared to WT (13% vs 7% respectively; $p < 0.05$). These cells were located in line with the atrial border of the MV leaflet in WT rats, but more diffusely into the leaflet in KI animals. The MV phenotyping at D7 confirmed the presence of MVD, but no difference was observed in myeloid cell proportion at this younger age (6% vs 6% for WT and KI animals, respectively; $p = 0.63$). Expression levels of typical extracellular matrix markers (*Has1* +8.3x in KI, $p = 0.001$ and *Hyal1* -0.6x in KI, $p = 0.008$) and endothelial activation (*Esm1* +2.1x in KI, $p = 0.005$), as well as inflammatory markers (*S100a8* +2.4x in KI, $p = 0.02$; and *Ccl7* +2.7x in KI, $p = 0.2$), confirmed the activation of interstitial and endothelial cells in KI animals and the pro-inflammatory valve environment.

Conclusion: In the FlnA-P637Q rat model, the development of a myxomatous MVD at D7 precedes the recruitment of myeloid cells observed at later stage (D21). The pro-inflammatory environment

associated with MVD at D7 most probably determines leucocyte recruitment through complex cellular cross-talk that needs to be further studied to decipher the molecular mechanisms leading to MVD.

ABBREVIATIONS

AB: alcian blue

CCL: cc chemokine ligand

ECM: extracellular matrix

EF: ejection fraction

EMT: endothelial to mesenchymal transition

HSC: hematopoietic stem cell

FC: fractional shortening

FlnA: Filamin A

HPS: hematoxylin phloxin safran

KI: knock-in

LA: left atrium

LV: left ventricle

MMP: matrix metallo proteinase

MV: mitral valve

MVD: mitral valve dystrophy

MVP: mitral valve prolapse

SEM: standard error to the mean

TGF- β : transforming growth factor β

VEC: valvular endothelial cell

VEGF: vascular endothelial growth factor

VIC: valvular interstitial cell

WT: wild type

1. Introduction

Mitral valve dystrophy (MVD) is one of the most common valvular heart diseases affecting 2 to 5% of the population.¹ Myxomatous MVD, which is characterized by an elongated and thickened MV with accumulation of proteoglycans, is the main etiology observed in patients with primary mitral regurgitation.² To date, our understanding of the pathophysiological mechanisms leading to this disease remains limited and patients with severe and symptomatic forms are referred to mitral valve surgery.^{3,4}

Since many years, MV is described as a complex tissue composed by an extracellular matrix (ECM) structured in three layers and populated by valvular interstitial cells (VICs, described as fibroblast-like cells) which are in charge of the homeostasis of the valve, as well as valvular endothelial cells (VEC) surrounding the valve. More recently, the presence of immune cells has been highlighted in the context of healthy valve and myxomatous MVD.⁵⁻¹⁰ As also reported for VIC and VEC, the population of immune cells observed in the MV, mainly described as macrophages, is heterogeneous.¹¹ This could be explained, at least in part, by the different origin of these cells (embryonic source or hematopoietic CD45⁺ cells)^{6,12,13}, as well as by a potential effect of the valve microenvironment on their phenotype/activation.

Even if the role of the macrophages has been well described during valvulogenesis, little is known on the prevalence, role and function of these “resident” immune cells originating from the hemogenic endocardium after birth.^{6,12,14-16} On the other hand, recent studies established that 8 to 10% of adult valvular cells are hematopoietic CD45⁺ cells, and reported a specific role of these “recruited” macrophages in the physiological development, maturation and homeostasis of the valve, as well as in their involvement in the pathophysiological mechanisms leading to MVD, both in human and murine models.^{5-10,15}

The analysis of knock-out mice models exhibiting myxomatous-like valve dystrophy reported a consistent increase in macrophages into the valves.^{8,17} Interestingly, in the context of myxomatous

MVD related to Marfan syndrome, depletion of myeloid cells protect against MVD progression over time.¹⁸ In addition, inflammatory ECM and chemokine activity arose as potential trigger for valve remodeling and MVD progression.^{6,17} However, there is still controversies regarding the specific role of macrophages in the initiation and/or evolution of the disease.

We recently generated the first rat model for non-syndromic myxomatous MVD: the Filamin-A knock-in (KI) rat.¹⁹ Thanks to a transcriptomic study performed at 21-day post-birth (D21), we reported the involvement of multiple pathophysiological processes including response to stress, endothelial to mesenchymal transition and a central role for immune cells. Indeed, 30% of the GO-terms differentially expressed in mutated MV as compared to WT referred to this pathway.

In the current study, we aimed to evaluate the contribution of myeloid cells, and particularly macrophages, in the initiation and/or progression of MVD, based on the analysis of our unique KI FlnA-P637Q rat model of non-syndromic myxomatous MVD.

Cytometry, immunohistochemistry and qPCR analyses revealed that myeloid cell proportion is increased in KI animals at D21, but not at the earlier stage of D7 when a pro-inflammatory micro-environment is nonetheless already present simultaneously with MVD.

2. Methods

2.1 Rats

The rat model used in this study has been previously described.¹⁹ Briefly, Sprague-Dawley FlnA-P637Q Knock-In (KI) rats were engineered using Crispr/Cas9 methods.²⁰ In the present study, 7-day (D7) and 21-day (D21) post-natal KI and Wild-Type (WT) rats were analyzed by investigators blinded for the animal's genotype.

2.2 Cytometry

Anterior and posterior MV leaflets from at least 7 littermate rats for each genotype were dissected and pooled to generate one biological sample. Digestion of MV was performed using a solution of HBSS

(Sigma, H1641), 1,2U/mL Dispase II (Sigma D4693-1G) and 2mg/mL Collagenase IV (Worthington LS004188) for 45 min at 37°C. Cells were filtered on 40µm sieve before 2 washing cycles in HBSS, 2%FBS with centrifugation cycles (4°C for 5' at 400 x g). Fc Block (Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™), 10µg/mL) was added to the cells to avoid non-specific staining, and then isolated cells were stained with antibodies (Abs) presented in the Table 1, for 1h at 4°C under rotation. Cells were finally washed 3 times in FACS Buffer (PBS, FBS 2%, EDTA 1mM) (centrifugation cycles at 4°C for 5', 400 x g), before adding Dapi to assess viability.

To compensate fluorescence spectral overlap, controls were prepared using Ultracom eBeads Plus (Invitrogen, 01-3333-42), for each Ab of the panel, according to the manufacturer's protocols.

Flow cytometry was conducted using a Symphony A5.2 Flow Cytometer (BD Biosciences). FCS 3.0 files were processed using BD FACSDiva™ v8.5 software. For flow cytometric analyses, cell doublets were gated out using FSC-A vs FSC-H and SSC-A vs SSC-H followed by Dapi staining exclusion to identify live cells on viable (Dapi-) single cells (Figure 1). Then viable single cells were gated on CD45 to analyze the proportion of total CD45⁺ leukocyte within the MV. As presented Figure 1, viable single cells were also gated on CD206 and/or CD11b expression to identify myeloid cells. The CD206, CD11b negative cells were then gated on CD31 (i.e. VEC) and CD34 (i.e. progenitor cells). Then, CD45⁺ cells were finally gated (i.e. defined as "other hematopoietic-derived cells") before the rest of the cells, negative for all markers, were considered as VICs. Indeed, to our knowledge, no specific marker is available to identify and quantify VIC by cytometry. Flow cytometric analyses were performed on FlowJo Software (Tree Star, Ashland, USA). Flow cytometry was performed on 9 (for WT) and 7 (for KI) different pools of MV.

2.3 Immunofluorescence

For immunofluorescence staining, serial histological slides were deparaffined and rehydrated before antigen retrieval in Citrate buffer pH6.2, and saturation in 2% BSA (bovine serum albumin). Primary Abs were used to identify macrophages (i.e. CD206 Ab), hematopoietic stem cells (i.e. CD45 Ab) and VECs (i.e. CD31 Ab) (see complete list of Abs, references and specific dilution in Table 2). All primary

Abs were incubated at 4°C overnight. Nuclei were stained with Hoechst. All images were captured using Tie2 microscope (Zeiss).

2.4 Standard histological staining

After harvesting, hearts were fixed in 10% formalin for 48 hours, dehydrated, cleared in xylene and embedded in paraffin. 3µm thick slides were sectioned using a microtome and serial slides were stained. Standard histology staining was performed for Hematoxylin Phloxin Safran (HPS: Hematoxylin cp813, Diapath; Phloxin pb-p-25, Biognost; Saffron 27481.105, VWR) and Alcian Blue (c0053, Diapath; pH2.5). The slides were examined under light microscopy and scanned using NanoZoomer Hamamatsu. As previously defined,¹⁹ several histological features (i.e. leaflet thickness, free edge and medial part thickness, cellular turgescence, leaflet immaturity) were used to qualitatively recognize myxomatous MVD. Histological score presented in Table 3 was build to assess the remodeling of the MV, on 16 WT and 15 KI animals.

2.5 RNA isolation, cDNA synthesis, primer design and qPCR

WT and KI mitral valve leaflets (i.e. both anterior and posterior leaflets) were dissected, snap-frozen and stored at -80°C before RNA extraction using the miRNeasy mini kit (Qiagen). Quality control was performed using the NanoDrop with a 260/280 ratio of 1.8-2.2 being acceptable. cDNA transcription was conducted using the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) and the following protocol: 25°C 10', 37°C 120', 85°C 5' and cooled to 4°C. cDNA were stored at -80°C until amplification by real-time semi-quantitative PCR (qPCR).

Specific primer targeting relevant genes involved in the pathophysiological pathways as identified in our previous study¹⁹ were designed using Primer3Plus and included *Ccl7*, *Cspg4*, *Esm1*, *Gapdh*, *Has1*, *Hyal1*, *S100a8* (Table 4).

The qPCR reaction was performed using the Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 times at 95°C for 15 sec. followed by 60°C for 1 min. Melting

curve (95°C for 15 sec and 60°C for 15 sec) was performed at the end of the last cycle to assess the amplification specificity. Results of gene expression were processed under SDS2.2 software. Ct raw data were adjusted between runs thanks to an interplate calibrator. For each marker, delta Ct was calculated on the housekeeping gene Gapdh. Log2 transformation was applied to transform the data to a linear scale.

2.6 Statistics

Data are presented as means \pm standard deviation (SD) or median (IQR), as appropriate. Mann-Whitney test have been used to assess the difference of cellular proportion and the relative transcript expression between WT and KI animals at D7.

Data were analyzed using GraphPrism software, v8. A p-value <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 Mitral valve of 21-day-old KI rat present an increased proportion of immune cells

Cytometry experiments evaluating the proportion of different cell subtypes within MV tissue are presented Figure 2A. Concordant with previous studies, VICs turned out to be the major MV cell population without any difference between genotypes (81% \pm 7% in WT *versus* 75% \pm 8% in KI; $p=0.16$). As expected and previously described, CD31⁺ VECs represented the second most important cell population of WT MVs. Similar proportion of VECs was also present in KI animals (9% \pm 3% *versus* 9% \pm 3%, respectively; $p=0.68$). Also, CD34⁺ progenitors only represent a small relative proportion of MV cells: 1.0% \pm 0.2% in WT *versus* 1.2% \pm 0.8% in KI animals, $p=0.20$.

Importantly, significant differences between immune cell population was detected between genotype (Figure 2A). The proportion of hematopoietic CD45⁺ cells was significantly more important in KI as compared to WT MV: 13% \pm 5% vs 9% \pm 3%, $p=0.04$. Interestingly, 90% of these CD45⁺ cells were from myeloid lineage (i.e. CD45⁺ and [CD11b⁺ and/or CD206⁺] cells). Consistently, the proportion of CD11b⁺ and/or CD206⁺ myeloid cells was significantly higher in KI vs WT MV (13% \pm 6% in KI animals *versus* 7%

$\pm 5\%$ in WT animals; $p=0.05$). Immune non-myeloid cells (i.e. $CD45^+ CD11b^-$) are pooled and represented as “other hematopoietic-derived cells”.

Overall, cytometry experiments revealed the presence of increased immune cell proportion in KI MV compared to WT.

We observed by immunofluorescence that leukocytes (i.e. $CD45^+$) were mostly myeloid cells as stained by $CD206^+$ (Figure 2B-E'). We also found an increase in $CD45^+$ cells and in $CD206^+$ cells in KI animals, and interestingly differences in positive cell location, between WT (Figure 2B', C') and KI (Figure 2D', E') animals (Figure 2B', C', D', E'). $CD45^+$ cells and $CD206^+$ cells were lining the sub-endothelial layer of the atrialis, and mainly appeared in the medial part of the leaflet, both in WT and KI animals (Figure 2D, E'). However, they were more frequently found and invading the inner tissue in KI animals (Figure 2D', E'), compared to WT. Some macrophages were also found in the ventricular side of KI animals, area of turbulent shear stress (Figure 2D', E').

3.2 Seven-day-old KI rats exhibit myxomatous mitral valve dystrophy

In order to decipher whether the increased proportion of immune cells observed at D21 was the cause or the consequence of MVD, 7-day-old rats were analyzed. Macroscopic observation of MV showed heterogeneous thickening of both anterior and posterior leaflets in KI animals compared to WT (Figure 3A). Further histological analysis of the MV leaflets showed that WT animals display thin MV with light proteoglycan content (Figure 3B). The two proximal thirds were organized in layers (predominantly fibrosa and/or atrialis) with the presence of collagen. The last third displayed a physiological distal enlargement with few collagen and lack of cellular organization, revealing a certain immaturity of the leaflet at this younger age. As opposed to WT, KI animals presented thickened MV (80% of KI *versus* 37% of WT animals), mostly in the medial and the free edge part of the leaflets. In these areas, turgescient VECs were found in 83% of KI compared to 44% of WT animals. These turgescient VECs co-localized with micro-nodules of proliferation where inflammatory cells were also present. Layers were not well defined in KI leaflets and there were few collagens along the leaflets. The accumulation of

proteoglycans, which was a typical marker of myxomatous MVD in KI animals at later stage (D21), was also detected by Alcian Blue staining at D7 (Figure 3B).

Nevertheless, the MV remodeling in KI animals was heterogeneous. Indeed, some KI rats presented discrete leaflets thickening and relatively well organized layers containing collagen, suggestive of an early stage of the disease. In order to better quantify MVD at D7, a histological score based on qualitative and semi-quantitative criteria was used (Figure 3C and Table 3). According to these criteria, KI animals exhibited a significantly higher score compared to WT animals (6 ± 1.8 versus 3 ± 1.5 ; $n=16$ both KI and WT; $p<0.001$).

To determine whether the MV remodeling at D7 was also associated to the molecular markers we identified at D21, we performed qPCR experiments on whole MV of D7 animals. Interestingly, at D7, markers of endothelial dysfunction (*Esm1*) and ECM remodeling (*Hyal1* and *Has1*) exhibited the same expression pattern observed in WT *versus* KI animals at the latter stage (i.e. D21) (Figure 3D). *Esm1* expression more than doubled in KI animals compared to WT ($3.21 [2.82-3.54]$ *versus* $1.53 [0.79-2.22]$ respectively; $p=0.005$). *Hyal1* expression was significantly lower in KI animals compared to WT ($0.62 [0.55-0.72]$ *versus* $0.93 [0.89-1.14]$ respectively; $p=0.008$) whereas *Has1* expression was 8 times higher in KI MV compared to WT ($7.74 [4.37-11.01]$ *versus* $0.93 [0.81-1.32]$ respectively; $p=0.001$). On the other hand, *Cspg4* expression was not different between KI and WT animals ($0.94 [0.29-1.14]$ *versus* $0.95 [0.82-1.16]$ respectively; $p=0.90$).

Overall, our data showed that the myxomatous MVD is already present at D7 and exhibit the same phenotypic traits and molecular markers as those observed at D21.

3.3 Seven-day-old KI myxomatous MV exhibit an inflammatory micro-environment but no increased proportion of immune cell

Cytometry experiments evaluating the proportion of different cell subtypes within MV tissue at D7 are presented Figure 4A. As opposed to the data observed at D21, similar proportion of CD11b⁺ myeloid

cells were quantified in WT and KI MV (6% \pm 3% versus 6% \pm 2%, respectively; $p=0.46$). On the other hand, neither VICs nor CD31⁺ VECs proportion differed between WT and KI animals (respectively 87% \pm 4% versus 86% \pm 8%; $p=0.74$, for VICs and 7% \pm 2% versus 8% \pm 3%; $p=0.38$, for VECs). Similar to D21, only rare CD34⁺ cells were found in both conditions (0.4% \pm 0.1%; Figure 4A).

As presented Figure 4B-E', the localization of immune cells (CD45⁺ and CD206⁺) within MV tissue was similar between genotypes. Cells were preferentially located in the sub-endothelial layer in the atrialis side of the medial third and at the free edge of both leaflets (Figure 4B', C', D', E').

qPCR experiments revealed the presence of a pro-inflammatory micro-environment in KI MV with the increased relative expression of *S100a8* (2.4 [1.6-7.6] in KI versus 1.0 [0.7-1.3] in WT, $p=0.02$; Figure 4F). Also, there was a trend for an increase in *Ccl7* expression in KI valves (1.9 [1.1-3.2] in KI versus 0.7 [0.7-1.6] in WT; $p=0.2$; Figure 4F).

Overall at D7, the myxomatous phenotype in KI animals is simultaneously found with a pro-inflammatory environment, without any variation in the leukocyte nor specifically myeloid cell proportion or location within the MV leaflet.

4. Discussion

This study showed an increase in myeloid cells at D21 in the unique FlnA-P637Q rat model of non-syndromic MVD. The phenotypic and molecular analyses undertaken at D7 post-natal revealed the presence of MVD associated to a pro-inflammatory micro-environment, but not yet an increased proportion of myeloid cells, as observed at D21. These findings support the role of myeloid cells, and specifically macrophages, in MVD, even if the underlying pathophysiological mechanisms and their specific contribution in the initiation and/or progression of the disease needs to be defined.

4.1 MVD implies myeloid cells in 3-week-old rats

Different cell populations were described in healthy and pathological MV tissue, each of them participating to the development, maturation and homeostasis of the valve.^{6,12,14-16} Myxomatous MVD

is mainly characterized by ECM remodeling with accumulation of proteoglycans, and until recently, most of the studies looking at this disease were focused on the role of VICs to unravel the pathophysiological mechanisms related to these processes. Data highlighting the role of myeloid cells, and especially macrophages, in the development of myxomatous MVD have recently emerged.^{6,12,18} Taking advantage of our unique FlnA-P637Q KI rat model of non-syndromic MVD and the recent transcriptomic analysis highlighting chemotaxis and immune cell response as one of the main pathways leading to MVD,¹⁹ we aimed to study the contribution of these cells in this disease.

At D21, FlnA-P637Q KI animals presented a myxomatous MV phenotype¹⁹ which is concomitant with a 2-fold increase in the proportion of myeloid cells (i.e. 90% of the recruited hematopoietic cells were from myeloid lineage) compared to control animals. These findings confirmed previous data reported in mice model of bone marrow transplant and syndromic myxomatous MVD, and support a contribution of these cells in the pathophysiological mechanism leading to non-syndromic MVD.^{5,8,17,18,21} However, their specific role and the underlying mechanisms associated with the development and/or the progression of the disease remain completely unknown.

In the study of the mice model of Marfan syndrome exhibiting myxomatous MVD, Kim and collaborators reported an increase in both “recruited” and “resident” macrophages associated to pro-inflammatory ECM environment.¹⁸ Interestingly and as also observed in FlnA-P637Q model of non-syndromic MVD, macrophages subsets are specifically localized along the MV in the sub-endothelial layer on the flow side in WT animals, whereas they invaded MV tissue in diseased valve. This specific location could suggest an interrelationship between mechanical stresses imposed to the MV leaflets, and especially shear stress on VECs, and macrophages localization in the valve. As the MV remodeling evolves over time with the disease, the mechanical stresses increase all around the MV, which could lead to a more diffuse location of macrophages in MVD. Some features of this phenomenon, that could be described as a response to the changes in stresses imposed to the tissue, were clearly observed in MV of the FlnA-P637Q rats. One of the other hypotheses to explain the increase in myeloid cells could

be related to the pro-inflammatory ECM components, such as hyaluronic acid binding protein, that interacts with macrophages and then triggers immune response based on ECM remodeling.²² Interestingly, in the KI FlnA-P637Q rats, we reported hyaluronan dysregulation: indeed, the decreased expression of *Hyal1* coding for hyaluronidases (i.e. enzyme involved in hyaluronan degradation) and the increased expression of *Has1* (i.e. hyaluronan synthase) in KI animals, could also support the interrelationship between ECM remodeling with increased proteoglycan, and exacerbated immune response leading to the recruitment and activation of macrophages.

All these data suggest a complex interaction between stresses imposed to the leaflets, ECM remodeling and MV cells, including VIC and VECs, as well as a process of macrophages recruitment and/or activation. However, further studies are needed to dissect these specific points, as well as to determine whether macrophages are involved in the initiation of the disease and/or its progression.

4.2 Myeloid cells in early stage of MVD: which role for macrophages?

To unravel whether the increasing proportion of myeloid cells in KI MV observed at D21 is a cause or a consequence of the remodeling, we studied earlier stage of the disease: rats were phenotyped and MV cells were characterized at D7. Our investigation revealed the presence of a myxomatous MVD in 7-day-old KI rat, with similar features as observed at D21. However, no difference in the proportion of myeloid cells was reported in these juvenile rats. Because the increase in myeloid cells occurs after initial MV remodeling, it is likely that these immune cells contribute to progression of MVD, rather than its initiation. These data are in line with the recent findings published in syndromic MVD: indeed, using monocyte-derived macrophages deficient mice coupled with Marfan syndrome mice, Kim and colleagues showed that deficiency in “recruited” macrophages was associated with an inhibition of the progression of the myxomatous MV disease in this context.¹⁸

In another hand, we reported pro-inflammatory environment characterized by the increased expression of *S100a8* and *Ccl7* in KI MV as compared to WT at D7. These data suggest a potential activation of immune cells, with local production of inflammatory cytokines, at this early stage, that

could in turn participate to the recruitment of immune cells. However, whether this potential macrophage activation is the main trigger for the recruitment of macrophages remains to be studied.

Interestingly, activated VECs were also reported in KI MV at this early stage (i.e. turgescient cells and increase in the expression of *Esm1*). This activation of VECs could also participate to the pathophysiological processes, as these cell types were consistently reported as mediators of ECM remodeling in valve diseases, and also because activated VECs could exacerbate the recruitment of circulating monocytes by expressing endothelial cell adhesion molecules. The specific cross-talk between VECs and macrophages activation in MVD, with the ECM remodeling and then the activation of VICs should be investigated in order to determine the initial phenomenon leading to MVD and then identify pivotal target for this disease.

4.3 Limits

One of the inherent limitations of cytometry experiment is the choice of Abs panel, that did not allow us to clearly identify all cell population presented into the valve. In this study focused on immune cells, 10% of CD45⁺ cells were non-myeloid cells (CD11b⁻ CD206⁻) and were not specifically characterized. This subset of CD45⁺ cells was certainly heterogeneous, however mainly composed by lymphoid or dendritic cells.^{6,23} However, their proportion remains stable in both genotype and myeloid cells, in which we focused our studies, were recently identified as the most important player in myxomatous diseases.^{6,18,21}

Moreover, the diversity of VICs was not appreciated because of the negative selection of these cells. This could also be reported for VECs, where subpopulations with different profiles have been recently described.⁶ To overpass these limitation, single-cell approaches would be useful, however, these was out of the scope of the current study.

4.4 Conclusion

In the current study using the FlnA-P637Q KI rat model, we reported the development of a myxomatous MVD at D7 that precedes the recruitment of myeloid cells observed at later stage (D21). We also revealed the presence of a pro-inflammatory environment associated with MVD at D7, which likely contributes to leukocyte recruitment through complex cellular mechanisms and cross-talk that need to be further studied to decipher the molecular mechanisms leading to myxomatous mitral valve disease.

Funding: The present study has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 846291 and from the French Society of Cardiology under the “Alain Castaigne” scientific prize, both awarded to RC. RC is also supported by a “Connect Talent” research chair from Région Pays de la Loire and Nantes Métropole. EM is funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany’s Excellence Strategy – EXC2151 – 390873048.

Acknowledgments: We thank the Cytometry Facility Cytocell from Nantes for expert technical assistance. We acknowledge the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), a member of the national infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04). We also acknowledge the Therassay and the UTE facilities of the Structure Fédérative de Recherche François Bonamy (Nantes, France) for technical assistance.

Conflict of interest: The authors have reported no relationship relevant to the content of this paper to disclose.

References

1. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *The Lancet* 2006;**368**:1005–1011.
2. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, Boehme AK, Buxton AE, Carson AP, Commodore-Mensah Y, Elkind MSV, Evenson KR, Eze-Nliam C, Ferguson JF, Generoso G, Ho JE, Kalani R, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Levine DA, Lewis TT, Liu J, Loop MS, Ma J, Mussolino ME, Navaneethan SD, Perak AM, Poudel R, Rezk-Hanna M, Roth GA, Schroeder EB, Shah SH, Thacker EL, VanWagner LB, Virani SS, Voecks JH, Wang N-Y, Yaffe K, Martin SS. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2022;**145**:e153–e639.
3. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Gentile F, Jneid H, Krieger EV, Mack M, McLeod C, O’Gara PT, Rigolin VH, Sundt TM, Thompson A, Toly C. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 2021;**143**:e72–e227.
4. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, Capodanno D, Conradi L, De Bonis M, De Paulis R, Delgado V, Freemantle N, Gilard M, Haugaa KH, Jeppsson A, Jüni P, Pierard L, Prendergast BD, Sádaba JR, Tribouilloy C, Wojakowski W. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 2022;**75**:524.
5. Visconti RP, Ebihara Y, LaRue AC, Fleming PA, McQuinn TC, Masuya M, Minamiguchi H, Markwald RR, Ogawa M, Drake CJ. An In Vivo Analysis of Hematopoietic Stem Cell Potential: Hematopoietic Origin of Cardiac Valve Interstitial Cells. *Circulation Research* 2006;**98**:690–696.
6. Hulin A, Anstine LJ, Kim AJ, Potter SJ, DeFalco T, Lincoln J, Yutzey KE. Macrophage transitions in heart valve development and myxomatous valve disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;**38**:636–644.
7. Hulin A, Hortells L, Gomez-Stallons MV, O’Donnell A, Chetal K, Adam M, Lancellotti P, Oury C, Potter SS, Salomonis N, Yutzey KE. Maturation of heart valve cell populations during postnatal remodeling. *Development* 2019;**146**:dev173047.
8. Hulin A, Moore V, James JM, Yutzey KE. Loss of Axin2 results in impaired heart valve maturation and subsequent myxomatous valve disease. *Cardiovasc Res* 2017;**113**:40–51.
9. Thalji NM, Hagler MA, Zhang H, Casaclang-Verzosa G, Nair AA, Suri RM, Miller JD. Nonbiased Molecular Screening Identifies Novel Molecular Regulators of Fibrogenic and Proliferative Signaling in Myxomatous Mitral Valve Disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2015;**8**:516–528.
10. Geirsson A, Singh M, Ali R, Abbas H, Li W, Sanchez JA, Hashim S, Tellides G. Modulation of Transforming Growth Factor- Signaling and Extracellular Matrix Production in Myxomatous Mitral Valves by Angiotensin II Receptor Blockers. *Circulation* 2012;**126**:S189–S197.

11. Lavine KJ, Pinto AR, Epelman S, Kopecky BJ, Clemente-Casares X, Godwin J, Rosenthal N, Kovacic JC. The Macrophage in Cardiac Homeostasis and Disease: JACC Macrophage in CVD Series (Part 4). *J Am Coll Cardiol* 2018;**72**:2213–2230.
12. Shigeta A, Huang V, Zuo J, Besada R, Nakashima Y, Lu Y, Ding Y, Pellegrini M, Kulkarni RP, Hsiai T, Deb A, Zhou B, Nakano H, Nakano A. Endocardially Derived Macrophages Are Essential for Valvular Remodeling. *Developmental Cell* 2019;**48**:617-630.e3.
13. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 2013;**14**:986–995.
14. Nakano H, Liu X, Arshi A, Nakashima Y, Handel B van, Sasidharan R, Harmon AW, Shin J-H, Schwartz RJ, Conway SJ, Harvey RP, Pashmforoush M, Mikkola HKA, Nakano A. Haemogenic endocardium contributes to transient definitive haematopoiesis. *Nat Commun* 2013;**4**:1564.
15. Liu K, Jin H, Tang M, Zhang S, Tian X, Zhang M, Han X, Liu X, Tang J, Pu W, Li Y, He L, Yang Z, Lui KO, Zhou B. Lineage tracing clarifies the cellular origin of tissue-resident macrophages in the developing heart. *J Cell Biol* 2022;**221**:e202108093.
16. Yzaguirre AD, Speck NA. Insights into blood cell formation from hemogenic endothelium in lesser-known anatomic sites. *Dev Dyn* 2016;**245**:1011–1028.
17. Sauls K, Toomer K, Williams K, Johnson A, Markwald R, Hajdu Z, Norris R. Increased Infiltration of Extra-Cardiac Cells in Myxomatous Valve Disease. *JCDD* 2015;**2**:200–213.
18. Kim AJ, Xu N, Umeyama K, Hulin A, Ponny SR, Vagnozzi RJ, Green EA, Hanson P, McManus BM, Nagashima H, Yutzey KE. Deficiency of Circulating Monocytes Ameliorates the Progression of Myxomatous Valve Degeneration in Marfan Syndrome. *Circulation* 2020;**141**:132–146.
19. Delwarde C, Toquet C, Aumond P, Kayvanjoo AH, Foucal A, Le Vely B, Baudic M, Lauzier B, Blandin S, Véziers J, Paul-Gilloteaux P, Lecointe S, Baron E, Massaiu I, Poggio P, Rémy S, Anegon I, Le Marec H, Monassier L, Schott JJ, Mass E, Barc J, Le Tourneau T, Merot J, Capoulade R. Multimodality imaging and transcriptomics to phenotype mitral valve dystrophy in a unique knock-in Filamin-A rat model. *Cardiovascular Research* 2022:cvac136.
20. Remy S, Chenouard V, Tesson L, Usal C, Ménoret S, Brusselle L, Heslan J-M, Nguyen TH, Bellien J, Merot J, De Cian A, Giovannangeli C, Concordet J-P, Anegon I. Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci Rep* 2017;**7**:16554.
21. Kim AJ, Xu N, Yutzey KE. Macrophage lineages in heart valve development and disease. *Cardiovascular Research* 2021;**117**:663–673.
22. Proudfoot AEI, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TNC, Kosco-Vilbois MH. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:1885–1890.
23. Choi J-H, Do Y, Cheong C, Koh H, Boscardin SB, Oh Y-S, Bozzacco L, Trumpfheller C, Park CG, Steinman RM. Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J Exp Med* 2009;**206**:497–505.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Gating strategy for cell sorting.

Legend: Gating strategy for cell sorting and cell proportion analysis to determine the relative proportions of cells within MV tissue. In a first step, cells were selected from a forward scatter-area vs a side scatter-area, then doublets were removed before selecting only the live cells that were DAPI negative. Myeloid cells were selected by CD11b⁺ an/or CD206⁺ expression and VECs were identified by CD31⁺ expression. Progenitors were gated as CD34⁺ cells and VICs were negatively selected for all markers. VECs: Valvular Endothelial Cells; VICs: Valvular Interstitial Cells.

FIGURE 2: Proportion and location of VICs, VECs and myeloid cell in WT and KI MV at D21.

Legend: Panel A displays pie charts presenting the relative proportion of CD11b⁺ and/or CD206⁺ myeloid cells, CD31⁺ VECs, VICs, CD34⁺ progenitors and other hematopoietic-derived cells in mitral valve at 21 days post-natal, for WT(n=9) and KI animals (n=7). Mann-Whitney test between WT *versus* KI myeloid cells; P=0.05. CD45 immunostaining shows that CD45⁺ leukocytes were lining the sub-endothelial layer in WT animals (Panels B, B') whereas more diffusely in KI animals (Panels D, D'). CD206 immunostaining reveals that CD206⁺ macrophages were following the same location pattern as for leukocytes, both in WT (Panels C, C') and KI (Panels E, E') animals. Panels B', C', D' and E' are area magnifications of the posterior leaflet. (B,C,D,E) Scale bar = 500µm. (B',C',D',E') Scale bar = 100µm
VEC: Valvular Endothelial Cells; VIC: Valvular Interstitial Cells.

FIGURE 3: Macroscopic, histologic and molecular phenotyping of WT and KI mitral valves at D7.

Legend: Panel A presents captions of the macroscopic MV, showing the thickening of both anterior and posterior leaflets in KI animals compared to WT. Panel B displays standard histology evaluation of

HPS and Alcian Blue staining in serial slides of WT and KI MV. WT rats presented thin leaflets with few proteoglycans. KI rats displayed thickened leaflets with endothelial cells activation and higher proteoglycan content. Magnification of areas of interest shows flat endothelial cells in WT (blue box and arrow), turgescient endothelial cells in KI (red box and arrow) and micro-nodules in KI (green box and arrow). Images are representative of the cohort of 16 WT and 15 KI animals (all as biological replicates). Histologic score to grade the MV remodeling and assess MVD were presented in Panel C. Panel D displays the expression of *Esm1*, *Hyal1*, *Has1*, and *Cspg4* transcripts measured by qPCR on total valve, normalized on *Gapdh*. Mann-Whitney test performed between conditions. *: $p < 0.05$, **: $0.01 < p < 0.05$, ***: $0.001 < p < 0.01$ from WT, ns: non-significant p-value from WT.

HPS: Hematoxylin Phloxin Safran; qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction; VECs: Valvular Endothelial Cells; VICs: Valvular Interstitial Cells.

FIGURE 4: Cellular characterization of VICs, VECs and myeloid cell in WT and KI MV at D7.

Legend: Panel A displays pie charts with relative proportion of myeloid cells, VECs, VICs in mitral valve at 7 days post-natal, in both WT (n=12) WT and KI (n=10) animals. Mann-Whitney test between WT and KI; p value > 0.10 for all cell types. Panels B to E' presents immunofluorescence of CD45, CD206 and CD31 in MV of WT and KI animals at D7, showing no difference of positive cell location between genotypes. Panel F represents the expression of *S100a8* and *Ccl7* transcripts measured by qPCR on total valve, normalized on *Gapdh*, Mann-Whitney test performed between conditions. *: $p < 0.05$ from WT, ns: non-significant p-value from WT.

TABLE 1: Antibody list used for flow cytometry experiments.

Antibody	Fluorophore	Clone	Isotype	Reference	Concentration (µg/ml)	Excitation laser	(nm)
CD45	BUV395	30-F11	IgG2b,κ	BD Bioscience	2	UV (355 nm, 100mW)	370-393
CD206	AF647	15-2	IgG1,κ	Santa cruz sc-58986AF647	1,5	R (637 nm, 140 mW)	665-685
CD31	PE	TLD-3A12	IgG1	Novus NB100-64796PE	1	YG (561 nm, 200 mW)	590-593.5
CD34	PE/Cy7	HPCA1/1171	IgG1,κ	Novus NBP2-47911PECY7	4	YG (561 nm, 200 mW)	750-810
CD11b	AF594	OX-42	IgG2a	Novus NB100-65284AF594	1	YG (561 nm, 200 mW)	600-620

Legend: Antibodies used for flow cytometry, clone name, isotype, associated fluorophore, reference, working concentration, excitation laser and band-pass used are indicated.

TABLE 2: Antibody list used for immunofluorescence experiments.

Anticorps	Reference	Dilution
CD206	ProteinTech, 60143-1-Ig	1/10000
CD45	Gift from TRIP platform	1/200
CD31/PECAM-1	Novus, Nß100-2284	1/100
Goat anti-Mouse	ThermoFisher, A10037	1/1000
Goat anti-Rabbit	ThermoFisher, A21206	1/1000

Legend: Antibody used for immunofluorescence with references and working dilution.

TABLE 3: Histological criteria used for the grading of myxomatous MVD at D7.

Criteria
Thickened anterior leaflet
Thickened free edge
Thickened medial part
Remodeled TV
Turgescent or proliferative zone
Immature anterior leaflet
Diffuse Alcian Blue staining

Legend: Histological criteria used to quantify the mitral valve phenotype in 7-day-old rats.

TABLE 4: Sequences of primers used in qPCR experiments.

Gene	Forward	Reverse
Ccl7	GTGTCCCTGGGAAGCTGTTA	CACAGACTTCCATGCCCTTT
Cspg4	ACCCTCAGCACTTTCTCCTG	ATCATGCACGTATCGGATCA
Esm1	TGATTTGGTGACGAGTTTG	AAGGGGAAGTCCAGACACCT
Gapdh	TCATACTTGGCAGGTTTCTCC	CTGAACGGGAAGCTCACTG
Has1	GGCGTCTCTGAATAGCATC	CATGGGCTACGCTACCAAGT
Hyal1	ATGTGCCATAATGCCCTAC	AGCTCCTCCAGGGGTAGAAG
S100a8	GTGCCCTCAGTTTGTGCAG	CCCACCCTTATCACCAACAC

FIGURE 1

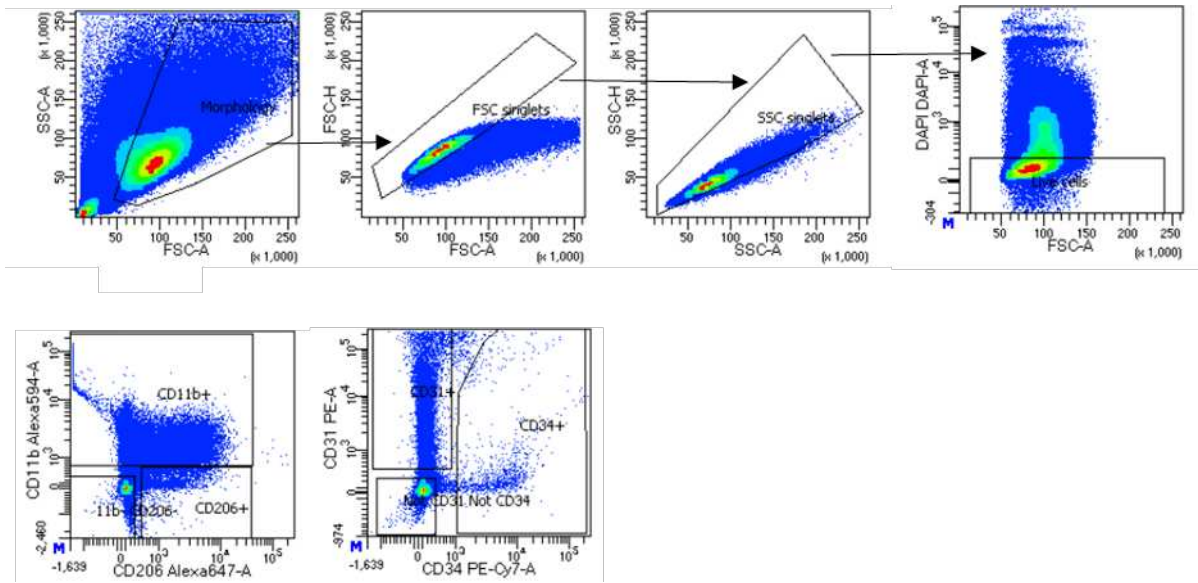


FIGURE 2

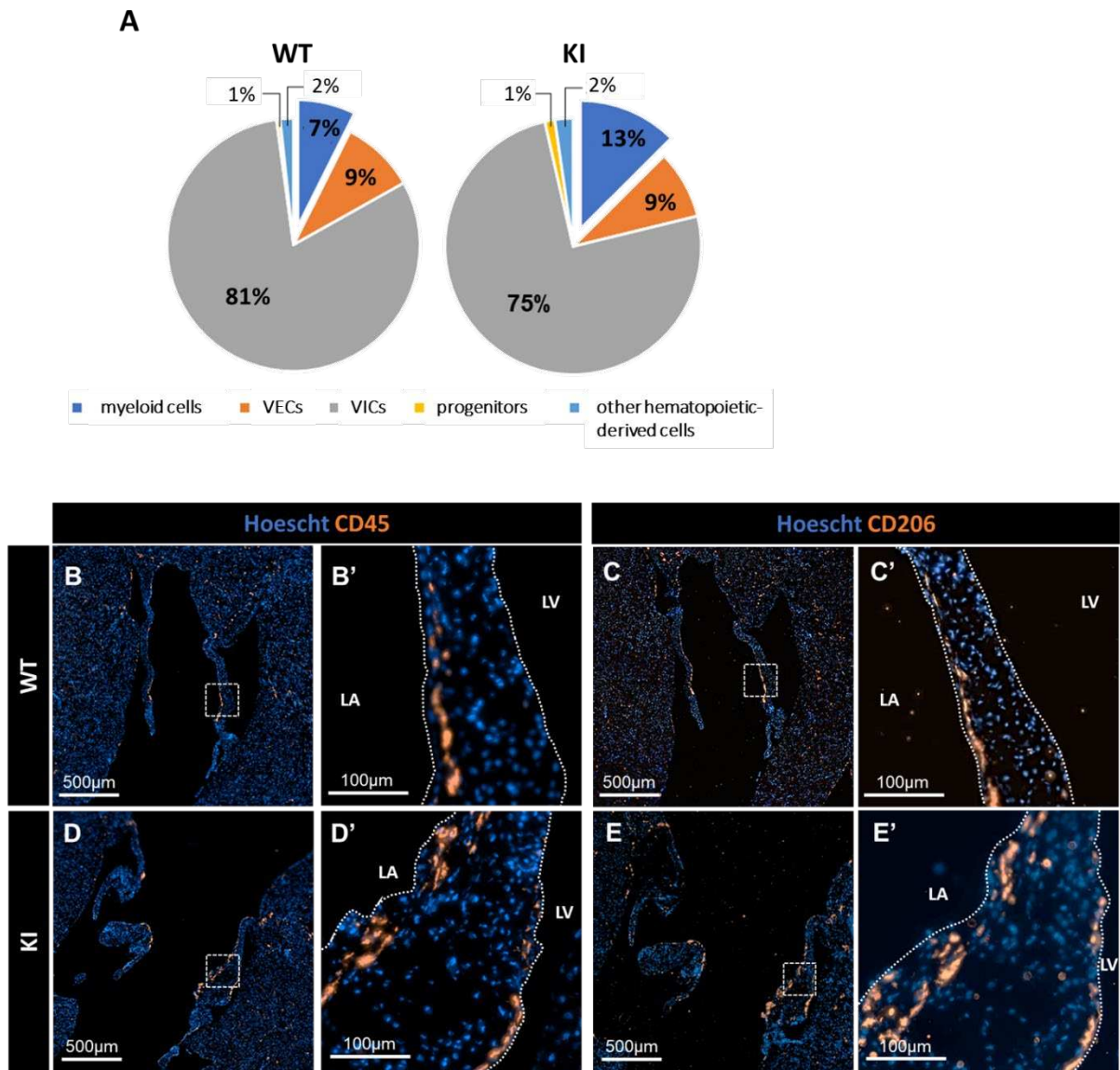


FIGURE 3

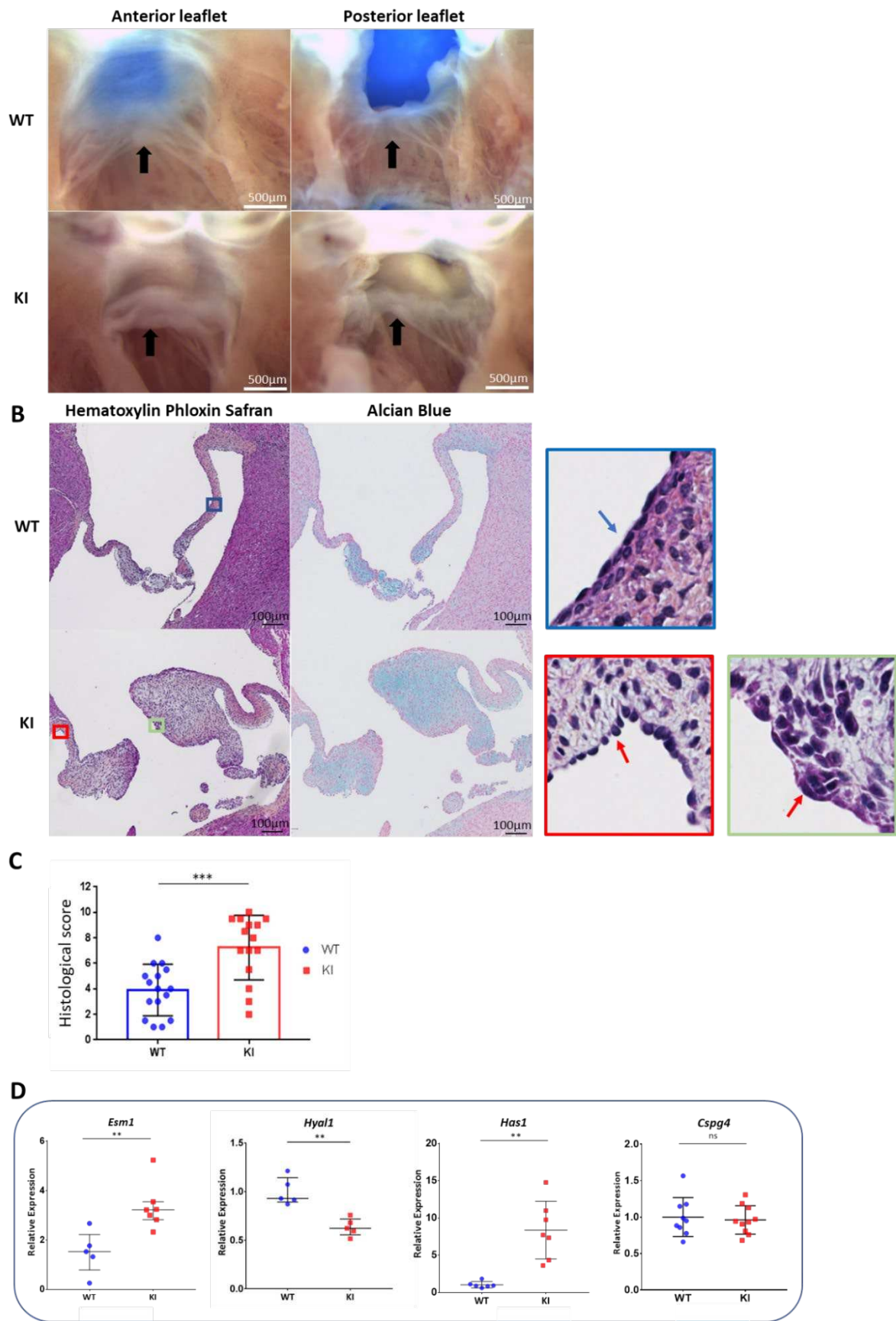
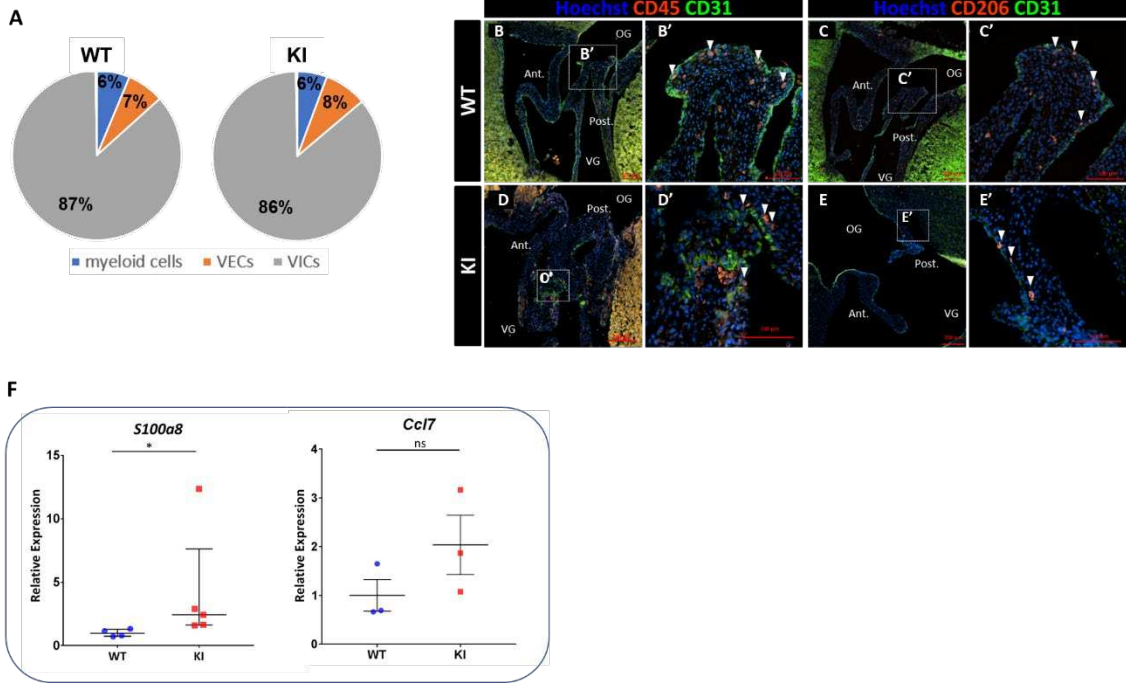


FIGURE 4



Chapitre 6 : Etude complémentaire - Identification des marqueurs moléculaires des CIVs, CEVs et cellules myéloïdes

L'étude du rat KI FLNA-P637Q a mis en avant l'implication de différentes voies de signalisation dans la DVM, mettant en jeu les types cellulaires majoritaires au sein des feuillets, à savoir les CIVs, CEVs et cellules immunitaires. Cependant, ces données proviennent d'une analyse transcriptomique sur tissu entier. Ainsi, la première étude complémentaire avait pour but d'identifier les marqueurs moléculaires spécifiques de chaque type cellulaire valvulaire pour définir les rôles spécifiques de ces cellules dans le remodelage myxoïde de la MEC. Pour cela, un protocole de tri cellulaire a été mis au point. La méthodologie, les résultats obtenus et les limites rencontrées sont présentés dans ce chapitre.

6.1 Matériel et Méthodes

6.1.1 Tri cellulaire

Les VM entières (i.e. feuillet antérieur et postérieur) ont été disséquées. Des pools de 7 valves de rats de la même portée ont été digérés et les cellules isolées ont été marquées selon le protocole décrit dans le Papier 2 (section 5.2, partie 2.2 du manuscrit Papier 2).

Le tri cellulaire a été réalisé sur le trieur BD FACSAria™ III. Les fichiers FCS 3.0 ont été obtenus grâce au logiciel dédié BD FACSDiva™ v8.5. Au sein des VM, les types cellulaires majeurs sont les CIVs, les CEVs et les cellules myéloïdes, c'est pourquoi ces cellules ont été triées. Les cellules ont été récupérées dans des Eppendorf de 1.5mL contenant 20µL de tampon de lyse (10U RNase Out (Invitrogen, 10154652), 2mM DTT, 0.15% of 10% Tween20 (Sigma, P1379), H2O). Dans chaque tube de récolte, 2000 cellules ont été triées.

Analyse

Afin d'exclure les doublets, les débris ainsi que les cellules mortes de l'analyse, la stratégie de « gating » similaire à celle décrite dans le Papier 2 (section 5.2, partie 2.2 du manuscrit Papier 2), a été appliquée. Les doublets ont été exclus de l'analyse par « gating » FSC-A vs FSC-H et SSC-A vs SSC-H suivi par une exclusion des cellules mortes positives pour le Dapi. Les cellules singulets viables ont alors été sélectionnées selon l'expression des marqueurs myéloïdes CD206 et CD11b. Les cellules CD206- CD11b- ont ensuite été triées sur les marqueurs CD31 pour les CEVs (exclusivement CD31⁺). Les cellules CD34⁺ ont été exclues du tri et le reste des cellules négatives ont été triées dans la population de CIVs (négatives pour tous les marqueurs).

6.1.2 Reverse transcription et qPCR

La transcription inverse a été réalisée sans extraction d'ARN préalable, à l'aide du « High capacity cDNA reverse transcription kit » (Applied Biosystems). Le protocole de qPCR est présenté dans le Papier 2 (section 5.2, partie 2.5 du manuscrit Papier 2). Les amorces ont été désignées sur Primer3Plus et les séquences sont présentées dans le Tableau 2. L'analyse des données de qPCR a été réalisée selon la méthode 2-deltaCt, comme détaillé dans le Papier 2 (section 5.2, partie 2.5 du manuscrit Papier 2).

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées en qPCR et leurs séquences respectives.

Gene	Forward	Reverse
Ccl7	GTGTCCCTGGGAAGCTGTTA	CACAGACTTCCATGCCCTTT
Cspg4	ACCCTCAGCACTTTCTCCTG	ATCATGCACGTATCGGATCA
Esm1	TGATTCGGTGACGAGTTTG	AAGGGGAAGTCCAGACACCT
Gapdh	TCATACTTGGCAGGTTTCTCC	CTGAACGGGAAGCTCACTG
Has1	GGGCGTCTCTGAATAGCATC	CATGGGCTACGCTACCAAGT
Hyal1	ATGTGCCATAATGCCCTAC	AGCTCCTCCAGGGGTAGAAG

6.2 Résultats

Les niveaux d'expression des différents transcrits ont été analysés afin de déterminer la signature moléculaire des types cellulaires majoritaires dans la VM saine (VM de rats WT). Ainsi, comme présenté en Figure 33, *Esm1* est exprimé majoritairement par les CEVs, mais également dans les CIVs (1[0.6-1.4] dans les cellules myéloïdes *versus* 38[12-79] dans les CEVs ou 11[10-28] dans les CIVs).

Hyal1, *Has1* et *Mmp17* sont exprimés principalement par les CEVs et CIVs. Les niveaux d'expression de *Has1* sont les suivants : 0.7[0.3-1.8] dans les cellules myéloïdes *versus* 7.1[4.1-9.9] dans les CEVs ; $p=0.02$ ou 10.4[1.2-19.9] dans les CIVs ; $p>0.05$. Concernant *Hyal1*, les expressions sont 0.9[0.6-1.5] dans les cellules myéloïdes *versus* 7.4[6.8-8.8] dans les CEVs ; $p<0.0001$ ou 6.0[5.6-6.4] dans les CIVs ; $p=0.0003$. L'expression de *Mmp17* est de 1.1[0.9-1.1] dans les cellules myéloïdes *versus* 3.6[2.8-4.7] dans les CEVs ; $p=0.10$ ou 3.8[1.7-4.3] dans les CIVs ; $p=0.10$.

Cspg4 est exprimé principalement par les CIVs (2.3[2.0-2.9] dans les CIVs *versus* 0.8[0.3-1.8] dans les cellules myéloïdes ; $p=0.03$ ou 1.1[1.0-1.6] dans les CEVs ; $p=0.008$).

Pour finir, comme attendu, les cytokines *Ccl12* et *Ccl7* sont exprimés exclusivement par les cellules myéloïdes (1[0.7-1.4] *versus* 0 [0-0] pour les deux transcrits, dans les CEVs ou CIVs).

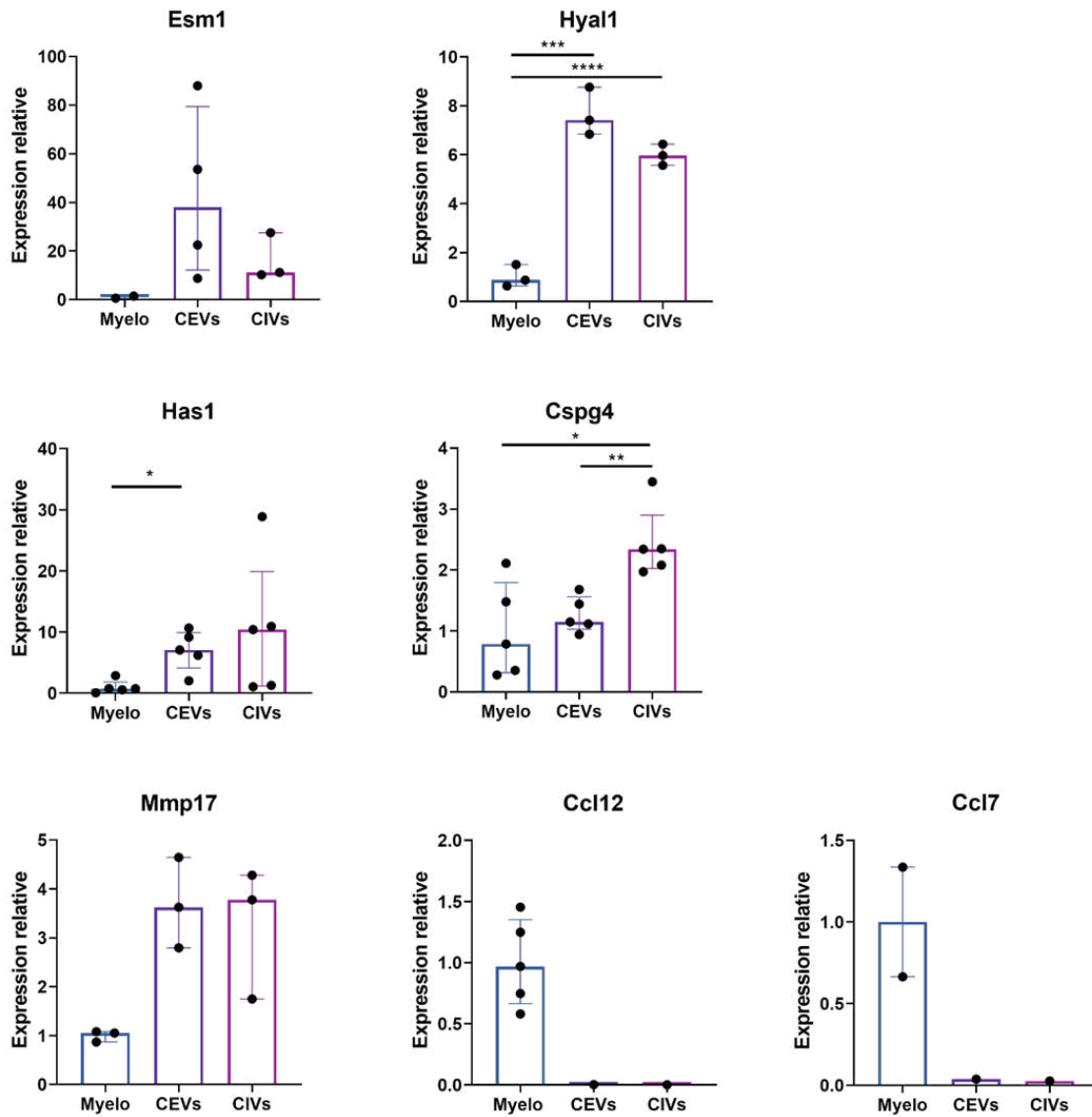


Figure 33 : Expression des transcrits *Esm1*, *Hyal1*, *Has1*, *Cspg4*, *Mmp17*, *Ccl12* et *Ccl7* chez les animaux WT, selon le type cellulaire. Myelo : cellules myéloïdes, CEVs : Cellules endothéliales valvulaires, CIVs : Cellules interstitielles valvulaires.

La Figure 34 présente les niveaux d'expression de certains transcrits en fonction du génotype. Les niveaux d'expression de *Esm1* sont significativement différents entre les animaux WT et KI dans les CIVs (respectivement 11[10-28] versus 79[41-105]; $p=0.05$). De plus, une tendance à l'augmentation de l'expression est rapportée dans les CEVs (38[12-79] versus 69[17-411]; $p=0.41$). Nous observons une tendance à la diminution de l'expression de *Hyal1* dans les CEVs (7.4[6.8-8.8] chez les WT versus 5.6[4.7-6.0] chez les KI ; $p=0.10$). Pour finir, *Cspg4* est

différentiellement exprimé entre les génotypes dans les CIVs triées (2.3[2.0-2.9] *versus* 4.2[4.1-5.7] ; p=0.008).

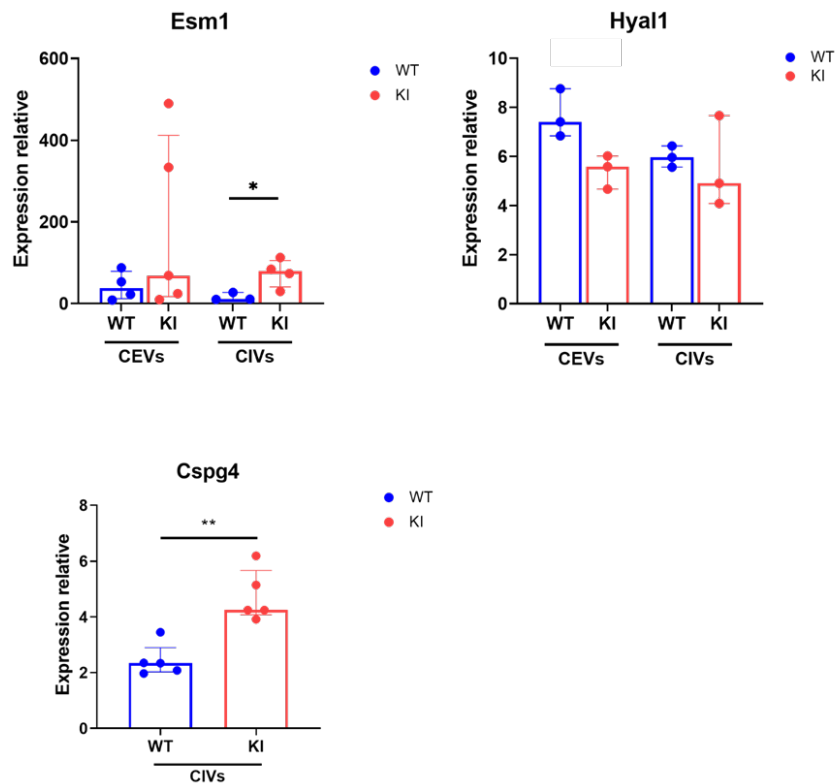


Figure 34 : Expression relative des transcrits Esm1, Hyal1 et Cspg4, selon le génotype et le type cellulaire.

6.3 Conclusion

Différentes populations cellulaires présentes au sein des feuillets mitraux jouent un rôle dans l'homéostasie tissulaire et ainsi dans la physiopathologie de la DVM. Néanmoins, les études sur les mécanismes impliqués dans la pathologie se sont concentrées sur les CIVs. Tirant profit du nouveau modèle de DVM, le rat KI FLNA-P637Q, les cellules des VM des animaux WT et KI ont été triées afin d'étudier l'expression de transcrits selon le type cellulaire : CIVs, CEVs et cellules myéloïdes.

Ces études de tri cellulaire démontrent l'activité spécifique aux différents types cellulaires dans les valves mitrales saines, mais aussi dans la physiopathologie de la DVM. Les marqueurs matriciels tels que Hyal1 (enzyme de dégradation de l'AH), ou Cspg4 sont dérégulés dans les CIVs KI. Déjà

rapporté dans d'autres études, le rôle de l'AH dans la DVM semble prépondérant même si ces récentes expériences et résultats nécessitent confirmation. L'origine de ces défauts dans la biologie de l'AH pourrait provenir d'une dysfonction développementale étant donné l'implication importante de cette protéine aux stades embryonnaires.

Néanmoins, le protocole faisant intervenir la digestion des VM par des enzymes, des cycles de marquages et lavages et le passage des cellules dans le trieur, peut aussi impacter le profil des cellules triées. En effet, les cellules sont labiles et les profils d'expression quantifiés pourraient être modulés par le protocole, rendant difficile la comparaison de ces résultats avec les données de transcriptomiques sur valve entière obtenus dans notre précédente étude³⁶⁹. Des approches de single cell, bien que coûteuses, seraient plus appropriées afin de caractériser les marqueurs moléculaires spécifiques de chaque type cellulaire, mais aussi afin de caractériser plus largement tous les types cellulaires présents, pour définir les rôles spécifiques des différentes cellules dans la DVM myxoïde. Cependant, ces résultats de tri cellulaire ouvrent des pistes de travail. Il sera notamment intéressant d'étudier la communication entre les CIVs, CEVs et cellules myéloïdes *in vitro*.

Chapitre 7 : Etude complémentaire - Déplétion des cellules myéloïdes par injections de liposomes-clodronate

Après avoir démontré la présence d'une DVM myxoïde à J7 sans dérégulation de la proportion des cellules immunitaires au sein des feuillets, la deuxième étude complémentaire visait à dépléter la population de macrophages valvulaires pour identifier son rôle dans le développement de la pathologie. Pour cela, j'ai mis au point un protocole de déplétion de macrophages par injections de liposomes-clodronate entre J7 et J21. La méthodologie, les résultats obtenus et les limites rencontrées sont présentés dans ce chapitre.

7.1 Matériel et Méthodes

7.1.1 Déplétion des macrophages

Les macrophages ont été déplétés par des injections répétées de liposomes contenant du clodronate (dichlorométhylène biphosphanate) (Liposoma, Amsterdam, The Netherlands), préparés selon le protocole d'encapsulation de Van Rooijen et collaborateurs³⁷⁰. Ces liposomes sont phagocytés par toutes les cellules dotées d'une fonction phagocytaire et donc notamment les macrophages. Au-delà d'une certaine concentration intracellulaire, le clodronate endocyté provoque l'apoptose de la cellule.

Dans le but de dépléter les macrophages de manière efficace et stable dans le temps, les rats ont été injectés par voie intrapéritonéale (IP) toutes les 24 heures de J5 à J7, puis toutes les 72 heures jusqu'au sacrifice à J21 (Figure 35). Lors de la phase d'induction de la déplétion (injections à J5, J6 et J7), les animaux étaient placés sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (induction 4,5% et maintien 2,5%) afin de réaliser une échographie abdominale pour s'assurer de la qualité de l'injection. La phase de maintien de la déplétion par des injections à J10, J13, J16 et J19 a ensuite été réalisée sur rat vigile. La dose poids de 10µl/g a été utilisée comme recommandé dans la littérature^{370,371}. Avant chaque injection, les rats ont donc été pesés, ce qui nous a aussi permis de

suivre la croissance des animaux tout au long du protocole. Des liposomes contrôles, contenant du PBS ont été injectés chez les rats WT et KI afin de former des groupes contrôles (n=8 par génotype et condition d'injection).

Lors du sacrifice à J21, les rats ont été euthanasiés par dislocation cervicale et la rate, le foie et le coeur ont été prélevés et fixés dans de la formaline 10% pour des analyses immuno-histologiques.

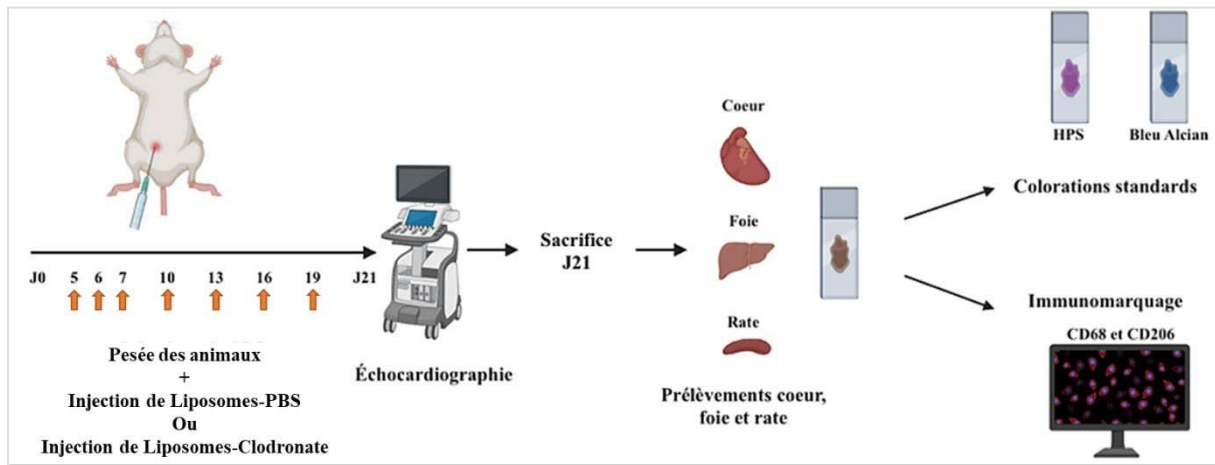


Figure 35 : Protocole expérimental de la déplétion des cellules myéloïdes chez les rats.

7.1.2 Suivi de la DVM

Echocardiographie

A J21, 16 animaux WT et 16 animaux KI ont été échocardiographiés dans le but d'analyser la fonction et la morphologie de la VM et du VG. L'anesthésie gazeuse a été induite sous isoflurane 4% et maintenue à 2% au cours de la prise d'image. Les animaux ont été positionnés en décubitus ventral sur la table chauffante dotée d'électrodes afin d'enregistrer simultanément l'électrocardiogramme. Les acquisitions ont été réalisées avec l'échocardiographe Vevo 3100 (FujiFilm Visualsonics Inc.) couplé à la sonde MX400 (20-46 MHz). Le mode temps-mouvement, le mode B et le Doppler couleur ont été utilisés pour évaluer la morphologie et la fonction de la VM et du VG en vue parasternale long axe et court axe (Figure 36). Les acquisitions ont été réalisées

selon les recommandations actuelles des guides de pratique et correspondent à la méthodologie utilisée dans notre étude précédente ^{369,372}. L'analyse des images a été réalisée sur le logiciel VevoLab 5.6.1.

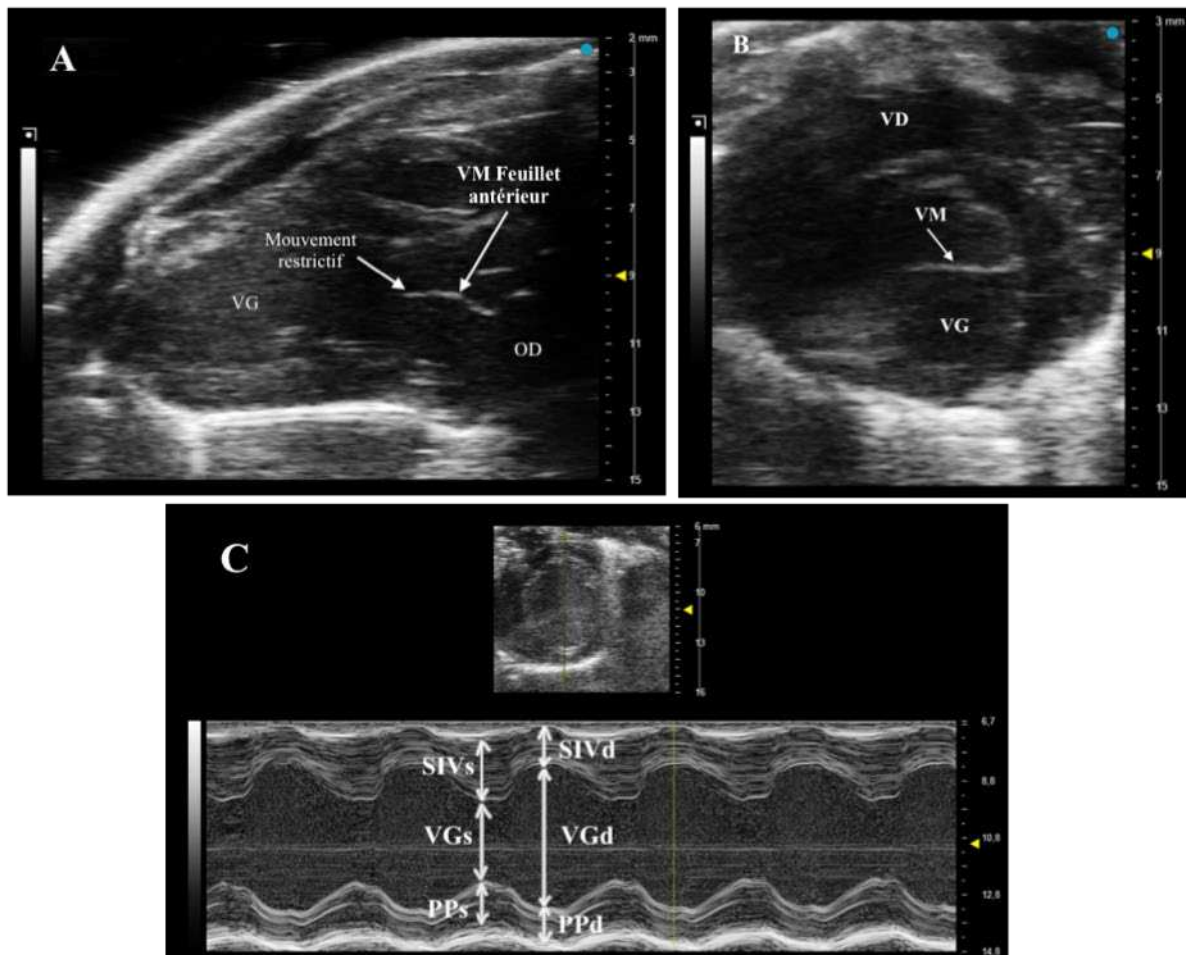


Figure 36 : Exemples d'images et d'analyse des échocardiographies des rats à J21. A) Image de la VM d'un animal en B-mode, en vue parasternale long axe. B) Mesure de l'épaisseur de la VM en B-mode, vue parasternale court axe. C) Image du VG en M-mode vue parasternale court axe. VM : Valve Mitrale ; VG : Ventricule Gauche ; VD : Ventricule Droit ; OD : Oreillette Droite ; SIVd/s : Épaisseur du septum interventriculaire du VG (diastole ou systole) ; VGd/s : Diamètre interne du VG (diastole ou systole) ; PPs/s : Épaisseur de la paroi postérieure du VG (diastole ou systole).

Analyse structurelle macroscopique et microscopique

- *Préparation des échantillons et des lames*

Après prélèvement, les cœurs, foies et rates ont été placés dans une solution de PBS pour les nettoyer. Des images macroscopiques de la VM ont été capturées à la loupe binoculaire Leica M80 dotée de la caméra Leica IC80 HD et du logiciel LeicaEZ. Tous les tissus ont ensuite été placés dans une solution de Formaline 10% pendant 48 heures afin de les fixer. Des bains successifs d'alcool ont permis la déshydratation (Tableau 3) puis l'inclusion en paraffine des échantillons par la plateforme MicroPiCell. Des coupes histologiques sériées de 3µm d'épaisseur ont été réalisées sur un microtome (Microm HM 355S, Thermo Scientific).

Tableau 3 : Etapes de fixation et de déshydratation des échantillons avant inclusion en paraffine.

Bain	Durée (min)
Formol	30
Formol	60
Alcool 70°	30
Alcool 96°	45
Alcool 100°	60
Alcool 100°	60
Alcool 100°	75
Xylène	60 x 3
Paraffine	60 x 3

- *Colorations standards*

Dans le but d'étudier la composition tissulaire des valves mitrales, des foies et des rates, deux types de colorations histologiques standards ont été utilisées : l'Héματοxyline Phloxine Saphran (HPS: Hematoxylin cp813, Diapath; Phloxin pb-p-25, Biognost; Saffron 27481.105, VWR)) et le Bleu Alcian (BA; (c0053, Diapath; pH2.5)). La coloration HPS permet de visualiser la morphologie des tissus par une coloration du noyau avec l'hémalum, du cytoplasme avec la phloxine et du collagène avec le safran. La coloration au BA permet quant à elle de mettre en évidence les protéoglycanes,

caractéristiques du remodelage myxoïde. Le protocole de coloration est composé de cinq étapes : i) le déparaffinage, ii) la réhydratation, iii) la coloration, iv) la déshydratation, v) le montage. Le Tableau 4 présente les étapes de déparaffinage, réhydratation et de déshydratation communes aux protocoles de coloration utilisées (détaillés dans le Tableau 5). Le montage se fait grâce au dépôt d'une goutte de liquide de montage DPX sur la lame et par l'ajout d'une lamelle. Les lames ont été visualisées et scannées en lumière blanche au NanoZoomer Hamamatsu.

Tableau 4 : Etapes de déparaffinage, réhydratation, coloration et déshydratation nécessaires à la réalisation d'une coloration histologique.

Etape	Bain	Durée
Déparaffinage	Xylène	5 min x 2
Réhydratation	Alcool	30 sec x 2
	Eau courante	3 min
Coloration		
Déshydratation	Eau courante	3 min
	Alcool 100%	1 min x 2
	Xylène	1 min x 2

Tableau 5 : Etapes spécifiques aux colorations histologiques HPS et Bleu Alcian.

Coloration	Bain	Durée
HPS	Hématoxyline	3 min
	Eau courante	3 min
	Acide trichloroacétique	1 min
	Eau courante	1 min
	Carbonate de lithium	30 sec
	Eau courante	1 min
	Phloxine	40 sec
	Eau courante	1 min
	Alcool	1 min
Bleu Alcian	Acide acétique	3 min
	Bleu Alcian	30 min
	Eau courante	3 min
	Kernechtrot	3 min
	Safran	1 min

- *Immunohistologie*

Dans le but d'évaluer la déplétion en macrophages dans les tissus, le contenu en macrophages dans les foies, rates et cœurs a été apprécié en immunofluorescence avec les Ab anti-CD206 et anti-

CD68. Les lames ont d'abord été déparaffinées (Tissue clear 3 x 3min) et réhydratées (Éthanol 100% 3 x 3 min et Eau courante 2 x 3 min). Le protocole d'immunofluorescence adapté (Tableau 6) a ensuite été réalisé avec les anticorps anti-CD206 (1/10000, ProteinTech 60143-1-Ig, démasquage tampon Tris-EDTA pH 9) et anti-CD68 (1/100, Bio-Rad MCA341R, démasquage tampon citrate pH 6,2). Le marquage anti-CD68 a été réalisé sur le foie et la rate afin de valider la qualité de la déplétion. Les marquages anti-CD68 et anti-CD206 ont été réalisés sur les lames de cœurs.

Tableau 6 : Etapes des protocoles d'immunofluorescence sur lames paraffine.

Étapes	Solution	Durée
Lavage	PBS-Tween 0,05%	5 min x 3
Démasquage à 90°C	Tampon acide (10 mM citrate, 2 mM EDTA, Tween 0,05%, pH 6,2) ou Tampon alcalin (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 9)	30 min
Lavage	PBS-Tween 0,05%	5 min x 3
Saturation de sites aspécifiques	BSA 2%	20 min
Marquage	Anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 1%	2 heures
Lavage	PBS-Tween 0,05%	5 min
Marquage	Anticorps secondaire dilué dans du PBS-BSA 1%	1 heure
Lavage	PBS-Tween 0,05%	5 min x 3
Coloration nucléaire	Hoechst 1 µg/mL	1 min
Lavage	PBS-Tween 0,05%	10 min
Montage	Solution de montage ProLong	

Les lames ont été lues sur le microscope Tie2 (Zeiss).

7.2 Résultats

7.2.1 Développement des animaux

Le suivi du poids des animaux est présenté en Figure 37 démontre qu'il n'y a aucune différence significative entre les animaux ayant reçu des injections de liposomes-PBS et ceux ayant reçu des liposomes-clodronate, indépendamment du génotype. Deux animaux KI injectés aux liposomes-clodronate sont décédés avant la fin de l'étude, l'un à J7 suite à un problème technique survenu lors

de l'injection et l'autre à J20 sans raison apparente mais pour lequel nous ne pouvons pas exclure un effet délétère de la déplétion. En effet, sa prise de poids était inférieure aux animaux du même groupe lors du protocole malgré un poids similaire à J7.

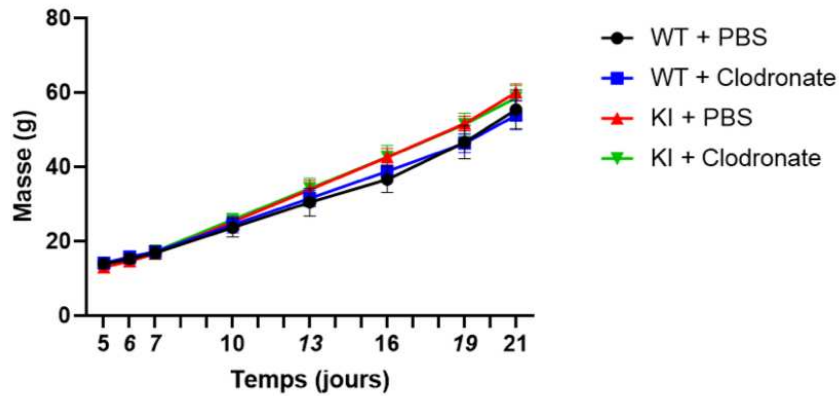


Figure 37 : Evolution de la masse des animaux entre J5 et J21, selon le génotype et l'injection.

7.2.2 Efficacité de la déplétion

La déplétion des tissus en macrophages a été analysée chez les animaux injectés aux liposomes-clodronate grâce aux immunomarquages anti-CD68 et anti-CD206 dans les VM et anti-CD68 dans les foies et rates.

Dans le foie, le marquage CD68 ne démontre pas de diminution du nombre de macrophages chez les animaux KI injectés aux liposomes-clodronate (Figure 38), celui-ci restant similaire au nombre de macrophages observés dans les groupes injectés au liposomes-PBS.

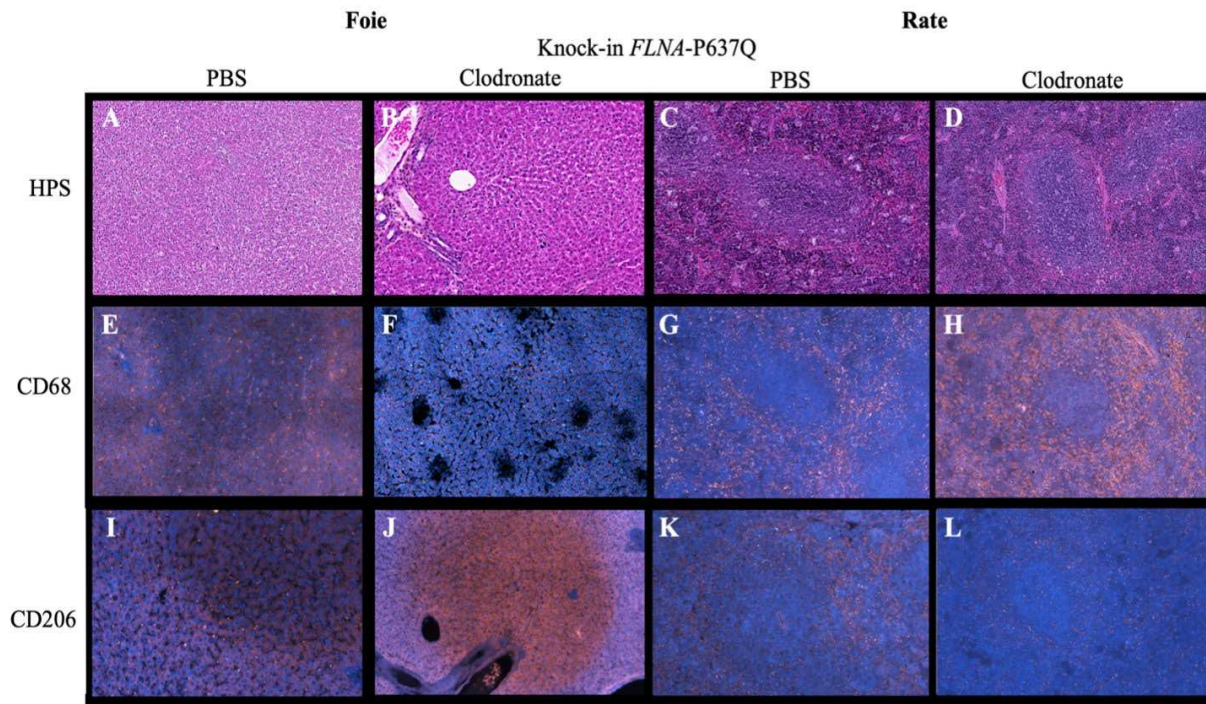


Figure 38 : Analyse immunohistologique du contenu en macrophages dans le foie et la rate des animaux KI injectés aux liposomes-PBS ou liposomes-clodronate. (A-D) Coloration standard HPS, (E-H) immuofluorescence anti-CD68, (I-L) immunofluorescence anti-CD206.

De façon similaire, dans les VM, les marquages CD68 et CD206 ne démontrent pas de diminution du nombre de macrophages entre les conditions (Figure 39).

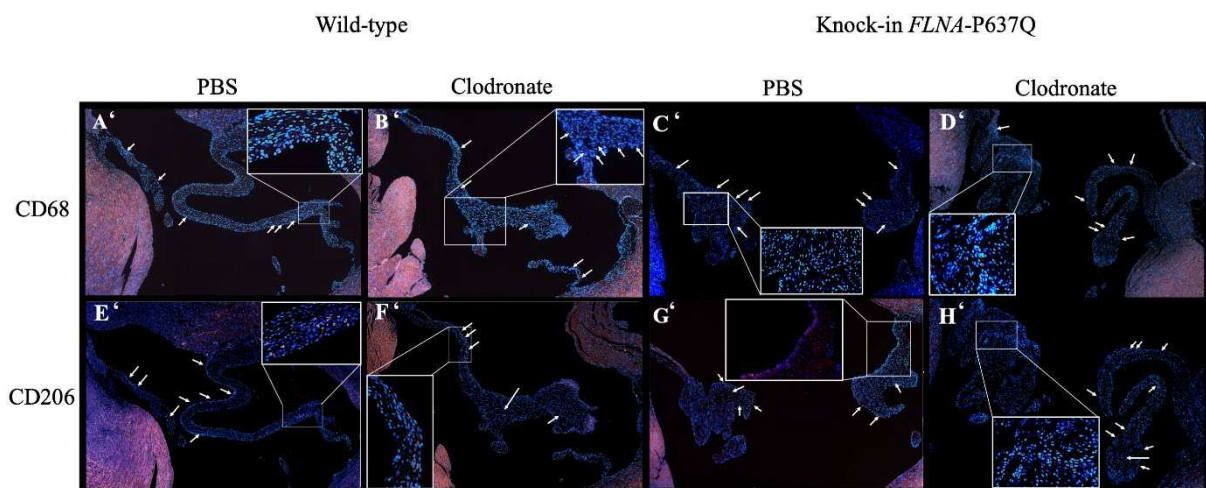


Figure 39 : Analyse immunohistologique du contenu en macrophages dans les valves mitrales des animaux WT et KI injectés aux liposomes-PBS ou liposomes-clodronate.

Ainsi, les injections de liposomes-clodronate ne semblent pas avoir induit de déplétion des macrophages dans notre modèle animal.

7.2.3 Caractérisation du phénotype cardiaque et mitral

L'absence de déplétion efficace des macrophages par traitement aux liposomes-clodronate laissait présager une absence d'effet sur la DVM. Les données exposées dans les paragraphes suivants montrent qu'effectivement ni la fonction ni la morphologie des VM des rats KI et WT ne sont pas modifiées par le traitement.

Analyse échocardiographique

La longueur et l'épaisseur du feuillet antérieur de la VM ont été mesurées pour chaque animal (Figure 40). Aucune différence significative de la longueur du feuillet antérieur n'a été observée entre les animaux injectés aux liposomes-clodronate comparativement aux liposomes-PBS ($2,36 \pm 0,23$ mm *versus* $2,41 \pm 0,30$ mm ; $p=0,99$ chez les WT et $2,20 \pm 0,20$ mm *versus* $2,41 \pm 0,26$ mm ; $p=0,61$ chez les KI). De plus, aucune différence significative n'a été relevée entre les animaux WT et KI, (KI *versus* WT après injection des liposomes-PBS : $p>0,99$; KI vs WT après injection des liposomes-clodronate : $p=0,88$).

Concernant l'épaisseur du feuillet antérieur, aucune différence significative n'a pu être observée entre les animaux : $0,14 \pm 0,03$ mm *versus* $0,13 \pm 0,02$ mm ; $p=0,99$ chez les animaux WT et $0,15 \pm 0,02$ mm *versus* $0,16 \pm 0,02$ mm ; $p=0,95$ chez les KI, injectés respectivement au clodronate et PBS.

La fréquence cardiaque mesurée restait stable entre les conditions respectivement (tous les p values $>0,90$).

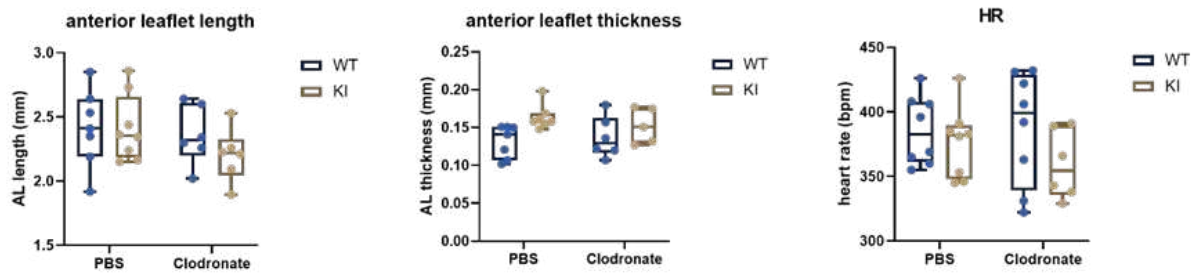


Figure 40 : Evaluation de la structure mitrale et du rythme cardiaque chez les animaux, à J21.

Analyse macroscopique

Contrairement aux données obtenues par échocardiographie, l'observation macroscopique de la morphologie valvulaire mitrale a permis d'évaluer un épaississement des valves KI par rapport aux WT. En effet, comme présenté Figure 41, les feuillets antérieurs des VM KI sont plus épais et blancs que les WT, indépendamment du type d'injection ayant été effectuée. Ces images sont représentatives de la cohorte : 9 animaux KI sur 14 présentaient une valve épaissie contre 0 animal WT sur les 16. L'appareil valvulaire mitral semble également pathologique chez les animaux KI, avec une diminution de la quantité des cordages et une augmentation de leur épaisseur (10 animaux concernés sur 14 chez les KI *versus* 0 animal sur 16 chez les WT). Ces traits caractéristiques des animaux mutés avaient été rapportés dans notre étude précédente.³⁶⁹

Néanmoins, l'observation macroscopique des valves n'a pas permis d'identifier de différence entre les animaux injectés au clodronate ou au PBS.

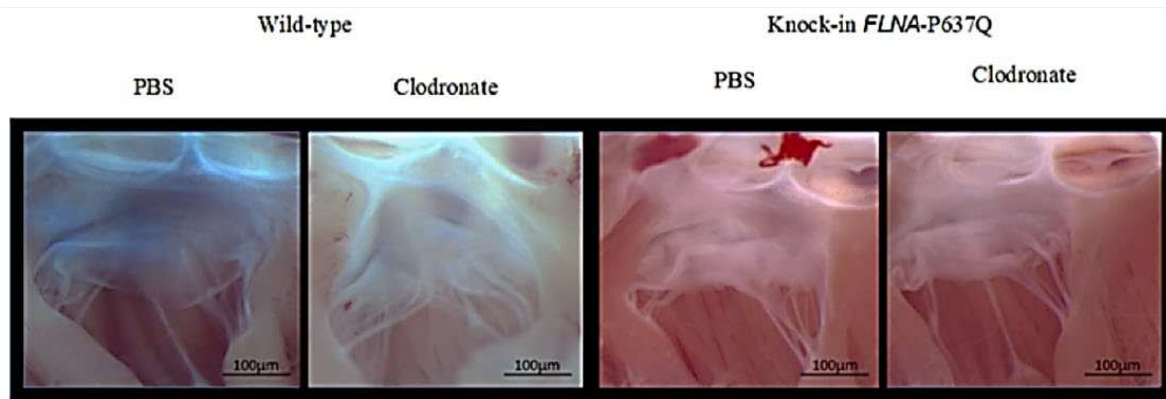


Figure 41 : Evaluation macroscopique de la morphologie du feuillet antérieur chez les animaux WT et KI, injectés au PBS ou clodronate.

Analyse histologique

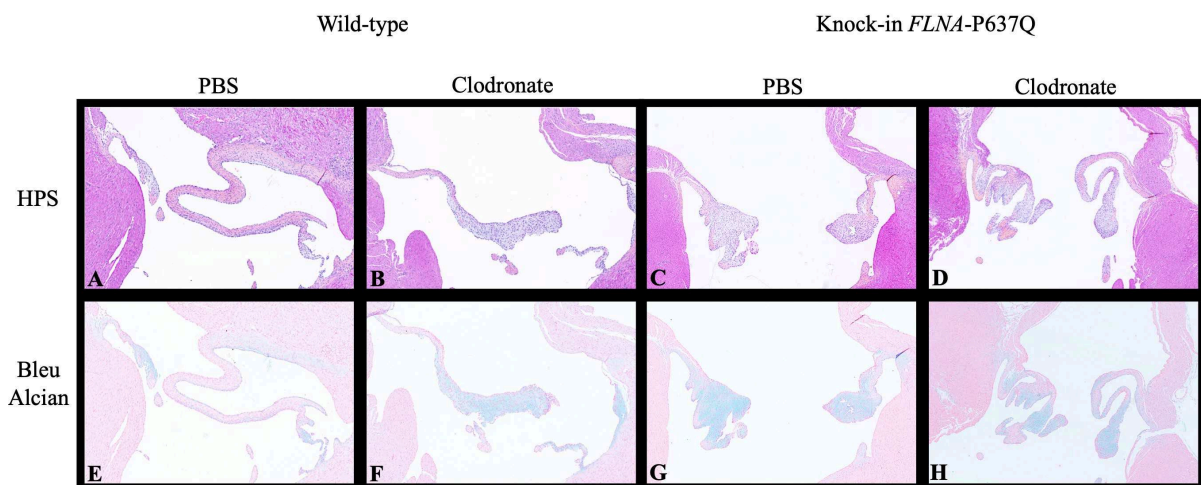


Figure 42 : Evaluation histologique des animaux WT (A, B, E, F) et KI (C, D, G, H), injectés au PBS (A, C, E, G) ou clodronate (B, D, F, H).

Les colorations standards HPS et BA mettent en évidence la structure et le contenu du tissu (Figure 42). Les différents composants des feuillets comme le collagène et les protéoglycanes sont observés. Les feuillets des VM des animaux WT injectés aux liposomes-PBS sont plutôt fins et pauvres en protéoglycanes (Figure 42A, E), cependant une hétérogénéité entre les différents animaux a été observée. Les feuillets mitraux des animaux KI injectés aux liposomes-PBS sont épaissis,

redondants et présentent une accumulation de protéoglycanes (Figure 42C, G). Ce phénotype de DVM myxoïde est identique à celui décrit dans notre étude de caractérisation du modèle ³⁶⁹.

Les animaux KI injectés aux liposomes-clodronate présentent un phénotype similaire à celui des animaux WT injectés aux liposomes-PBS (Figure 42D, H). Par ailleurs, les animaux WT injectés aux liposomes-clodronate (Figure 42B, F) semblent développer un phénotype qui se rapproche de celui d'un rat KI, caractérisé par un épaississement et une accumulation de protéoglycanes dans les feuillets.

7.3 Conclusion

Afin de déterminer le rôle des macrophages dans la DVM, un protocole de déplétion des macrophages chez les rats WT et KI a été mis en place. Par le biais d'injections répétées de liposomes-clodronate, le but était d'observer l'effet de la perte des macrophages sur le phénotype valvulaire.

Néanmoins, l'évaluation de la déplétion a révélé un taux largement inférieur à celui rapporté dans la littérature, ^{371,373,374} ne permettant donc pas de conclure quant au rôle des macrophages dans la DVM.

Bien que ce type d'expérimentation soit bien décrit dans la littérature, il présente de nombreuses limites qui peuvent en partie expliquer les résultats obtenus.

En effet, la dose et la voie d'injection n'étaient potentiellement pas adaptées à l'objectif. Même si la voie d'injection en IP est la plus décrite dans la littérature pour réaliser une déplétion en macrophages cardiaques ³⁷³, une injection par voie intraveineuse (IV) aurait permis une plus faible métabolisation des liposomes et ainsi un effet probablement supérieur. De plus, l'injection en IP n'induit pas une déplétion très spécifique, un effet plus large (notamment sur les cellules dendritiques) a été rapporté.

La fenêtre de traitement n'est peut-être pas adaptée aux liposomes-clodronate qui ont une action transitoire (repopulation des macrophages en 72h) ³⁷¹. Un âge aussi précoce que J7 pourrait également limiter l'efficacité de la déplétion, de par une forte activité de production des monocytes par la moelle osseuse à un stade où les rats sont en plein développement. Les liposomes à eux seuls pourraient également interférer avec la biologie des macrophages ³⁷⁰, limitant l'interprétation découlant de ce type de protocole.

Afin de trouver des alternatives, nous avons réalisé des tests d'injection par voie IV. Cependant l'approche rétro-orbitale n'est pas envisageable chez les ratons de moins de 18 jours qui n'ont pas encore les yeux ouverts. De même, la taille et la disponibilité de vaisseaux chez les ratons de J7 ne permettaient pas d'envisager l'option IV. Par ailleurs, l'utilisation d'un antagoniste CSF1R dans la nourriture pourrait être une alternative, néanmoins les ratons ne sont pas encore sevrés au début du protocole, il faudrait ainsi s'assurer que l'antagoniste passe dans le lait maternel. Pour finir, alors que Kim et collaborateurs ont profité du modèle de souris génétiquement modifiées $CCR2^{-/-}$ ²⁰⁵ pour induire une déplétion stable et constante des macrophages, induisant un effet sur le phénotype mitochondrial, nous ne disposons pas de modèle transgénique de rat permettant de dépler spécifiquement des cellules myéloïdes. C'est en effet la limite majeure à l'utilisation d'un modèle de rat.

Chapitre 8 : Discussion générale

Le prolapsus valvulaire mitral (PVM) touche 2 à 3% de la population générale et 10% des plus de 75 ans aux Etats-Unis.¹ Le substrat pathologique du PVM est la dystrophie valvulaire mitrale (DVM) de type myxoïde.²

Malgré l'augmentation de la prévalence du PVM, notamment due à l'espérance de vie grandissante, aucun traitement pharmacologique n'est disponible actuellement. Véritablement, le manque de modèles animaux pertinents pour étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le PVM est une limite majeure à la compréhension de la physiopathologie.

Mon équipe qui s'intéresse à la génétique du PVM, a mis en évidence la causalité du gène *FLNA* codant pour la protéine Filamine-A, dans le PVM.^{3,4} Tirant profit de cette découverte, le rat exprimant la mutation *FLNA*-P637Q a été généré il y a quelques années.⁵

Mon projet de thèse avait donc pour objectif premier de valider la pertinence du modèle de rat pour l'étude de la DVM par une approche d'imagerie multimodale, suivie d'une analyse des voies de signalisation impliquées dans le développement de la pathologie par RNA-sequencing. Le deuxième objectif visait à étudier plus spécifiquement le rôle des cellules immunitaires et plus particulièrement des macrophages dans le développement de la pathologie.

8.1 Avantages et inconvénients d'un modèle de rat

Mon travail de doctorat a établi le modèle KI *FLNA*-P637Q comme étant le premier modèle de rat de DVM myxoïde. Grâce à l'utilisation d'une approche d'imagerie multimodale basée sur l'échocardiographie, le microCT et l'histologie, il a été démontré que les animaux mutés développaient un phénotype myxoïde similaire à celui des patients, caractérisé par une elongation ainsi qu'un épaissement des feuillets mitraux associés à une accumulation de protéoglycanes. L'utilisation de l'échocardiographie est nécessaire pour diagnostiquer un PVM car c'est le seul outil

permettant une évaluation fonctionnelle valvulaire. De plus, une approche de microCT sur cœur entier, nécessitant des étapes de cannulation de l'aorte ascendante afin de transfuser *ex-vivo* l'agent de contraste, a été mise en place dans l'équipe au cours de la thèse pour quantifier le volume valvulaire. Pour finir, une analyse histologique dédiée à la VM a été réalisée. Ainsi, il était plus avantageux de travailler sur un modèle de rat, plus gros et au rythme cardiaque plus faible qu'une souris, rendant l'analyse de la fonction, du volume et de la structure de la VM plus aisée.

Cependant, la disponibilité de matériel dédié aux rats est limitée. En effet, le développement d'animaux transgéniques spécifiques ou d'anticorps, est nettement plus avancé pour la souris que pour le rat. Ce point a d'ailleurs été une limite lors de la caractérisation des cellules immunitaires au sein des VM et lors de la déplétion des cellules myéloïdes. Effectivement, il n'existe pas de modèle de rat transgénique pour la déplétion des cellules myéloïdes, alors qu'existe par exemple la souris *CCR2^{-/-}*.²⁰⁵

De plus, la quantité de cellules disponibles dans une VM d'un raton de 3 semaines est limitée : après le protocole de digestion enzymatique, environ 125.000 cellules par VM sont récupérées, nous contraignant à pooler les tissus. Dans le cadre de l'étude visant à comprendre les mécanismes, notamment à l'origine de la pathologie, l'âge précoce des animaux et donc la quantité limitée de matériel a été une contrainte.

8.2 Mécanismes impliqués dans la DVM

Le PVM est une pathologie à multiples étiologies, qui impliquent une défaillance cellulaire. Effectivement, les traitements anorexigènes tels que les médicaments à activité sérotoninergique ont été associés à un développement de DVM^{265,269}. De plus, 50% des patients qui développent une tumeur carcinoïde, associée à l'augmentation des taux circulants de sérotonine, développent également une valvulopathie. Par ailleurs, le PVM est retrouvé dans des syndromes rares, comme le syndrome de Marfan, caractérisé par une sur-activation de la voie du TGF- β ²⁰⁴.

Les études génétiques sur le PVM ont permis de mettre en avant la part de la mécanotransduction dans la pathologie, avec l'identification de *FLNA*, *DZIP*, *DCHSI*, *TNSI* et *LMCDI*. Cette voie de la mécanotransduction, est l'hypothèse centrale de mon travail visant à déceler les mécanismes à l'origine de la pathologie. Les réponses cellulaires aux stimuli mécaniques dépendent principalement des protéines sensorielles et des mécanorécepteurs tels que les canaux ioniques mécanosensibles, l'annexine V et les intégrines.³⁰¹

Ainsi, le remodelage valvulaire serait en fait un processus faisant intervenir les voies de signalisation liées à ces protéines, selon une organisation spatio-temporelle propre à la pathologie.³⁰⁷

L'analyse multi-omiques basée sur le RNA-sequencing et l'ATAC-sequencing, réalisée sur des VM entières de rats de 3 semaines, a démontré l'implication de multiples voies de signalisation dans la DVM. La régulation de la MEC, le stress moléculaire, l'EMT ainsi que l'implication des cellules immunitaires ont été mis en évidence dans la pathologie. La DVM est une pathologie multifactorielle complexe, pour laquelle l'analyse de la contribution de ces différentes voies de signalisation est nécessaire. L'implication de la mécanotransduction n'a été confirmée que par l'approche supervisée de l'analyse transcriptomique. Le métacluster sur le remodelage de la MEC pourrait inclure et donc masquer la réponse au stress mécanique, les deux mécanismes étant liés. Néanmoins, l'analyse régulomique par approche « ATAC-sequencing » suggère également l'implication de la mécanotransduction.

Dans notre étude, une signature moléculaire pour les voies Wnt et TGF- β a été identifiée. L'implication de ces voies présentées section 2.3 avait déjà été décrite dans le PVM, notamment syndromique, *in vivo* et *in vitro*, en partie en lien avec la réponse au stress mécanique.^{2,202-204,249} Wnt est exprimé dans les CEVs-coapt²² et est impliqué dans la biologie des cils. Le KO *FLNA* induit d'ailleurs la diminution de la longueur des cils primaires valvulaires mitraux²³⁰. D'autre part, une étude suggère que la signalisation TGF- β sert comme trans-activateur de la voie Wnt/ β -caténine

dans la DVM myxoïde ³¹⁶. Ainsi, le signal transcriptomique impliquant les voies Wnt et TGF- β dans la DVM pourrait traduire un lien avec une dérégulation des cils primaires mitraux et/ou un rôle du stress mécanique.

Afin de confirmer le rôle de la mécanotransduction dans la DVM, plusieurs expérimentations sont envisageables. L'incubation *ex vivo* de VM de rats dans un bioréacteur en appliquant un flux reproduisant des forces de cisaillement à niveaux physiologiques et pathologiques, suivie d'une analyse immunohistologique procurerait des informations quant à l'impact sur la croissance, la morphologie valvulaire et sur les voies d'activation des CIVs et CEVs en réponse au stress ⁹⁴.

La mise en culture de CIVs et l'induction d'un stress mécanique d'étirement par méthode de FlexCell suivie de l'étude du profil protéique rendrait compte de la réponse cellulaire au stress selon la condition physiopathologique. D'autre part, l'ajout dans le milieu de culture de molécules de stimulation telles que le BMP, le TGF- β , Wnt ... est un autre moyen d'obtenir des réponses concernant les mécanismes en jeu dans la DVM. Cependant, la plus grande difficulté dans l'étude des CIVs *in vitro* est de maintenir leur phénotype « natif ». En effet, les protocoles de culture actuels ne permettent pas de garder un phénotype quiescent, limitant l'utilisation des approches *in vitro*. Il serait intéressant de co-cultiver et/ou de cultiver en 3 dimensions des CIVs et CEVs, en utilisant des techniques de bioprinting. En effet, se rapprocher de l'organisation cellulaire trouvée *in vivo* serait un réel avantage pour les investigations des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la DVM *in vitro*.

La mutation FLNA identifiée par mon équipe, a permis de récolter des cellules souches de patients mutés. Ces cellules sont le meilleur moyen de reproduire le phénotype cellulaire des patients *in vitro*. Néanmoins, il est primordial de mettre au point les protocoles de différenciation de ces cellules hiPSC (« human induced pluripotent stem cell ») avant de débiter les manipulations sur les cellules mutées. Pour le moment, seule la différenciation en CEVs est au point. En effet, le protocole de différenciation en CIVs, bien que publié par une équipe récemment, n'a jamais été reproduit. ³⁷⁵

L'analyse transcriptomique présentée dans le Papier 1 de ce manuscrit, a été réalisée sur des VM entières. Pour cette raison, la part de chaque type cellulaire dans les différentes voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie de la DVM n'est pas connue.

8.3 Implication des cellules immunitaires dans la DVM

Plus de 30% de l'analyse des GO-terms provenant de l'étude transcriptomique faisait référence aux cellules immunitaires. C'est pour cette raison que je me suis ensuite attachée à déterminer le rôle de ces cellules, et notamment des macrophages dans la pathologie. Nous avons établi une augmentation de la proportion des cellules myéloïdes dans les VM dystrophiques chez le rat à l'âge de 3 semaines. Cette caractéristique avait d'ailleurs été identifiée dans les feuillets myxoïdes humains²⁰², des feuillets mitraux de souris KO FlnA et Axin2 développant une DVM,^{295,296} ainsi que dans des modèles souris de DVM liée au syndrome de Marfan.²⁰⁵ Les macrophages, qui représentent la majorité des cellules myéloïdes au sein des VM²², sont un type cellulaire hétérogène. Cette hétérogénéité peut être due i) aux différentes origines de ces cellules qui peuvent provenir du sac vitellin, du foie fœtal ou encore de la moelle osseuse^{77,91,151} et ii) aux effets de l'environnement tissulaire sur leur phénotype et/ou leur activation. Bien que leur rôle spécifique ne soit pas encore élucidé, l'étude la plus récente sur des valves de patients, des souris et des cochons développant une DVM dans le cadre d'un syndrome de Marfan, démontre le rôle prépondérant des macrophages dérivés de monocytes et de l'environnement pro-inflammatoire associé, dans le développement de la DVM myxoïde²⁰⁵.

Afin de déterminer pourquoi la proportion de cellules myéloïdes est doublée dans les VM des rats à 3 semaines, j'ai réalisé le phénotypage des rats à un stade plus précoce, soit 7 jours.

A J7, un phénotype myxoïde similaire à celui observé à J21 est déjà présent. La caractérisation des cellules myéloïdes à J7 a révélé la présence d'un environnement mitral pro-inflammatoire,

suggérant une activation potentielle des cellules immunitaires associée à la production de cytokines inflammatoires qui participeraient au recrutement des cellules immunitaires. Ces données restent toutefois à valider, en qPCR et par immunomarquages.

Dans le but de déceler le rôle des macrophages dans l'initiation ou la progression de la DVM, un protocole de déplétion de ces cellules par injections répétées de liposomes-clodronate entre J7 et J21 a été mis en place. Cependant, la stratégie adoptée n'a pas permis de déléter efficacement les macrophages chez les rats, ne permettant pas de conclure sur leur implication. Néanmoins, grâce à un modèle de souris génétiquement modifié ($CCR2^{-/-}$) déplétées de cellules myéloïdes de manière stable et efficace, Kim et collaborateurs ont démontré l'effet de réversion de l'absence des cellules myéloïdes dans la progression du phénotype dystrophique dans le temps, dans un contexte de DVM syndromique.²⁰⁵

Les VM sont soumises à des forces mécaniques uniques, variable au cours du cycle cardiaque et permanentes, et le remodelage myxoïde exacerbe ces stresses. Dans le cas de valves aortiques sténosées, les forces de cisaillement augmentent l'expression des molécules d'adhésion endothéliales ICAM1 et VCAM1 *via* la stimulation du recrutement de leucocytes. Une fois sur le site, ces cellules sécrètent les cytokines TNF- α et TGF- β , activant le remodelage de la MEC par les VICs⁹⁴⁻⁹⁶. Un processus similaire pourrait être impliqué dans l'entretien de la DVM chez le rat, mettant en jeu Madcam1, Tnfsf18 et S100a8 trouvés sur-exprimés dans les valves KI lors de l'analyse transcriptomique réalisée à 3 semaines.

Des approches de co-culture de macrophages et CIVs suivies de l'étude du sécrétome permettraient de déceler l'impact de la stimulation immunitaire des CIVs sur leur profil d'expression notamment de protéines matricielles. Cependant *in vivo*, le recrutement des leucocytes au sein de la VM dépend probablement de l'expression de molécules d'adhésion par les CEVs. Ainsi, des co-cultures mettant en jeu les trois types cellulaires seraient intéressantes à mettre en place, bien que complexe,

notamment pour les raisons citées section 8.2. L'utilisation d'un système de chambre de Boyden permettrait de mettre en avant la migration cellulaire en réponse à des cytokines.

Il est connu que les plaquettes interagissent avec les monocytes dans le sang et permettent leur recrutement et leur différenciation en macrophages dans les tissus. De plus, stockée dans les plaquettes, la sérotonine est nécessaire à la régulation de la production du TNF- α et de l'IL-1 β ²⁶⁴. Pour cela, l'étude de la biologie plaquettaire chez les rats est envisagée.

8.4 Perspectives

L'étude du phénotype mitral à des stades plus précoces, notamment développementaux (pré et post EMT ; E9.5 à E14.5) permettrait de déterminer le stade d'apparition de la pathologie. En effet, il est nécessaire d'identifier les mécanismes à l'initiation de la pathologie pour la compréhension de la physiopathologie de la DVM.

Il est intéressant d'étudier les causes de l'augmentation de la proportion de macrophages dans les valves mitrales à J21. Des tests de prolifération (marquages ki67, tunel) et d'infiltration (transplantation de moelle osseuse marquée) seraient des perspectives envisageables car ces marquages sont au point au laboratoire, et que nous avons accès à des lames histologiques de VM ainsi qu'à des cultures cellulaires.

Un objectif futur est de déterminer l'effet de la mutation sur les macrophages. Pour cela, nous avons débuté l'isolement de cellules myéloïdes de la moelle osseuse, leur mise en culture et leur différenciation en macrophages *via* l'IFN- γ . Ensuite, nous planifions d'investiguer les fonctions, notamment de phagocytose, de prolifération et de migration des cellules. Par ailleurs, des injections de LPS induiraient une infection chez les rats, permettant ainsi de déterminer si la mutation FLNA-P637Q a un effet sur le système immunitaire.

Pour conclure, le nouveau modèle de rat KI FLNA-P637Q ouvre la porte à de nombreuses voies de signalisation pour expliquer la physiopathologie du PVM, qui requièrent des évaluations

complémentaires afin de déterminer précisément leur implication dans la pathologie. D'autres études sont donc à réaliser afin d'améliorer les connaissances sur la physiopathologie de la DVM, toujours dans le but d'améliorer la prise en charge des patients, ainsi que de se rapprocher d'un potentiel traitement pharmacologique permettant de ralentir l'évolution de la maladie.

Bibliographie

1. Nkomo, V. T. *et al.* Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *The Lancet* **368**, 1005–1011 (2006).
2. Rabkin, E. *et al.* Activated Interstitial Myofibroblasts Express Catabolic Enzymes and Mediate Matrix Remodeling in Myxomatous Heart Valves. *Circulation* **104**, 2525–2532 (2001).
3. Kyndt, F. *et al.* Mapping of X-Linked Myxomatous Valvular Dystrophy to Chromosome Xq28. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 627–632 (1998).
4. Kyndt, F. *et al.* Mutations in the Gene Encoding Filamin A as a Cause for Familial Cardiac Valvular Dystrophy. *Circulation* **115**, 40–49 (2007).
5. Remy, S. *et al.* Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci. Rep.* **7**, 16554 (2017).
6. Iung, B. *et al.* Contemporary Presentation and Management of Valvular Heart Disease: The EURObservational Research Programme Valvular Heart Disease II Survey. *Circulation* **140**, 1156–1169 (2019).
7. Vahanian, A. *et al.* 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed.* **75**, 524 (2022).
8. Basso, C. *et al.* Arrhythmic Mitral Valve Prolapse and Sudden Cardiac Death. *Circulation* **132**, 556–566 (2015).
9. Basso, C., Iliceto, S., Thiene, G. & Perazzolo Marra, M. Mitral Valve Prolapse, Ventricular Arrhythmias, and Sudden Death. *Circulation* **140**, 952–964 (2019).
10. Levine, R. A. *et al.* Mitral valve disease—morphology and mechanisms. *Nat. Rev. Cardiol.* **12**, 689–710 (2015).

11. Levine, R. A., Jerosch-Herold, M. & Hajjar, R. J. Mitral Valve Prolapse. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 835–837 (2018).
12. Nishimura, R. A., Vahanian, A., Eleid, M. F. & Mack, M. J. Mitral valve disease--current management and future challenges. *Lancet Lond. Engl.* **387**, 1324–1334 (2016).
13. Chiechi, M. A., Lees, W. M. & Thompson, R. FUNCTIONAL ANATOMY OF THE NORMAL MITRAL VALVE. *J. Thorac. Surg.* **32**, 378–398 (1956).
14. Kim, D.-H. *et al.* In vivo measurement of mitral leaflet surface area and subvalvular geometry in patients with asymmetrical septal hypertrophy: insights into the mechanism of outflow tract obstruction. *Circulation* **122**, 1298–1307 (2010).
15. Dal-Bianco, J. P. & Levine, R. A. Anatomy of the mitral valve apparatus: role of 2D and 3D echocardiography. *Cardiol. Clin.* **31**, 151–164 (2013).
16. Liao, J. & Vesely, I. A structural basis for the size-related mechanical properties of mitral valve chordae tendineae. *J. Biomech.* **36**, 1125–1133 (2003).
17. Song, J.-M. *et al.* Basal chordae sites on the mitral valve determine the severity of secondary mitral regurgitation. *Heart Br. Card. Soc.* **101**, 1024–1031 (2015).
18. Padala, M. *et al.* Mechanics of the mitral valve strut chordae insertion region. *J. Biomech. Eng.* **132**, 081004 (2010).
19. Guy, T. S. & Hill, A. C. Mitral valve prolapse. *Annu. Rev. Med.* **63**, 277–292 (2012).
20. Merryman, W. D. *et al.* Correlation between heart valve interstitial cell stiffness and transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **290**, H224–H231 (2006).
21. Grande-Allen, K. J. *et al.* Glycosaminoglycans and proteoglycans in normal mitral valve leaflets and chordae: association with regions of tensile and compressive loading. *Glycobiology* **14**, 621–633 (2004).
22. Hulin, A. *et al.* Maturation of heart valve cell populations during postnatal remodeling. *Development* **146**, dev173047 (2019).

23. Latif, N., Sarathchandra, P., Taylor, P. M., Antoniw, J. & Yacoub, M. H. Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J. Heart Valve Dis.* **14**, 218–227 (2005).
24. Lincoln, J., Lange, A. W. & Yutzey, K. E. Hearts and bones: Shared regulatory mechanisms in heart valve, cartilage, tendon, and bone development. *Dev. Biol.* **294**, 292–302 (2006).
25. Dal-Bianco, J. P., Beaudoin, J., Handschumacher, M. D. & Levine, R. A. Basic Mechanisms of Mitral Regurgitation. *Can. J. Cardiol.* **30**, 971–981 (2014).
26. Itoh, A. *et al.* Active stiffening of mitral valve leaflets in the beating heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H1766-1773 (2009).
27. Gupta, V. *et al.* Abundance and location of proteoglycans and hyaluronan within normal and myxomatous mitral valves. *Cardiovasc. Pathol.* **18**, 191–197 (2009).
28. Ayoub, S. *et al.* Heart Valve Biomechanics and Underlying Mechanobiology. *Compr. Physiol.* **6**, 1743–1780 (2016).
29. Sacks, M. S. & Yoganathan, A. P. Heart valve function: a biomechanical perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**, 1369–1391 (2007).
30. Sacks, M. S. *et al.* Surface strains in the anterior leaflet of the functioning mitral valve. *Ann. Biomed. Eng.* **30**, 1281–1290 (2002).
31. Sacks, M. S., David Merryman, W. & Schmidt, D. E. On the biomechanics of heart valve function. *J. Biomech.* **42**, 1804–1824 (2009).
32. Lim, K. O., Boughner, D. R. & Smith, C. A. Dynamic elasticity of human mitral valve chordae tendineae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **55**, 413–418 (1977).
33. Lim, K. O. & Boughner, D. R. Mechanical properties of human mitral valve chordae tendineae: variation with size and strain rate. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **53**, 330–339 (1975).
34. Tao, G., Kotick, J. D. & Lincoln, J. Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **100**, 203–232 (2012).

35. van der Rest, M. & Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **5**, 2814–2823 (1991).
36. Vuorio, E. & de Crombrughe, B. The family of collagen genes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 837–872 (1990).
37. Canty, E. G. & Kadler, K. E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* **118**, 1341–1353 (2005).
38. Kadler, K. Matrix loading: assembly of extracellular matrix collagen fibrils during embryogenesis. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **72**, 1–11 (2004).
39. Eyre, D. R., Paz, M. A. & Gallop, P. M. Cross-linking in collagen and elastin. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 717–748 (1984).
40. Corsi, A. *et al.* Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **17**, 1180–1189 (2002).
41. Kalamajski, S. & Oldberg, A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **29**, 248–253 (2010).
42. Beach, Z. M. *et al.* Decorin knockdown is beneficial for aged tendons in the presence of biglycan expression. *Matrix Biol. Plus* **15**, 100114 (2022).
43. Reed, C. C. & Iozzo, R. V. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj. J.* **19**, 249–255 (2002).
44. Kresse, H. & Schönherr, E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J. Cell. Physiol.* **189**, 266–274 (2001).
45. Stecco, A., Cowman, M., Pirri, N., Raghavan, P. & Pirri, C. Densification: Hyaluronan Aggregation in Different Human Organs. *Bioeng. Basel Switz.* **9**, 159 (2022).
46. Wight, T. N. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 617–623 (2002).

47. Misra, S. *et al.* Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J.* **278**, 1429–1443 (2011).
48. Swierczewska, M., Han, H. S., Kim, K., Park, J. H. & Lee, S. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **99**, 70–84 (2016).
49. Fernández-Tabanera, E., Melero-Fernández de Mera, R. M. & Alonso, J. CD44 In Sarcomas: A Comprehensive Review and Future Perspectives. *Front. Oncol.* **12**, 909450 (2022).
50. Ghosh, S. C., Neslihan Alpay, S. & Klostergaard, J. CD44: a validated target for improved delivery of cancer therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets* **16**, 635–650 (2012).
51. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 33–45 (2003).
52. Stern, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 317–325 (2004).
53. Spadaccio, C. *et al.* Cells and extracellular matrix interplay in cardiac valve disease: because age matters. *Basic Res. Cardiol.* **111**, 16 (2016).
54. Liu, A. C., Joag, V. R. & Gotlieb, A. I. The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology. *Am. J. Pathol.* **171**, 1407–1418 (2007).
55. Filip, D. A., Radu, A. & Simionescu, M. Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells. *Circ. Res.* **59**, 310–320 (1986).
56. Lester, W., Rosenthal, A., Granton, B. & Gotlieb, A. I. Porcine mitral valve interstitial cells in culture. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **59**, 710–719 (1988).
57. Mulholland, D. L. & Gotlieb, A. I. Cell biology of valvular interstitial cells. *Can. J. Cardiol.* **12**, 231–236 (1996).
58. Taylor, P. M., Batten, P., Brand, N. J., Thomas, P. S. & Yacoub, M. H. The cardiac valve interstitial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 113–118 (2003).

59. Latif, N. *et al.* Characterization of molecules mediating cell-cell communication in human cardiac valve interstitial cells. *Cell Biochem. Biophys.* **45**, 255–264 (2006).
60. Tamura, K., Jones, M., Yamada, I. & Ferrans, V. J. Wound healing in the mitral valve. *J. Heart Valve Dis.* **9**, 53–63 (2000).
61. Liu, A. C. & Gotlieb, A. I. Characterization of cell motility in single heart valve interstitial cells in vitro. *Histol. Histopathol.* **22**, 873–882 (2007).
62. Davies, P. F. Mechanisms involved in endothelial responses to hemodynamic forces. *Atherosclerosis* **131 Suppl**, S15-17 (1997).
63. Durbin, A. D. & Gotlieb, A. I. Advances towards understanding heart valve response to injury. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* **11**, 69–77 (2002).
64. Blevins, T. L. *et al.* Mitral Valvular Interstitial Cells Demonstrate Regional, Adhesional, and Synthetic Heterogeneity. *Cells Tissues Organs* **187**, 113–122 (2008).
65. Kunzelman, K. S. & Cochran, R. P. Stress/strain characteristics of porcine mitral valve tissue: parallel versus perpendicular collagen orientation. *J. Card. Surg.* **7**, 71–78 (1992).
66. Mengyao Yu. Leveraging genome-wide association studies data to inform the biology behind the genetic risk for mitral valve prolapse. (2019).
67. Butcher, J. T., Penrod, A. M., García, A. J. & Nerem, R. M. Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1429–1434 (2004).
68. Girard, P. R. & Nerem, R. M. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. *J. Cell. Physiol.* **163**, 179–193 (1995).
69. Goddard, L. M. *et al.* Hemodynamic Forces Sculpt Developing Heart Valves through a KLF2-WNT9B Paracrine Signaling Axis. *Dev. Cell* **43**, 274-289.e5 (2017).
70. Johnson, C. L., Riley, L., Bersi, M., Linton, M. F. & Merryman, W. D. Impaired macrophage trafficking and increased helper T-cell recruitment with loss of cadherin-11 in

- atherosclerotic immune response. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* (2021)
doi:10.1152/ajpheart.00263.2021.
71. Choi, J.-H. *et al.* Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J. Exp. Med.* **206**, 497–505 (2009).
 72. MacGrogan, D. *et al.* Identification of a peripheral blood gene signature predicting aortic valve calcification. *Physiol. Genomics* **52**, 563–574 (2020).
 73. Shimoni, S., Bar, I., Meledin, V., Gandelman, G. & George, J. Circulating regulatory T cells in patients with aortic valve stenosis: Association with disease progression and aortic valve intervention. *Int. J. Cardiol.* **218**, 181–187 (2016).
 74. Visconti, R. P. *et al.* An In Vivo Analysis of Hematopoietic Stem Cell Potential: Hematopoietic Origin of Cardiac Valve Interstitial Cells. *Circ. Res.* **98**, 690–696 (2006).
 75. Hajdu, Z. *et al.* Recruitment of bone marrow-derived valve interstitial cells is a normal homeostatic process. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 955–965 (2011).
 76. Kim, A. J., Xu, N. & Yutzey, K. E. Macrophage lineages in heart valve development and disease. *Cardiovasc. Res.* **117**, 663–673 (2021).
 77. Shigeta, A. *et al.* Endocardially Derived Macrophages Are Essential for Valvular Remodeling. *Dev. Cell* **48**, 617-630.e3 (2019).
 78. da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C. & Oliver, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **62**, 698–738 (2014).
 79. Varricchi, G., Marone, G. & Kovanen, P. T. Cardiac Mast Cells: Underappreciated Immune Cells in Cardiovascular Homeostasis and Disease. *Trends Immunol.* **41**, 734–746 (2020).
 80. Wypasek, E. *et al.* Mast Cells in Human Stenotic Aortic Valves Are Associated with the Severity of Stenosis. *Inflammation* **36**, 449–456 (2013).
 81. Ingason, A. B., Mechmet, F., Atacho, D. A. M., Steingrímsson, E. & Petersen, P. H. Distribution of mast cells within the mouse heart and its dependency on Mitf. *Mol. Immunol.* **105**, 9–15 (2019).

82. Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**, 86–90 (2012).
83. Epelman, S., Liu, P. P. & Mann, D. L. Role of Innate and Adaptive Immunity in Cardiac Injury and Repair. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 117–129 (2015).
84. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
85. Nahrendorf, M. & Swirski, F. K. Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ. Res.* **119**, 414–417 (2016).
86. Williams, J. W., Giannarelli, C., Rahman, A., Randolph, G. J. & Kovacic, J. C. Macrophage Biology, Classification, and Phenotype in Cardiovascular Disease: JACC Macrophage in CVD Series (Part 1). *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 2166–2180 (2018).
87. Epelman, S. *et al.* Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **40**, 91–104 (2014).
88. Lavine, K. J. *et al.* The Macrophage in Cardiac Homeostasis and Disease: JACC Macrophage in CVD Series (Part 4). *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 2213–2230 (2018).
89. Bajpai, G. *et al.* The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat. Med.* **24**, 1234–1245 (2018).
90. Bajpai, G. *et al.* Tissue Resident CCR2⁻ and CCR2⁺ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ. Res.* **124**, 263–278 (2019).
91. Hulin, A. *et al.* Macrophage transitions in heart valve development and myxomatous valve disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 636–644 (2018).
92. Aikawa, E. *et al.* Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation* **115**, 377–386 (2007).

93. Otto, C. M., Kuusisto, J., Reichenbach, D. D., Gown, A. M. & O'Brien, K. D. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* **90**, 844–853 (1994).
94. Sucosky, P., Balachandran, K., Elhammali, A., Jo, H. & Yoganathan, A. P. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 254–260 (2009).
95. Jian, B., Narula, N., Li, Q., Mohler, E. R. & Levy, R. J. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann. Thorac. Surg.* **75**, 457–465; discussion 465-466 (2003).
96. Kaden, J. J. *et al.* Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* **170**, 205–211 (2003).
97. Anstine, L. J., Horne, T. E., Horwitz, E. M. & Lincoln, J. Contribution of Extra-Cardiac Cells in Murine Heart Valves is Age-Dependent. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, e007097 (2017).
98. Mills, C. D., Thomas, A. C., Lenz, L. L. & Munder, M. Macrophage: SHIP of Immunity. *Front. Immunol.* **5**, 620 (2014).
99. Witt, C. Cardiac embryology. *Neonatal Netw. NN* **16**, 43–49 (1997).
100. Combs, M. D. & Yutzey, K. E. Heart Valve Development: Regulatory networks in development and disease. *Circ. Res.* **105**, 408 (2009).
101. Lin, C.-J., Lin, C.-Y., Chen, C.-H., Zhou, B. & Chang, C.-P. Partitioning the heart: mechanisms of cardiac septation and valve development. *Dev. Camb. Engl.* **139**, 3277–3299 (2012).
102. Anderson, R. H., Webb, S., Brown, N. A., Lamers, W. & Moorman, A. Development of the heart: (3) formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. *Heart Br. Card. Soc.* **89**, 1110–1118 (2003).
103. Männer, J. & Yelbuz, T. M. Functional Morphology of the Cardiac Jelly in the Tubular Heart of Vertebrate Embryos. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **6**, 12 (2019).

104. Nieto, M. A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* **342**, 1234850 (2013).
105. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
106. Oosthoek, P. W., Wenink, A. C., Wisse, L. J. & Gittenberger-de Groot, A. C. Development of the papillary muscles of the mitral valve: morphogenetic background of parachute-like asymmetric mitral valves and other mitral valve anomalies. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **116**, 36–46 (1998).
107. Eisenberg, L. M. & Markwald, R. R. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.* **77**, 1–6 (1995).
108. Markwald, R. R., Fitzharris, T. P. & Manasek, F. J. Structural development of endocardial cushions. *Am. J. Anat.* **148**, 85–119 (1977).
109. Runyan, R. B. & Markwald, R. R. Invasion of mesenchyme into three-dimensional collagen gels: a regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue. *Dev. Biol.* **95**, 108–114 (1983).
110. Abedin, M., Tintut, Y. & Demer, L. L. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ. Res.* **95**, 671–676 (2004).
111. Chang, C.-P. *et al.* A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* **118**, 649–663 (2004).
112. Christoffels, V. M. *et al.* T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **229**, 763–770 (2004).
113. Rivera-Feliciano, J. & Tabin, C. J. Bmp2 instructs cardiac progenitors to form the heart-valve-inducing field. *Dev. Biol.* **295**, 580–588 (2006).

114. Shirai, M., Imanaka-Yoshida, K., Schneider, M. D., Schwartz, R. J. & Morisaki, T. T-box 2, a mediator of Bmp-Smad signaling, induced hyaluronan synthase 2 and Tgf 2 expression and endocardial cushion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18604–18609 (2009).
115. Butcher, J. T. & Markwald, R. R. Valvulogenesis: the moving target. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**, 1489–1503 (2007).
116. Moorman, A., Webb, S., Brown, N. A., Lamers, W. & Anderson, R. H. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart Br. Card. Soc.* **89**, 806–814 (2003).
117. Person, A. D., Klewer, S. E. & Runyan, R. B. Cell biology of cardiac cushion development. *Int. Rev. Cytol.* **243**, 287–335 (2005).
118. Wang, Y. *et al.* Endocardial to myocardial notch-wnt-bmp axis regulates early heart valve development. *PloS One* **8**, e60244 (2013).
119. Wang, Y. *et al.* Notch-Tnf signalling is required for development and homeostasis of arterial valves. *Eur. Heart J.* **38**, 675–686 (2017).
120. van Wijk, B., Moorman, A. F. M. & van den Hoff, M. J. B. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc. Res.* **74**, 244–255 (2007).
121. Inai, K., Norris, R. A., Hoffman, S., Markwald, R. R. & Sugi, Y. BMP-2 induces cell migration and periostin expression during atrioventricular valvulogenesis. *Dev. Biol.* **315**, 383–396 (2008).
122. Ma, L., Lu, M.-F., Schwartz, R. J. & Martin, J. F. Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 5601–5611 (2005).
123. Sugi, Y., Yamamura, H., Okagawa, H. & Markwald, R. R. Bone morphogenetic protein-2 can mediate myocardial regulation of atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in mice. *Dev. Biol.* **269**, 505–518 (2004).

124. Gasparics, Á. & Sebe, A. MRTFs- master regulators of EMT: MRTFs- Master Regulators of EMT. *Dev. Dyn.* **247**, 396–404 (2018).
125. Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A. B. & Ooshima, A. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest.* **112**, 1486–1494 (2003).
126. Armstrong, E. J. & Bischoff, J. Heart Valve Development: Endothelial Cell Signaling and Differentiation. *Circ. Res.* **95**, 459–470 (2004).
127. Liebner, S. *et al.* Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J. Cell Biol.* **166**, 359–367 (2004).
128. Luna-Zurita, L. *et al.* Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J. Clin. Invest.* **120**, 3493–3507 (2010).
129. Timmerman, L. A. *et al.* Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* **18**, 99–115 (2004).
130. de Vlaming, A. *et al.* Atrioventricular valve development: new perspectives on an old theme. *Differ. Res. Biol. Divers.* **84**, 103–116 (2012).
131. Wu, B. *et al.* Nfatc1 coordinates valve endocardial cell lineage development required for heart valve formation. *Circ. Res.* **109**, 183–192 (2011).
132. Romano, L. A. & Runyan, R. B. Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev. Biol.* **223**, 91–102 (2000).
133. Dor, Y. *et al.* A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects. *Dev. Camb. Engl.* **128**, 1531–1538 (2001).
134. Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 359–371 (2006).

135. Stankunas, K., Ma, G. K., Kuhnert, F. J., Kuo, C. J. & Chang, C.-P. VEGF signaling has distinct spatiotemporal roles during heart valve development. *Dev. Biol.* **347**, 325–336 (2010).
136. Norris, R. A. *et al.* Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J. Cell. Biochem.* **101**, 695–711 (2007).
137. Yang, J.-H., Wylie-Sears, J. & Bischoff, J. Opposing actions of Notch1 and VEGF in post-natal cardiac valve endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 512–516 (2008).
138. Hove, J. R. *et al.* Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature* **421**, 172–177 (2003).
139. Duchemin, A.-L., Vignes, H. & Vermot, J. Mechanically activated piezo channels modulate outflow tract valve development through the Yap1 and Klf2-Notch signaling axis. *eLife* **8**, e44706 (2019).
140. O'Donnell, A. & Yutzey, K. E. Mechanisms of heart valve development and disease. *Dev. Camb. Engl.* **147**, dev183020 (2020).
141. Qu, X. *et al.* Loss of flow responsive Tiel results in Impaired Aortic valve remodeling. *Dev. Biol.* **455**, 73–84 (2019).
142. Del Monte, G., Grego-Bessa, J., González-Rajal, A., Bolós, V. & De La Pompa, J. L. Monitoring Notch1 activity in development: evidence for a feedback regulatory loop. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **236**, 2594–2614 (2007).
143. Pucéat, M. Embryological origin of the endocardium and derived valve progenitor cells: from developmental biology to stem cell-based valve repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 917–922 (2013).
144. Dzierzak, E. & Bigas, A. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell* **22**, 639–651 (2018).
145. Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631–644 (2008).

146. Palis, J. Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis: emergence of erythroid, megakaryocyte, and myeloid potential in the mammalian embryo. *FEBS Lett.* **590**, 3965–3974 (2016).
147. Nakano, H. *et al.* Haemogenic endocardium contributes to transient definitive haematopoiesis. *Nat. Commun.* **4**, 1564 (2013).
148. Yzaguirre, A. D. & Speck, N. A. Insights into blood cell formation from hemogenic endothelium in lesser-known anatomic sites. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **245**, 1011–1028 (2016).
149. Zamir, L. *et al.* Nkx2.5 marks angioblasts that contribute to hemogenic endothelium of the endocardium and dorsal aorta. *eLife* **6**, e20994 (2017).
150. Liu, K. *et al.* Lineage tracing clarifies the cellular origin of tissue-resident macrophages in the developing heart. *J. Cell Biol.* **221**, e202108093 (2022).
151. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* **14**, 986–995 (2013).
152. Ginhoux, F. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841–845 (2010).
153. Hashimoto, D. *et al.* Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* **38**, 792–804 (2013).
154. Kierdorf, K., Prinz, M., Geissmann, F. & Gomez Perdiguero, E. Development and function of tissue resident macrophages in mice. *Semin. Immunol.* **27**, 369–378 (2015).
155. Pinto, A. R. *et al.* An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS One* **7**, e36814 (2012).
156. Yadgir, S. *et al.* Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990–2017. *Circulation* **141**, 1670–1680 (2020).
157. Le Tourneau, T. *et al.* Genetics of syndromic and non-syndromic mitral valve prolapse. *Heart* **104**, 978–984 (2018).

158. Lazar, F., Marques, L. C. & Aiello, V. D. Myxomatous degeneration of the mitral valve. *Autopsy Case Rep.* **8**, (2018).
159. Cahill, T. J. *et al.* Community prevalence, mechanisms and outcome of mitral or tricuspid regurgitation. *Heart Br. Card. Soc.* heartjnl-2020-318482 (2021) doi:10.1136/heartjnl-2020-318482.
160. Carpentier, A. Cardiac valve surgery--the 'French correction'. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **86**, 323–337 (1983).
161. Zoghbi, W. A. *et al.* Recommendations for Noninvasive Evaluation of Native Valvular Regurgitation: A Report from the American Society of Echocardiography Developed in Collaboration with the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance. *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* **30**, 303–371 (2017).
162. Anyanwu, A. C. & Adams, D. H. Etiologic Classification of Degenerative Mitral Valve Disease: Barlow's Disease and Fibroelastic Deficiency. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **19**, 90–96 (2007).
163. Hjortnaes, J. *et al.* Comparative Histopathological Analysis of Mitral Valves in Barlow Disease and Fibroelastic Deficiency. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **28**, 757–767 (2016).
164. Otto, C. M. *et al.* 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary. *J. Am. Coll. Cardiol.* **77**, 450–500 (2021).
165. Gheorghe, L. L. *et al.* Imaging for Native Mitral Valve Surgical and Transcatheter Interventions. *JACC Cardiovasc. Imaging* **14**, 112–127 (2021).
166. Sugimoto, T. *et al.* What Does 3D Echocardiography Add to 2D Echocardiography in the Assessment of Mitral Regurgitation? *Curr. Cardiol. Rep.* **19**, 90 (2017).
167. Penicka, M. *et al.* Prognostic Implications of Magnetic Resonance-Derived Quantification in Asymptomatic Patients With Organic Mitral Regurgitation: Comparison With Doppler Echocardiography-Derived Integrative Approach. *Circulation* **137**, 1349–1360 (2018).

168. Uretsky, S. *et al.* Discordance between echocardiography and MRI in the assessment of mitral regurgitation severity: a prospective multicenter trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 1078–1088 (2015).
169. Constant Dit Beaufils, A.-L. *et al.* Replacement Myocardial Fibrosis in Patients With Mitral Valve Prolapse: Relation to Mitral Regurgitation, Ventricular Remodeling, and Arrhythmia. *Circulation* **143**, 1763–1774 (2021).
170. Garg, P. *et al.* Assessment of mitral valve regurgitation by cardiovascular magnetic resonance imaging. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 298–312 (2020).
171. Kitkungvan, D. *et al.* Myocardial Fibrosis in Patients With Primary Mitral Regurgitation With and Without Prolapse. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 823–834 (2018).
172. Young, A. & Feldman, T. Percutaneous mitral valve repair. *Curr. Cardiol. Rep.* **16**, 443 (2014).
173. Nalliah, C. J. *et al.* Mitral valve prolapse and sudden cardiac death: a systematic review and meta-analysis. *Heart Br. Card. Soc.* **105**, 144–151 (2019).
174. Baumgartner, H. *et al.* 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur. Heart J.* **38**, 2739–2791 (2017).
175. Salik, I., Lee, L. S. & Widrich, J. Mitral Valve Repair. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
176. Perier, P., Hohenberger, W., Batz, G., Lakew, F. & Diegeler, A. Mitral valve repair for degenerative mitral valve regurgitation. *Indian J. Thorac. Cardiovasc. Surg. Off. Organ Assoc. Thorac. Cardiovasc. Surg. India* **36**, 12–17 (2020).
177. Kumar, M., Thompson, P. D. & Chen, K. New Perspective on Pathophysiology and Management of Functional Mitral Regurgitation. *Trends Cardiovasc. Med.* (2022) doi:10.1016/j.tcm.2022.03.001.
178. Nishimura, R. A. *et al.* 2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American

College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* **135**, (2017).

179. Avierinos, J.-F. *et al.* Natural history of asymptomatic mitral valve prolapse in the community. *Circulation* **106**, 1355–1361 (2002).
180. Gammie, J. S. *et al.* Isolated Mitral Valve Surgery: The Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Surgery Database Analysis. *Ann. Thorac. Surg.* **106**, 716–727 (2018).
181. Verma, S. & Mesana, T. G. Mitral-Valve Repair for Mitral-Valve Prolapse. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2261–2269 (2009).
182. Leguerrier, A., Flecher, E., Fouquet, O. & Lelong, B. Prothèses valvulaires cardiaques. *EMC - Cardiol.* **4**, 1–31 (2009).
183. Stone, G. W. *et al.* Transcatheter Mitral-Valve Repair in Patients with Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **379**, 2307–2318 (2018).
184. Kalbacher, D. *et al.* Long-term outcome, survival and predictors of mortality after MitraClip therapy: Results from the German Transcatheter Mitral Valve Interventions (TRAMI) registry. *Int. J. Cardiol.* **277**, 35–41 (2019).
185. Chiarito, M. *et al.* Outcome after percutaneous edge-to-edge mitral repair for functional and degenerative mitral regurgitation: a systematic review and meta-analysis. *Heart Br. Card. Soc.* **104**, 306–312 (2018).
186. Praz, F. *et al.* Compassionate use of the PASCAL transcatheter mitral valve repair system for patients with severe mitral regurgitation: a multicentre, prospective, observational, first-in-man study. *The Lancet* **390**, 773–780 (2017).
187. Feldman, T. *et al.* Percutaneous repair or surgery for mitral regurgitation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1395–1406 (2011).
188. Foster, E. *et al.* Percutaneous mitral valve repair in the initial EVEREST cohort: evidence of reverse left ventricular remodeling. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **6**, 522–530 (2013).

189. Szerlip, M. *et al.* 2-Year Outcomes for Transcatheter Repair in Patients With Mitral Regurgitation From the CLASP Study. *JACC Cardiovasc. Interv.* **14**, 1538–1548 (2021).
190. Alperi, A., Granada, J. F., Bernier, M., Dagenais, F. & Rodés-Cabau, J. Current Status and Future Prospects of Transcatheter Mitral Valve Replacement: JACC State-of-the-Art Review. *J. Am. Coll. Cardiol.* **77**, 3058–3078 (2021).
191. Enta, Y. & Nakamura, M. Transcatheter mitral valve replacement. *J. Cardiol.* **77**, 555–564 (2021).
192. Fiorilli, P. N., Herrmann, H. C. & Szeto, W. Y. Transcatheter mitral valve replacement: latest advances and future directions. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **10**, 85–95 (2021).
193. Hensey, M. *et al.* Transcatheter Mitral Valve Replacement: An Update on Current Techniques, Technologies, and Future Directions. *JACC Cardiovasc. Interv.* **14**, 489–500 (2021).
194. Webb, J. G. *et al.* 1-Year Outcomes for Transcatheter Repair in Patients With Mitral Regurgitation From the CLASP Study. *JACC Cardiovasc. Interv.* **13**, 2344–2357 (2020).
195. Xiling, Z. *et al.* Transcatheter Mitral Valve Repair or Replacement: Competitive or Complementary? *J. Clin. Med.* **11**, 3377 (2022).
196. David, T. E., David, C. M., Tsang, W., Lafreniere-Roula, M. & Manlhiot, C. Long-Term Results of Mitral Valve Repair for Regurgitation Due to Leaflet Prolapse. *J. Am. Coll. Cardiol.* **74**, 1044–1053 (2019).
197. Buzzatti, N. *et al.* Transcatheter or surgical repair for degenerative mitral regurgitation in elderly patients: A propensity-weighted analysis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **158**, 86-94.e1 (2019).
198. Feldman, T. *et al.* Randomized Comparison of Percutaneous Repair and Surgery for Mitral Regurgitation: 5-Year Results of EVEREST II. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 2844–2854 (2015).
199. Guérin, P. Traitement percutané de l'insuffisance mitrale par Mitraclip chez le sujet âgé. *Ann. Cardiol. Angéiologie* **67**, 474–481 (2018).

200. Kolibash, A. J. *et al.* Evidence for progression from mild to severe mitral regurgitation in mitral valve prolapse. *Am. J. Cardiol.* **58**, 762–767 (1986).
201. Dietz, H. C. *et al.* Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* **352**, 337–339 (1991).
202. Geirsson, A. *et al.* Modulation of Transforming Growth Factor- Signaling and Extracellular Matrix Production in Myxomatous Mitral Valves by Angiotensin II Receptor Blockers. *Circulation* **126**, S189–S197 (2012).
203. Neptune, E. R. *et al.* Dysregulation of TGF- β activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat. Genet.* **33**, 407–411 (2003).
204. Ng, C. M. *et al.* TGF- β –dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1586–1592 (2004).
205. Kim, A. J. *et al.* Deficiency of Circulating Monocytes Ameliorates the Progression of Myxomatous Valve Degeneration in Marfan Syndrome. *Circulation* **141**, 132–146 (2020).
206. Cousin, M. A. *et al.* Functional validation reveals the novel missense V419L variant in TGFBR2 associated with Loeys–Dietz syndrome (LDS) impairs canonical TGF- β signaling. *Mol. Case Stud.* **3**, a001727 (2017).
207. Loeys, B. L. *et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat. Genet.* **37**, 275–281 (2005).
208. Loeys, B. L. *et al.* Aneurysm Syndromes Caused by Mutations in the TGF- β Receptor. *N. Engl. J. Med.* **355**, 788–798 (2006).
209. Chivulescu, M. *et al.* Mitral annulus disjunction is associated with adverse outcome in Marfan and Loeys–Dietz syndromes. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* **22**, 1035–1044 (2020).
210. MacCarrick, G. *et al.* Loeys-Dietz syndrome: a primer for diagnosis and management. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **16**, 576–587 (2014).

211. Taub, C. C. *et al.* Mitral valve prolapse in Marfan syndrome: an old topic revisited. *Echocardiogr. Mt. Kisco N* **26**, 357–364 (2009).
212. Malfait, F. *et al.* The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **175**, 8–26 (2017).
213. Superti-Furga, A., Gugler, E., Gitzelmann, R. & Steinmann, B. Ehlers-Danlos syndrome type IV: a multi-exon deletion in one of the two COL3A1 alleles affecting structure, stability, and processing of type III procollagen. *J. Biol. Chem.* **263**, 6226–6232 (1988).
214. Paige, S. L., Lechich, K. M., Tierney, E. S. S. & Collins, R. T. Cardiac involvement in classical or hypermobile Ehlers–Danlos syndrome is uncommon. *Genet. Med.* **22**, 1583–1588 (2020).
215. Morningstar, J. E. *et al.* Mitral Valve Prolapse and Its Motley Crew-Syndromic Prevalence, Pathophysiology, and Progression of a Common Heart Condition. *J. Am. Heart Assoc.* **10**, e020919 (2021).
216. Hirose, T. *et al.* Comparative study of dermal components and plasma TGF- β 1 levels in Slc39a13/Zip13-KO mice. *J. Vet. Med. Sci.* **77**, 1385–1389 (2015).
217. Ku, C.-H. *et al.* Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch. *Cardiovasc. Res.* **71**, 548–556 (2006).
218. Devereux, R. B., Brown, W. T., Kramer-Fox, R. & Sachs, I. Inheritance of mitral valve prolapse: effect of age and sex on gene expression. *Ann. Intern. Med.* **97**, 826–832 (1982).
219. Delling, F. N. *et al.* Familial clustering of mitral valve prolapse in the community. *Circulation* **131**, 263–268 (2015).
220. Disse, S. *et al.* Mapping of a first locus for autosomal dominant myxomatous mitral-valve prolapse to chromosome 16p11.2-p12.1. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1242–1251 (1999).
221. Freed, L. A. *et al.* A locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 11p15.4. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1551–1559 (2003).

222. Nesta, F. *et al.* New locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 13: clinical insights from genetic studies. *Circulation* **112**, 2022–2030 (2005).
223. Monteleone, P. L. & Fagan, L. F. Possible X-linked congenital heart disease. *Circulation* **39**, 611–614 (1969).
224. Duval, D. *et al.* MVP-Associated Filamin A Mutations Affect FlnA-PTPN12 (PTP-PEST) Interactions. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2**, 233–247 (2015).
225. Durst, R. *et al.* Mutations in DCHS1 cause mitral valve prolapse. *Nature* **525**, 109–113 (2015).
226. Clark, H. F. *et al.* Dachous encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginal disc morphogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev.* **9**, 1530–1542 (1995).
227. Feng, Y. *et al.* Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 19836–19841 (2006).
228. Sauls, K. *et al.* Developmental basis for filamin-A-associated myxomatous mitral valve disease. *Cardiovasc. Res.* **96**, 109–119 (2012).
229. Dina, C. *et al.* Genetic association analyses highlight biological pathways underlying mitral valve prolapse. *Nat. Genet.* **47**, 1206–1211 (2015).
230. Toomer, K. A. *et al.* Primary cilia defects causing mitral valve prolapse. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaax0290 (2019).
231. Sekimizu, K. *et al.* The zebrafish iguana locus encodes Dzip1, a novel zinc-finger protein required for proper regulation of Hedgehog signaling. *Dev. Camb. Engl.* **131**, 2521–2532 (2004).
232. Wolff, C. *et al.* iguana encodes a novel zinc-finger protein with coiled-coil domains essential for Hedgehog signal transduction in the zebrafish embryo. *Genes Dev.* **18**, 1565–1576 (2004).
233. Zhang, B. *et al.* GSK3 β -Dzip1-Rab8 cascade regulates ciliogenesis after mitosis. *PLoS Biol.* **13**, e1002129 (2015).

234. Arnold, C. R. *et al.* Comparative analysis of genes regulated by Dzip1/iguana and hedgehog in zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **244**, 211–223 (2015).
235. Kim, H. R., Richardson, J., van Eeden, F. & Ingham, P. W. Gli2a protein localization reveals a role for Iguana/DZIP1 in primary ciliogenesis and a dependence of Hedgehog signal transduction on primary cilia in the zebrafish. *BMC Biol.* **8**, 65 (2010).
236. Tay, S. Y. *et al.* The iguana/DZIP1 protein is a novel component of the ciliogenic pathway essential for axonemal biogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **239**, 527–534 (2010).
237. Wang, C., Low, W.-C., Liu, A. & Wang, B. Centrosomal protein DZIP1 regulates Hedgehog signaling by promoting cytoplasmic retention of transcription factor GLI3 and affecting ciliogenesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 29518–29529 (2013).
238. Toomer, K. A. *et al.* A role for primary cilia in aortic valve development and disease: Bicuspid Aortic Valve Disease as a Ciliopathy. *Dev. Dyn.* **246**, 625–634 (2017).
239. Rath, N., Wang, Z., Lu, M. M. & Morrisey, E. E. LMCD1/Dyxin is a novel transcriptional cofactor that restricts GATA6 function by inhibiting DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8864–8873 (2005).
240. Yu, M. *et al.* Genome-Wide Association Meta-Analysis Supports Genes Involved in Valve and Cardiac Development to Associate With Mitral Valve Prolapse. *Circ. Genomic Precis. Med.* (2021) doi:10.1161/CIRCGEN.120.003148.
241. Roselli, C. *et al.* Genome-wide association study reveals novel genetic loci: a new polygenic risk score for mitral valve prolapse. *Eur. Heart J.* **43**, 1668–1680 (2022).
242. Guignabert, C. & Humbert, M. Targeting transforming growth factor- β receptors in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **57**, 2002341 (2021).
243. Annes, J. P., Munger, J. S. & Rifkin, D. B. Making sense of latent TGF β activation. *J. Cell Sci.* **116**, 217–224 (2003).

244. Wipff, P.-J., Rifkin, D. B., Meister, J.-J. & Hinz, B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **179**, 1311–1323 (2007).
245. Unsöld, C., Hyytiäinen, M., Bruckner-Tuderman, L. & Keski-Oja, J. Latent TGF-beta binding protein LTBP-1 contains three potential extracellular matrix interacting domains. *J. Cell Sci.* **114**, 187–197 (2001).
246. Ge, G. & Greenspan, D. S. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J. Cell Biol.* **175**, 111–120 (2006).
247. Mu, D. *et al.* The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J. Cell Biol.* **157**, 493–507 (2002).
248. Oyama, M. A. & Chittur, S. V. Genomic expression patterns of mitral valve tissues from dogs with degenerative mitral valve disease. *Am. J. Vet. Res.* **67**, 1307–1318 (2006).
249. Hulin, A. *et al.* Emerging pathogenic mechanisms in human myxomatous mitral valve: lessons from past and novel data. *Cardiovasc. Pathol.* **22**, 245–250 (2013).
250. Sainger, R. *et al.* Human Myxomatous Mitral Valve Prolapse: Role of Bone Morphogenetic Protein 4 in valvular interstitial cell activation. *J. Cell. Physiol.* **227**, 2595–2604 (2012).
251. Oyama, M. A. *et al.* Comparative pathology of human and canine myxomatous mitral valve degeneration: 5HT and TGF- β mechanisms. *Cardiovasc. Pathol.* **46**, 107196 (2020).
252. Euler-Taimor, G. & Heger, J. The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* **69**, 15–25 (2006).
253. Heldin, C.-H. & Moustakas, A. Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a022053 (2016).
254. Tan, K. *et al.* Evaluation of canine 2D cell cultures as models of myxomatous mitral valve degeneration. *PLoS ONE* **14**, (2019).
255. Todorovic, V. *et al.* Long form of latent TGF- β binding protein 1 (Ltbp1L) regulates cardiac valve development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **240**, 176–187 (2011).

256. Galvin, K. M. *et al.* A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat. Genet.* **24**, 171–174 (2000).
257. Moskowitz, I. P. *et al.* Transcription factor genes Smad4 and Gata4 cooperatively regulate cardiac valve development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4006–4011 (2011).
258. Tang, Q., McNair, A. J., Phadwal, K., Macrae, V. E. & Corcoran, B. M. The Role of Transforming Growth Factor- β Signaling in Myxomatous Mitral Valve Degeneration. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, 872288 (2022).
259. Goumans, M.-J. & Ten Dijke, P. TGF- β Signaling in Control of Cardiovascular Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a022210 (2018).
260. Ni, W. & Watts, S. W. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **33**, 575–583 (2006).
261. Fitzgerald, L. W. *et al.* Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol. Pharmacol.* **57**, 75–81 (2000).
262. Ayme-Dietrich, E., Aubertin-Kirch, G., Maroteaux, L. & Monassier, L. Cardiovascular remodeling and the peripheral serotonergic system. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **110**, 51–59 (2017).
263. Launay, J. M. *et al.* Ras involvement in signal transduction by the serotonin 5-HT2B receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 3141–3147 (1996).
264. Jaffré, F. *et al.* Involvement of the Serotonin 5-HT2B Receptor in Cardiac Hypertrophy Linked to Sympathetic Stimulation. *Circulation* **110**, 969–974 (2004).
265. Connolly, J. M. *et al.* Fenfluramine disrupts the mitral valve interstitial cell response to serotonin. *Am. J. Pathol.* **175**, 988–997 (2009).
266. Hutcheson, J. D., Setola, V., Roth, B. L. & Merryman, W. D. Serotonin receptors and heart valve disease--it was meant 2B. *Pharmacol. Ther.* **132**, 146–157 (2011).

267. Jian, B. *et al.* Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am. J. Pathol.* **161**, 2111–2121 (2002).
268. Robiolio, P. A. *et al.* Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* **92**, 790–795 (1995).
269. Connolly, H. M. *et al.* Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N. Engl. J. Med.* **337**, 581–588 (1997).
270. Disatian, S. & Orton, E. C. Autocrine serotonin and transforming growth factor beta 1 signaling mediates spontaneous myxomatous mitral valve disease. *J. Heart Valve Dis.* **18**, 44–51 (2009).
271. Disatian, S., Lacerda, C. & Orton, E. C. Tryptophan hydroxylase 1 expression is increased in phenotype-altered canine and human degenerative myxomatous mitral valves. *J. Heart Valve Dis.* **19**, 71–78 (2010).
272. Scruggs, S. M., Disatian, S. & Orton, E. C. Serotonin transmembrane transporter is down-regulated in late-stage canine degenerative mitral valve disease. *J. Vet. Cardiol. Off. J. Eur. Soc. Vet. Cardiol.* **12**, 163–169 (2010).
273. Arndt, J. W. *et al.* Serum serotonin concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *J. Vet. Intern. Med.* **23**, 1208–1213 (2009).
274. Oyama, M. A. & Levy, R. J. Insights into serotonin signaling mechanisms associated with canine degenerative mitral valve disease. *J. Vet. Intern. Med.* **24**, 27–36 (2010).
275. Cremer, S. E. *et al.* Serotonin Concentrations in Platelets, Plasma, Mitral Valve Leaflet, and Left Ventricular Myocardial Tissue in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease. *J. Vet. Intern. Med.* **28**, 1534–1540 (2014).
276. Droogmans, S. *et al.* Dose dependency and reversibility of serotonin-induced valvular heart disease in rats. *Cardiovasc. Toxicol.* **9**, 134–141 (2009).

277. Pavone, L. M. *et al.* Serotonin transporter gene deficiency is associated with sudden death of newborn mice through activation of TGF-beta1 signalling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **47**, 691–697 (2009).
278. Mekontso-Dessap A. *et al.* Deficiency of the 5-Hydroxytryptamine Transporter Gene Leads to Cardiac Fibrosis and Valvulopathy in Mice. *Circulation* **113**, 81–89 (2006).
279. Broekhuis, J. R., Leong, W. Y. & Jansen, G. Regulation of cilium length and intraflagellar transport. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **303**, 101–138 (2013).
280. Broekhuis, J. R., Verhey, K. J. & Jansen, G. Regulation of cilium length and intraflagellar transport by the RCK-kinases ICK and MOK in renal epithelial cells. *PLoS One* **9**, e108470 (2014).
281. Niggemann, B., Müller, A., Nolte, A., Schnoy, N. & Wahn, U. Abnormal length of cilia--a cause of primary ciliary dyskinesia--a case report. *Eur. J. Pediatr.* **151**, 73–75 (1992).
282. Yuan, S. *et al.* Target-of-rapamycin complex 1 (Torc1) signaling modulates cilia size and function through protein synthesis regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2021–2026 (2012).
283. Ivy, D. D. *et al.* Cardiovascular abnormalities in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **5**, 2032–2036 (1995).
284. Lumiaho, A. *et al.* Mitral valve prolapse and mitral regurgitation are common in patients with polycystic kidney disease type 1. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **38**, 1208–1216 (2001).
285. Thompson, C. L., Chapple, J. P. & Knight, M. M. Primary cilia disassembly down-regulates mechanosensitive hedgehog signalling: a feedback mechanism controlling ADAMTS-5 expression in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, 490–498 (2014).
286. Mangos, S. *et al.* The ADPKD genes *pkd1a/b* and *pkd2* regulate extracellular matrix formation. *Dis. Model. Mech.* **3**, 354–365 (2010).

287. Boutet, A. *et al.* Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J.* **25**, 5603–5613 (2006).
288. Humphreys, B. D. *et al.* Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am. J. Pathol.* **176**, 85–97 (2010).
289. Dal-Bianco, J. P. *et al.* Active Adaptation of the Tethered Mitral Valve: Insights into a Compensatory Mechanism for Functional Mitral Regurgitation. *Circulation* **120**, 334–342 (2009).
290. Shapero, K., Wylie-Sears, J., Levine, R. A., Mayer, J. E. & Bischoff, J. Reciprocal interactions between mitral valve endothelial and interstitial cells reduce endothelial-to-mesenchymal transition and myofibroblastic activation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **80**, 175–185 (2015).
291. Wylie-Sears, J., Levine, R. A. & Bischoff, J. Losartan inhibits endothelial-to-mesenchymal transformation in mitral valve endothelial cells by blocking transforming growth factor- β -induced phosphorylation of ERK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 870–875 (2014).
292. Kim, A. J., Alfieri, C. M. & Yutzey, K. E. Endothelial Cell Lineage Analysis Does Not Provide Evidence for EMT in Adult Valve Homeostasis and Disease. *Anat. Rec.* **302**, 125–135 (2019).
293. Bartko, P. E. *et al.* Effect of Losartan on Mitral Valve Changes After Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 1232–1244 (2017).
294. Dal-Bianco, J. P. *et al.* Myocardial Infarction Alters Adaptation of the Tethered Mitral Valve. *J. Am. Coll. Cardiol.* **67**, 275–287 (2016).
295. Hulin, A., Moore, V., James, J. M. & Yutzey, K. E. Loss of Axin2 results in impaired heart valve maturation and subsequent myxomatous valve disease. *Cardiovasc. Res.* **113**, 40–51 (2017).
296. Sauls, K. *et al.* Increased Infiltration of Extra-Cardiac Cells in Myxomatous Valve Disease. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2**, 200–213 (2015).

297. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
298. Lee, S. H. & Choi, J.-H. Involvement of Immune Cell Network in Aortic Valve Stenosis: Communication between Valvular Interstitial Cells and Immune Cells. *Immune Netw.* **16**, 26–32 (2016).
299. Taylor, B. C., Lee, C. T. & Amaro, R. E. Structural basis for ligand modulation of the CCR2 conformational landscape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 8131–8136 (2019).
300. Zheng, Y. *et al.* Structure of CC chemokine receptor 2 with orthosteric and allosteric antagonists. *Nature* **540**, 458–461 (2016).
301. Mobasheri, A., Carter, S. D., Martín-Vasallo, P. & Shakibaei, M. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol. Int.* **26**, 1–18 (2002).
302. Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
303. Luo, B.-H., Carman, C. V. & Springer, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 619–647 (2007).
304. van der Flier, A. & Sonnenberg, A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* **305**, 285–298 (2001).
305. Calderwood, D. A. *et al.* The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J. Biol. Chem.* **277**, 21749–21758 (2002).
306. Schwartz, M. A. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* **11**, 466–470 (2001).
307. Pagnozzi, L. A. & Butcher, J. T. Mechanotransduction Mechanisms in Mitral Valve Physiology and Disease Pathogenesis. *Front. Cardiovasc. Med.* **4**, 83 (2017).
308. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* **275**, 21785–21788 (2000).

309. Chen, H. S., Kolahi, K. S. & Mofrad, M. R. K. Phosphorylation Facilitates the Integrin Binding of Filamin under Force. *Biophys. J.* **97**, 3095–3104 (2009).
310. Zhang, J. *et al.* Targeted inhibition of Focal Adhesion Kinase Attenuates Cardiac Fibrosis and Preserves Heart Function in Adverse Cardiac Remodeling. *Sci. Rep.* **7**, 43146 (2017).
311. Waxman, A. S., Kornreich, B. G., Gould, R. A., Sydney Moise, N. & Butcher, J. T. Interactions between TGF β 1 and cyclic strain in modulation of myofibroblastic differentiation of canine mitral valve interstitial cells in 3D culture. *J. Vet. Cardiol.* **14**, 211–221 (2012).
312. Blomme, B. *et al.* Mechanical strain induces a pro-fibrotic phenotype in human mitral valvular interstitial cells through RhoC/ROCK/MRTF-A and Erk1/2 signaling pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **135**, 149–159 (2019).
313. Arora, P. D., Narani, N. & McCulloch, C. A. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am. J. Pathol.* **154**, 871–882 (1999).
314. Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. & Chaponnier, C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2730–2741 (2001).
315. Hulin, A. *et al.* Metallothionein-dependent up-regulation of TGF- β 2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve. *Cardiovasc. Res.* **93**, 480–489 (2012).
316. Thalji, N. M. *et al.* Nonbiased Molecular Screening Identifies Novel Molecular Regulators of Fibrogenic and Proliferative Signaling in Myxomatous Mitral Valve Disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **8**, 516–528 (2015).
317. Hutcheson, J. D., Ryzhova, L. M., Setola, V. & Merryman, W. D. 5-HT(2B) antagonism arrests non-canonical TGF- β 1-induced valvular myofibroblast differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53**, 707–714 (2012).

318. Lacerda, C. M. R., Kisiday, J., Johnson, B. & Orton, E. C. Local serotonin mediates cyclic strain-induced phenotype transformation, matrix degradation, and glycosaminoglycan synthesis in cultured sheep mitral valves. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **302**, H1983–H1990 (2012).
319. Lardeux, A. *et al.* Filamin-A-Related Myxomatous Mitral Valve Dystrophy: Genetic, Echocardiographic and Functional Aspects. *J Cardiovasc. Transl. Res.* **4**, 748–756 (2011).
320. Le Tourneau, T. *et al.* New insights into mitral valve dystrophy: a Filamin-A genotype–phenotype and outcome study. *Eur. Heart J.* **39**, 1269–1277 (2018).
321. Trochu, J.-N. *et al.* Clinical characteristics of a familial inherited myxomatous valvular dystrophy mapped to Xq28. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 1890–1897 (2000).
322. Freed, L. A. *et al.* Mitral valve prolapse in the general population: the benign nature of echocardiographic features in the Framingham Heart Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 1298–1304 (2002).
323. Avierinos, J.-F., Detaint, D., Messika-Zeitoun, D., Mohty, D. & Enriquez-Sarano, M. Risk, determinants, and outcome implications of progression of mitral regurgitation after diagnosis of mitral valve prolapse in a single community. *Am. J. Cardiol.* **101**, 662–667 (2008).
324. Aalberts, J. J. J. *et al.* Screening of TGFBR1, TGFBR2, and FLNA in familial mitral valve prolapse. *Am. J. Med. Genet. A.* **164**, 113–119 (2014).
325. Bandaru, S., Ala, C., Zhou, A.-X. & Akyürek, L. M. Filamin A Regulates Cardiovascular Remodeling. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6555 (2021).
326. Zhou, A.-X., Hartwig, J. H. & Akyürek, L. M. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol.* **20**, 113–123 (2010).
327. Zhou, X., Borén, J. & Akyürek, L. M. Filamins in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc. Med.* **17**, 222–229 (2007).
328. Lu, J. *et al.* Filamin B mutations cause chondrocyte defects in skeletal development. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1661–1675 (2007).

329. Stossel, T. P. & Hartwig, J. H. Interactions between actin, myosin, and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages. Alveolar macrophage myosin Mg-2+-adenosine triphosphatase requires a cofactor for activation by actin. *J. Biol. Chem.* **250**, 5706–5712 (1975).
330. Nakamura, F., Stossel, T. P. & Hartwig, J. H. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adhes. Migr.* **5**, 160–169 (2011).
331. Stossel, T. P. *et al.* Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 138–145 (2001).
332. van der Flier, A. & Sonnenberg, A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim. Biophys. Acta* **1538**, 99–117 (2001).
333. Calderwood, D. A. *et al.* Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1060–1068 (2001).
334. Ohta, Y., Hartwig, J. H. & Stossel, T. P. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat. Cell Biol.* **8**, 803–814 (2006).
335. Nakamura, F. FilGAP and its close relatives: a mediator of Rho–Rac antagonism that regulates cell morphology and migration. *Biochem. J.* **453**, 17–25 (2013).
336. Gorlin, J. B. *et al.* Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J. Cell Biol.* **111**, 1089–1105 (1990).
337. Ito, T., Suzuki, A. & Stossel, T. P. Regulation of water flow by actin-binding protein-induced actin gelatin. *Biophys. J.* **61**, 1301–1305 (1992).
338. Cunningham, C. C. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J. Cell Biol.* **129**, 1589–1599 (1995).
339. Nakamura, F., Osborn, T. M., Hartemink, C. A., Hartwig, J. H. & Stossel, T. P. Structural basis of filamin A functions. *J. Cell Biol.* **179**, 1011–1025 (2007).
340. Kim, H., Sengupta, A., Glogauer, M. & McCulloch, C. A. Filamin A regulates cell spreading and survival via β 1 integrins. *Exp. Cell Res.* **314**, 834–846 (2008).

341. Bandaru, S. *et al.* Targeting Filamin A Reduces Macrophage Activity and Atherosclerosis. *Circulation* **140**, 67–79 (2019).
342. Leung, R. *et al.* Filamin A regulates monocyte migration through Rho small GTPases during osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **25**, 1077–1091 (2010).
343. Jurak Begonja, A., Hoffmeister, K. M., Hartwig, J. H. & Falet, H. FlnA-null megakaryocytes prematurely release large and fragile platelets that circulate poorly. *Blood* **118**, 2285–2295 (2011).
344. Liu, J. *et al.* Structural mechanism of integrin inactivation by filamin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 383–389 (2015).
345. Berrou, E. *et al.* Gain-of-Function Mutation in Filamin A Potentiates Platelet Integrin α IIb β 3 Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 1087–1097 (2017).
346. Rosa, J.-P., Raslova, H. & Bryckaert, M. Filamin A: key actor in platelet biology. *Blood* **134**, 1279–1288 (2019).
347. Kiema, T. *et al.* The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol. Cell* **21**, 337–347 (2006).
348. Fox, J. E., Goll, D. E., Reynolds, C. C. & Phillips, D. R. Identification of two proteins (actin-binding protein and P235) that are hydrolyzed by endogenous Ca²⁺-dependent protease during platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* **260**, 1060–1066 (1985).
349. Nakamura, F., Hartwig, J. H., Stossel, T. P. & Szymanski, P. T. Ca²⁺ and Calmodulin Regulate the Binding of Filamin A to Actin Filaments *. *J. Biol. Chem.* **280**, 32426–32433 (2005).
350. Salimi, R. *et al.* Blocking the Cleavage of Filamin A by Calpain Inhibitor Decreases Tumor Cell Growth. *Anticancer Res.* **38**, 2079–2085 (2018).
351. Mooso, B. A. *et al.* Enhancing the effectiveness of androgen deprivation in prostate cancer by inducing Filamin A nuclear localization. *Endocr. Relat. Cancer* **19**, 759–777 (2012).

352. Planagumà, J. *et al.* Filamin A-hinge region 1-EGFP: a novel tool for tracking the cellular functions of filamin A in real-time. *PloS One* **7**, e40864 (2012).
353. Vadlamudi, R. K. *et al.* Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat. Cell Biol.* **4**, 681–690 (2002).
354. Iwamoto, D. V. *et al.* Structural basis of the filamin A actin-binding domain interaction with F-actin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 918–927 (2018).
355. Ehrlicher, A. J., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Weitz, D. A. & Stossel, T. P. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature* **478**, 260–263 (2011).
356. Nakamura, F., Song, M., Hartwig, J. H. & Stossel, T. P. Documentation and localization of force-mediated filamin A domain perturbations in moving cells. *Nat. Commun.* **5**, 4656 (2014).
357. Haataja, T. J. K. *et al.* Non-syndromic Mitral Valve Dysplasia Mutation Changes the Force Resilience and Interaction of Human Filamin A. *Structure* **27**, 102-112.e4 (2019).
358. Duval, D. *et al.* Valvular dystrophy associated filamin A mutations reveal a new role of its first repeats in small-GTPase regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1843**, 234–244 (2014).
359. Nishiya, N. *et al.* Hic-5, a Paxillin Homologue, Binds to the Protein-tyrosine Phosphatase PEST (PTP-PEST) through Its LIM 3 Domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 9847–9853 (1999).
360. Zheng, Y. *et al.* Ras-induced and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 phosphorylation-dependent isomerization of protein tyrosine phosphatase (PTP)-PEST by PIN1 promotes FAK dephosphorylation by PTP-PEST. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4258–4269 (2011).
361. Davidson, D. & Veillette, A. PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates. *EMBO J.* **20**, 3414–3426 (2001).

362. Davidson, D., Shi, X., Zhong, M.-C., Rhee, I. & Veillette, A. The Phosphatase PTP-PEST Promotes Secondary T Cell Responses by Dephosphorylating the Protein Tyrosine Kinase Pyk2. *Immunity* **33**, 167–180 (2010).
363. Rhee, I., Davidson, D., Souza, C. M., Vacher, J. & Veillette, A. Macrophage fusion is controlled by the cytoplasmic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST/PTPN12. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2458–2469 (2013).
364. Fan, G.-P. *et al.* Pharmacological Inhibition of Focal Adhesion Kinase Attenuates Cardiac Fibrosis in Mice Cardiac Fibroblast and Post-Myocardial-Infarction Models. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **37**, 515–526 (2015).
365. Zhang, T. *et al.* Cross-talk between TGF-beta/SMAD and integrin signaling pathways in regulating hypertrophy of mesenchymal stem cell chondrogenesis under deferral dynamic compression. *Biomaterials* **38**, 72–85 (2015).
366. Sethi, R. *et al.* A Novel Structural Unit in the N-terminal Region of Filamins. *J. Biol. Chem.* **289**, 8588–8598 (2014).
367. Haataja, T. J. K. *et al.* Critical Structural Defects Explain Filamin A Mutations Causing Mitral Valve Dysplasia. *Biophys. J.* **117**, 1467–1475 (2019).
368. Norris, R. *et al.* Expression Of The Familial Cardiac Valvular Dystrophy Gene, Filamin-A, During Heart Morphogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **239**, 2118–2127 (2010).
369. Delwarde, C. *et al.* Multimodality imaging and transcriptomics to phenotype mitral valve dystrophy in a unique knock-in Filamin-A rat model. *Cardiovasc. Res.* cvac136 (2022) doi:10.1093/cvr/cvac136.
370. Van Rooijen, N. & Sanders, A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* **174**, 83–93 (1994).

371. van Rooijen, N. & Hendriks, E. Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **605**, 189–203 (2010).
372. Zacchigna, S. *et al.* Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function. *Cardiovasc. Res.* **117**, 43–59 (2021).
373. Zandbergen, H. R. *et al.* Macrophage depletion in hypertensive rats accelerates development of cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **14**, 68–75 (2009).
374. van Rooijen, N. & van Nieuwmegen, R. Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res.* **238**, 355–358 (1984).
375. Neri, T. *et al.* Human pre-valvular endocardial cells derived from pluripotent stem cells recapitulate cardiac pathophysiological valvulogenesis. *Nat. Commun.* **10**, 1929 (2019).

Titre : Analyse d'un nouveau modèle de dystrophie valvulaire mitrale : le rat KI FlnA-P637Q.
Implication des cellules immunitaires

Mots clés : Dystrophie Valvulaire Mitrale, Modèle Animal, Filamine-A, Imagerie Multimodale, Omiques

Résumé : La dystrophie valvulaire mitrale (DVM) touche 2 à 3% de la population. Néanmoins, aucun traitement pharmacologique n'est disponible actuellement, la seule option thérapeutique est la chirurgie valvulaire. Afin d'étudier la physiopathologie de la DVM, j'ai analysé un nouveau modèle animal : le rat Knock-In (KI) FlnA-P637Q qui exprime la mutation Filamine-A identifiée par notre groupe dans une famille.

Grâce à une approche d'imagerie multimodale, j'ai réalisé le phénotypage valvulaire du rat KI FlnA-P637Q, par échocardiographie, microCT et histologie. J'ai ainsi pu démontrer la pertinence de ce modèle, qui développe un DMV de type myxoïde, pour étudier les mécanismes impliqués dans la DVM.

L'analyse transcriptomique réalisée à 3 semaines, a mis en évidence l'implication de multiples voies de signalisation dans la pathologie : organisation de la matrice extracellulaire, migration des cellules épithéliales, réponse au stress mécanique et l'implication des cellules immunitaires. Afin de déceler le rôle des cellules immunitaires dans l'initiation et/ou la progression de la pathologie, des approches de cytométrie et qPCR ont été mises en place, conjointement à un phénotypage de la DVM chez des rats âgés de 7 jours.

Ces analyses mettent en évidence que le développement de la DVM précède le recrutement des cellules immunitaires..

Ce travail démontre la pertinence du modèle de rat KI FlnA-P637Q dans l'étude de la physiopathologie mitrale et décèle un rôle des cellules myéloïdes dans la pathologie.

Title: Analysis of a new mitral valve dystrophy animal model: the FlnA-P637Q KI rat.
Involvement of immune cells.

Keywords: Mitral Valve Dystrophy, Animal Model, Filamin-A, Multimodal Imaging, Omics

Abstract: Mitral valve dystrophy (MVD) touches 2 to 3% of the population. However, there is no pharmacological treatment available, patients are referred to surgery. To study the pathophysiological mechanisms involved in MVD, I analyzed a new animal model: the FlnA-P637Q KI rat which expresses a Filamin-A mutation found by my group in MVD patients. Using multimodal imaging approach based on echocardiography, microCT and histology, I phenotyped the model. I showed the pertinence of the FlnA rat which develops myxomatous dystrophy, to study the mechanisms implied in MVD.

3-week-old MV underwent transcriptomic analysis: extracellular matrix organization, epithelial cell migration, response to mechanical stress, and a central contribution of immune cells are highlighted as the main signaling pathways. To decipher immune cell role in the initiation and progression of MVD, cytometry and qPCR approached have been developed. The analysis reveal a role for myeloid cells in the progression rather than the onset of the pathology. This work reveals the pertinence of the new FlnA-P637Q KI rat model to study mitral pathophysiological processes and highlights a role for myeloid cells in MVD.