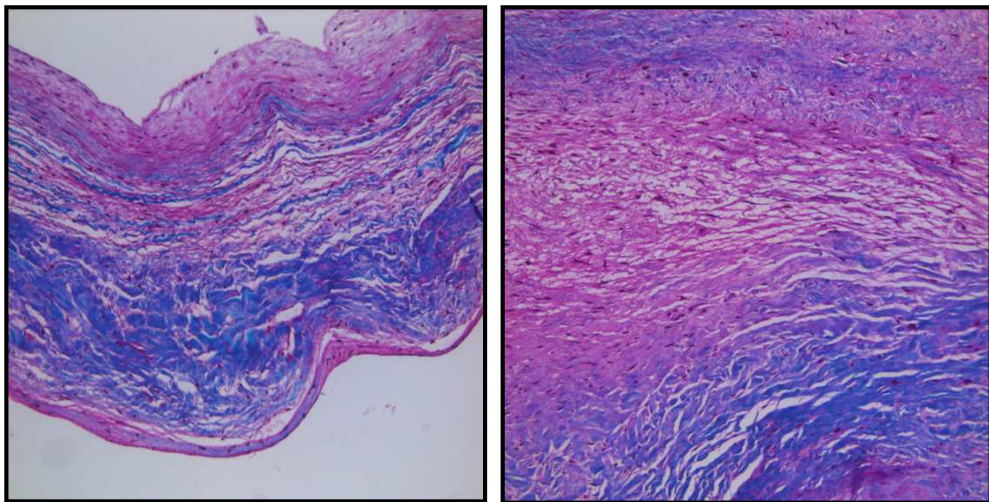


LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES TISSUS CONJONCTIFS

Professeur B. Nusgens
Professeur A. Colige
Professeur M. Radermecker

**Etude des mécanismes pathogéniques
impliqués dans la dégénérescence myxoïde de
la valve mitrale**



Alexia HULIN

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

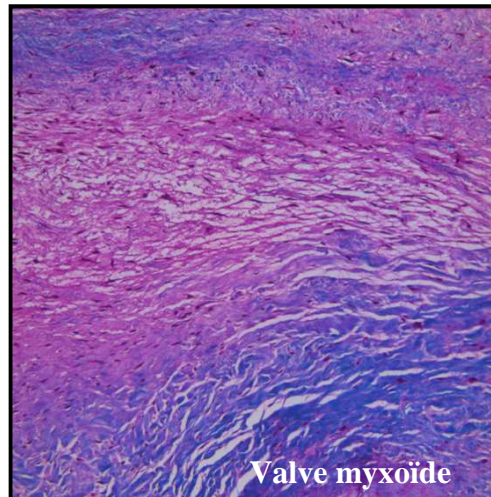
LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES TISSUS CONJONCTIFS

Professeur B. Nusgens
Professeur A. Colige
Professeur M. Radermecker

**Etude des mécanismes pathogéniques
impliqués dans la dégénérescence myxoïde de
la valve mitrale**



Valve saine



Valve myxoïde

Coupe transversale et coloration au trichrome de Masson du feuillet postérieur P2 d'une valve saine et d'une valve myxoïde au même grossissement.

Alexia HULIN

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je vais volontiers me plier à la coutume qui consiste à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à sa bonne réalisation.

En premier lieu, j'aimerais profondément remercier le Professeur Betty Nusgens de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs et de m'avoir encadrée, avec beaucoup de patience, pendant toutes ces années. Je remercie très sincèrement le Professeur Alain Colige de l'avoir brillamment épaulée dans ce dur labeur et d'avoir su affronter, avec le sourire, un certain entêtement. Leur disponibilité, leur dynamisme, leur rigueur scientifique et ce souci du détail qui leur est propre m'ont procuré un merveilleux enseignement et m'ont permis de mener à bien ce travail. Et surtout, je tacherai, dans le futur, de me souvenir que "dans la vie, tout n'est pas noir, tout n'est pas blanc".

Je tiens également à remercier le Professeur Marc Radermecker pour s'être impliqué activement, et avec un enthousiasme à toute épreuve, dans ce projet. Son aide dans la récolte d'échantillons, sa grande disponibilité, ses nombreuses connaissances et son vif intérêt ont été une aide précieuse tout au long de ce travail.

J'en profite également pour remercier Maire-France Hans, Josée Monard et Marie-Hélène Delbouille, du département de chirurgie abdominale et de transplantation, sans qui la collecte de prélèvements sains n'aurait pu être possible

A mon sens, la recherche scientifique n'est rien sans le partage d'idées, de connaissances et d'expériences et que faire sans collègues qui vous remontent le moral chacun à leur façon et qui m'ont permis d'évoluer dans une ambiance de travail extrêmement agréable, à la fois rigoureuse et joviale.

Un grand merci à Georgette Réga pour m'avoir ouvert les portes de la culture et à Marie-Jeanne Nix pour son excellence technique mais surtout pour son souci des autres et pour son soutien dans les moments difficiles. Je remercie également Tony, l'homme de la situation, qui a toujours répondu présent avec enthousiasme et dont le travail fut sans faille malgré les dysfonctionnements. Sans oublier Cocotte qui a su m'accompagner dans le monde merveilleux de l'immunohistologie et parce qu'après tout, un mot un geste, cocotte fait le reste!

Merci à ceux et celles qui ont partagé mon bureau et ont, dès lors, pu profiter pleinement de mon caractère. Je vous remercie pour la bonne ambiance qui a toujours régné et pour toutes ces discussions passionnantes avec ou sans porte fermée. Je remercie du fond du coeur le Docteur Christophe Deroanne pour sa sagacité, pour l'intérêt porté à mon travail et pour m'avoir aidée et soutenue dans le cheminement de mes pensées. Un énorme merci aux Audrey, Henno et Stultiens, qui ont eu la "chance" de me côtoyer pendant ces années et que je revois toujours avec grand plaisir. Si il devait y avoir des caractéristiques liées à ce prénom j'imagine que la gentillesse, la bonne humeur et, malheureusement, une passion pour la couleur rose en feraient partie. J'ajouterai que l'imagination d'Audrey S. combinée à celle de Lionel et ses nombreuses histoires "à la Père castor médical" m'ont valu de nombreux fous rires bénéfiques. Je souhaite à Jérôme autant de bons moments et lui assure qu'il fut un temps où je n'étais pas vissée à mon ordinateur.

Mes sincères remerciements au Docteur Charles Lambert pour la mise en culture dont j'ai pu profiter dès le début et pour sa précieuse aide jusqu'aux derniers moments. Je tiens également à remercier le docteur Nancy Garbacki pour les nombreuses aides informatiques de dernière minute, les remarques pertinentes qu'elles soient scientifiques ou non et les délicieuses expériences culinaires qui ont été toujours les bienvenues.

Je suis heureuse de pouvoir remercier Christine pour son efficacité administrative bien sur mais plus particulièrement pour sa présence bien au-delà du cadre du travail. Le commencement, basée sur une mise aux enchères, laissait présager de la suite et je ne fus pas déçue. J'ajouterai un énorme merci à l'ensemble de la famille Grégoire pour m'avoir d'emblée aussi bien intégrée.

Je remercie de même tous mes collègues de bench, déjà partis (Pierre, Giang, Johanne, Victor, Eric) et ceux m'ayant accompagnée jusque maintenant, d'avoir partagé des moments de doutes, la positive attitude, le rêve après lotterie, l'apéro Titi (mon porai préféré, prochaine étape Megan Fox), Audrey C et Maude (je pense avoir exprimé toute ma gratitude lorsque j'ai accepté de regarder ces trois merveilleux films dont je tairai le nom), Loli (d'être toujours à l'écoute de nouvelles idées), Romain (ce fut un réel plaisir de pratiquer l'ironie avec toi) Yves, Céline et Gaëlle, j'ai pleine confiance en vous pour perpétuer cette ambiance bon enfant et familiale qui a largement contribué au plaisir de réaliser ce travail avec vous tous.

Je remercie très vivement les filles d'à coté et Jojo pour les pauses "inspirations" et leur accueil toujours chaleureux ainsi que les moments "groupies". Je tiens également à remercier Emilie Feyereisen d'avoir scanné des centaines de lames.

Je tiens enfin à adresser mes remerciements au FNRS et au Fonds Léon Frédéricq pour l'octroi de bourse qui m'a permis d'initier et de finaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je terminerai cette partie, en insistant sur le fait que tout ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'aide et les encouragements reçus de mon entourage, je me limiterai à mentionner les soirées de l'ambassadeur, et de ma famille et ce depuis le début de mes études. Votre soutien inconditionnel et votre patience ont sans conteste largement contribué à l'aboutissement de ce travail. (Et je tiens à vous remercier d'avance d'être venu m'écouter en vous demandant bien ce que j'ai pu faire pendant toutes ces années.)

Bon ben voilà,

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION GENERALE	7
I. L'appareil valvulaire mitral	7
II. Le développement des valves cardiaques	11
III. La dégénérescence myxoïde de la valve mitrale	14
1. Prévalence et manifestations cliniques	17
2. Diagnostic	19
3. Traitement	20
3.1 Chirurgie	20
3.2 Ingénierie tissulaire	21
4. Composante cellulaire	22
4.1 Les cellules endothéliales	23
4.2 Les cellules valvulaires interstitielles	23
4.3 Activation des cellules valvulaires interstitielles dans les valves myxoïdes	24
4.4 Ossification endochondrale dans les valvulopathies	25
5. Composante matricielle	25
5.1 Les protéines de structure	26
5.1.1 Généralités	26
5.1.2 Protéines de structure dans les valves myxoïdes	28
5.2 Les glycosaminoglycans et protéoglycans	28
5.2.1 Généralités	28
5.2.2 Glycosaminoglycans et protéoglycans dans les valves myxoïdes	32
5.3 Les MMPs et ADAMTS	32
5.3.1 Généralités	32
5.3.2 Les MMPs et ADAMTS dans les valves myxoïdes	34
6. Pathogénie	35
6.1 Génétique de la dégénérescence myxoïde	36
6.2 Dégénérescence myxoïde causée par des mutations affectant les tissus conjonctifs	36
6.2.1 Signalisation par les facteurs de la superfamille des TGF- β	37
6.2.2 Maladie de Marfan	38
6.2.3 Syndrome de Loeys-Dietz	41
6.2.4 Autres syndromes génétiques liés aux voies de régulation du TGF- β	41
6.3 Implication de la MMP2	42

6.4 Implication du clivage du versican par les ADAMTS	43
6.5 Implication mécanique	43
6.6 La dégénérescence myxoïde canine	44
IV. Les métallothionéines	45
Publication 1: L'insuffisance mitrale par dégénérescence myxoïde : aspect biochimique et considérations physiopathologiques	47
BUTS ET PLAN DU TRAVAIL	55
RESULTATS	57
Partie I : Implication des métallothionéines 1/2 et du TGF-β2 dans la dégénérescence myxoïde de la valve mitrale.....	57
Introduction.....	57
Résumé des résultats.....	57
Publication 2 : Metallothionein-dependent up-regulation of TGF- β 2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve	62
Résultats complémentaires	81
Conclusions.....	83
Partie II :Etude des mécanismes potentiels de modulation de l'expression des métallothionéines 1/2 <i>in vitro</i>	85
Introduction.....	85
Matériels et méthodes	86
Résultats.....	87
Conclusions.....	94
Partie III.....	95
Publication 3 : Pathogenic mechanisms in human myxomatous mitral valve : lessons from past and novel data	95
DISCUSSION GENERALE.....	105
Sélection des patients.....	105
Isolement et caractérisation des cellules valvulaires interstitielles	106
Pathogénie de la MMV	108
Les métallothionéines.....	109
Implication du TGF- β 2 dans la MMV	113
Les ADAMTS et le clivage des protéoglycans	114
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	117
BIBLIOGRAPHIE	119
LISTE DES PUBLICATIONS PERSONNELLES.....	139

LISTE DES ABREVIATIONS

α -SMA	α -smooth muscle actin
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeat
ADAMTSL	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeat like
Akt	protein kinase B
ALK	activin receptor-like kinase
Ang II	angiotensin II
AT1R	angiotensin II type 1 receptor
AVC	atrioventricular cushion
BAV	bicuspid aortic valve
BMP	bone morphogenetic protein
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein B
CCND2	cyclin D2
CS	chondroitin sulfate
CDC42EP3	CDC42 effector protein 3
CDK1	cyclin-dependent kinase 1
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A ou p21
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C ou p57
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
CTGF	connective tissue growth factor
Ctrl	control
DS	dermatan sulfate
EBM	endothelial basal medium
EGF	epidermal growth factor
EMT	endothelial mesenchymal transition
ErbB	epidermal growth factor receptor
Erk1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FACIT	fibril associated collagens with interrupted triple helices
FBN1	fibrillin-1
FBS	fetal bovine serum
FED	fibro-elastic degenerescence
FGF	fibroblast growth factor
GADD	growth arrest and DNA damage
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPI	glycophosphatidyl inositol
HAS	hyaluronan synthase
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor
HS	heparan sulfate
IER3	immediate early response 3
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KS	keratan sulfate
LAP	latency associated protein
LDL	low density lipoprotein
LIMK1	LIM kinase-1

Lrp5	low-density lipoprotein receptor-related protein 5
LLC	latent large complex
LTBP	latent transforming growth factor β binding protein
MMP	matrix metalloproteinase
MMV	myxomatous mitral valve
MRE	metal response element
MT	metallothionein
MT1/2	subfamily 1 and 2 of metallothioneins
MTF1	metal transcription factor 1
MT-MMP	membrane type matrix metalloproteinase
NO	nitric oxide
Par6	Partitioning defective 6 homolog alpha
PI3K	phosphatidyl inositol 3 kinase
PPARGC1A	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha"
PRELP	proline/arginine-rich and leucine-rich repeat protein
PTEN	phosphatase and TENsin homolog
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
R-Ras	Ras-related protein
R-smad	receptor-regulated smad
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SLC	small latent complex
SLRP	small leucine rich repeat proteoglycan
SM22 α	transgelin
Sox	sry-related high-mobility-group box
Syk	spleen tyrosine kinase
tbx	thromboxane
TGF- β	transforming growth factor- β
TGF β R	transforming growth factor- β receptor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIC	cellules valvulaires interstitielles
vWF	von-Willebrand factor
Wnt	wingless integration site

INTRODUCTION GENERALE

I. L'appareil valvulaire mitral

Les valves cardiaques sont composées de fins feuillets, ou cuspides, qui doivent s'ouvrir et se fermer de façon coordonnée 100.000 fois par jour afin d'assurer le transfert unidirectionnel du flux sanguin indispensable au bon fonctionnement de l'appareil cardiovasculaire.

Les valves cardiaques sont subdivisées en deux groupes. Les valves atrio-ventriculaires comprennent la valve mitrale, qui sépare l'oreillette gauche du ventricule gauche, et la valve tricuspide qui sépare l'oreillette droite du ventricule droit. Les valves sigmoïdes, aortique et pulmonaire, se situent à la naissance de leur artère respective et assurent leur séparation avec le ventricule gauche ou droit (Figure 1).

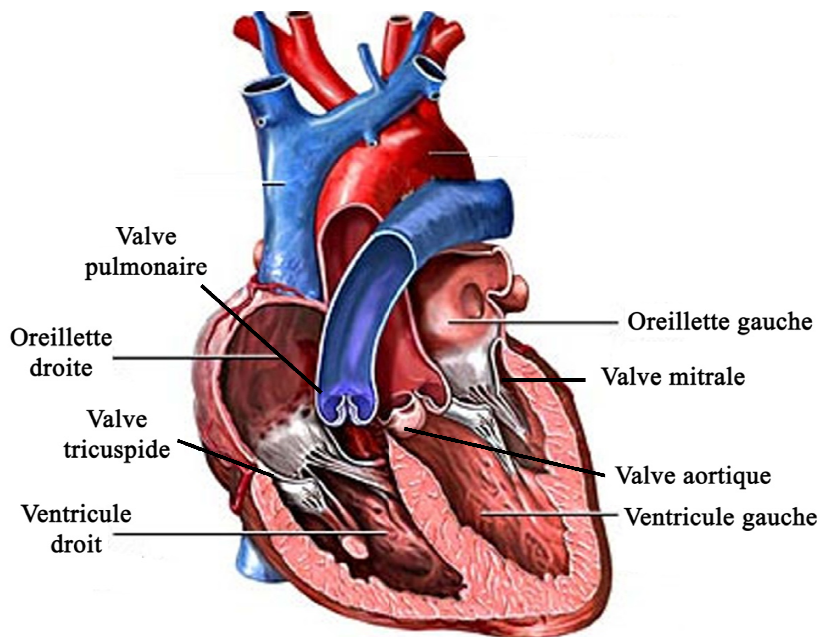


Figure 1: Les valves cardiaques. Coupe frontale du coeur présentant les quatre valves cardiaques. La valve tricuspide et la valve mitrale sont des valves atrio-ventriculaires séparant l'oreillette du ventricule. Les valves sigmoïdes comprennent la valve pulmonaire et aortique qui se situent entre le ventricule et l'artère pulmonaire ou l'aorte, respectivement.

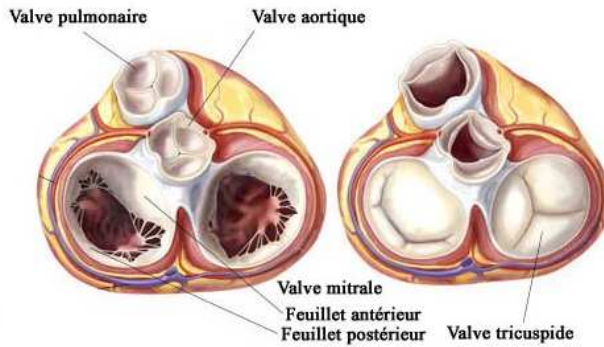
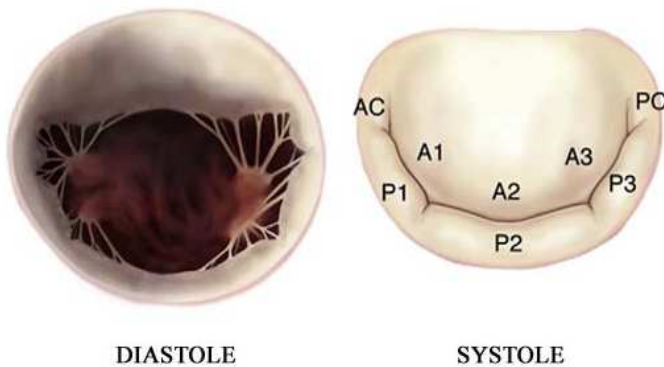


Figure 2: Vue apicale des valves cardiaques en diastole et en systole. La segmentation de la valve mitrale est visible lors de la systole. Le feuillet postérieur présente trois zones visibles nommées P1, P2 et P3 tandis que les zones A1, A2 et A3 du feuillet antérieur ne sont pas délimitées anatomiquement.

AC= commissure antérieure, PC= commissure postérieure.

Segmentation de la valve mitrale



DIASTOLE

SYSTOLE

L'appareil valvulaire mitral est complexe. Il est constitué de deux feuillets, antérieur (aortique) et postérieur (mural) (Figure 2). Ces feuillets s'insèrent sur des structures fibreuses (anneau) et sont reliés au muscle ventriculaire par des cordages tendineux et des muscles papillaires. Cet appareil sous-valvulaire permet aux feuillets de résister à la pression qui se développe pendant la contraction ventriculaire et empêche le sang d'être refoulé dans l'oreillette gauche. Le feuillet postérieur s'insère sur la majorité de la circonférence de l'anneau mitral, bien que l'essentiel de l'aire mitrale soit couverte par le feuillet antérieur. Les deux feuillets sont subdivisés en trois zones dont les limitations sont visibles au niveau du feuillet postérieur (P1, P2, P3) alors que la distinction A1, A2, A3 du feuillet antérieur est une convention (Figure 2) ¹. Le bon fonctionnement de la valve mitrale implique l'absence de reflux sanguin dans l'oreillette gauche en systole et une ouverture sans restriction en diastole.

A l'instar des autres valves cardiaques, les feuillets de la valve mitrale présentent, en coupe transversale, trois couches superposées entourées par un endothélium continu. La couche exposée au côté atrial (l'atrialis) est, sous l'endothélium, composée d'un tissu conjonctif riche en fibres élastiques tandis que la fibrosa de la face ventriculaire, également endothélialisée, est particulièrement riche en collagène. Entre ces deux couches, la spongiosa est une structure moins fibreuse et enrichie en protéoglycans (Figure 3) ^{1,2}.

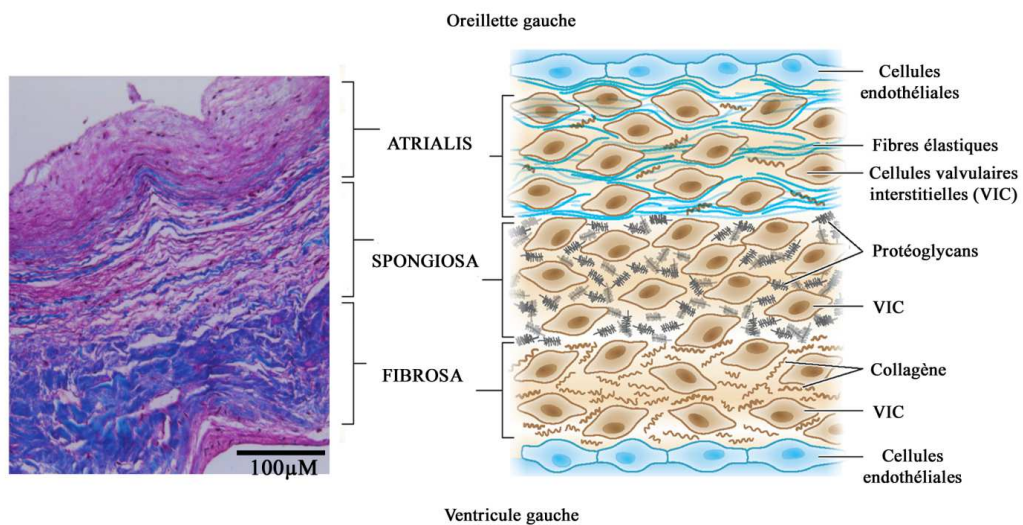


Figure 3: Structure de la valve mitrale. Coupe transversale d'un feuillet de la valve mitrale coloré au trichrome de Masson. De l'oreillette gauche vers le ventricule gauche, le feuillet présente trois couches. La première, appelée atrialis, est riche en fibres élastiques. La spongiosa, qui est la couche centrale, se compose majoritairement de protéoglycans tandis que la dernière couche, la fibrosa, est riche en collagène. Une couche de cellules endothéliales entoure le feuillet de part et d'autre. Les cellules qui peuplent la valve sont appelées cellules valvulaires interstitielles (VIC). D'après Schoen et al ³

La composition particulière de chaque couche confère les propriétés biomécaniques nécessaires au bon fonctionnement de la valve mitrale tout au long des cycles cardiaques. La fibrosa, riche en collagène, est responsable de la résistance mécanique à la traction de la valve tandis que l'atrialis, contenant de nombreuses fibres élastiques, offre la résilience nécessaire à l'extension et la rétraction du feuillet. La spongiosa joue un rôle d'amortisseur de chocs par sa composition riche en protéoglycans fortement hydratés ⁴. La composition de chaque couche varie au sein même du feuillet mais également entre les deux feuillets. En effet, le feuillet antérieur est plus riche en fibres de collagène tandis que le feuillet postérieur voit sa proportion de protéoglycans accrue et sa fibrosa amincie. Ces variations de composition sont vraisemblablement dues aux contraintes mécaniques spécifiques que subissent les feuillets. Il a notamment été décrit que lorsque la valve mitrale est fermée, le feuillet antérieur est soumis à des tensions mécaniques tandis que la majorité du feuillet postérieur est soumis à des forces de compression ⁵. Dans l'ensemble, l'épaisseur des feuillets d'une valve saine est inférieure à 1mm sauf au niveau du bord libre, où se réalise la coaptation, qui présente un aspect plus épais et rugueux.

Ces feuillets conjonctifs contiennent une population hétérogène de cellules appelées collectivement "cellules valvulaires interstitielles" (VIC) présentant des caractéristiques spécifiques qui seront décrites en détail dans le chapitre III de cette introduction afin de pouvoir souligner leur implication dans la dégénérescence myxoïde. Pour des raisons identiques, la composante matricielle des feuillets mitraux sera détaillée dans ce même chapitre. Avant d'introduire et de décrire les connaissances actuelles concernant la pathologie mitrale, qui fait l'objet de ce travail, il nous a paru pertinent d'introduire les étapes et facteurs clé intervenant au cours du développement de la valve mitrale en raison de leurs réactivations et implications potentielles dans les pathologies valvulaires.

II. Le développement des valves cardiaques

Une connaissance approfondie de la valvulogénèse a permis de mieux appréhender les mécanismes potentiellement impliqués dans les pathologies valvulaires. En effet, certaines voies de signalisation et facteurs de transcription activés au cours du développement sont réactivés dans les valves pathologiques^{6, 7}. Par ailleurs, le dysfonctionnement des valves cardiaques pourrait résulter d'une morphogénèse altérée des cuspidés ou d'un défaut dans l'organisation ou l'homéostasie matricielle en cours de développement⁸. Certains auteurs considèrent de ce fait que la dégénérescence myxoïde, au même titre que d'autres valvulopathies, pourrait trouver son origine dans de subtiles malformations congénitales qui entraîneront des dérèglements physiologiques à un âge plus avancé^{1, 8, 9}.

Le développement des valves cardiaques est un processus complexe au cours duquel un bourrelet de matrice gélatineuse (bourrelet endocardique) donne naissance à de fins feuillets fibreux très structurés¹⁰. Il est intéressant de noter que le développement valvulaire partage de nombreuses voies de signalisation communes au développement de l'os, du cartilage et des tendons¹¹.

Initialement, le cœur se présente comme un tube de cellules endocardiques entouré d'un tube myocardique, tous deux séparés par une matrice extracellulaire appelée gelée cardiaque (Figure 4A). Le développement des valves commence, au cours de l'inflexion du tube cardiaque, par l'apparition de protrusions ou bourrelets endocardiques dans le canal atrio-ventriculaire et le tronc artériel qui donneront naissance respectivement aux valves atrio-ventriculaires et sigmoïdes. Par la suite, les cellules endocardiques du bourrelet reçoivent un signal provenant du myocarde sous-jacent et entament une transition endothélio-mésenchymateuse (EMT). Les bourrelets endocardiques, peuplés de cellules progénitrices mésenchymateuses prolifératives, grossissent et s'allongent. Par la suite, les cellules mésenchymateuses cessent de proliférer, se différencient en VIC et synthétisent une matrice structurée plus dense composée de collagènes, d'élastine et de protéoglycans.

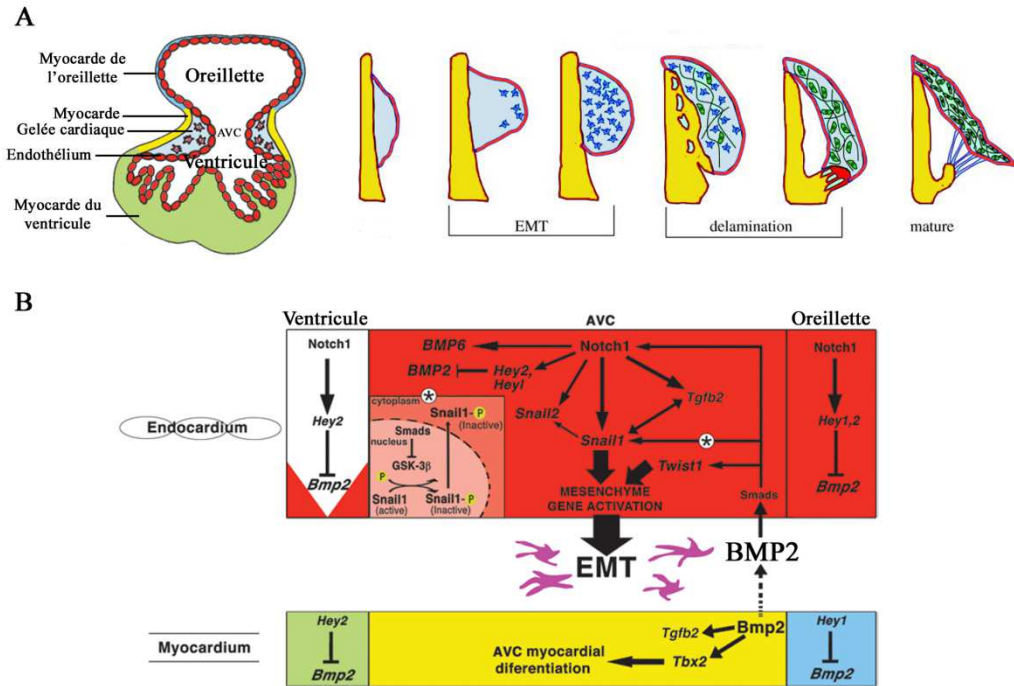


Figure 4: Développement des valves cardiaques. **A:** Le bourrelet endocardique (AVC) donne naissance aux fins feuillets valvulaires après une série d'étapes. Les cellules endothéliales (en rouge) reçoivent d'abord un signal du myocarde (en jaune) sous-jacent qui déclenche une transition endothélio-mésenchymateuse (EMT). En conséquence, des cellules mésenchymateuses (cellules bleues) envahissent le bourrelet et prolifèrent. Elles se différencient et donnent naissance aux cellules valvulaires interstitielles (cellules vertes). La matrice extracellulaire du bourrelet endocardique est remodelée (délamination) et le bourrelet s'allonge et s'affine pour former le feuillet mature. **B:** Schéma représentatif de l'ensemble des mécanismes impliqués dans l'EMT qui est initiée par l'expression myocardique de BMP2. Notch1 et TGF- β 2 sont également deux facteurs clé impliqués au cours de cette première étape. D'après Butcher et al et Luna-Zurita et al^{10, 12}.

Une meilleure compréhension des facteurs et voies de signalisation impliqués dans les différentes étapes du développement valvulaire a été rendue possible grâce aux études réalisées sur le développement du zebrafish et les embryons de poulet et de souris.

Ainsi, l'importance des facteurs Notch1, BMP2 et TGF- β 2 a été démontrée dans la formation des bourrelets endocardiques et l'induction de la EMT¹⁰. La formation du bourrelet résulte de la sécrétion par les cellules du myocarde d'une matrice riche en hyaluronan. Cette zone bien précise de formation est déterminée par l'expression myocardique de BMP2 qui induit la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endocardiques adjacentes notamment via Notch1 et TGF- β 2 (Figure 4B)¹². BMP2 serait, quant à lui, initialement régulé par la voie Wnt/ β -caténine¹³. Outre la signalisation par ces molécules, les facteurs de croissance EGF et FGF4 induisent la prolifération des cellules mésenchymateuses nécessaire à la croissance des bourrelets¹⁴ tandis que le VEGF régule la prolifération des cellules endocardiques¹⁵. L'ensemble de ces voies de signalisation active un réseau complexe de facteurs de transcription comprenant Twist1, Tbx20, Snails, Msx1 et Msx2^{14, 16}.

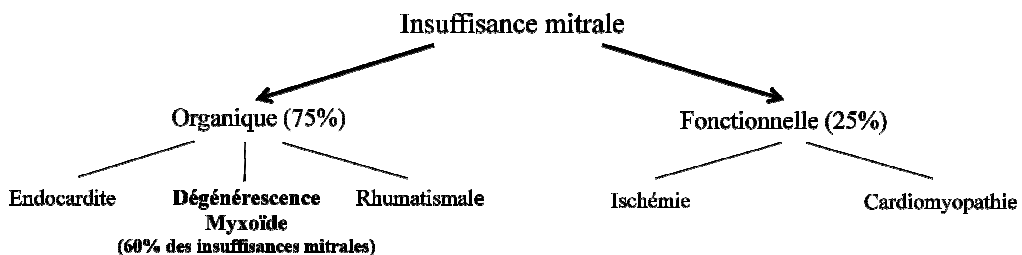
La transformation des bourrelets en une valve mature structurée, peuplée de cellules valvulaires interstitielles, est induite par RANKL¹⁵. Cette maturation consiste en un remodelage et une compartimentalisation de la matrice extracellulaire en trois zones stratifiées. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette stratification demeurent largement incompris. Un rôle des contraintes et forces mécaniques est fortement suspecté mais n'a jamais pu être démontré de manière formelle¹⁴. Par ailleurs, la localisation précise de certains facteurs de transcription suggère qu'ils contribuent activement à la stratification de la valve. Ainsi, l'activation de Notch est uniquement observée dans l'atrialis alors que Sox9 est présent dans la spongiosa où il régule l'expression de molécules matricielles de type "cartilagineux". L'expression de scleraxis, un facteur de transcription de type "tendineux", est, quant à elle, limitée aux cordages alors que l'axe Wnt/ β -caténine permet la structuration de la fibrosa^{14, 17}. La différenciation des cellules mésenchymateuses en VIC de type fibroblastique serait sous la dépendance de la périostine^{18, 19} qui serait induite par le TGF- β ^{20, 21}.

Le développement harmonieux de la valve, notamment lors de la EMT, est également largement dépendant de la composition et des propriétés de la matrice extracellulaire ²². L'implication de l'hyaluronan, composant principal du bourrelet endocardique, a été révélée par l'étude des souris déficientes pour l'hyaluronan synthase 2. Ces souris présentent des malformations cardiaques importantes, dont notamment une altération du bourrelet endocardique. Ceci résulterait d'un manque d'activation des récepteurs à l'EGF, ErbB2 et ErbB3, les cellules endothéliales des bourrelets endocardiques étant dès lors incapables de réaliser la EMT ^{23, 24}. Ces altérations sont similaires à celles observées dans les souris n'exprimant pas le versican, un protéoglycan qui se fixe à l'hyaluronan ²⁴. Les produits de clivage du versican participeraient par ailleurs à la formation et à la différenciation des bourrelets. Ils sont en effet abondants dans les régions sous-jacentes de l'endothélium où les cellules viennent de subir la EMT et ne sont présents qu'en très faibles quantités dans la zone centrale du bourrelet. Ce clivage serait réalisé par des enzymes de la famille des ADAMTS, dont l'ADAMTS-1 en association avec son co-facteur, la fibuline-1 ²⁵. L'implication des ADAMTS-5 et ADAMTS-9 a été également démontrée récemment dans des modèles de souris déficientes pour ces enzymes qui présentent des malformations de la valve aortique et une dégénérescence myxoïde de la valve mitrale ^{9, 26}.

III. La dégénérescence myxoïde de la valve mitrale

La compétence fonctionnelle de la valve mitrale dépend d'une interaction harmonieuse entre les différents composants de l'appareil valvulaire comprenant les feuillets, l'anneau, les cordages, les muscles papillaires et le ventricule gauche. Une altération de l'une ou l'autre de ces structures entraîne un dysfonctionnement valvulaire plus ou moins marqué appelé insuffisance mitrale quand il s'agit de régurgitation ou sténose quand il s'agit d'entrave au remplissage. C'est la première qui est rencontrée dans la dégénérescence myxoïde.

L'insuffisance mitrale est dite organique si elle découle d'une altération intrinsèque de l'appareil mitral, et fonctionnelle si elle résulte d'un remodelage local ou global du ventricule gauche sans altération de l'appareil valvulaire qui apparaît "normal" même si certaines études montrent des remodelages des feuillets^{27, 28}. Les pathologies de la valve mitrale sont liées à plusieurs étiologies. L'insuffisance mitrale organique peut résulter d'une pathologie rhumatismale, d'une dégénérescence myxoïde ou d'une endocardite tandis que les cardiomyopathies et ischémies myocardiques induisent une insuffisance mitrale fonctionnelle (Figure 5)²⁹. Dans le cadre de cette introduction, nous ne nous intéresserons qu'à la dégénérescence myxoïde de la valve mitrale (MMV).



Classification de Carpentier

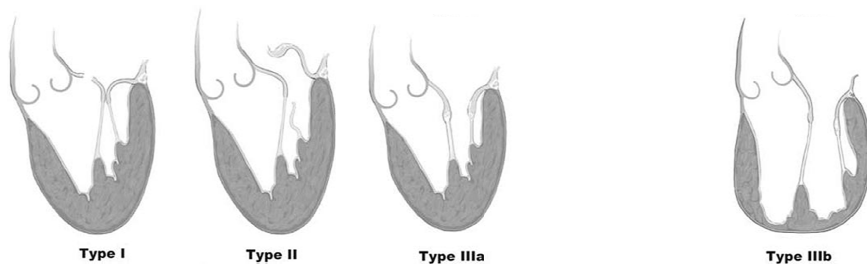


Figure 5: Classification de l'insuffisance mitrale. L'insuffisance mitrale est dite organique lorsqu'une altération intrinsèque de l'appareil mitral est à l'origine de la dysfonction valvulaire. Elle sera qualifiée de fonctionnelle lorsqu'elle résulte d'un remodelage du ventricule gauche. L'insuffisance mitrale possède plusieurs étiologies dont la dégénérescence myxoïde qui représente environ 60% des cas. Carpentier a établi une classification fonctionnelle de l'insuffisance mitrale. Ainsi le type I se caractérise par un déplacement normal des feuillets mais présente soit une perforation du feuillet, soit une dilatation de l'anneau. La dégénérescence myxoïde est à l'origine d'un déplacement excessif du feuillet (prolapsus) qui caractérise le type II. Le type III décrit une restriction du mouvement des feuillets causé par une pathologie rhumatismale (IIIa) ou une dysfonction du ventricule gauche (IIIb). D'après Fedak *et al* et McCarthy *et al*^{30, 31}.

Les feuillets de la valve mitrale dite myxoïde présentent des caractéristiques histopathologiques qui vont de pair avec une altération de ses propriétés biomécaniques³². De manière générale, la dégénérescence myxoïde s'accompagne d'une activation myofibroblastique des cellules valvulaires interstitielles³³ et d'un remodelage matriciel. Il est caractérisé par une désorganisation et une fragmentation des fibres élastiques et des faisceaux de collagène de l'atrialis et de la fibrosa ainsi que par une accumulation de protéoglycans dans la spongiosa provoquant un épaissement du feuillet (Figure 6)³⁴.

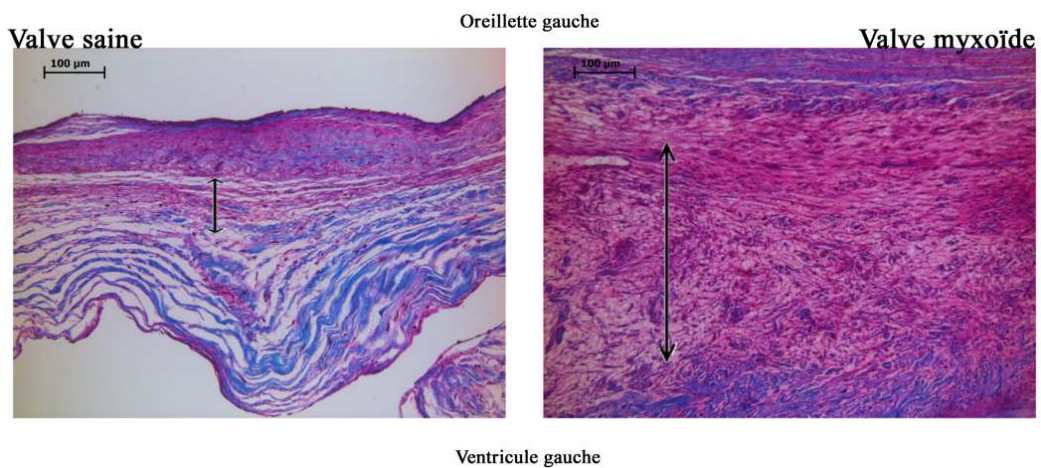


Figure 6: Valve mitrale myxoïde. Coupe transversale et coloration au trichrome de Masson du feuillet postérieur P2 d'une valve saine et d'une valve myxoïde. C'est principalement la spongiosa (indiquée par la double flèche) qui est épaissie dans la valve myxoïde. Les structures élastiques et les protéoglycans apparaissent en rose et le collagène en bleu. (Données personnelles)

Après une évocation du tableau clinique de cette pathologie, les altérations tissulaires, cellulaires et moléculaires rapportées dans la littérature seront décrites plus en détails en nous référant à la valve mitrale saine. Ces descriptions sont précédées d'un cours rappel des connaissances actuelles sur chacun de ces acteurs. Enfin, les mécanismes pathogéniques potentiels suggérés par des maladies génétiques des tissus conjonctifs chez l'Homme et par des modèles animaux seront discutés.

1. Prévalence et manifestations cliniques

La prévalence globale des valvulopathies est de 2.5% aux USA et augmente avec l'âge. Elle est de 0,7% pour la tranche 18-44 ans et de 13.3% pour la population au-delà de 75 ans. Des statistiques similaires sont observées en Europe ^{35, 36}. Le vieillissement de la population et l'amélioration des modalités de dépistage expliquent en grande partie le nombre croissant de patients chez qui est diagnostiqué une valvulopathie.

L'insuffisance mitrale est la deuxième valvulopathie la plus fréquente après la sténose aortique ³⁷. Elle résulte d'une mauvaise coaptation des feuillets valvulaires lors de la contraction systolique, ce qui entraîne un reflux sanguin dans l'oreillette gauche. Dans les pays industrialisés, la dégénérescence myxoïde est à l'origine de 60% des insuffisances mitrales. Elle se caractérise par des modifications histopathologiques d'un ou des deux feuillets. L'altération fonctionnelle qui en découle engendre une insuffisance mitrale essentiellement de type II selon la classification fonctionnelle de Carpentier (Figure 5) et touche de 0.6% à 2.4% de la population ^{36, 38-40}.

Les feuillets pathologiques dits "billowing" sont caractérisés par une ballonnisation tout en conservant leur coaptation sous ou dans le plan de l'anneau mitral (Figure 7B). On parle de prolapsus lorsque le bord libre dépasse le plan de l'anneau en systole (Figure 7C). Dans ce cas, la perte de coaptation peut être responsable d'une fuite mitrale. On parle de feuillet "flail" lorsqu'il y a rupture de cordage et que le segment de valve n'est plus arrimé au muscle papillaire (Figure 7D). Ce dernier cas est habituellement associé à une insuffisance mitrale sévère. L'échocardiographie permet de préciser ces différentes catégories même si une confusion persiste dans la littérature ^{28, 41}.

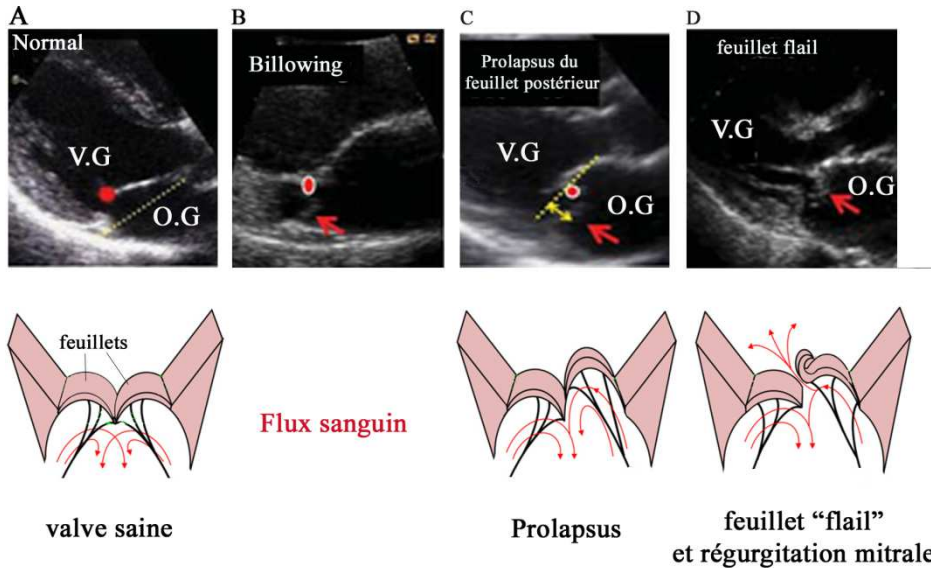


Figure 7: Images échocardiographiques de la dégénérescence myxoïde de la valve mitrale. **A:** Dans une valve saine, la coaptation (point rouge) se réalise en dessous du plan de l'anneau mitral (en pointillé jaune). **B:** Une valve "billowing" présente une ballonnisation d'un feuillet (flèche rouge) tout en gardant sa zone de coaptation sous ou dans le plan mitral. **C:** le prolapsus valvulaire mitral définit un déplacement systolique dans l'oreillette gauche d'un feuillet (feuillet postérieur) **D:** Cette image montre le feuillet antérieur "flail" (indiqué par la flèche rouge). La direction du flux sanguin est également représentée sous forme de schémas simplifiés. O.G= oreillette gauche, V.G= ventricule gauche. D'après Lancellotti *et al*²⁸ et Richards *et al*⁴²

Anatomiquement, les valves dégénératives couvrent un large spectre de lésions valvulaires (Figure 8). A une extrémité du spectre, la déficience fibro-élastique concerne principalement des personnes âgées et se caractérise par de fins feuillets presque transparents formant une valve de taille normale. Dans ce cadre, le prolapsus du feuillet résulte de la rupture d'un cordage. A l'autre extrémité du spectre se trouve la maladie de Barlow qui touche des patients plus jeunes et implique l'altération et le recouvrement de tous les segments de la valve. L'excès de tissu que l'on retrouve au niveau des feuillets redondants et épaissis s'associe à des cordages épais et allongés, rompus ou non. Entre ces deux extrêmes, on identifie des valves mitrales dont principalement le segment P2 du feuillet postérieur est myxoïde. Les échantillons étudiés au cours de ce mémoire sont des segments P2 faisant partie de cette dernière catégorie.^{28, 31, 41, 43}

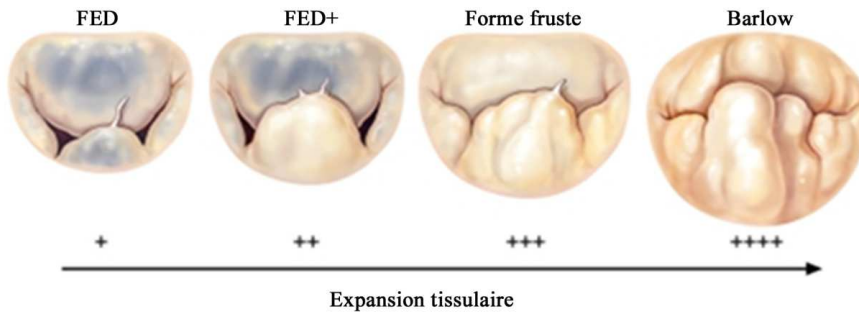


Figure 8: Spectre des valves d'étiologie dégénérative. FED définit des valves dont les feuillets sont fins et transparents. Une dégénérescence myxoïde et un épaissement s'observent généralement dans le feuillet qui prolapse (FED+). La forme fruste décrit une expansion tissulaire qui présente une dégénérescence myxoïde dans plus d'un feuillet mais n'implique pas un élargissement de l'anneau. Dans la maladie de Barlow, l'entièreté de la valve est affectée. D'après Adams *et al*⁴³.

2. Diagnostic

La ballonnisation des feuillets myxoïdes est souvent sans conséquence physiopathologique significative. Cependant, la dégénérescence myxoïde sous-jacente peut amener progressivement à des altérations fonctionnelles de la valve. L'élongation ou la rupture de cordages entraîne le prolapsus lui-même générateur d'insuffisance mitrale, le reflux sanguin résultant de cette insuffisance ayant des répercussions sur la fonction auriculaire et ventriculaire⁴⁴.

La découverte d'un prolapsus valvulaire peut survenir lors d'un examen de routine en l'absence de symptômes ou chez un patient se plaignant de fatigue, de dyspnée ou de palpitations. L'auscultation doit être complétée par des mesures échocardiographiques qui permettront de déterminer la sévérité de l'insuffisance mitrale et ses répercussions sur la fonction cardiaque. Une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire (<60%) et une dilatation du ventricule gauche mesurée en fin de systole (> 40 mm) ainsi que l'apparition d'une fibrillation auriculaire et d'hypertension pulmonaire (> 50 mmHg au repos) sont des facteurs qui orientent vers un traitement chirurgical⁴¹. La dégénérescence myxoïde étant une maladie évolutive, il est recommandé de surveiller attentivement cette pathologie par des contrôles échocardiographiques réguliers⁴⁴.

3. Traitement

3.1 Chirurgie

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement médicamenteux pour le prolapsus valvulaire mitral. Lorsque l'insuffisance mitrale est sévère et symptomatique, le seul traitement étiologique est la chirurgie. Elle a pour objectif de rétablir une bonne surface de coaptation en corrigeant la dilatation de l'anneau et les anomalies des feuillets sans entraver l'ouverture diastolique (principe de technique de Carpentier⁴⁵). La technique chirurgicale standard implique la résection du segment myxoïde prolabé, la reconstruction du feuillet et la pose d'un anneau afin de restaurer la géométrie de la valve et réduire la tension sur les feuillets (Figure 9A). Ces techniques ont été utilisées avec succès depuis 1983 et sont garantes de succès à long terme, de la chirurgie réparatrice mitrale. L'évolution actuelle tend à utiliser des cordages artificiels pour rétablir l'attache du segment myxoïde et déplacer le tissu myxoïde dans le ventricule sans, ou minimalement, réséquer le tissu (Figure 9B)^{43,44}.

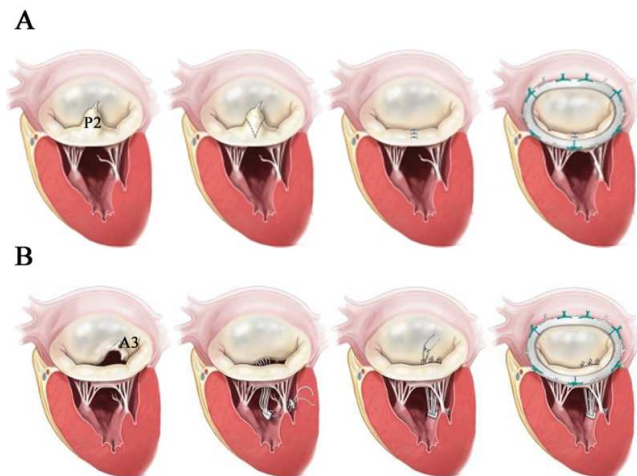


Figure 9: Traitement chirurgical de la dégénérescence myxoïde de la valve mitrale. A: Résection triangulaire et annuloplastie selon la technique de Carpentier sur un prolapsus du segment P2. **B:** Réparation d'un prolapsus du segment A3 sans résection. La coaptation est rétablie par attache du feuillet myxoïde aux muscles papillaires à l'aide de cordages artificiels. D'après Adams *et al*⁴³.

3.2 Ingénierie tissulaire

Le remplacement de valves par des prothèses valvulaires est une opération courante. Elle n'est toutefois pas sans conséquence. En effet, les prothèses mécaniques nécessitent un traitement anticoagulant à vie alors que les valves biologiques (péricarde bovin ou valve porcine fixés au glutaraldéhyde) subissent une dégénérescence, principalement par calcification, qui altère progressivement leur performance. L'évolution des connaissances scientifiques a stimulé le développement de valves cardiaques de dernière génération au sein desquelles sont présentes des cellules vivantes afin d'assurer l'homéostasie tissulaire à long terme ⁴. Actuellement, l'ingénierie tissulaire se focalise principalement sur le développement de valves aortiques bien que l'intérêt pour les valves mitrales soit grandissant ⁴⁶. Deux approches sont actuellement en développement. Dans une première approche, une matrice, d'origine synthétique ou naturelle, est colonisée *in vitro* par des cellules appropriées. Elle est ensuite soumise à des facteurs solubles et des stimuli mécaniques semblables aux sollicitations physiques rencontrées *in vivo* afin de favoriser la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que le remodelage progressif du biomatériau primitif en une structure mimant une valve normale. Bien que les résultats actuels soient encourageants, la résistance et les propriétés mécaniques de ces tissus ne sont pas encore satisfaisantes ⁴⁷⁻⁴⁹. Une alternative à la maturation *in vitro* est l'implantation chirurgicale d'une structure primaire pouvant être colonisée par des cellules progénitrices circulantes et permettant leur différenciation afin de favoriser la formation progressive d'un nouveau tissu valvulaire adapté aux conditions locales *in vivo* ⁵⁰. Ces développements prometteurs sont toutefois toujours au stade expérimental et nécessitent une compréhension approfondie de la biologie cellulaire et matricielle des valves.

4. Composante cellulaire

Les feuillets mitraux sont entourés d'une monocouche de cellules endothéliales recouvrant un tissu conjonctif contenant une population hétérogène de cellules appelées collectivement cellules valvulaires interstitielles (VIC) (Figure 10). Celles-ci joueraient un rôle actif dans la fonction mécanique de la valve et participeraient aux divers processus biologiques impliqués dans sa maintenance et sa durabilité. Il faut toutefois noter que la majorité des études réalisées concernent les cellules de la valve aortique et ce n'est que récemment que la composante cellulaire des valves mitrales a retenu l'intérêt de la communauté scientifique.

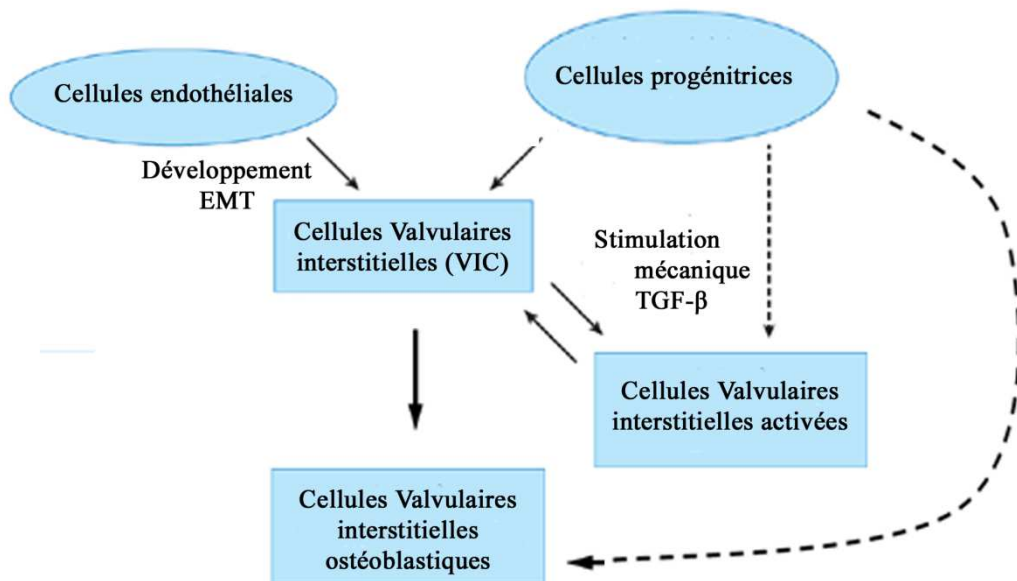


Figure 10: Origine et phénotype des cellules valvulaires. Les cellules peuplant la valve forment une population hétérogène et sont appelées cellules valvulaires interstitielles (VIC). Elles proviennent, lors du développement embryonnaire, de la transition endothélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules endothéliales. Dans une valve saine, elles sont majoritairement quiescentes. Dans une valve pathologique, telle la valve mitrale myxoïde, des sous-populations de VIC deviennent activées, caractérisées par l'expression d' α -SMA ou présentant des caractéristiques ostéoblastiques. Les cellules progénitrices donnant naissance à ces sous-populations pourraient être endothéliales ou circulantes. Les flèches en pointillés décrivent des relations supposées. D'après Liu *et al*⁵¹ et Schoen³.

4.1 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment une monocouche à la surface des feuillets en continuité avec l'endocarde de l'oreillette et du ventricule. Elles partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules endothéliales vasculaires, notamment en terme de marqueurs. Elles possèdent toutefois des propriétés spécifiques comme le démontrent deux études réalisées par Butcher sur des cellules endothéliales de valves aortiques porcines^{52, 53}. En réponse à des forces de cisaillement, les cellules endothéliales vasculaires s'alignent parallèlement au flux. A l'inverse, les cellules endothéliales valvulaires s'orientent perpendiculairement, suite à une organisation différente des adhésions focales, et expriment un profil transcriptionnel différent de celui des cellules vasculaires, notamment en termes de médiateurs inflammatoires ou de marqueurs de type "chondrogénique" et "ostéogénique"^{52, 53}. Il faut, par ailleurs, mentionner que leur profil transcriptionnel varie selon le coté de la valve, ventriculaire ou auriculaire, qu'elles tapissent⁵⁴.

4.2 Les cellules valvulaires interstitielles

Les VIC proviennent, lors du développement embryonnaire, d'une transition endothélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules endothéliales du bourrelet endocardique. Ce processus peut être réactivé *in vitro*⁵⁵ et induit *in vivo* en réponse à un stress mécanique ainsi que le montre un modèle d'insuffisance mitrale fonctionnelle⁵⁶. Ces cellules progénitrices font preuve d'une plasticité unique, puisqu'elles peuvent subir une différenciation de type ostéoblastique ou cartilagineux non seulement *in vitro* mais également *in vivo* sous l'effet de stimuli mécaniques⁵⁷. Ces diverses données suggèrent l'existence chez l'adulte d'une sous-population de cellules progénitrices dans l'endothélium capables de se différencier et de renouveler la population de VIC dans le feuillet valvulaire⁵⁸. Il y aurait donc une relation étroite entre les VIC qui contrôlent l'homéostasie matricielle et les cellules valvulaires endothéliales responsables du maintien de la population des VIC (Figure 10)²⁹

En plus d'une origine locale, les cellules interstitielles pourraient également provenir d'une source externe. Une étude démontre en effet que des cellules souches hématopoïétiques sont présentes dans des valves de souris adultes où elles expriment du collagène de type I et se différencient en cellules morphologiquement similaires aux cellules natives de la valve⁵⁹.

L'étude des cellules valvulaires progénitrices n'en est toutefois qu'à ses débuts et leur participation et/ou réponse à la pathologie valvulaire sont encore peu connues. Néanmoins, la présence de cellules progénitrices de différentes origines et leur plasticité pourraient expliquer l'existence de sous-populations de cellules interstitielles fonctionnellement différentes selon leur localisation dans la valve⁵¹. Les cellules de la fibrosa auraient des caractéristiques de type osseux et tendineux tandis que les cellules de la spongiosa seraient de type cartilagineux produisant plus de glycosaminoglycans et protéoglycans sous la dépendance de Sox9¹¹.

Les VIC peuplant la valve adulte forment donc une population hétérogène⁶⁰ phénotypiquement différente d'autres types de cellules mésenchymateuses, notamment des fibroblastes du derme⁶¹. Elles expriment *in vitro* une variété de protéines contractiles du muscle cardiaque et squelettique^{62, 63}, suggérant l'existence d'une machinerie contractile qui serait fonctionnelle comme le suggère la contraction de cuspidés porcines en réponse à des agents vasoconstricteurs tel que l'endothéline-1^{62, 64}. Leur rôle effectif, dans le tissu valvulaire, reste encore à déterminer²⁹.

4.3 Activation des cellules valvulaires interstitielles dans les valves myxoïdes

Alors qu'une valve saine est composée majoritairement de cellules interstitielles dites quiescentes⁶⁵, les valves myxoïdes contiennent des VIC activées exprimant l' α -SMA et présentant un phénotype proche de celui des myofibroblastes³³. Elles sécrètent par ailleurs des métalloprotéases matricielles (MMPs) et des cathepsines et seraient dès lors un des acteurs du remodelage matriciel de la valve myxoïde. Cette activation des VIC se ferait sous la dépendance de chimiokines et de facteurs de croissance dont le TGF- β ^{33, 51, 66}.

4.4 Ossification endochondrale dans les valvulopathies

L'expression par les VIC de marqueurs spécifiques des chondrocytes et des ostéoblastes apparaît déjà au cours de la valvulogénèse et s'observe également dans les valves pathologiques⁶⁷. Les valves myxoïdes contiennent des cellules interstitielles possédant un morphotype de "chondrocytes hypertrophiques" s'accompagnant d'une surexpression de Sox9 et de la formation de dépôts "cartilagineux". Une ossification endochondrale a été également observée dans les valves aortiques calcifiées. Ce processus résulterait de l'activation de la voie β -caténine par la fixation de la glycoprotéine Wnt3 au Lrp5, co-récepteur de la famille des LDL. Les cellules subissant une différenciation ostéoblastique pourraient être présentes dans la valve sous forme de progéniteurs ou résulter d'une transformation de cellules interstitielles quiescentes⁵¹.

5. Composante matricielle

Les VIC résident dans une matrice extracellulaire composée principalement de collagène, élastine, glycoprotéines, glycosaminoglycans et protéoglycans qu'elles synthétisent, secrètent et dégradent pour maintenir la fonction physiologique de la valve. Outre le fait d'assurer la compétence mécanique requise, la matrice extracellulaire est un puissant régulateur du phénotype des VIC à la fois par les signaux mécaniques qu'elle transfère à la cellule par l'intermédiaire des intégrines et par les signaux chimiques issus des facteurs de croissance et cytokines qui y sont séquestrés. La compartimentalisation trilaminée des feuillets valvulaires et la composition spécifique de chaque segment sont en partie déterminées au cours du développement (voir le chapitre II de cette introduction). Des travaux suggèrent que le remodelage du tissu valvulaire en compartiments serait également régulé par les forces hémodynamiques et mécaniques durant la période post-natale⁶⁸.

5.1 Les protéines de structure

5.1.1 Généralités

Les protéines de structure de la matrice extracellulaire se subdivisent en protéines fibrillaires (collagène et élastine), glycoprotéines microfibrillaires (fibrilline et fibuline) et glycoprotéines d'adhésion qui participent aux interactions cellule-matrice (fibronectine et laminine).

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères. A ce jour, la superfamille des collagènes compte 28 membres. Les collagènes sont des molécules homo- ou hétérotrimériques composées de trois chaînes α formant une triple hélice caractéristique de cette famille. La formation de la triple hélice résulte de la répétition dans la chaîne α d'une séquence G-X-Y où X et Y correspondent fréquemment à une proline et une hydroxyproline. Lorsque la triple hélice est formée, le clivage des propeptides amino- et carboxy-terminaux du procollagène par les ADAMTS-2, 3 et 14 et la BMP1, respectivement, permet l'assemblage spontané des molécules matures en fibrilles stabilisées ultérieurement par la formation de liaisons croisées par la lysyl-oxydase. Cette réticulation est responsable de la cohésion et de la résistance mécanique remarquable des fibres et faisceaux de collagène. A l'exception de 4 types transmembranaires, les collagènes sont pour la plupart déposés dans la matrice extracellulaire où ils forment des assemblages supramoléculaires qui définissent leur sous-famille (Figure 11) et leur confèrent un rôle structurel contribuant aux propriétés mécaniques des tissus. D'autre part, ils régulent la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire en interagissant avec de nombreux récepteurs cellulaires dont principalement les intégrines^{69, 70}.

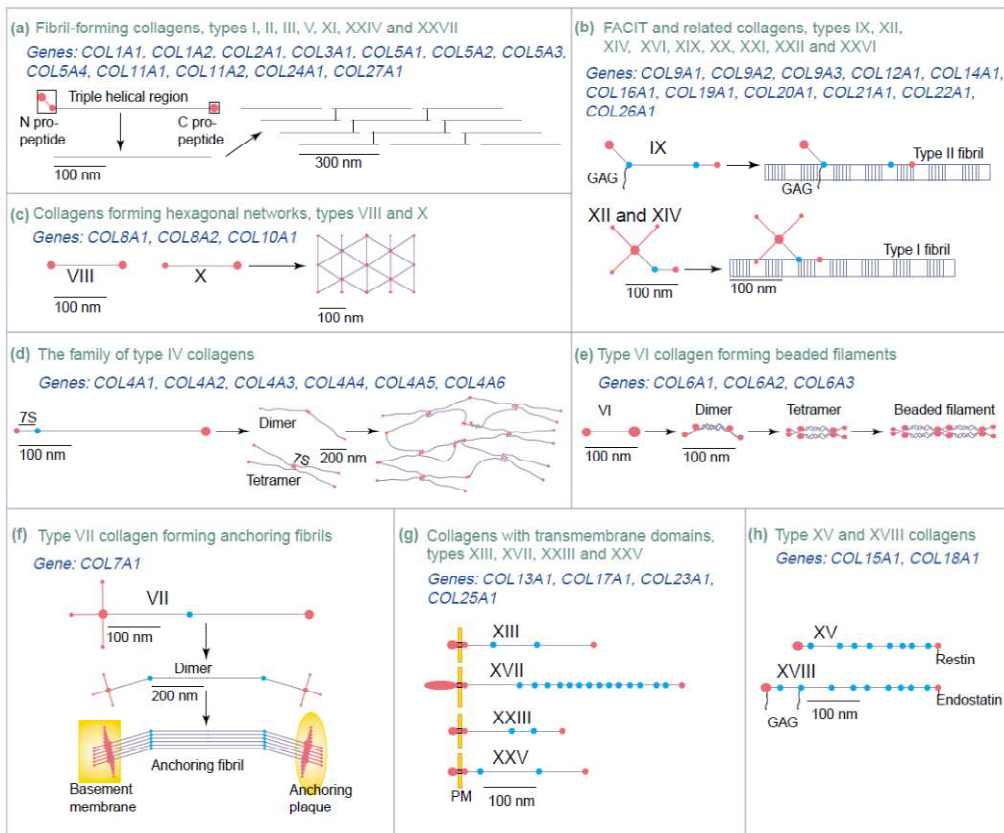


Figure 11: Membres de la superfamille des collagènes et leur assemblage supramoléculaire. La superfamille des collagènes se divise en 8 sous-familles. (a) Les collagènes fibrillaires. (b) Les collagènes contenant des domaines en triple hélice interrompus par des domaines non-hélicoïdaux et interagissant avec les collagènes fibrillaires (FACIT = " Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices). (c) Les collagènes formant des réseaux hexagonaux. (d) La famille des collagènes de type IV qui se trouvent dans les membranes basales. (e) Le collagène de type VI forme des filaments perlés. Le collagène de type XXVIII, récemment décrit, serait structurellement proche du collagène de type VI ⁷¹ (f) Le collagène de type VII forme des fibrilles d'ancrage. (g) Les collagènes possédant des domaines transmembranaires. (h) Les collagènes de type XV et XVIII générant par clivage des fragments antiangiogènes (restine et endostatine). Les domaines collagènes sont marqués en mauve foncé, les domaines amino- et carboxyterminaux sont colorés en rose et les domaines non hélicoïdaux interrompant la triple hélice sont en bleu. D'après Myllyharju et Kivirikko ⁷².

Les fibres élastiques sont des polymères hétéromériques formés de molécules d'élastine associées à des structures microfibrillaires composées principalement de fibrilline et fibuline. Les fibres élastiques forment un réseau conférant élasticité et résilience aux tissus, propriétés essentielles pour la fonction des structures vasculaires et autres organes mobiles. Les composants microfibrillaires ont, par ailleurs, la capacité de moduler l'activité des facteurs de croissance de la famille du TGF- β . De plus, par la présence de motifs d'attachement cellulaire, les fibres élastiques contrôlent également la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire^{73, 74}.

5.1.2 Protéines de structure dans les valves myxoïdes

Il existe relativement peu de données concernant les protéines de structure dans les valves myxoïdes humaines. Une étude biochimique par Cole *et al*⁷⁵ montre toutefois que la valve mitrale saine chez l'homme contient 74% de collagène de type I, 24% de collagène de type III et 2% de collagène de type V. Une quantité accrue de ces trois collagènes, en particulier le collagène de type III, est décrite dans les valves myxoïdes. Une analyse immunohistochimique des feuillets myxoïdes montre, par ailleurs, une distribution anormale de la fibrilline-1 accompagnée d'une désorganisation des fibres élastiques et des collagènes fibrillaires⁷⁶. Le rôle de la fibrilline-1 dans le développement de la dégénérescence myxoïde est confirmé par son association à la maladie de Marfan et de Loeys-Dietz et dans un modèle de souris transgénique⁷⁷ (voir la section 6.2)

5.2 Les glycosaminoglycans et protéoglycans

5.2.1 Généralités

Les glycosaminoglycans sont des hétéropolysaccharides formés par la répétition linéaire d'une unité disaccharidique dont la nature des sucres qui la compose les subdivise en cinq types : acide hyaluronique ou hyaluronan, dermatan sulfate (DS), chondroïtine sulfate (CS), heparine/heparan sulfate (HS), keratan sulfate (KS) (Figure 12).

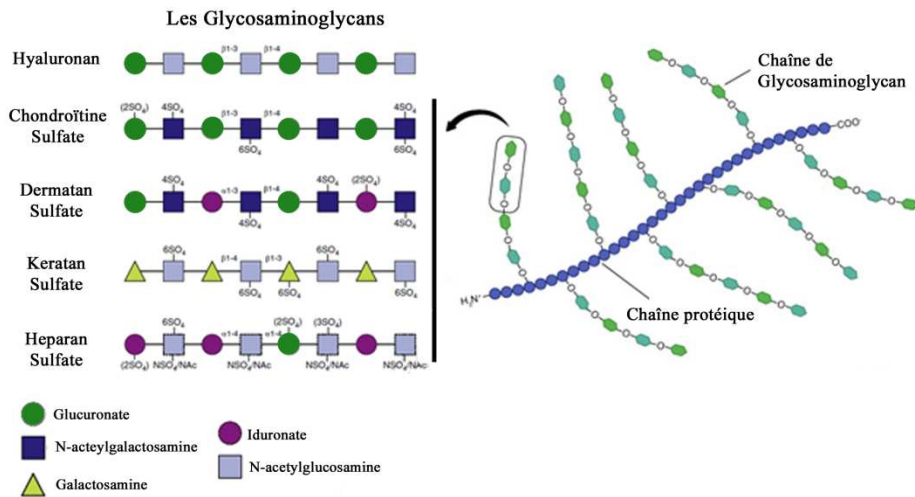


Figure 12: Structure des protéoglycans. Les protéoglycans se composent d'une chaîne protéique sur laquelle sont fixées une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycans (GAG). Les GAG sont composés de la répétition d'une unité disaccharidique dont la nature est détaillée ci-dessus. L'hyaluronan, ou acide hyaluronique, est le seul glycosaminoglycan qui ne se lie pas à une chaîne protéique. D'après Stanton *et al* ⁷⁸.

L'hyaluronan est synthétisé par addition alternée d'un acide glucuronique et d'une unité N-acétyl glucosamine catalysée par la hyaluronan synthase (HAS), dont 3 isoformes existent chez les mammifères. Parmi ceux-ci, la hyaluronan synthase 2 (HAS2) semble jouer un rôle significatif au cours du développement puisque la délétion de son gène chez la souris est létale à mi-gestation en raison de nombreuses malformations cardiovasculaires comme nous l'avons décrit précédemment (voir le chapitre II) ²⁴.

A la seule exception du hyaluronan, tous les glycosaminoglycans s'associent à un squelette protéique pour former les protéoglycans. Les protéoglycans se répartissent en trois familles: les protéohéparan sulfates, les hyalectans et les petits protéoglycans riches en leucine (SLRP ="small leucine rich proteoglycans"). Chaque famille est subdivisée en sous-familles selon l'homologie, les propriétés du squelette protéique, la taille et la composition des glycosaminoglycans associés (Figure 13). La grande diversité moléculaire des protéoglycans réside dans la multitude de combinaisons possibles entre le nombre et la nature des glycosaminoglycans et la structure protéique, qui ensemble déterminent leurs propriétés biologiques ⁷⁹.

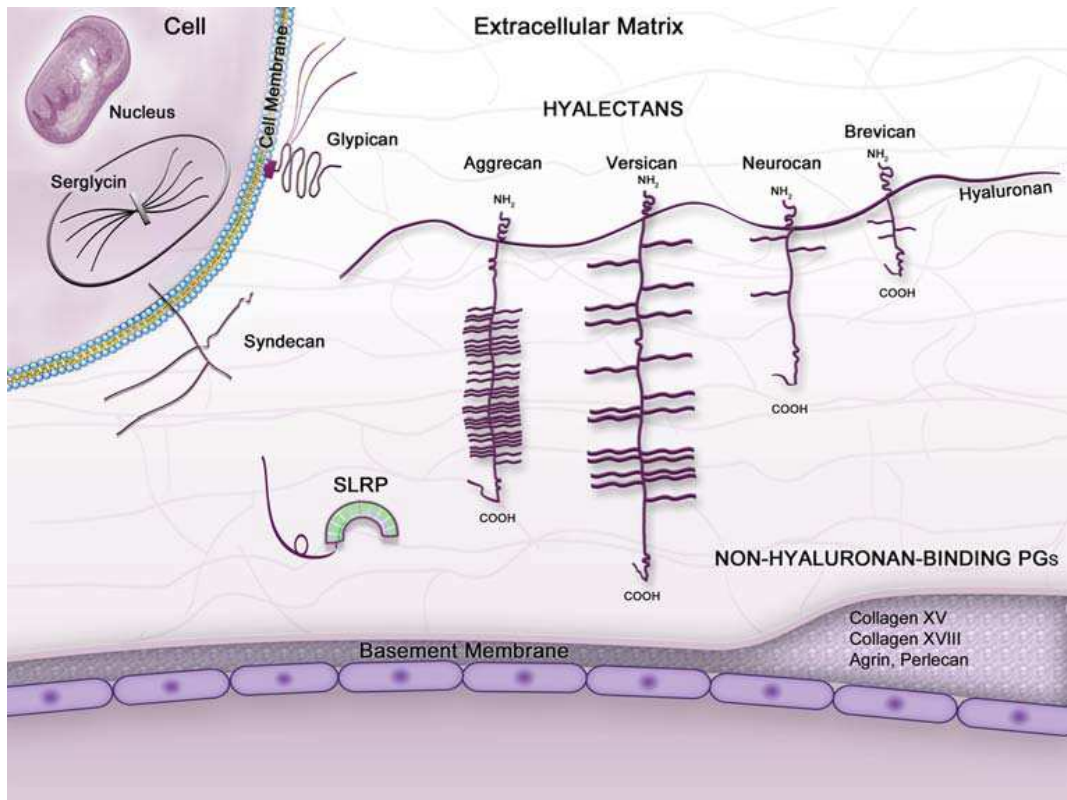


Figure 13: Classification des protéoglycans selon leur structure et leur localisation. La serglycin est le seul protéoglycan intracellulaire présent dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales. Les protéohéparan sulfates se localisent dans la membrane basale (collagène de type XV et XVIII, perlecan et agrin) ou au niveau de la membrane cellulaire (syndecans, glypicans). Les protéoglycans extracellulaires sont constitués par les hyalactans qui se lient à l'hyaluronan (neurocan, brevican, versican, aggrecan) et les SLRPs ("Small Leucine Rich Proteoglycans") qui sont indépendants de l'hyaluronan. D'après Schaefer et Schaefer⁸⁰.

La famille des *protéohéparan sulfates* doit son nom à la nature de la chaîne polysaccharidique qui décore le cœur protéique. Cette famille comprend des protéoglycans de membrane basale (perlecan, agrin et collagènes de type XV et XVIII) ou ancrés dans la membrane plasmique (syndécans et glypican)⁸¹. Ils interviennent dans les interactions cellule-matrice et la régulation de nombreuses voies de signalisation par la modulation de l'activité de facteurs de croissance capables de se lier à l'héparine et aux héparan sulfates (FGF, HB-EGF).. Le clivage des protéohéparan sulfates de la membrane plasmique abolit leur rôle de co-récepteur mais libère un fragment extracellulaire qui reste biologiquement actif^{82, 83}. Par ailleurs, certains protéohéparan

sulfates de membrane basale présentent, à leur extrémité carboxyterminale, des domaines qui, une fois libérés par clivage protéolytique, s'avèrent être de puissants agents antiangiogènes (endostatine, restine, endorepelline)⁷⁹

Les *hyalectans* - le versican, l'aggrécan, le neurocan et le brevican - sont des protéoglycans de grande taille composés de trois domaines globulaires. Leur nom provient de leur capacité à se lier par le domaine G1 avec l'hyaluronan tandis que le domaine G3 permet des interactions avec diverses glycoprotéines. Ces deux domaines sont séparés par une région de liaison des chaînes de glycosaminoglycans. Leur nombre, allant de 3 (brevican) à 100 chaînes (aggrécan), leur longueur et leur degré de sulfatation, contribuent significativement à la fonction des hyalectans. Les nombreuses charges négatives présentes sur les chaînes de glycosaminoglycans se repoussent en offrant des espaces qui entrappent de larges quantités d'eau, l'ensemble formant un gel visqueux comblant l'espace interfibrillaire de la matrice extracellulaire. Ce mécanisme explique pourquoi les complexes riches en aggrécan et/ou versican participent largement à la fonction d'amortisseur des cartilages et dictent les propriétés visco-élastiques des structures cardiovasculaires comme les valves cardiaques. Outre ses propriétés biomécaniques, l'interaction du versican avec de nombreuses protéines matricielles (collagène de type I, fibrilline, fibuline,...) et membranaires (intégrine β 1) en fait un acteur clé des interactions cellule-matrice. Le clivage de l'aggrécan, du brevican et du versican par plusieurs membres de la famille des ADAMTS, les protéoglycanases, joue un rôle important dans le développement et dans des pathologies telles que l'ostéoarthrite et les affections cardiovasculaires^{78, 84}.

La structure générale des membres de la *famille SLRP* comprend deux domaines riches en cystéine séparés par une région riche en répétitions de résidus leucine. Le coeur protéique peut être associé à des chaînes de CS (décorine, biglycan et épiphycan) ou de KS (fibromoduline, lumican, keratocan, PRELP, ostéoadhérine, chondroadhérine et ostéoglycine). La décorine et le biglycan modulent la fibrillogenèse des collagènes fibrillaires. Ils peuvent également interagir avec les collagènes de type VI, XII et XIV ou la fibronectine et l'élastine. Cependant leur fonction ne se limite pas à un rôle

strictement structurel car ils se révèlent être des activateurs clé de nombreuses voies signalétiques par interaction directe avec différents récepteurs ou indirectement en interagissant avec des facteurs de croissance tels que les TGF- β , BMP,....⁸⁵⁻⁸⁷.

5.2.2 Glycosaminoglycans et protéoglycans dans les valves myxoïdes

Les glycosaminoglycans et protéoglycans de la valve mitrale normale ont des localisations spécifiques selon le feuillet qui pourraient être liées aux types de contraintes mécaniques perçues localement. La concentration en glycosaminoglycans est plus importante dans le feuillet postérieur qui supporte surtout des forces de compression. Il s'agit principalement de l'hyaluronan et des CS tandis que le protéoglycan principal est le versican. Par contre, la décorine et le biglycan sont les composants majoritaires des zones sous tension c'est-à-dire du feuillet antérieur⁵. Une des caractéristiques systématiques de la dégénérescence myxoïde est l'accumulation de protéoglycans et glycosaminoglycans. Un excès de décorine, biglycan et versican est ainsi décrit dans les feuillets myxoïdes, la quantité d'hyaluronan y restant par ailleurs inchangée.⁸⁸.

D'après les nombreuses fonctions que peuvent exercer les protéoglycans et leur implication dans la valvulogénèse²², il est vraisemblable que leur accumulation représente bien plus qu'un processus passif secondaire à la pathologie et qu'ils participent activement à la dégénérescence myxoïde par leur fonctions de signalisation.

5.3 Les MMPs et ADAMTS

5.3.1 Généralités

Les metzincines sont des protéases qui partagent un motif conservé HExxHxxGxxH, permettant la liaison de l'ion zinc dans le site catalytique, suivi d'une courte séquence contenant une méthionine cruciale pour la conformation tri-dimensionnelle et la stabilisation du site catalytique. Cette famille se subdivise en 4 groupes: les serralysines, les MMPs, les astacines et les adamalysines (ADAMs et ADAMTS). Ces enzymes sont produites sous forme latente où l'ion zinc est bloqué par

une cystéine du prodomaine. La latence est levée lorsque celui-ci est clivé soit intracellulairement par la furine, soit dans le milieu extracellulaire par le système plasminogène/plasmine ou d'autres MMPs. Dans le cadre de cette introduction nous ne détaillerons que les MMPs et ADAMTS (Figure 14)^{89,90}.

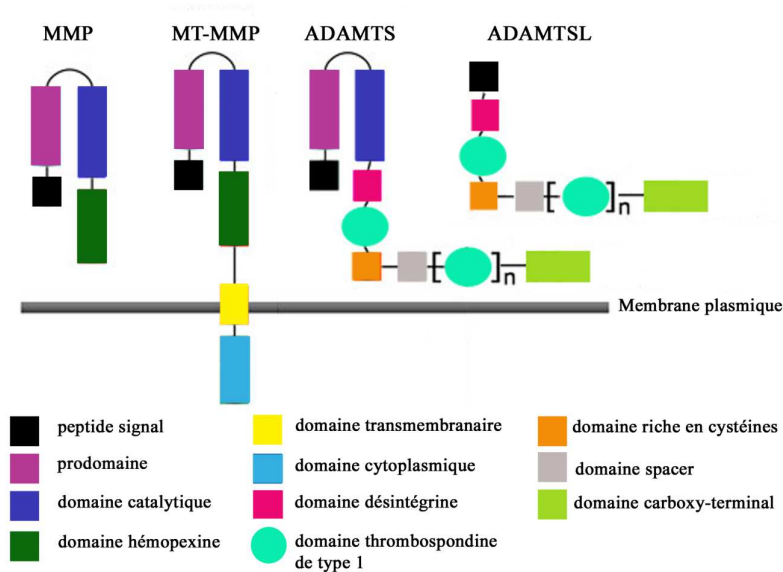


Figure 14: Structure schématique générale des MMPs, ADAMTS et ADAMTSL. Les MMPs et ADAMTS appartiennent à la superfamille des metzincines. Elles possèdent un peptide signal suivi d'un prodomaine et d'un domaine catalytique où se lie l'ion zinc. La plupart des MMPs possèdent un domaine de type hémopexine. Les MT-MMP 1-6 s'ancrent à la membrane par un lien GPI ou grâce à un domaine transmembranaire prolongé par une séquence intracytoplasmique. Les ADAMTS se distinguent par la présence d'un domaine désintégrine, d'un domaine riche en cystéine et un nombre variable de répétitions de thrombospondine de type 1. Les ADAMTSL sont des homologues des ADAMTS mais ne possèdent ni le prodomaine ni le domaine catalytique. D'après Klein et Bischoff⁹¹.

A ce jour, 23 *MMPs* ont été identifiées chez l'Homme. Sur base de leur caractéristiques structurales, elles se classent en MMPs sécrétées et MMPs ancrées dans la membrane plasmique (MT-MMPs). L'ensemble des molécules composant la matrice extracellulaire ainsi que de très nombreux facteurs de croissance, récepteurs membranaires, protéines d'adhésion, cytokines et chimiokines peuvent être clivés par les MMPs, ce qui explique leur implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques⁹².

La famille des *ADAMTS*, dont les deux premiers membres, *ADAMTS-1* et *ADAMTS-2* ont été clonés et décrits en 1997 pratiquement simultanément par une équipe japonaise ⁹³ et notre laboratoire ⁹⁴, compte à ce jour 19 membres (Figure 15). Après les domaines communs aux métalloprotéases matricielles, se trouvent le domaine désintégrine et divers domaines, dont un nombre variable de répétitions thrombospondine de type I. Le clivage de la partie carboxy-terminale des *ADAMTS* régule à la fois leur activité et leur localisation. Collectivement, elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Sur base de l'analyse phylogénétique et de leur substrats, quand ils sont connus, les *ADAMTS* se répartissent en plusieurs groupes (Figure 15). Parmi ceux-ci, les aminoprocollagène peptidases (*ADAMTS-2*, -3 et -14) participent à la maturation des procollagènes fibrillaires en clivant leur propeptide amino-terminal. Un second groupe rassemble les *ADAMTS-1*, -4, -5, -8, -9, -15 et -20 qui peuvent cliver des protéoglycans, dont les hyalectans sont les substrats les mieux définis à l'heure actuelle ^{78, 95, 96}. La famille *ADAMTS* au sens large inclut également 7 *ADAMTSL* qui partagent les domaines carboxy-terminaux des *ADAMTS* mais ne possèdent pas de prodomaine ni de domaine catalytique. Il n'est pas exclu qu'elles puissent agir comme inhibiteurs compétitifs des *ADAMTS*. Toutefois, à l'heure actuelle, il semble qu'elles aient principalement des fonctions structurelles, notamment en participant et en contrôlant la formation des microfibrilles, avec comme conséquence une régulation de la signalisation de la voie des TGF- β ^{97, 98}.

5.3.2 Les MMPs et *ADAMTS* dans les valves myxoïdes

Une expression accrue des collagénases (*MMP-1* et *MMP-13*) ⁶⁵ et des élastases (*MMP-2* et *MMP-9*) accompagnée d'une réduction de la synthèse de TIMP2, un inhibiteur physiologique, pourraient expliquer en partie les altérations structurelles des fibres élastiques et de collagène observées dans les valves myxoïdes ⁹⁹. Les *ADAMTS* n'ont jamais été mesurées dans les valves mitrales saines ou pathologiques. Cependant, leur implication dans le développement de la dégénérescence myxoïde est fortement suspectée sur la base d'études réalisées dans des modèles murins (voir le sous-chapitre 6.4) ^{9, 26}.

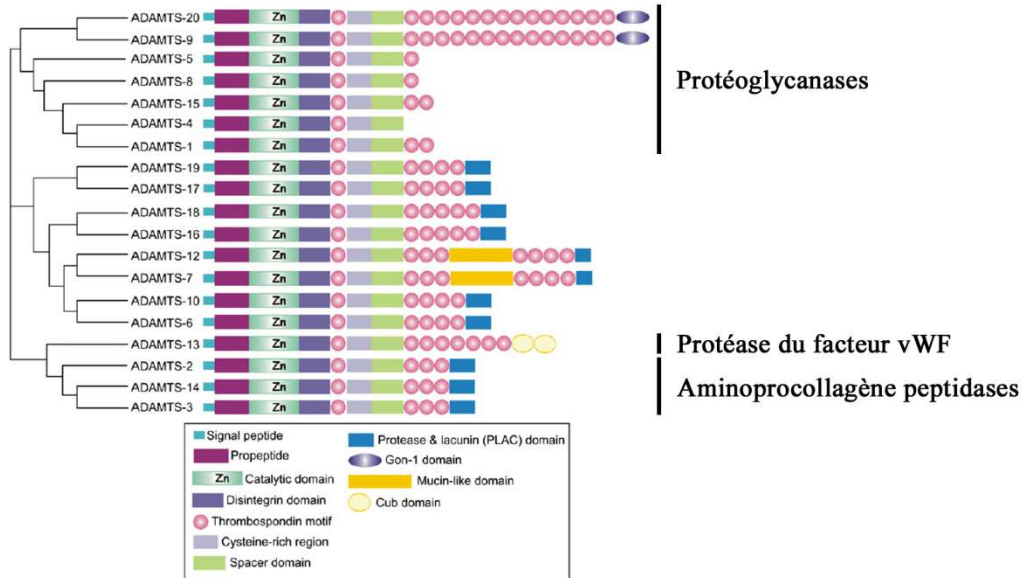


Figure 15: Structure schématique et organisation phylogénétique des ADAMTS. Toutes les ADAMTS partagent un domaine amino-terminal identique et se distinguent par leurs domaines carboxy-terminaux et leurs activités. Les protéoglycanases sont impliquées dans le clivage des protéoglycans. L'ADAMTS-13 clive le facteur de von Willebrand (vWF) tandis que les ADAMTS-2,-3 et -14 sont connues pour cliver le propeptide amino-terminal des procollagènes fibrillaires. Ces classifications fonctionnelles représentent l'état actuel des connaissances qui sont appelées à évoluer. D'après Stanton *et al* ⁷⁸.

6. Pathogénie

La dégénérescence myxoïde de la valve mitrale a été longtemps étudiée principalement de manière descriptive sur la base d'observations et semi-quantifications histologiques. Ces observations ont permis de mettre en évidence un ensemble de modifications, tant au niveau cellulaire que matriciel, sans toutefois mener à des avancées significatives concernant l'étiopathogénie de la maladie. C'est l'existence d'une dégénérescence myxoïde dans certaines maladies génétiques des tissus conjonctifs ainsi que l'étude de souris déficientes qui ont apporté des éléments nouveaux à l'origine d'une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents.

6.1 Génétique de la dégénérescence myxoïde

Au vu des connaissances actuelles, il semble que seuls 1 à 2% des cas de dégénérescence myxoïde soient associés à des pathologies génétiques des tissus conjonctifs dont nous détaillerons l'importance ci-après.

Si la majorité des patients affectés semblent être des cas sporadiques, une forme familiale autosomale dominante a toutefois été décrite. Le criblage génétique de familles atteintes de prolapsus valvulaires mitraux sévères, catégorisés comme souffrant d'une maladie de Barlow, a en effet permis l'identification de 3 loci présents sur les chromosomes 11, 13 et 16 couvrant respectivement des régions de 46, 16 et 24 gènes connus. Cependant, à l'heure actuelle, aucun d'entre eux n'a pu être spécifiquement incriminé¹⁰⁰⁻¹⁰². Plus récemment, l'analyse génétique de 4 familles a révélé que des mutations dans le gène de la filamine A sont responsables de la dégénérescence myxoïde non-syndromique associée au chromosome X¹⁰³. La filamine A est une protéine du cytosquelette interagissant avec la vimentine et faisant la jonction entre les filaments d'actine et des protéines membranaires telles que les intégrines. Au-delà de son rôle structurel, elle est impliquée dans certaines voies de signalisation telles que celles du TGF- β , de R-Ras et de Syk. Son rôle pathogénique dans la dégénérescence myxoïde n'est toutefois pas encore défini^{104, 105}.

6.2 Dégénérescence myxoïde causée par des mutations affectant les tissus conjonctifs

Une dégénérescence myxoïde est observée dans un certain nombre de pathologies des tissus conjonctifs associées à des altérations des voies de signalisation régulées par les TGF- β . Cette superfamille de facteurs de croissance se compose notamment des TGF- β et des BMPs que nous décrirons brièvement dans cette introduction^{106, 107}.

6.2.1 Signalisation par les facteurs de la superfamille des TGF- β

Il existe trois gènes codant pour 3 TGF- β distincts (TGF- β 1, - β 2, - β 3). Ils sont synthétisés sous forme d'un précurseur "processé" dans l'appareil de Golgi par clivage du propeptide en facteur de croissance mature qui demeure toutefois lié à son propeptide (LAP = "latency associated peptide") qui le maintient latent. Les dimères de ce petit complexe latent (SLC = "small latent complex") se fixent par des liaisons disulfures à une protéine LTBP ("Latent TGF- β binding protein") pour former un large complexe latent (LLC = "large latent complex"). Celui-ci est sécrété dans la matrice extracellulaire où il se fixe et forme un réservoir de TGF- β latent. Cette immobilisation se fait principalement au niveau des polymères de fibrillines formant les microfibrilles des fibres élastiques (Figure 16) ¹⁰⁸. Le TGF- β latent séquestré dans la matrice extracellulaire peut être activé par clivage protéolytique par la plasmine ou certaines MMPs, dont la MMP2 et la MMP9. Alternativement des radicaux libres, la thrombospondine-1, un abaissement de pH et les intégrines α v β 6 et α v β 8 peuvent également libérer du TGF- β actif ¹⁰⁹.

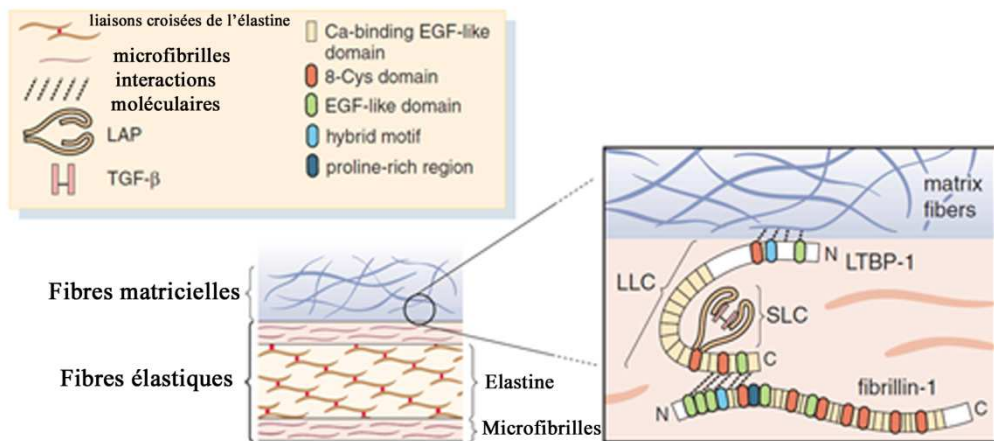


Figure 16: Le TGF- β dans la matrice extracellulaire. Le TGF- β lié à son propeptide (LAP = "latency associated peptide") est présent dans la matrice extracellulaire sous la forme d'un petit complexe latent (SLC = "small latent complex") fixé à une protéine LTBP ("Latent TGF- β binding protein") pour former le large complexe latent du TGF- β (LLC = "large latent complex"). Celui-ci se fixe à la matrice extracellulaire en interagissant avec la fibrilline-1, une des glycoprotéines formant les structures microfibrillaires des fibres élastiques. D'après Kaartinen et Warburton ¹⁰⁸.

La signalisation des molécules de la famille TGF- β s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs sérine/thréonine kinases de type I et II. Il existe 7 récepteurs de type I, appelés ALK ("activin receptor-like kinases") et 5 récepteurs de type II. Lorsqu'il interagit avec un de ses ligands, un récepteur de type II recrute un récepteur de type I et le "transphosphoryle" ce qui mène à l'activation de messagers intracellulaires spécifiques (Figure 17A). A titre d'exemple, les TGF- β 1, 2 et 3 induisent la phosphorylation de smad2 et smad3 par l'intermédiaire d'ALK5 (TGF β R-I), alors que les BMPs activent les smad1, 5 et 8 par l'intermédiaire d' ALK1, 2, 3 ou 6 (Figure 17B). Il existe par ailleurs des co-récepteurs, le betaglycan (TGF β R-III) et l'endoglin, qui ne possèdent pas d'activité kinase mais accroissent l'affinité des ligands pour les récepteurs de type I et II¹¹⁰.

Les R-smads phosphorylés s'associent à un co-smad (smad4) pour être transportés dans le noyau où ils régulent positivement ou négativement la transcription de leurs gènes cibles (Figure 17A). La spécificité de cette régulation est assurée par l'association des smads avec un ensemble de protéines partenaires et co-facteurs^{111, 112}. En parallèle de la voie canonique des smads, d'autres voies de signalisation, dites non-canoniques et impliquant Erk1/2, p38, JNK, les Rho GTPases et Akt par exemple, peuvent également être activées par les TGF β R1 et RII (Figure 17C)¹¹³.

6.2.2 Maladie de Marfan

Des mutations de la fibrilline 1 sont responsables d'une maladie génétique autosomale dominante des tissus conjonctifs connue sous le nom de syndrome de Marfan dont l'incidence est d'environ 2-3/10000¹¹⁴. Les patients atteints présentent des complications oculaires, une hyperlaxité des articulations, des altérations squelettiques et des anomalies vasculaires et cardiaques telles qu'un anévrisme de l'aorte ascendante et un épaissement de la valve mitrale aboutissant à un prolapsus dans environ 56% des cas^{115, 116}.

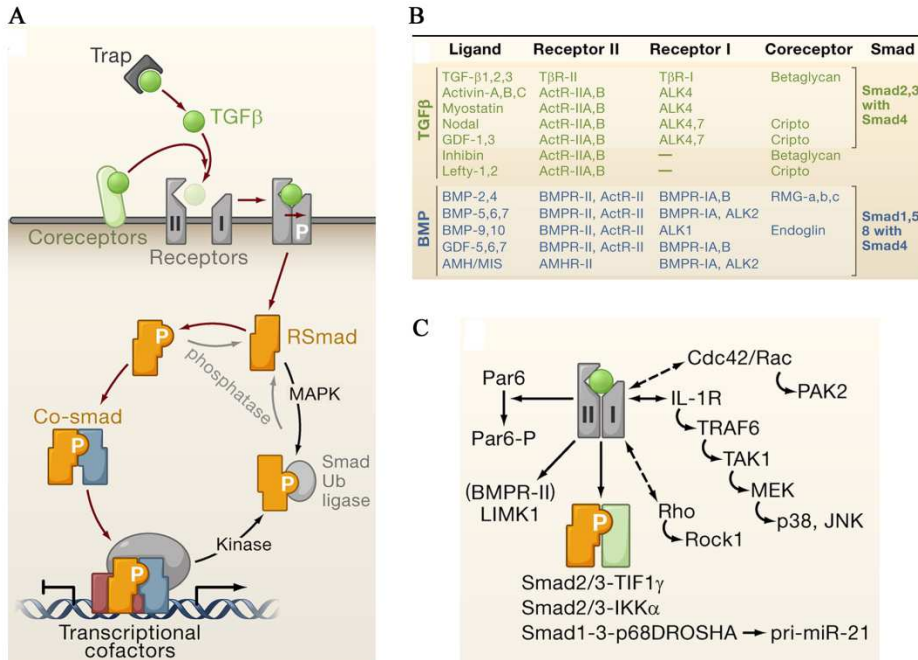


Figure 17: Voie de signalisation du TGF-β. **A:** Lorsqu'un ligand, libéré ou présenté par un co-récepteur, se lie à un récepteur de type II, il induit le recrutement et la phosphorylation d'un récepteur de type I. Cette activation permet la phosphorylation des R-smads (smad1,2,3,5 et 8) qui forment alors avec smad4 (co-smad) un complexe capable de réguler la transcription de gènes cibles. **B:** Tableau récapitulatif des interactions préférentielles entre les différents ligands de la superfamille du TGF-β, leur récepteurs et co-récepteurs ainsi que leurs protéines smad cibles. Les TGF-β induisent plus particulièrement la phosphorylation des smad2 et 3, alors que les BMPs activent les smad1, 5 et 8. **C:** En plus de la voie canonique des smads requérant smad4, d'autres voies de signalisation peuvent être régulées, notamment par l'intermédiaire de TIF1 γ , IKK α et p68 Droscha. Une activation directe par les récepteurs de type I ou de type II a également été démontrée pour les RhoGTPases et les MAPK d'une part et les Par6 ou LIMK1, d'autre part. D'après Massague¹¹⁷

Les souris hétérozygotes portant une mutation de la fibrilline 1, substituant une cystéine par une glycine (Fbn^{C1039G/+}), récapitulent le phénotype cardiovasculaire du syndrome de Marfan. Elles ont permis de mettre en évidence le rôle pathogénique de cette protéine microfibrillaire. Histologiquement, les valves mitrales épaissies se caractérisent par une prolifération cellulaire accrue, une concentration plus élevée en TGF-β activé et, en conséquence, une augmentation de la phosphorylation de smad2⁷⁷. Tout récemment, il a été montré qu'une voie non-canonique du TGF-β impliquant Erk1/2 est également activée dans l'aorte des souris Fbn^{C1039G/+}¹¹⁸. Par ailleurs, des concentrations sanguines accrues en TGF-β1 ont été mises en évidence chez ces souris

ainsi que chez les patients souffrant du syndrome de Marfan¹¹⁹. L'hypothèse d'une implication de l'activation des voies de signalisation sous la dépendance de TGF- β , suite à une dérégulation de séquestration par les microfibrilles, est renforcée par l'amélioration du phénotype des souris Fbn^{C1039G/+} et Fbn^{C1039G/C1039G} suite à l'administration d'anticorps neutralisant le TGF- β ⁷⁷. Par la suite, le losartan, un antagoniste du récepteur de type I de l'angiotensine II (AT1R), a été également utilisé avec succès dans ce modèle murin, pour atténuer les anévrismes de l'aorte et réduire la concentration de TGF- β 1 circulant. La signalisation induite par AT1R stimule en effet l'expression du TGF- β , de ses récepteurs et d'un de ses activateurs, la thrombospondine-1 (Figure 18). Des inhibiteurs de la voie Erk1/2 et JNK sont également efficaces chez les souris Fbn^{C1039G/+}^{118, 120}. Des études cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité du losartan dans le traitement du syndrome de Marfan chez l'Homme¹²¹⁻¹²³.

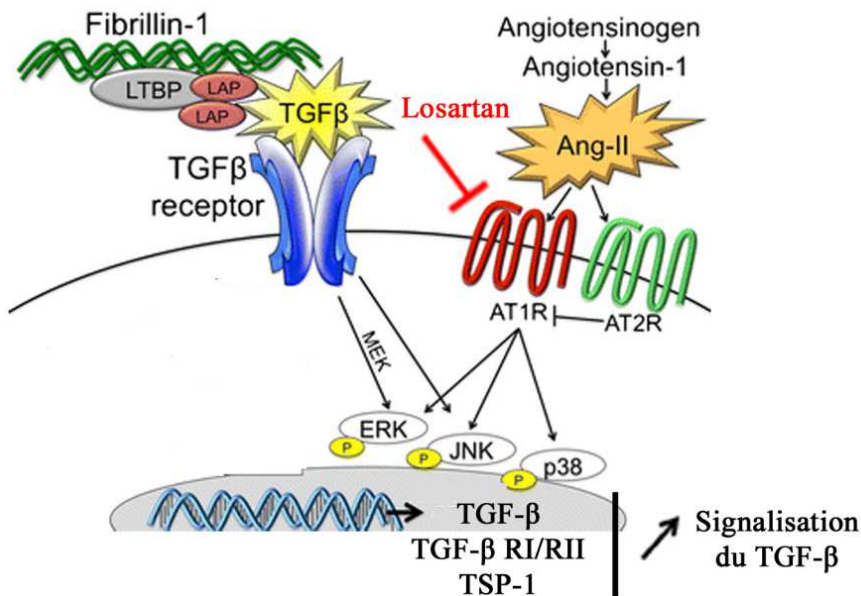


Figure 18: Relations entre les voies de signalisation de l'angiotensine de type II (Ang-II) et du TGF- β . Les voies de signalisation non-canoniques du TGF- β et de l'Ang-II via son récepteur de type I(AT1R) induisent la phosphorylation de ERK1/2 et JNK. L'activation de AT1R favorise également l'expression du TGF- β lui-même, de ses récepteurs de type I et II (TGF- β RI/RII) et d'un activateur, la thrombospondine de type I (TSP-1). La losartan, un antagoniste de AT1R, s'est montré efficace dans l'amélioration des symptômes du syndrome de Marfan par atténuation de l'activation de la voie de signalisation TGF- β . D'après Habashi *et al* et Judge *et al*^{115, 124}.

6.2.3 Syndrome de Loeys-Dietz

Le syndrome de Loeys-Dietz est causé par des mutations dans le domaine kinase du récepteur de type I ou de type II du TGF- β . De manière surprenante, celles-ci induisent une activation de la voie TGF- β par stimulation de la phosphorylation de smad2 et une expression accrue de CTGF (un gène cible du TGF- β) et de collagène¹²⁵. La prévalence des prolapsus valvulaires mitraux est de 35% chez les individus portant une mutation du TGF β RII.¹¹⁶

6.2.4 Autres syndromes génétiques liés aux voies de régulation du TGF- β

Récemment, il a été montré que des mutations du gène codant pour smad3 induisent également une activation de la voie TGF- β . Les patients présentent des anévrismes thoraciques, de l'ostéoarthrite et des prolapsus valvulaires mitraux avec une prévalence similaire à celle observée dans les syndromes de Loeys-Dietz et de Marfan¹²⁶. Par ailleurs, des dysfonctions de la valve mitrale ont été rapportées chez des patients porteurs de mutations dans le gène de smad4¹²⁷. L'importance de la régulation de la séquestration du TGF- β est également illustrée dans une chondrodysplasie rare, la dysplasie géléophysique. Cette maladie génétique se caractérise par un raccourcissement des extrémités, un retard statural et des épaissements des valves cardiaques responsables d'un décès dans les premières années de la vie. Le Goff *et al*¹²⁸ ont identifié des mutations du gène ADAMTSL2 qui code pour une protéine homologue aux ADAMTS mais ne possédant pas de domaine catalytique¹²⁹. Un défaut de sécrétion de la protéine et une augmentation significative du TGF- β 1 ainsi qu'une translocation nucléaire accrue du p-smad2 sont observés dans les cultures de fibroblastes des patients. L'interaction de l'ADAMTSL2 avec le LTBP1¹²⁸ ainsi qu'avec la fibrilline 1¹³⁰ suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle significatif dans la régulation de la biodisponibilité du TGF- β .

Bien que logiquement suspectée, une activation de la voie TGF- β n'avait pas encore été rapportée dans la forme idiopathique de la dégénérescence myxoïde de la valve mitrale. Les résultats faisant l'objet de ce mémoire supportent la participation de TGF- β 2. Par ailleurs, une surexpression de BMP4, un facteur de croissance qui s'est révélé capable d'activer *in vitro* les cellules valvulaires quiescentes en myofibroblastes, a été observée dans les valves myxoïdes humaines,¹³¹.

6.3 Implication de la MMP2

Un modèle de souris transgénique surexprimant la forme active de la MMP2 au niveau cardiaque est caractérisé, entre autres, par le développement d'une dégénérescence myxoïde de la valve mitrale comparable à celle décrite chez l'Homme, avec notamment une expansion de la spongiosa par accumulation de glycosaminoglycans et une densité accrue de cellules valvulaires interstitielles. Certaines cellules présentent un phénotype de chondrocytes hypertrophiques et expriment la glycoprotéine COMP ("cartilage oligomeric matrix protein") spécifique des chondrocytes différenciés. Les altérations, touchant également les cordages, n'apparaissent que tardivement, vers 12-14 mois, et entraînent un prolapsus valvulaire sévère alors que les souris plus jeunes ont une fonction et une histologie valvulaire normales¹³². Une activité élevée de la MMP2, également observée dans les valves myxoïdes humaines⁹⁹ pourrait expliquer les altérations structurelles de la matrice extracellulaire observées dans les valves myxoïdes puisque l'élastine et les collagènes de type I et III en sont des substrats et qu'elle est capable d'activer les formes latentes de TGF- β .

6.4 Implication du clivage du versican par les ADAMTS

Les travaux réalisés par l'équipe de Suneel Apte et Christine Kern suggèrent que l'absence de clivage du versican par des protéoglycanases contribue à la dégénérescence myxoïde. Des souris haploinsuffisantes pour l'ADAMTS-9 (*adams9^{+/-}*) souffrent d'un épaissement des feuillets des valves aortiques et mitrales. Ces altérations résulteraient d'un clivage déficient, et donc d'une accumulation, de versican et seraient exacerbées chez les souris de plus de 6 mois ²⁶.

Tout récemment, les souris déficientes en ADAMTS-5 ont également été proposées comme un modèle de dégénérescence myxoïde mitrale. Leurs valves présentent un épaissement marqué par accumulation de versican sous sa forme non clivée. Ces modifications s'étendent à tout le mésenchyme valvulaire et s'accompagnent d'un indice de prolifération cellulaire accru et d'une expression de BMP2 et de *sox9* plus élevée que dans les valves des souris de type sauvage. Ces altérations sont déjà observées dans les valves des embryons (E17.5) et persistent jusqu'à l'âge adulte. Le croisement des souris *ADAMTS5^{-/-}* avec des souris haploinsuffisantes pour le versican résulte en une atténuation du phénotype, ce qui implique directement l'accumulation et le manque de clivage de ce protéoglycan dans le développement de la maladie. Ce modèle de dégénérescence myxoïde, avec une pénétrance de 100 %, une viabilité normale et une fertilité non altérée pourrait s'avérer des plus utile pour tester de futures interventions thérapeutiques visant à corriger ou ralentir l'évolution de la maladie⁹.

6.5 Implication mécanique

La valve mitrale, au même titre que les trois autres valves cardiaques, est soumise en permanence à des forces mécaniques de nature et d'intensité diverses. Ces forces mécaniques sont intégrées par les cellules en signaux biochimiques par le biais de récepteurs membranaires, les intégrines. Celles-ci forment en effet un lien physique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette et sont également couplées à des complexes de signalisation. Bien qu'une implication directe des forces mécaniques dans la dégénérescence myxoïde ne soit pas formellement prouvée, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* tendent à montrer leur importance.

Ainsi, il est intéressant d'observer l'influence de la pression sanguine sur l'épaisseur valvulaire, les valves du côté gauche du cœur étant plus épaisses que celles du côté droit¹. D'autre part, le stress mécanique est à l'origine d'un épaissement des feuillets dans des modèles d'insuffisance mitrale fonctionnelle caractérisés par un remodelage matriciel important, une proportion élevée de cellules interstitielles exprimant l' α -SMA s'accompagnant d'une réactivation de la EMT^{56, 133}. Un stress mécanique anormal peut provenir d'une détérioration de l'appareil sous-valvulaire et/ou du reflux sanguin¹³⁴, induisant une perturbation des charges mécaniques supportées par les feuillets. De subtiles déformations de la géométrie des tissus valvulaires, déterminées au cours du développement, pourraient également engendrer des comportements mécaniques inappropriés, s'aggravant avec l'âge et provoquant une reprogrammation progressive du phénotype cellulaire.

Les feuillets de la valve mitrale normale se bombent dans l'oreillette lors de la contraction systolique. Une étude révèle une hétérogénéité de courbure dans une région du segment P1 et deux foyers du segment P2 qui pourrait expliquer la fréquence élevée de la dégénérescence myxoïde du segment P2¹³⁵. Au delà de ces observations *in vivo*, la perception des signaux mécaniques par les VIC est significative comme en atteste leur influence sur le phénotype cellulaire¹³⁶ ainsi que sur la modulation de synthèse de collagène¹³⁷ et de protéoglycans^{138, 139} en réponse à des contraintes mécaniques.

6.6 La dégénérescence myxoïde canine

Avec l'âge, les chiens ont tendance à développer une dégénérescence myxoïde qui représente 75% des maladies cardiovasculaires canines. Sa prévalence varie selon les races, les Cavalier King Charles Spaniels étant les plus fréquemment atteints. La dégénérescence myxoïde canine est proposée par certains comme un modèle pertinent de la dégénérescence humaine¹⁴⁰, notamment en raison de la possibilité d'analyser la progression de la maladie dont la sévérité a été associée à l'expression d' α -SMA, de MMP-1, de MMP-3¹⁴¹ et MMP-13^{142, 143} mais aussi de TGF- β 1 et de TGF- β 3^{141, 144}.

IV. Les métallothionéines

Un résumé des connaissances actuelles sur les métallothionéines et leur implication dans le remodelage cardiovasculaire de certaines pathologies nous a paru indispensable en raison du rôle pathogénique que pourraient jouer ces molécules dans la dégénérescence myxoïde mis en lumière au cours de nos travaux.

Les métallothionéines sont des petites protéines de 61 acides aminés dont un tiers sont des résidus cystéine. Grâce à leur haute teneur en groupement thiols qui leur confère une capacité de liaison naturelle avec les métaux tels que le zinc, cuivre, cadmium et mercure ainsi qu'une activité rédox, les métallothionéines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques. Ce sont d'ailleurs les protéines intracellulaires les plus abondantes contenant du zinc. Elles sont impliquées dans la régulation de la concentration intracellulaire de divers métaux, la chélation des métaux lourds et la protection contre le stress oxydatif ¹⁴⁵. La famille des métallothionéines est encodée par 10 gènes fonctionnels localisés sur le chromosome 16. Elles sont réparties en 4 sous-familles, MT-1 à MT-4, dont seule la sous-famille MT-1 comprend plusieurs membres (MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1H, MT-1M, MT-1X) ¹⁴⁶. Alors qu'un nombre important de stimuli, comprenant les métaux, les cytokines et le stress oxydatif, peuvent induire l'expression des MT-1 et MT-2, l'expression des MT-3 et MT-4 est plus spécifiquement contrôlée et est limitée au système nerveux central ou aux épithéliums stratifiés ¹⁴⁷.

La liaison des résidus cystéine avec les métaux lourds ou leur oxydation par les radicaux libres déplacent les ions Zn^{2+} liés aux métallothionéines. Ces ions libérés vont se fixer au facteur de transcription MTF-1 qui est transloqué dans le noyau où il active la transcription de ses gènes cibles dont les métallothionéines MT-1 et MT-2 elles-mêmes (Figure 19) ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

Les MT-1 et MT-2 ont été détectées dans de nombreux cancers et leur expression élevée a été associée dans certains cas avec l'hyperprolifération cellulaire ¹⁵⁰ et la résistance à la chimiothérapie ¹⁵¹. Elles sont toutefois sous-exprimées dans des carcinomes hépatocellulaires ou des adénocarcinomes du foie, ce qui témoigne d'un rôle

diversifié des métallothionéines dans les cancers ¹⁵². L'absence du facteur de transcription MTF-1, régulateur des métallothionéines, inhibe la croissance tumorale et semble responsable de l'accumulation d'une matrice extracellulaire abondante, potentiellement en relation avec une activation de TGF- β 1 et de la transglutaminase 2. Plus récemment, un lien entre les métallothionéines et le remodelage matriciel du système vasculaire a également été suspecté. Une réduction de l'expression des métallothionéines a été décrite dans les cellules musculaires lisses de l'aorte ascendante de patients porteurs d'une valve aortique bicuspidie. Ces cellules ne répondraient pas correctement à un stress oxydatif, ce qui induirait un remodelage matriciel aboutissant à une dilatation de l'aorte thoracique ¹⁵³.

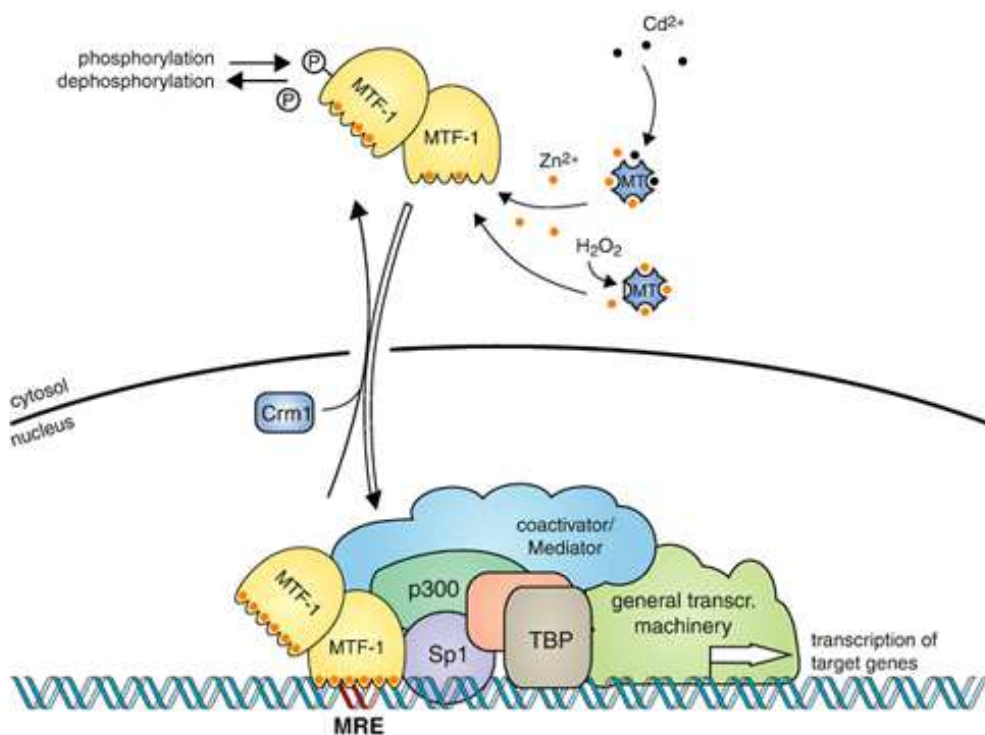


Figure 19: Régulation de MTF-1 et des métallothionéines (MT). L'activation de MTF-1 est modulée par phosphorylation et liaison avec des ions zinc. Ces derniers peuvent être libérés de leur complexe avec les métallothionéines suite à une oxydation par un stress oxydatif (H_2O_2) ou un déplacement par des métaux lourds (Cd^{2+}). La fixation du zinc sur MTF-1 induit sa translocation dans le noyau où il se fixe, avec d'autres facteurs de transcription et coactivateurs, au motif MRE et régule l'expression de gènes dont les MT. D'après Gunther *et al* ¹⁵⁴.

Publication 1: L'insuffisance mitrale par dégénérescence myxoïde : aspect biochimique et considérations physiopathologiques

Marc A Radermercker, Kevin Boulanger, Alexia Hulin, Charles Lambert, Raymond Limet, Charles Lapière, Betty Nusgens.

Rev Med Liege 2008; 63 : 4 : 187-192

L'INSUFFISANCE MITRALE PAR DÉGÉNÉRESCENCE MYXOÏDE :

aspect biochimique et considérations physiopathologiques

M.A. RADERMECKER (1), K. BOULANGER (2), A. HULIN (3), CH. LAMBERT (4), R. LIMET (5), CH. LAPIÈRE (6), B. NUSGENS (7)

RÉSUMÉ : La valvule mitrale est une structure complexe soumise par sa fonction à des sollicitations mécaniques importantes et répétées. L'insuffisance mitrale par dégénérescence myxoïde est actuellement l'une des étiologies les plus fréquentes des valvulopathies mitrales. Cette atteinte de la valve est par ailleurs retrouvée dans des affections génétiques du tissu conjonctif. Nous proposons l'hypothèse que l'insuffisance mitrale par dégénérescence myxoïde serait la résultante d'une anomalie de la fonction des cellules interstitielles des tissus conjonctifs et/ou de leurs rapports avec la matrice extracellulaire. Après un rappel général du rôle de la matrice extracellulaire conjonctive au niveau du coeur, nous caractérisons l'insuffisance mitrale dégénérative et en dressons, sur base de nos travaux et de la littérature un bilan biochimique permettant de proposer une hypothèse physiopathologique.

Mots-clés : Valvule mitrale - Dégénérescence myxoïde - Matrice extracellulaire - Myofibroblastes

MYXOMATOUS MITRAL VALVE DEGENERATION : BIOCHEMICAL ASPECTS AND PHYSIOPATHOLOGICAL CONSIDERATIONS

SUMMARY : Mitral valve is a complex structure which is submitted to repeated mechanical constraints. In clinical practice, an increasing incidence of mitral insufficiency resulting from myxomatous degeneration is observed. Since myxomatous degeneration is also observed in defined genetic diseases of connective tissues, we propose the hypothesis that idiopathic mitral insufficiency might result from a minor alteration of the interstitial valvular cells and / or their interactions with their support. After a brief review of the role of the extracellular matrix in the heart, some histopathological and biochemical aspects of myxomatous degeneration are presented. Our data and those of the literature will be summarized and a physiopathological hypothesis proposed for myxomatous mitral valve degeneration.

KEYWORDS : Mitral valve - Myxomatous degeneration - Extracellular matrix - Myofibroblast

INTRODUCTION

Le coeur peut, en première approximation, être assimilé à une pompe à élastance variable. Malgré cette conceptualisation très pertinente, la grande majorité des études cliniques et physiologiques ont porté sur la fonction systolique en mettant l'accent sur les éléments contractiles ou cardiomyocytes. Si leur importance ne peut être sous-estimée, il faut toutefois savoir que 75% des cellules constituant le myocarde ne sont pas des cardiomyocytes (1, 2) et que les fibroblastes, cellules conjonctives par excellence, représentent 90 à 95% de cette masse cellulaire non-cardiomyocytaire (3). Les cardiomyocytes sont en effet inclus et ancrés dans une matrice tridimensionnelle formée d'un réseau de fibres et de macro-molécules, laquelle détermine largement la structure et la fonction du myocarde (4). La mise en évidence d'un remodelage myocardique dans toutes les conditions physiopathologiques est responsable d'un regain d'intérêt pour la matrice conjonctive.

Le remodelage myocardique est observé à l'échelon macroscopique (épaississement pariétal, dilatation et sphéricisation du myocarde), microscopique (hypertrophie, réorganisation des fibres et fibrose intra-myocardique) ou biochimique (5). Ce processus est observé après la perte de cardiomyocytes (infarctus, myocardite etc...) (6, 7) ou lors d'une surcharge en pression (sténose aortique, hypertension artérielle) ou en volume (insuffisance mitrale ou aortique) (8). Ces conditions physiopathologiques induisent les signaux pariétaux (stress pariétal) et, *via* l'insuffisance cardiaque, la réponse neuro-humorale qui vont orchestrer le processus de remodelage. Acteur de l'évolution vers l'insuffisance cardiaque décompensée, le processus de remodelage entraîne une perte d'efficacité mécanique, lors de la contraction d'un ventricule devenu sphérique (dysfonction systolique) et/ou altère les propriétés visco-élastiques des ventricules en diastole, responsable d'une augmentation des pressions de remplissage (dysfonction diastolique).

Le rôle de la trame conjonctive apparaît de façon encore plus évidente lorsque l'on considère les valvules cardiaques qui sont, par essence, des structures soumises à des contraintes mécaniques répétées.

(1) Agrégé, (5) Professeur Ordinaire, Service de Chirurgie Cardio-Vasculaire et Thoracique, CHU Sart Tilman, Liège.

(2) Etudiant, Université de Liège.

(3) Licencié en Biochimie, (4) Docteur en Sciences biomédicales, (6) Professeur Emérite, (7) Professeur Ordinaire, Chef de Service, Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs, CHU Sart Tilman, Liège.

LE TISSU CONJONCTIF OU DE SOUTIEN

Celui-ci a été bien étudié au niveau de la peau et est principalement formé de fibroblastes inclus dans un gel matriciel extracellulaire dont les principaux composants sont les collagènes (type I, III et V), les fibres élastiques formées par l'association des fibrillines et de l'élastine, les protéoglycans (lumican, biglycan, décorine etc...) et diverses glycoprotéines (fibronectine, tenascine, ...). Ces différents composants et les enzymes impliquées dans leur maturation et leur dégradation (catabolisme) sont sécrétés par les cellules de la matrice conjonctive (fibroblaste). Le niveau respectif entre synthèse et dégradation de la matrice en détermine la composition, la structure et l'abondance et, dès lors, les propriétés mécaniques. Les interactions entre les cellules conjonctives et leur support sont bi-directionnelles et réciproques pour conférer aux tissus des propriétés adéquates. De nombreux travaux ont mis en évidence la reconnaissance chimique des macromolécules extracellulaires de la matrice et l'influence de facteurs diffusibles (cytokines, hormones, facteurs de croissance) dans les interactions cellules-matrice (9). L'influence de stimuli ou de contraintes mécaniques a longtemps été sous-estimée, mais représente avec certitude une modalité d'interaction qui mérite l'attention (10).

Les contraintes mécaniques ou leur relaxation influencent le phénotype cellulaire par des mécanismes partiellement élucidés (11). Ceux-ci impliquent la reconnaissance des différentes macromolécules de la matrice par un ensemble de récepteurs (dont les intégrines constituent le groupe principal, mais incluant également les syndécans, le dystroglycan, le récepteur 67 kDa à la laminine, CD44 et les galectines) et les protéines cytoplasmiques des plaques d'adhésions focales associées. Par l'intermédiaire du cytosquelette réagissant aux forces mécaniques et de molécules de signalisation intracellulaire, cette interaction aboutit à la régulation de gènes susceptibles aux signaux mécaniques.

Au-delà du maintien de l'intégrité tissulaire, cette interaction entre cellules et matrice joue un rôle fondamental dans les processus aussi complexes que l'embryogenèse, la différenciation cellulaire ou l'invasion tumorale.

LA VALVULE MITRALE

Située entre l'oreillette gauche et le ventricule gauche, elle s'ouvre largement en diastole, permettant le remplissage ventriculaire et se ferme durant la phase d'éjection systolique. Contraire-

ment aux valves aortique et pulmonaire, dont le fonctionnement relativement passif, est dépendant des gradients de pression ventriculo-artérielle et des flux sanguins, il apparaît que la valve mitrale a une physiologie propre, une ouverture et une fermeture comportant des mouvements actifs dans lesquels interviennent de façon coordonnée et synchrone les différents constituants de l'appareil valvulaire (annulus, voile, cordage et muscle papillaire) (Fig. 1). Au plan histologique, la valvule mitrale est un tissu constitué de quatre couches distinctes, qui sont, de la surface auriculaire à la région ventriculaire, l'auricularis, la spongiosa, la fibrosa et la ventricularis.

La fibrosa est la couche valvulaire maîtresse car elle assure, par son riche réseau en fibres denses de collagène, la rigidité du tissu valvulaire et lui permet de résister aux pressions élevées générées par le ventricule. Directement adjacente vers l'oreillette, la spongiosa est caractérisée par un tissu conjonctif moins dense et une richesse particulière en protéoglycans. La fonction de cette couche tissulaire est l'amortissement des chocs lors de la fermeture de la valve et l'atténuation des forces de friction entre auricularis et fibrosa. L'auricularis est, quant à elle, composée principalement de fibres élastiques, rendant compte de la déformation de la surface

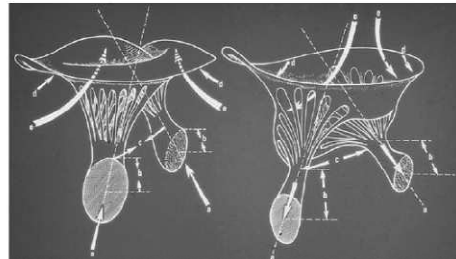


Figure 1. Fonctionnement intégré des différents éléments constituant l'appareil mitral en systole (gauche) et diastole (droite).

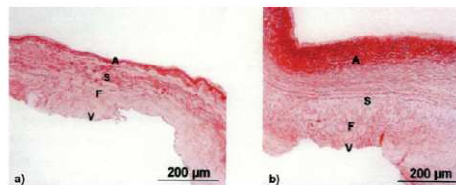


Figure 2. Valvule normale (a) et mixoïde (b). Le caractère dystrophique de la valvule mixoïde est traduit par l'excès de tissu et sa désorganisation.

auriculaire de la valve lors de la systole, tandis que la ventricularis se confond avec l'endocarde (Fig. 2).

La valvule mitrale est donc une structure lamellaire dont l'organisation tissulaire permet de faire face aux contraintes résultant des variations de volume, de pression et de forme au cours du cycle cardiaque. Plus qu'ailleurs, l'interaction entre les cellules interstitielles et la matrice extracellulaire doit y jouer un rôle important. Des modifications phénotypiques de la structure valvulaire ont déjà été documentées dans des conditions expérimentales de surcharge en pression ou en volume (12, 13).

LE PROLAPSUS VALVULAIRE MITRAL IDIOPATHIQUE ET LA DÉGÉNÉRESCENCE MYXOÏDE

Le prolapsus valvulaire mitral idiopathique est une cause fréquente d'insuffisance mitrale dans les contrées industrialisées. Sa prévalence est de 2 à 15% dans la population générale, ce qui en fait une des affections cardiologiques les plus fréquentes (14). Chez environ 15% des patients, il évoluera sur une période de 10 à 15 ans vers l'insuffisance mitrale (15). Le segment valvulaire malade présente habituellement un aspect myxoïde caractérisé par un épaississement du feuillet, un élargissement des espaces inter-cordages au niveau du bord libre et enfin, des cordages allongés et souvent rompus. La dilatation de la surface annulaire est particulièrement fréquente lorsqu'il existe une insuffisance mitrale associée. Ce prolapsus valvulaire avec ou sans insuffisance peut être idiopathique (dégénérescence fibro-élastique, maladie de Barlow) ou associé à une maladie génétique du tissu conjonctif (Marfan, Ehlers-Danlos, pseudo-xanthome elasticum etc...) (16).

Au plan clinique, on distingue l'insuffisance mitrale dégénérative idiopathique intéressant l'ensemble du tissu valvulaire avec ballonnisation et prolapsus des feuillets (maladie de Barlow) qui représente une entité clinique distincte, syndromique, et les autres formes (dégénérescence fibroélastique), en général limitées au segment médian de la valve postérieure. Il s'agit de deux entités distinctes sur le plan clinique et macroscopique. Elles sont situées, selon nous, aux extrêmes du spectre des valvulopathies dégénératives, puisqu'il n'existe que de très discrètes différences entre elles sur le plan de l'histologie qualitative (17).

En 1999, un premier locus génétique pour le prolapsus valvulaire mitral par dégénérescence myxoïde (maladie de Barlow) a été localisé sur

un intervalle de quelques centimorgans (chromosome 16p11.2-p12.1) (18). D'autres loci ont été identifiés sur les chromosomes 5, 11 et 13 (19). Les gènes responsables restent toujours, à ce jour, non identifiés. Différents éléments nous amènent à penser que le prolapsus idiopathique par dégénérescence myxoïde dans sa forme la plus fréquente pourrait être la traduction d'une altération au niveau du tissu conjonctif. Il surviendrait chez les sujets qui, comme nous l'observons fréquemment, ne présentent aucun stigmate de déficience du tissu conjonctif ailleurs dans l'organisme. L'atteinte isolée de la valvule mitrale pourrait être la conséquence de régulations intra-tissulaires spécifiques ou de la révélation de cette «faiblesse» du tissu conjonctif au niveau d'une structure soumise, quel que soit le style de vie des patients, aux sollicitations mécaniques imposées par le fonctionnement cardiaque. Le cœur tiendrait donc le rôle de banc d'épreuve permettant, par les contraintes que son fonctionnement impose aux tissus, de manifester certaines déficiences.

C'est sur base de cette hypothèse que s'articule notre recherche plus fondamentale. Nous avons d'abord étudié l'anatomie et l'histologie de la valvule mitrale normale puis pathologique. Ensuite, nous avons réalisé un bilan phénotypique au niveau du tissu conjonctif de la dégénérescence myxoïde (fragment de la valve postérieure prélevé lors de valvuloplastie) par rapport à des segments de valves témoins normales. Actuellement, nous avons identifié les cellules interstitielles (fibroblastes, myofibroblastes) peuplant le tissu de soutien de la valve mitrale et avons développé une technique pour les isoler et les cultiver *in vitro*. Cette approche va nous permettre de caractériser leur profil biosynthétique après plusieurs passages en culture en faisant la part de ce qui dépend d'une expression génétique intrinsèque ou de ce qui est régulé par les interactions cellules-matrice au sein du tissu. Ensuite, disposant de cellules interstitielles de valves normales et myxoïdes, nous pouvons de façon expérimentale par l'utilisation d'un système de contrainte *in vitro* (FlexerCell) étudier les modifications biosynthétiques en fonction de sollicitations mécaniques imposées à ces cellules. Enfin, le développement et l'expansion de cellules interstitielles *in vitro* nous permettront, le moment venu, d'utiliser ce matériel pour constituer une valve biologique autologue ou homologue *via* l'ensemencement d'une matrice artificielle et le développement d'un néo-tissu valvulaire en bioréacteur.

TABLEAU I. MESURE PAR RT-PCR DU NIVEAU D'EXPRESSION D'UNE SÉLECTION D'ARN MESSAGERS CORRESPONDANT AUX GÈNES CODANT POUR LES FIBRES ET LES ENZYMES CATABOLIQUES POUR LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE DANS LE TISSU VALVULAIRE NORMAL ET MYXOÏDE

	Nombre de Cycles	Valvules normales n=4	Valvules myxoïdes n=4	t-test
aI I	23	100+-29	88+-20	NS
aIII	23	100+-43	107+-23	NS
élastine	35	100+-60	99+-28	NS
fibrilline 1	26	100+-58	118+-30	NS
fibrilline 2	34	100+-81	194+-88	0,8
décorine	23	100+-70	211+-48	<0,02
MMP2	26	100+-25	97+-21	NS
MMP14	28	100+-42	115+-33	NS

ANALYSE MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE DES VALVES MYXOÏDES ET NORMALES

La caractéristique anatomo-pathologique principale de la valve myxoïde réside dans une désorganisation du tissu valvulaire au niveau de ses quatre couches qui restent toutefois reconnaissables. Le feuillet valvulaire est redondant et trois à quatre fois plus épais que la valve normale (Fig. 1). Au niveau microscopique, on note une infiltration de la spongiosa par un matériel amorphe riche en protéoglycans (myxoïde). Celui-ci infiltre focalement la fibrosa et l'auricularis. Cette infiltration myxoïde se prolonge dans les cordages tendineux au niveau de la zone rugueuse. Cette observation peut rendre compte de la fragilité anormale des cordages tels que rencontrés dans les dégénérescences myxoïdes. Au niveau de l'auricularis, on note un accroissement de la densité des fibres élastiques et une fibrose significative. La densité cellulaire de la spongiosa est trois fois et demi supérieure dans le tissu myxoïde par rapport au tissu normal (20).

PHÉNOTYPE CELLULAIRE ET BILAN BIOCHIMIQUE AU NIVEAU DU TISSU CONJONCTIF DE L'INSUFFISANCE MITRALE MYXOÏDE

Les variations de composition des différents constituants de la matrice extracellulaire (protéines fibrillaires, métalloprotéases et protéoglycans) ont été analysées au niveau de leur ARN messager (ARNm) à partir de bandes de tissu mitral (depuis l'anneau vers le bord libre) afin d'obtenir un échantillon représentatif du tissu dans son entièreté. Une technique de RT-PCR a été appliquée sur les ARN tissulaires extraits. L'intensité des signaux des produits d'amplification des ARNm sélectionnés est normalisée par rapport à un standard interne et exprimée en uni-

tés arbitraires par unité d'ARN 28S ribosomal, représentatif de l'ARN total de la prise d'essai.

Nous avons mesuré l'expression de différents gènes candidats potentiellement impliqués dans la dégénérescence myxoïde sur base des affections génétiques connues ou des observations morphologiques. Parmi ceux-ci, les collagènes de types I et III, l'élastine, la fibrilline 1 et 2, la décorine et les métalloprotéases (MMP2 et MT1 MMP) ont été étudiés. Nos résultats sont rapportés dans le tableau I : on remarquera que le collagène I et III, ainsi que la décorine, qui requièrent le moins de cycles d'amplification sont les ARNm les plus abondants, tandis que les ARNm de l'élastine et de la fibrilline 2 sont nettement moins exprimés. Le niveau de l'expression des ARNm par unité de 28S rARN pour les collagènes I et III est très similaire entre le tissu normal et myxoïde. On sait que le stress mécanique accroît la synthèse du collagène dans les insuffisances mitrales expérimentales et semble être la réponse habituelle du tissu conjonctif soumis à une tension accrue (10). Le dépôt de collagène dépend d'un équilibre dynamique entre synthèse et dégradation, mais la structure finale du tissu dépend de l'assemblage des molécules en fibres de collagènes. Cet assemblage peut être modulé par différents facteurs parmi lesquels les collagènes mineurs, des enzymes cataboliques et les protéoglycans (21). Nous n'avons pas observé de modification significative des métalloprotéases matricielles, la MMP2 et de son activateur membranaire MT1 MMP. Aucune élévation significative des ARNm pour la MMP3 n'a été notée, alors que cette enzyme, comme les précédentes, est connue pour être régulée par les contraintes et relaxations mécaniques (22). Un accroissement de leur synthèse a été rapporté en cas d'endocardite, situation pathologique très différente de la dégénérescence myxoïde. Il est néanmoins plausible que les métalloprotéases matricielles soient impliquées dans le remode-

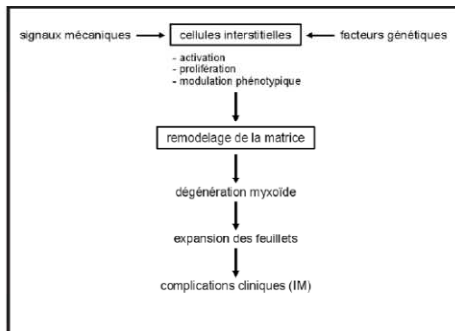


Figure 3. Schéma physiopathologique

lage de la matrice extracellulaire dans la dégénérescence myxoïde (23).

Le tissu myxoïde est caractérisé par une organisation architecturale anormale des faisceaux de collagène qui sont dispersés, irrégulièrement organisés et focalement associés en structure spiralee. Ces polymères anormaux conservent toutefois leur périodicité axiale, mais occupent un volume considérablement plus important que la normale. L'organisation architecturale des polymères dépend des fonctions des cellules qui en assurent la synthèse et des contraintes mécaniques auxquelles elles sont soumises. Une telle organisation anormale est également rencontrée dans certaines maladies du tissu conjonctif comme le Marfan et l'Ehlers-Danlos de type IV, où un déficit respectif en fibrilline 1 et en collagène de type III expliquent la fragilité valvulaire. Nous savons que dans certains cas, l'analyse de familles atteintes de prolapsus valvulaire mitral suggère une hérédité dominante (18). Les données de la littérature suggèrent qu'elle n'est en relation avec aucun gène du collagène, mais pourrait peut-être être en relation avec une anomalie des enzymes intervenant dans le processus complexe post-traductionnel du collagène. Cependant, toutes les déficiences enzymatiques de ce type sont récessives et, dès lors, incompatibles avec l'hérédité dominante rencontrée en clinique.

Notre observation d'un accroissement de l'ARNm pour la décorine suggère que ce petit protéoglycan riche en leucine pourrait être incriminé dans la fibrillogenèse anormale du collagène (24). Même si l'acide hyaluronique représente le glycosaminoglycan principal retrouvé au niveau de la spongiosa des valves myxoïdes, l'augmentation de production de décorine pourrait affecter la fibrillogenèse des collagènes de type I et

III, et des fibres élastiques. Nos résultats ne permettent toutefois pas de savoir s'il s'agit d'un facteur princeps dans le déclenchement de la dégénérescence myxoïde ou d'une conséquence secondaire de ce processus par l'intermédiaire des sollicitations mécaniques.

PROPOSITION D'UN SCHEMA PHYSIOPATHOLOGIQUE DE L'INSUFFISANCE MITRALE PAR DÉGÉNÉRESCENCE MYXOÏDE

Sur base de nos travaux et de la littérature, nous postulons que la dégénérescence myxoïde représente le «chemin final commun» d'une valve ou d'un segment de valve soumis à des contraintes mécaniques anormales. Celles-ci pourraient résulter d'un stress intrinsèquement anormal (surcharge en pression), d'une anomalie de composition des fibres de la matrice, d'un déficit de transmission des signaux mécaniques entre cellules interstitielles et matrice extracellulaire, ou enfin, d'une anomalie morphologique (anatomique) du support de la valve rendant compte d'un stress mécanique pathologique des feuillets. Dans la majorité des cas, le facteur causal n'est pas encore déterminé même si différentes observations que nous avons rappelées suggèrent une prédisposition génétique discrète qui rendrait la valve et ses cellules moins capables de réagir à des sollicitations mécaniques normales. Dans cette hypothèse, la dégénérescence myxoïde apparaîtrait principalement au niveau du segment médian de la valve postérieure qui est soumis aux contraintes mécaniques les plus importantes. C'est effectivement à ce niveau que l'on observe le plus souvent les processus de dégénérescence myxoïde et les dysfonctions valvulaires les plus significatives.

La réponse à un stress mécanique ou une perception anormale de ce stress au niveau des cellules interstitielles aboutirait au remaniement du tissu conjonctif valvulaire. Cette réaction s'apparenterait à l'observation faite sur les cartilages où un accroissement local de la pression induit une production de protéoglycans (25). Mutatis mutandis, l'augmentation des protéoglycans et glycosaminoglycans au niveau de la spongiosa pourrait être une façon de protéger les cellules de la valve des effets mécaniques des forces de compression. La littérature récente s'intéresse de très près à ce parallèle (26) et au fait que, comme les cartilages, le tissu valvulaire n'est pas vascularisé dans les conditions physiologiques. La présence de protéoglycans et certaines glycoprotéines de nature semblable à celles des cartilages pourrait en être la raison. Nous pensons que cette adaptation qui pourrait être transi-

toirement favorable porte en elle l'amorce de la déstructuration du tissu, peut-être par l'expression anormale de protéoglycans, parmi lesquels la décorine et d'autres que nous recherchons actuellement. Ceci entraînerait une fibrillogénèse anormale des fibres de collagène et élastiques qui, en fragilisant davantage le tissu, aboutirait à l'entretien d'un cercle vicieux. Dans ce scénario, les contraintes mécaniques exercées sur le tissu augmentent irrémédiablement avec l'apparition progressive, par l'élongation et la rupture de cordages, à une insuffisance mitrale qui ne fait qu'emballer le processus morbide (Fig. 3).

BIBLIOGRAPHIE

- Zak R.— Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Cir Res*, 1974, **35**, 17-26.
- Nag AC.— Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart : a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*, 1980, **28**, 41-61.
- Eghabali M, Tomek R, Woods C, et al.— Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype : specific effect of transforming growth factor β . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**, 795-799.
- Caulfield JB, Borg TK.— The collagen network of the heart. *Lab Invest*, 1979, **40**, 364-372.
- Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, et al.— Remodeling and repair of the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol*, 1992, **20**, 3-16.
- Pfeffer MA, Braunwald E.— Ventricular remodeling after myocardial infarction : experimental observations and clinical implications. *Circulation*, 1990, **81**, 1161-1172.
- Jugdutt BI.— Prevention of ventricular remodeling post myocardial infarction : timing and duration of therapy. *Can J Cardiol*, 1993, **9**, 103-114.
- Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, et al.— Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res*, 1990, **67**, 23-34.
- Chiquet-Ehrismann R, Tannheimer M, Koch M, et al.— Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J Cell Biol*, 1994, **127**, 2093-2101.
- Lambert CA, Soudant EP, Nusgens BV, Lapiere CM.— Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. *Lab Invest*, 1992, **4**, 444-451.
- Bishop JE, Lindahl G.— Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res*, 1999, **42**, 27-44.
- Willems JE, Havenith MG, Smits JF, Daemen MJ.— Structural alterations in heart valves during left ventricular pressure overload in the rat. *Lab Invest*, 1994, **71**, 127-133.
- Quick DW, Kunzelman KS, Kneebone JM, Cochran RP.— Collagen synthesis is upregulated in mitral valves subjected to altered stress. *ASAO J*, 1997, **43**, 181-186.
- Levy D, Savage D.— Prevalence and clinical features of mitral valve prolapse. *Am Heart J*, 1987, **113**, 1281-1290.
- Levine RA, Stathogiannis E, Newell JB, et al.— Reconsideration of echocardiographic standards for mitral valve prolapse : lack of association between displacement isolated to the apical four chamber view and independent echocardiographic evidence of abnormality. *J Am Coll Cardiol*, 1988, **11**, 1010-1019.
- Jaffe AS, Geltman EM, Rodey GE, Uitto J.— Mitral valve prolapse : a consistent manifestation of type IV Ehlers-Danlos syndrome. The pathogenic role of the abnormal production of type III collagen. *Circulation*, 1981, **64**, 121-125.
- Fomes P, Heudes D, Fuzellier JF, et al.— Correlation between clinical and histological patterns of degenerative mitral valve insufficiency : a histomorphometric study of 130 excised segments. *J Cardiovasc Pathol*, 1999, **8**, 81-92.
- Disse S, Abergel E, Berrebi A, et al.— Mapping of a first locus for autosomal dominant myxomatous mitral valve prolapse to chromosome. 16p11.2-p12.1. *Am J Hum Genet*, 1999, **65**, 1242-1251.
- Nesta F, Leyne M, Yosefy C, et al.— New locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 13 : clinical insights from genetic studies. *Circulation*, 2005, **112**, 2022-2030.
- Radermecker MA, Colige A, Lambert CA, et al.— Increased mRNA expression of decorin in the prolapsing posterior leaflet of the mitral valve. *Int Cardiovasc Thorac Surg*, 2003, **2**, 389-394.
- Chandrasekhar S, Kleinman HK, Hassel JR, et al.— Regulation of type I collagen fibril assembly by link protein and proteoglycans. *Coll Relat Res*, 1984, **4**, 323-337.
- Lambert CA, Lapiere C, Nusgens BV.— An interleukin-1 loop is induced in human skin fibroblasts upon stress relaxation in a three-dimensional collagen gel but is not involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase 1. *J Biol Chem*, 1998, **273**, 23143-23149.
- Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, et al.— Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation*, 1998, **98**, 331-338.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, et al.— Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*, 1997, **136**, 729-743.
- De Croos JN, Dhaliwal SS, Grympas MD, et al.— Cyclic compressive mechanical stimulation induces sequential catabolic and anabolic gene changes in chondrocytes resulting in increased extracellular matrix accumulation. *Matrix Biol*, 2006, **25**, 323-331.
- Lincoln JN, Lange AW, Yutzey KE.— Hearts and bones. Shared regulatory mechanisms in heart valve, cartilage, tendon, and bone development. *Developmental Biology*, 2006, **294**, 292-302.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. M.A. Radermecker, Service de Chirurgie Cardiovasculaire et Thoracique, CHU Sart Tilman, Liège, Belgique.
email : mradermecker@chu.ulg.ac.be



BUTS ET PLAN DU TRAVAIL

Bien que la dégénérescence myxoïde reste la principale cause d'insuffisance mitrale et touche 2 à 3 % de la population, les avancées scientifiques dans ce domaine restaient limitées au moment où nous avons entamé nos travaux de recherche. Elles étaient essentiellement basées sur des observations histologiques révélant un remodelage matriciel des feuillets myxoïdes conduisant à leur épaissement et leur relâchement ainsi que sur des études biochimiques qui portaient sur un nombre réduit d'acteurs connus potentiellement impliqués dans ce remodelage, notamment les MMPs, les TIMPs et diverses macromolécules de la matrice extracellulaire. Plus récemment, le rôle prépondérant que joueraient les changements de phénotype et la plasticité des cellules valvulaires interstitielles ainsi que l'activation de voies de signalisation impliquées dans la valvulogénèse ont été mis en avant par plusieurs auteurs. Ces études *in vitro* s'adressaient cependant essentiellement à des VIC d'origine porcine, ovine ou canine provenant pour la plupart de valves aortiques tandis que les cellules de la valve mitrale restaient moins exploitées. L'élucidation de certaines pathologies génétiques humaines associées à une dégénérescence myxoïde de la valve mitrale et, plus récemment, la caractérisation de souris transgéniques ont apporté des informations pertinentes sur les voies de signalisation potentiellement impliquées. A ce jour, la forme idiopathique de la maladie chez l'Homme demeure cependant largement méconnue d'un point de vue étiologique et mécanistique et fait l'objet des travaux de recherche que nous avons poursuivis dans le cadre de ce mémoire de doctorat.

Notre stratégie a été, en premier lieu, d'élargir nos connaissances de cette pathologie en identifiant, grâce à une analyse transcriptomique globale par microarray, les gènes modulés dans les segments P2 de feuillets myxoïdes humains. Deux groupes de gènes sous-exprimés dans la pathologie nous ont paru pertinents : des enzymes de détoxification radicalaire, principalement les métallothionéines, et des agréganases de la famille des ADAMTS. Grâce au développement d'une banque de cellules interstitielles provenant de valves mitrales saines et myxoïdes, des études *in vitro* ont permis d'évaluer la contribution fonctionnelle de ces gènes à la pathologie, puis de

mettre en lumière le rôle potentiel du TGF- β 2 dans la dégénérescence myxoïde *in vivo*. Cette première partie de nos travaux a fait l'objet d'une publication dont les données sont rapportées sous la forme d'un bref résumé et détaillées dans la publication n°2 annexée au mémoire.

La deuxième partie de ce mémoire s'adresse aux mécanismes potentiels intervenant dans la répression de l'expression des métallothionéines dans les cellules de valves saines et myxoïdes *in vitro*. D'une part, une altération génétiquement déterminée des cellules myxoïdes a été recherchée et, d'autre part, les régulations opérées sur l'expression des métallothionéines par les forces de traction mécaniques, le TGF- β 2 lui-même et la voie PI3K/Akt, qui avait été mise en évidence dans le microarray, ont été investiguées.

Ces différentes données ont finalement été intégrées dans un article de revue discutant des nouvelles avancées dans les connaissances de l'insuffisance mitrale et qui constitue la publication n°3 annexée au mémoire. Une discussion générale de nos résultats située dans le contexte des données de la littérature ainsi que les perspectives de recherches et développements nouveaux clôturent ce mémoire.

RESULTATS : PARTIE I

Implication des métallothionéines 1/2 et du TGF- β 2 dans la dégénérescence myxoïde de la valve mitrale.

Introduction

L'étude histologique de la valve mitrale myxoïde montre, principalement au niveau de la spongiosa, un dépôt excessif de protéoglycans, dont le versican, ainsi qu'une fragmentation et une désorganisation des faisceaux de collagène et des fibres élastiques dans la fibrosa et l'atrialis. Outre ces altérations de structure de la matrice extracellulaire, des modulations du phénotype des cellules valvulaires interstitielles (VIC) ont été décrites. Une des hypothèses, répandue dans la littérature, suggère que le nombre accru de VIC activées, de type myofibroblastique, serait responsable du remodelage matriciel des valves myxoïdes. Bien qu'une implication du TGF- β soit suspectée sur la base des éléments détaillés dans notre introduction, aucune étude à l'heure actuelle n'a encore démontré une association formelle entre la signalisation de ce facteur de croissance et la forme idiopathique de la dégénérescence myxoïde mitrale.

Ce bref aperçu des connaissances actuelles démontre clairement que la compréhension des mécanismes participant à la pathologie mitrale et à sa progression demeure largement lacunaire. Le premier volet de notre étude a consisté à identifier des gènes modulés dans la dégénérescence myxoïde et à évaluer la pertinence de leur implication dans son développement.

Résumé des résultats

Une analyse transcriptomique a été réalisée par microarray sur le segment P2 de 3 valves saines et 3 valves myxoïdes. Cette analyse indicative nous a permis d'identifier une série de gènes dont l'expression était réduite dans la pathologie. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR individuellement sur 17 prélèvements de MMV et 14 prélèvements sains. Un premier groupe de gènes concerne des aggrecanases de la famille des ADAMTS (ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5 et ADAMTS-9)

impliquées dans la dégradation des protéoglycans. Un deuxième groupe comprend des gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydatif, notamment 6 gènes de la famille des métallothionéines (MT) appartenant aux sous-familles MT-1 et MT-2 (MT1/2). Ces résultats transcriptomiques ont été confirmés par western-blot sur les extraits tissulaires et par marquage immunohistochimique sur coupe (Figure 20).

Afin de mimer et de comprendre les mécanismes de la répression observée *in vivo*, des VIC provenant de tissus sains ont été transfectées avec un siARN réprimant l'expression des MT-1 et MT-2 (siMT1/2) (Figure 21A). Cette extinction n'induit aucune modification de la quantité de TGF- β 1 ou de TGF- β 3 (non montré). Par contre, il stimule la transcription et la sécrétion du TGF- β 2 dans le milieu de culture (Figure 21B). Au niveau tissulaire, le TGF- β 2 est également plus exprimé dans les segments myxoïdes où il est même parfois associé à la matrice extracellulaire comme le montrent des analyses immunohistologiques. Son abondance est, de façon intéressante, significativement corrélée à l'épaisseur des valves (Figure 21C).

Un remodelage matriciel et une activation myofibroblastique des VIC étant décrits dans la pathologie, le rôle potentiel du TGF- β 2 dans ces processus a été évalué en culture à l'aide de VIC issues de valves saines. L'addition de TGF- β 2 induit une phosphorylation de smad-2 et une expression accrue d' α -SMA. Cette activation conduit également à une réduction de l'expression de l'ADAMTS-1 et à une accumulation de versican dans le milieu de culture (Figure 22), données expérimentales en accord avec nos observations *in vivo* sur les valves myxoïdes.

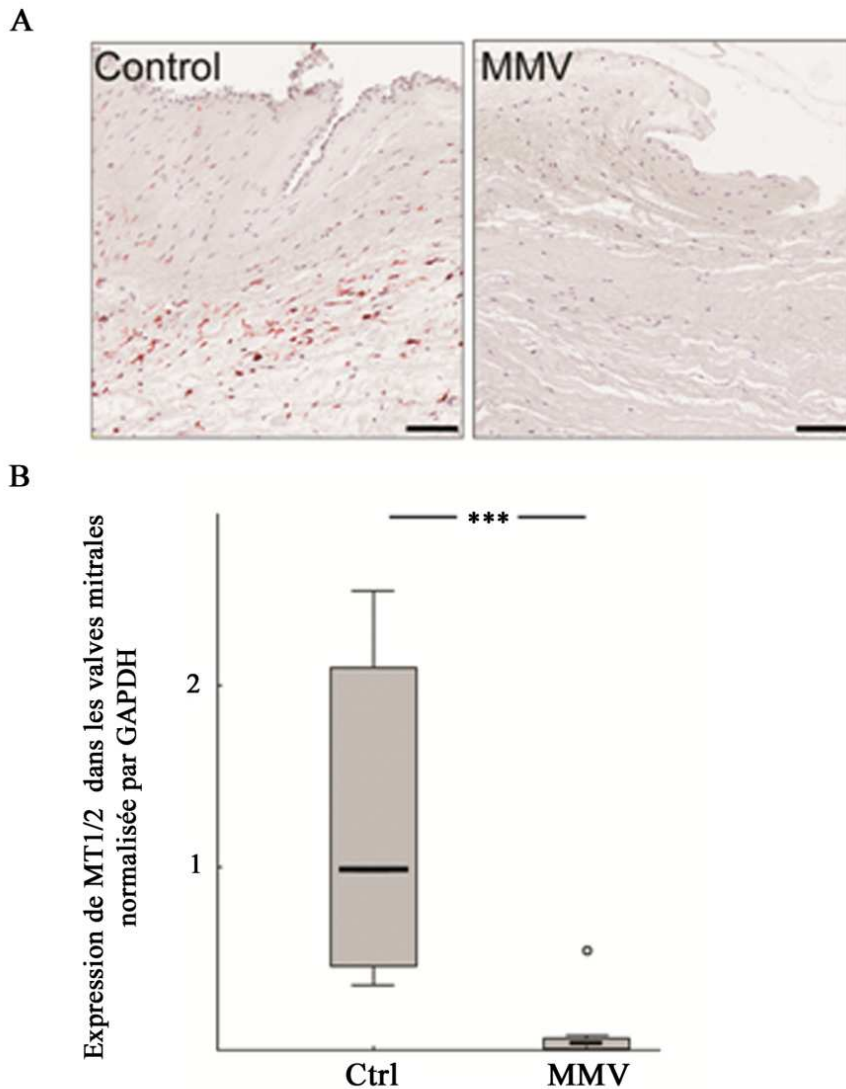


Figure 20: Les métallothionéines des sous-familles MT-1 et MT-2 (MT1/2) sont réduites dans les valves mitrales myxoïdes (MMV). A: Image représentative du marquage immunohistochimique des cellules exprimant les MT1/2 (marquage rouge) dans une coupe de valve saine (Control) et une coupe de valve myxoïde (MMV) (barre = 100µm) B: L'abondance relative des MT1/2 a été évaluée par quantification des signaux obtenus après une analyse par western blot sur des extraits protéiques de 5 valves saines (Ctrl) et 8 valves myxoïdes (MMV). Les signaux obtenus pour les MT1/2 sont normalisés par rapport à la GAPDH. Les résultats sont présentés sous forme de "boxplot" où la médiane est représentée par la barre horizontale. *** $p < 0.001$ déterminé par le U test de Mann-Whitney.

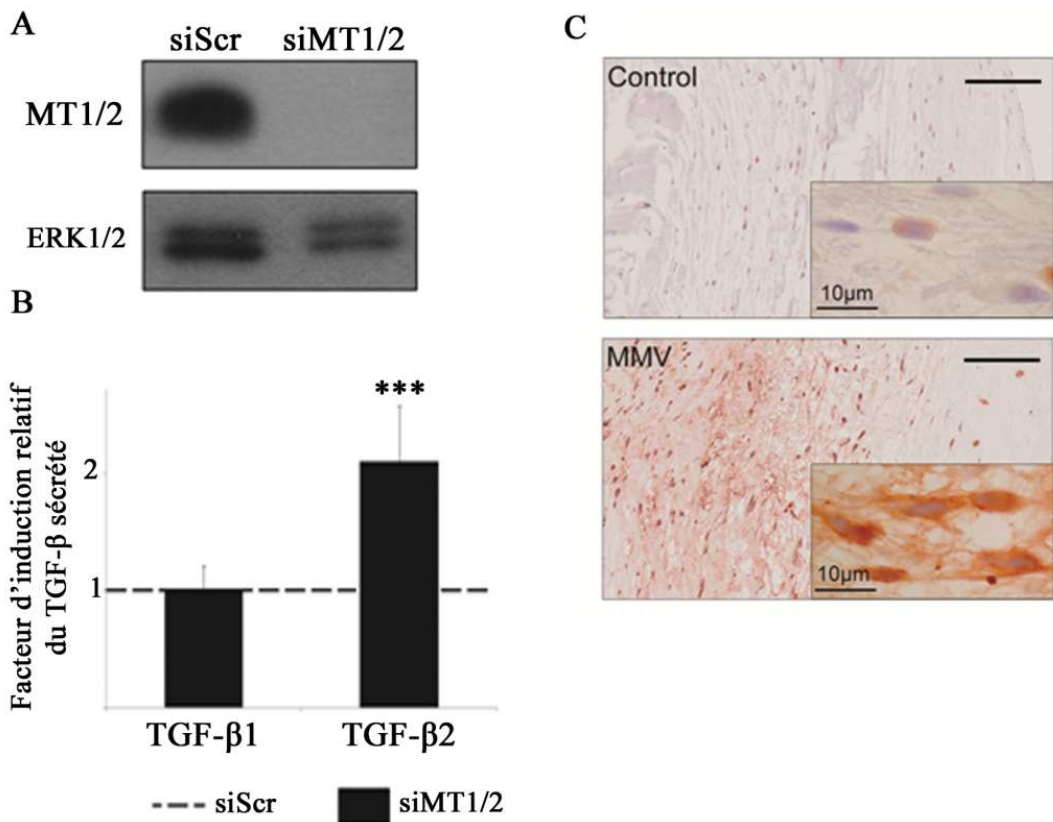


Figure 21: La suppression de l'expression des MT1/2 stimule la sécrétion du TGF-β2 par les cellules valvulaires interstitielles (VIC). Des VIC provenant de valves saines ont été transfectées avec 20nM d'un siARN ciblant la famille des MT-1 et MT-2 (siMT1/2) ou un siRNA non pertinent servant de contrôle (siScr). **A:** L'extinction des MT1/2 est effective après 72h de transfection comme illustré dans le western-blot en utilisant Erk1/2 comme contrôle de la quantité totale de protéines. **B:** Quantité de TGF-β1 et TGF-β2, mesurée par ELISA, libérée dans le milieu des cellules transfectées par le siMT1/2 par comparaison aux cellules transfectées par le siScr (ligne en pointillée). Les résultats représentent la moyenne du facteur d'induction ± écart-type par rapport à la condition contrôle pour des cellules provenant de 5 valves mitrales saines. *** $p < 0.001$ déterminé par un t-test de Student apparié. **C:** Image représentative du marquage immunohistochimique du TGF-β2 dans une coupe de valve saine (Control) et une coupe de valve myxoïde (MMV) (barre =100μm). Les encarts représentent un agrandissement d'une zone de la coupe où un dépôt de TGF-β2 extracellulaire est visible.

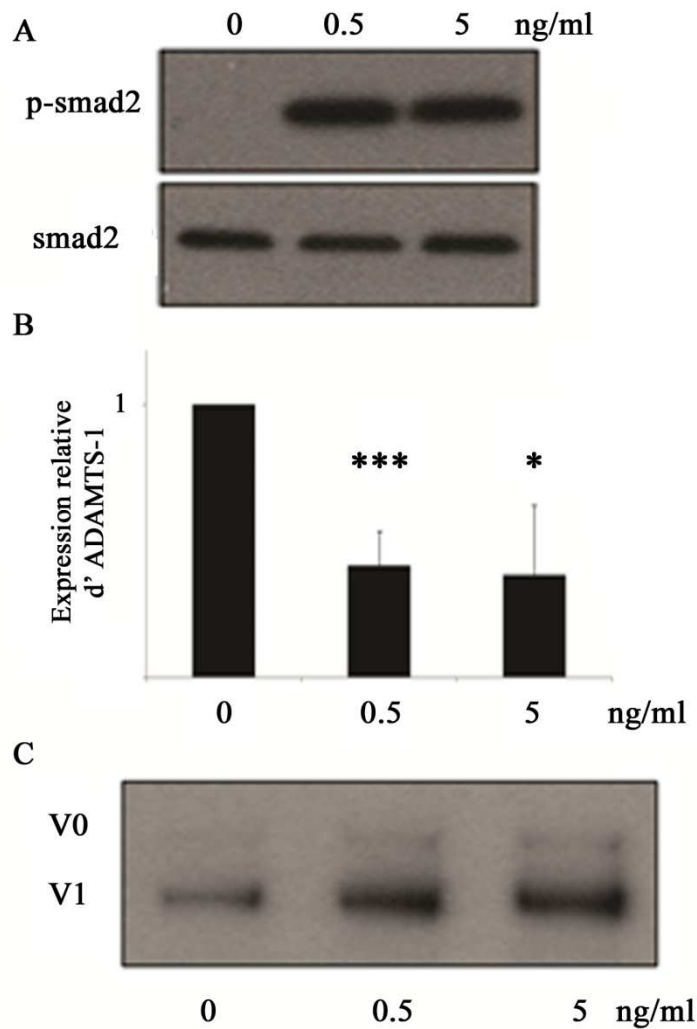


Figure 22 : Activation des cellules interstitielles (VIC) de valves saines par le TGF- β 2. **A:** Après 1h de stimulation, smad2 est phosphorylé dans les cellules traitées par le TGF- β 2. **B:** Après 48h de stimulation, l'expression d'ADAMTS-1 est significativement réduite par rapport à l'expression mesurée dans les cellules non traitées (0ng/ml). Les résultats représentent la moyenne du facteur d'induction \pm écart-type pour des VIC provenant de 5 valves mitrales saines. * $p < 0.05$ et *** $p < 0.001$ déterminé par un t-test de Student apparié. **C:** Western blot du versican (isoformes V0 et V1) présent dans le milieu des VIC traitées, pendant 48h par le TGF- β 2.

Publication 2 : Metallothionein-dependent up-regulation of TGF- β 2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve

Alexia Hulin, Christophe F. Deroanne, Charles A. Lambert, Bruno Dumont, Vincent Castronovo, Jean-Olivier Defraigne, Betty V. Nusgens, Marc A. Radermecker, and Alain Colige.

Cardiovasc. Res. 2012 Mar 1; 93(3).



Metallothionein-dependent up-regulation of TGF-β2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve

Alexia Hulin^{1*}, Christophe F. Deroanne¹, Charles A. Lambert¹, Bruno Dumont², Vincent Castronovo², Jean-Olivier Defraigne³, Betty V. Nusgens¹, Marc A. Radermecker^{4†}, and Alain C. Colige^{1†}

¹Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA-Cancer, University of Liège, Tour de Pathologie, B23/3, B-4000 Sart-Tilman, Belgium; ²Metastasis Research Laboratory, GIGA-Cancer, University of Liège, Sart-Tilman, Belgium; ³Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, CHU Sart-Tilman, University of Liège, Sart-Tilman, Belgium; and ⁴Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery and Human Anatomy, CHU Sart-Tilman, University of Liège, Sart-Tilman, Belgium

Received 14 September 2011; revised 7 December 2011; accepted 9 December 2011; online publish-ahead-of-print 16 December 2011

Time for primary review: 19 days

Aims	Although an excessive extracellular matrix remodelling has been well described in myxomatous mitral valve (MMV), the underlying pathogenic mechanisms remain largely unknown. Our goal was to identify dysregulated genes in human MMV and then to evaluate their functional role in the progression of the disease.
Methods and results	Dysregulated genes were investigated by transcriptomic, immunohistochemistry, and western blot analyses of the P2 segment collected from human idiopathic MMV during valvuloplasty (<i>n</i> = 23) and from healthy control valves (<i>n</i> = 17). The most striking results showed a decreased expression of two families of genes: the metallothioneins-1 and -2 (MT1/2) and members of the ADAMTS. The mechanistic consequences of the reduced level of MT1/2 were evaluated by silencing their expression in normal valvular interstitial cells (VICs) cultures. The knock-down of MT1/2 resulted in the up-regulation of transforming growth factor-beta 2 (TGF-β2). Most importantly, TGF-β2 was also found significantly increased in MMV tissues. The activation of VICs <i>in vitro</i> by TGF-β2 induced a down-regulation of ADAMTS-1 and an accumulation of versican as observed in human MMV.
Conclusion	Our studies demonstrate for the first time that MMV are characterized by reduced levels of MT1/2 accompanied by an up-regulation of TGF-β2. In turn, increased TGF-β2 signalling induces down-regulation of aggrecanases and up-regulation of versican, two co-operating processes that potentially participate in the development of the pathology.
Keywords	Myxomatous mitral valve • Metallothionein • TGF-β • ADAMTS • Valvular interstitial cells

1. Introduction

Myxomatous mitral valve (MMV) disease is the most frequent cause of non-ischaemic mitral regurgitation in the industrialized countries.¹ MMV can be sporadic or familial. Several studies have indeed shown that four loci on chromosomes 11, 13, 16, and X are associated with the disease but no specific gene has been clearly identified yet.² MMV is characterized by an increased amount of elastin and collagen in myxomatous mitral leaflets, which is further accompanied by an altered architectural organization of their fibres.³ Another cardinal

feature is an excessive deposition of proteoglycans such as decorin, biglycan, and versican.⁴ This extracellular matrix (ECM) remodelling progressively results in thickening of one or both leaflets, the posterior segment being the most frequently affected. This causes an abnormal displacement of mitral leaflet(s) into the left atrium during systole leading to an incomplete closure of the valve and ultimately to mitral regurgitation and cardiac insufficiency.⁵

Potential mechanisms have been identified to explain the excessive remodelling of the mitral valve tissue. Valvular interstitial cells (VICs) might be the key actors⁶ as they display features of activated myofibroblasts in MMV and seem to express increased levels of several

[†] Equally promoted the work.

* Corresponding author. Tel: +3243662469; fax: +3243662457; Email: ahulin@ulg.ac.be

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2011. For permissions please email journals.permissions@oup.com.

MMPs that are most probably responsible for the remodelling of collagen and elastic fibres.⁷ Alterations of TGF-β signalling could also be involved, since myxomatous degeneration of the mitral valve is observed in heritable connective tissue disorders such as Marfan syndrome,⁸ caused by mutations in fibrillin 1 gene,⁹ and Loeys–Dietz syndrome, due to inactivating mutations in TGF-βRI or II,¹⁰ two genetic defects characterized by an excessive TGF-β signalling.^{10,11} However, no study has shown so far an association between TGF-β dysregulation and idiopathic MMV in humans.

As the pathogenic mechanisms causing, or participating in, the degeneration of mitral valve are still to be clarified, the first goal of our study was to identify genes modulated in MMV compared with normal valves by a global transcriptomic analysis. The reduced expression of a series of genes [such as superoxide dismutase 2, glutaredoxin, and the metallothioneins family (MTs)] involved in the response to oxidative stress suggested that the protection against reactive oxygen species could be weakened in human MMV, as shown in some studies.¹² Furthermore, a recent study¹³ showed a low expression of MTs in the ascending aortic aneurysm of bicuspid valve patients thought to be associated with the remodelling of ECM. As several members of the MT1 and MT2 families were down-regulated in our transcriptomic analysis, we considered this first group in priority. A second group of down-regulated genes concerned members of the ADAMTS family involved in the degradation of proteoglycans known to accumulate in MMV. The *in vitro* and *in vivo* studies reported here demonstrate a key relationship between MTs and ADAMTS through TGF-β2 signalling and identify mechanisms potentially participating in the progression of MMV.

2. Methods

Detailed procedures and protocols are provided in the Supplementary material online.

2.1 Tissue collection

P2 segments of posterior leaflets of MMV were obtained during elective surgery from valvuloplasty to correct severe mitral regurgitation from 23 patients. Normal P2 segments were collected from hearts of donors rejected for transplantation (*n* = 17). Strips of tissue, from the free edge to the annulus, were used for isolation and cultures of VICs, immunohistochemistry, transcriptomic, and proteomic analyses. The thickness of leaflets was measured on haematoxylin–eosin sections in successive fields from the annulus to the free edge. Demographics of the patients are detailed in Table 1. The study conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Liège University Hospital (B70720071262), and a written consent was obtained from the informed patients.

2.2 Valvular interstitial cells (VICs) cultures

VIC cultures were established by outgrowth from explants of human normal (*n* = 7) and myxomatous (*n* = 4) mitral valves maintained in EBM medium-10% FBS (Lonza). Cells were used at passage 4–7.

2.3 Immunocytochemistry

Characterization of VICs was achieved by immunostaining of CD31 (1/200, Dako), smooth muscle α-actin (α-SMA, 1/300, Sigma) and vimentin (1/400, Dako) on fixed subconfluent VIC cultures. Labelled

Table 1 Demographics of mitral valve tissues collected from transplant donors (control) and patients with myxomatous mitral valve (MMV) used in the different analytical procedures

Type of analysis	n	Age ± SD (years)	Gender M/F
Total			
Control	17	54 ± 12	12/5
MMV	23	62 ± 12	19/4
Transcriptomic			
Control	11	54 ± 8	6/5
MMV	13	64 ± 12	11/2
Proteomic			
Control	5	60 ± 7	2/3
MMV	8	61 ± 13	7/1
Immunohistochemistry			
Control	16	53 ± 12	12/4
MMV	18	60 ± 12	15/3
Cell culture			
Control	7	52 ± 14	3/4
MMV	4	63 ± 14	4/0

and non-labeled cells were counted in six fields at a ×16 magnification using a Zeiss Axiovert25 inverted fluorescent microscope. No CD31-positive cell was detected. All VICs expressed vimentin, whereas 13 ± 6% were positive for α-SMA.

2.4 RNA extraction

Total RNA was extracted from aliquots of frozen powdered valvular tissues using the RiboPure kit (Ambion) and from VIC cultures using the High Pure RNA isolation kit (Roche Molecular Biochemical).

2.5 Microarray analysis

Transcriptomic analysis was performed by using the Affymetrix HG-U133A 2.0 chip on total RNA from MMV and control samples. Probe synthesis, hybridization, washing protocols, and signals scanning were performed at the Genomics Facility of the GIGA-Research Center, University of Liège with the GeneChip Operating Software.

2.6 RT–PCR analysis

RT–PCR analysis was performed as previously described¹⁴ using the set of primers and the conditions described in the Supplementary material online, Table S1.

2.7 Proteins extraction and western blotting

For MTs analyses, proteins were extracted from valvular tissues or VIC cultures using a specially designed procedure followed by stabilization with bromobimane (Sigma)¹⁵ as detailed in the Supplementary material online. For the other proteins, VICs were lysed in SDS–PAGE buffer, electrophoresed, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The electrotransfer of MTs used a protocol adapted from Mizzen.¹⁶ Membranes were blocked and probed with antibodies against MTs (1/200, Dako), GAPDH (1/5000, Dako), Erk1/2 (15000,

Sigma), α -SMA (1/5000, Sigma), Smad2, and phospho-Smad2 (1/500, Cell Signaling).

2.8 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed in valvular tissue sections using a primary monoclonal antibody recognizing the members of the MT1 and MT2 subfamilies (1/100, Dako), a primary monoclonal anti-versican (1/1000, Developmental Studies Hybridoma Bank) and a primary monoclonal anti-TGF- β 2 (1/100, Abcam). The number of MT-positive cells was counted by two blinded observers in five microscopic fields at a $\times 40$ magnification. TGF- β 2 staining intensity in cells and in the ECM was scored by four blinded observers on a scale from 0 (no detectable labelling) to 4 (strong labelling). A mean score value was established for each tissue section and expressed in arbitrary units (a.u.). The standard deviation between scoring for the same slide by the four blinded observers was <0.6 . Versican staining was quantified by image analysis using the software OlyVIA (Olympus) and Quantity One 4.6 (BioRad) and expressed in intensity/mm².

2.9 siRNA transfection

siRNA (S, 5'-GAGUGCAAUUGCACCUCUCCU-3' and AS, 5'-AGGAGGUGCAUUUGCACUC-3') targeting common sequences of the MT1 and MT2 subfamilies members was transfected according to a previously described procedure, using an irrelevant siRNA as control.¹⁷ Briefly, calcium-phosphate-mediated transfection was performed overnight on subconfluent VICs, from five normal mitral valves, at a final concentration of 20 nmol/L siRNA. VICs were washed twice with PBS and once with EBM with 0.2% BSA (Sigma). This last step was defined as time 0 post-transfection. Cells were lysed for western blot and RT-PCR analysis 72 h post-transfection to evaluate the silencing efficiency.

2.10 ELISA

TGF- β 1 and TGF- β 2 concentrations were measured in the conditioned medium of 72 h transfected VICs (DuoSet ELISA kit, R&D systems) after activation of the latent forms by HCl.

2.11 TGF- β 2 treatment of VICs

After stimulation with increasing concentration (0–5 ng/mL) of human recombinant TGF- β 2 (T2812, Sigma), VICs isolated from five normal mitral valves were lysed for western blot or RT-PCR analyses after 1 or 48 h.

2.12 Cadmium treatment of VICs

Subconfluent cultures from four normal mitral valves and four MMV were supplemented with increasing concentration of CdCl₂ from 0 to 5 μ mol/L for 12 and 24 h. Cells were lysed for RT-PCR analysis.

2.13 Versican analyses

Conditioned mediums of VICs treated with increasing concentration of human recombinant TGF- β 2 were digested at 37°C with chondroitinase ABC (0.2 U/100 μ g protein, Sigma) as described by Kischel et al.¹⁸ and analysed by western blotting using monoclonal antibody against versican (1/300, Developmental Studies Hybridoma Bank).

2.14 Statistical analyses

As the investigated variables measured in the *in vivo* analyses did not follow a Gaussian distribution, the significance of differences between the two groups was tested by using the Mann-Whitney U

test for unpaired samples. The data are represented by box plots showing the median of the results. Upper and lower limits of boxes represent inter-quartiles (25 and 75th), whereas upper and lower bars show highest and smallest non-outlier data. The statistical analysis for *in vitro* experiments was performed by using a paired t-test of Student. Results were reported as mean \pm SD of the indicated number of independent experiments using VICs from at least four normal and four MMV.

The correlation between age and *in vivo* data as well as between TGF- β 2 staining scoring and valve thickness was established by using Spearman rank correlation. The proportion of female patients was not significantly different between the two groups as determined with Fisher's exact test.

3. Results

3.1 Demographics of mitral valve tissues

The median segment P2 of the posterior leaflet was collected in 23 patients undergoing valvuloplasty to correct severe mitral regurgitation resulting from primary myxomatous degeneration. A similar segment was obtained from the heart of 17 donors unsuitable for transplantation and with no history of cardiovascular pathologies. The myxomatous leaflets were significantly thicker than normal leaflets (1.8 ± 0.4 vs. 1.0 ± 0.5 mm, respectively; $P < 0.0001$). The controls were significantly younger than the MMV patients as typical of the transplant donors. The proportion of female patients was slightly higher in the control group but not significantly different between the two groups (Table 1). In our study, however, none of the investigated parameters was found to be significantly correlated with age or gender (data not shown).

3.2 Transcriptomic analysis

A microarray analysis of RNA extracted from three MMV and three control samples was performed to identify potentially dysregulated genes in myxomatous segments. The expression of 414 genes was altered by, at least, a factor of 2: 158 genes being up-regulated and 256 genes down-regulated. Strikingly, several genes involved in the protection against oxidative stress, among which genes of the MT family, were down-regulated (Table 2). Because of the excessive accumulation of proteoglycans consistently observed in MMV, we also noticed the down-regulated expression of aggrecanases of the ADAMTS family having probe set on the chip.

These potentially dysregulated expressions in MMV were evaluated for confirmation by RT-PCR performed on a larger number of MMV ($n = 13$) and control ($n = 11$) RNA samples. Among the investigated MT isoforms, only the MT2A, MT1E, and MT1X were expressed. As shown in Figure 1A, their expression was significantly reduced in the MMV tissues when compared with that in healthy valves, validating the microarray results. The same approach was used for measuring the expression of aggrecanases (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, and -15). A significantly reduced expression was observed for ADAMTS-1, -4, -5, and -9 in the MMV samples when compared with controls (Figure 1B), the ADAMTS-8 and -15 being not expressed in any sample.

Table 2 Selected results of microarray analysis of myxomatous mitral valve (MMV) and control mitral valve

Gene	Fold change (MMV vs. control)
Oxidative stress response genes	
MT2A Metallothionein 2A	-3.2
MT1E Metallothionein 1E	-3.2
MT1X Metallothionein 1X	-4.6
MT1G Metallothionein 1G	-4.6
MT1F Metallothionein 1F	-5.7
MT1M Metallothionein 1M	-6.5
GLRX Glutaredoxin	-2.3
SOD2 Superoxide dismutase 2	-4.9
Aggrecanases	
ADTS9 ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 9	-2
ADTS1 ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	-2.5
ADTS5 ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 5	-3.2

ADTS4, probe set not present in the microarray.

3.3 Metallothioneins expression in valvular tissue and VICs culture

MT proteins were also measured in tissue samples by western blotting (Figure 2A) using an antibody specific for a conserved epitope shared by human MT isoforms 1 and 2 (MT1/2). The mean value for MT content normalized to that of GAPDH was significantly reduced in MMV tissues when compared with controls (Figure 2B). By immunohistological staining of normal mitral valves using the same antibody, cells expressing MT 1/2 were mainly localized in the spongiosa as observed in the representative picture of Figure 2C (left panel). The staining was almost absent in MMV (Figure 2C, right panel). Quantification of positive cells in 18 MMV samples and 16 control valves (Figure 2D) showed their nearly complete absence in most of the MMV, in agreement with the western blot results.

The basal expression level of MT1/2 did not significantly differ between the VICs isolated from four MMV and four healthy valves (not shown). Exposure to 5 μmol/L CdCl₂ resulted in a strong induction of the three investigated MT isoforms, similar to that in control and MMV cells as shown in the Supplementary material online, Figure S1, indicating that the metal-responsive pathway was not altered in MMV interstitial cells.

3.4 Silencing of MT 1/2 up-regulates the expression and secretion of TGF-β2 by VICs

The functional consequences of MT down-regulation was evaluated in cell culture using VICs from healthy donors (n = 5) transfected with MT1/2-specific siRNA and an irrelevant siRNA as control. The effective and specific silencing of MT1/2 72 h post-transfection was demonstrated by western blotting (Figure 3A). In parallel, RT-PCR was also performed to assess the repression of individual MT1/2 isoforms. As

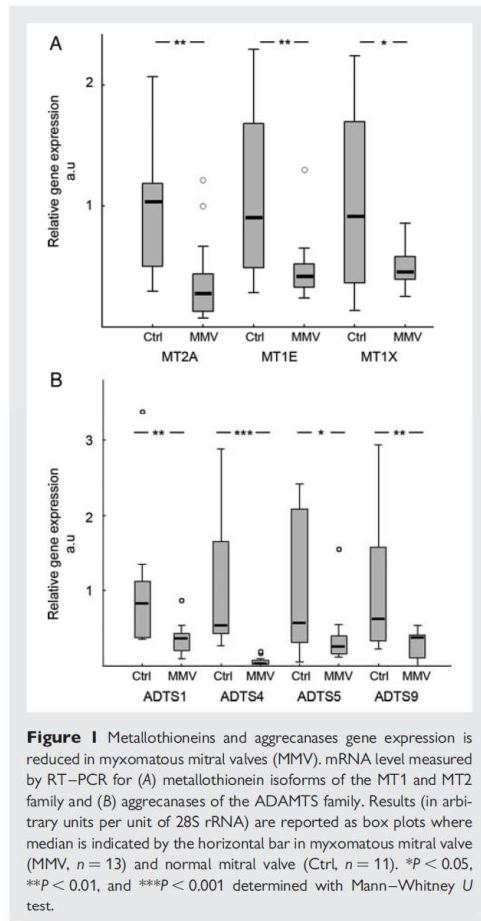
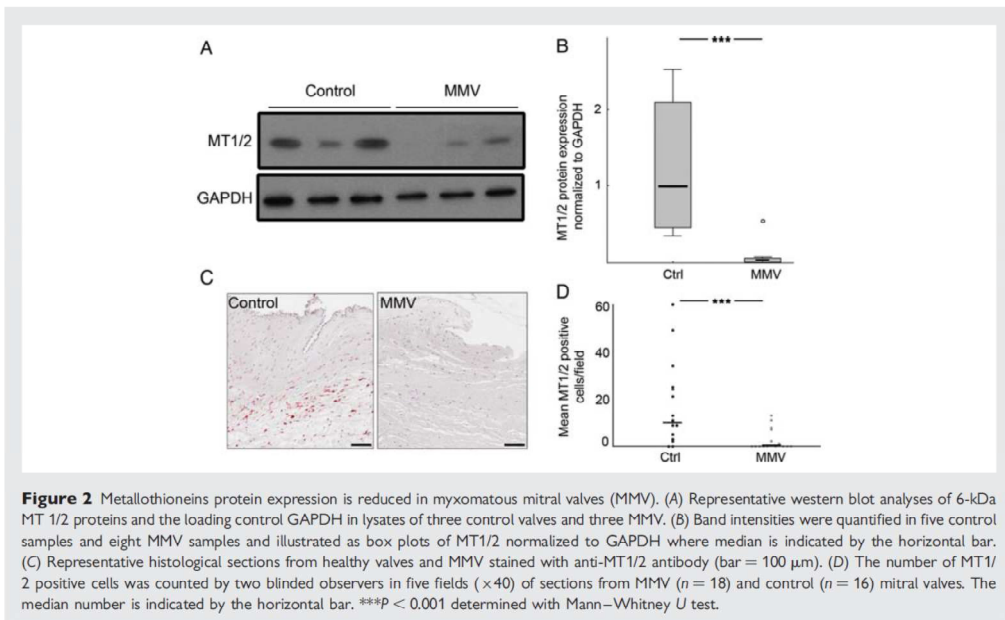


Figure 1 Metallothioneins and aggrecanases gene expression is reduced in myxomatous mitral valves (MMV). mRNA level measured by RT-PCR for (A) metallothionein isoforms of the MT1 and MT2 family and (B) aggrecanases of the ADAMTS family. Results (in arbitrary units per unit of 28S rRNA) are reported as box plots where median is indicated by the horizontal bar in myxomatous mitral valve (MMV, n = 13) and normal mitral valve (Ctrl, n = 11). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 determined with Mann-Whitney U test.

shown in Figure 3B, the mRNA level of the three isoforms that we found down-regulated in MMV (MT2A, MT1E, and MT1X) was reduced in the siMT transfected cells.

Based on the occurrence of MMV in genetic disorders associated with excessive TGF-β signalling, the levels of TGF-β1 and TGF-β2 were measured in the 72 h-conditioned medium of transfected cells. MT1/2 silencing did not modify the amount of TGF-β1 released in the medium (50 ± 14 pg/mL) but induced a significant increase in TGF-β2 production (92–263 pg/mL) when compared with the control cells (44–154 pg/mL) (Figure 3D). This siMT-induced up-regulation of TGF-β2 occurred at a pre-translational step, since TGF-β2 mRNA was significantly increased in the MT1/2 silenced VICs while TGF-β1 (Figure 3C) and TGF-β3 (not shown) mRNA level were not modified. Whether this increase depends on a transcriptional activation or a stabilization of the mRNA needs further investigation.



3.5 TGF- β 2 expression is increased in MMV tissue

TGF- β 1 and TGF- β 2 expression was then measured by RT–PCR in individual MMV ($n = 11$) and normal mitral valves ($n = 7$). As illustrated in Figure 4A, TGF- β 2 expression was significantly increased in MMV samples when compared with healthy valvular tissue, whereas TGF- β 1 expression was similar in both groups. An immunohistological staining of TGF- β 2 in 18 MMV and 13 control valves, as illustrated by representative samples (Figure 4B), followed by individual scoring (Figure 4C) showed a higher grade of labelling in MMV (1.5-fold) consistent with 1.6-fold increase in mRNA level (Figure 4A). Interestingly a strong staining of the surrounding ECM was observed in some parts of MMV leaflets (5/18) as shown in the lower panel of Figure 4B.

The implication of TGF- β 2 in leaflet remodelling was further evaluated by analysing the potential correlation between TGF- β 2 levels expressed as the score obtained from immunohistochemistry evaluations (Figure 4C) and valve thickness. Pathological valves and control valves were included in order to take into account the variability occurring in non-diseased heart valves. A positive correlation (Spearman $r = 0.44$, $P < 0.05$) was observed, further suggesting the active role of TGF- β 2.

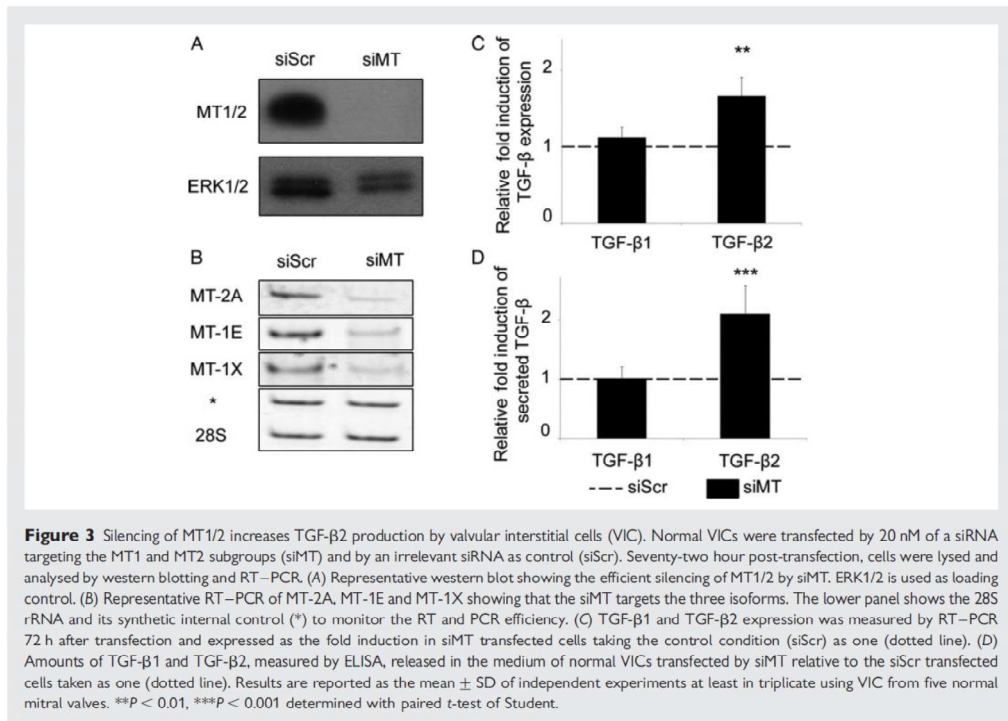
3.6 TGF- β 2 activates VICs and modulates the ADAMTS-1 expression and versican production

Normal VICs were treated by recombinant TGF- β 2 for increasing times. An increase in phosphorylated-smad2 was already observed after 1 h of treatment, even at a concentration as low as 0.5 ng/mL

(Figure 5A). After 48 h, VICs displayed the phenotypic changes typical of myofibroblastic activation characterized notably by the induction of α -SMA (Figure 5B). Because a reduced expression of aggrecanases was observed in MMV, their expression was measured by RT–PCR in TGF- β 2-treated VICs. As illustrated in Figure 5C, the addition of TGF- β 2 lead to a significantly decreased expression of ADAMTS-1, the most highly expressed aggrecanase in mitral valve (Supplementary material online). It has been shown that the remodelling of ECM occurring in MMV is characterized by an excessive deposition of versican.⁴ This finding was confirmed here by using a semi-quantitative evaluation. The intensity of versican staining in MMV ($n = 18$) was almost two times stronger than in normal leaflets ($n = 13$) (Supplementary material online, Figure S2). Versican being a known substrate of ADAMTS-1, we evaluated its accumulation in the medium of TGF- β 2-treated VICs. Versican can be found as four different isoforms (V0, V1, V2, and V3) resulting from alternative splicing of the primary transcript. The treatment by TGF- β 2 resulted in a significant production of V0 and V1 isoforms while V2 and V3 were not detected (Figure 5D).

4. Discussion

Although MMV has been well described at clinical, functional, and histological levels, only a few studies addressed the cellular and molecular mechanisms underlying the extracellular remodelling consistently observed in this pathology. Two characteristic features of MMV are the disorganization of the collagen and elastic fibrillar structures, as well as the accumulation of material enriched in proteoglycans, leading to a thickening of the leaflets. Our starting experimental strategy was to perform a global transcriptomic analysis

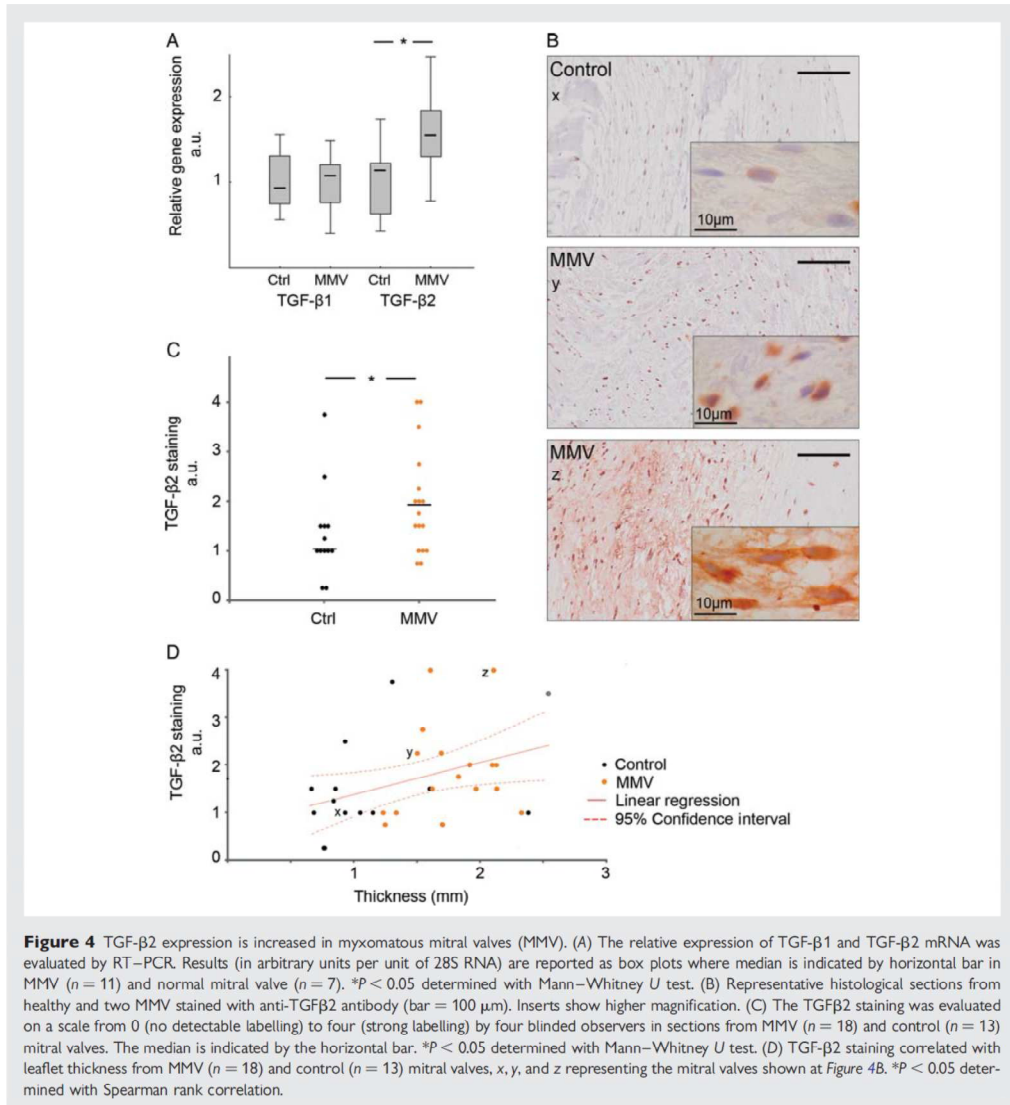


by microarray. This initial characterization provided indicative data allowing to identify potential cellular processes and families of genes worth to be explored in MMV. As stated and explained in the introduction, two families of genes, down-regulated in MMV, were considered in priority: the MT involved in the protection against oxidative stress and ADAMTS, enzymes involved in the degradation of proteoglycans.

MTs are cysteine-rich small proteins that display antioxidant functions and are involved in zinc homeostasis, but the full spectrum of their biological functions is not fully elucidated yet. Under hypoxia,¹⁹ oxidative stress, or metal exposure,²⁰ they are transcriptionally activated upon nuclear translocation of the zinc finger factor MTF1 and its binding to metal response elements (MREs) present in the MT1/2 promoters but also in other target genes.²¹ Furthermore, MTs have been recently involved in the modulation of functions of various vascular cell types and macrophages, as demonstrated in MT knockout mice.²² MTs seem therefore to participate in cellular processes other than metal and oxidative stress response. The pathways leading to the down-regulation of MTs in MMV are not yet known and may be multiple. To evaluate whether it could be related to intrinsic transcriptional dysregulation, we compared the MT1/2 expression in normal and MMV VICs treated with cadmium *in vitro* (Supplementary material online, Figure S1). The similar and strong induction observed in both types of cells suggests that the cellular machinery driving the metal-induced MT expression is not

altered in MMV, at least *in vitro*. This contrasts with data obtained at the mRNA level with the aortic smooth muscle cells from bicuspid aortic valve patients.¹³ It has to be noticed, however, that MTs can be regulated independently of the MRE through other cis-acting elements and transcription factors in response to various other extracellular stimuli, such as VEGF²³ or shear stress as observed in endothelial cells.²⁴ In healthy valves, MTs were essentially expressed by the VIC in the spongiosa but a potential paracrine regulation by signals or soluble factors produced by endothelial cells could be considered as recently suggested.²⁵ These regulations would be worth to be evaluated in co-culture²⁶ of VICs and static or shear-stressed endothelial cells. Genetic acquired defects disturbing these pathways could potentially indirectly affect the MT expression in MMV. A direct modulation of VICs by mechanical stress or relaxation¹⁴ is another possibility. Further investigations would be required to disclose the pathways involved in the MT down-regulation in MMV.

Myxomatous degeneration of the mitral valve occurs also in patients suffering from connective-tissues disorders related to enhanced TGF- β signalling, such as Marfan and Loeys-Dietz syndromes.^{9,27} Moreover, mutations in ADAMTSL2 cause a rare autosomal recessive disorder called geleophysic dysplasia. Affected patients present dilatation and thickening of heart valves and are characterized by an increased production of TGF- β 1 by mutated fibroblasts.²⁸ Idiopathic MMV has been suspected to be associated with an altered TGF- β signalling²⁹ although it was never clearly



demonstrated in humans. On the other hand, a reduced expression of MT caused by the loss of MTF1 was correlated to an increased expression and activation of TGF-β1 and to an enhanced matrix deposition in tumours.³⁰ These evidences prompted us to investigate a possible link between MT and TGF-β signalling in cultured VICs by using a siRNA strategy. To mimic the *in vivo* situation, the siRNA was designed to silence all the expressed members of the MT1 and MT2 families. While this silencing did not alter TGF-β1 expression, it significantly increased the synthesis and secretion of TGF-β2.

Although TGF-β1 was known to regulate MT,^{31,32} our data demonstrate for the first time that MTs control the expression of TGF-β2. We further showed that TGF-β2 was increased in human MMV at the mRNA and protein level. With the exception of one single study showing a high expression of TGF-β1 and TGF-β3 in canine MMV,²⁹ the role of TGF-β, and more specifically TGF-β2, in the idiopathic form of the human disease has never been shown. The increased expression of TGF-β2 might also be involved in the hypercellularity⁷ and in the higher expression of type I collagen observed in

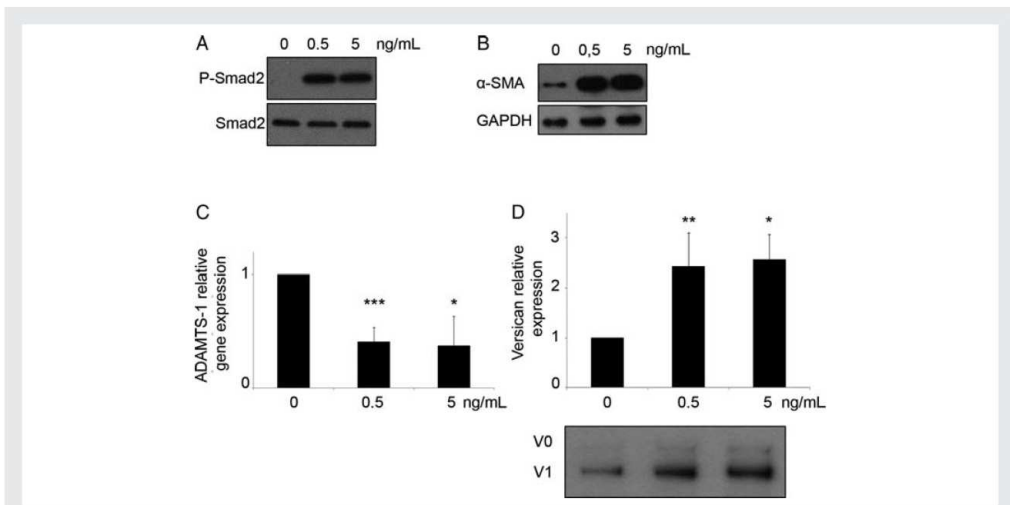


Figure 5 TGF-β2 activates VIC and decreases ADAMTS-1 expression. Normal VICs were treated by increasing concentrations of TGF-β2 (0 to 5 ng/mL). (A) Cells were lysed after 1 h of stimulation and analysed by western blot for phosphorylated Smad2 (P-Smad2) and total Smad2. (B) Cells were lysed after 48 h of stimulation and analysed by western blot for α-SMA. GAPDH was used as loading control (C) ADAMTS-1 expression was measured by RT-PCR after 48 h of stimulation by TGF-β2 and expressed as the fold induction relative to the control condition (0 ng/mL) taken as 1. Results are the mean ± SD of independent experiments at least in triplicate using VIC from five normal valves. *P < 0.05 and ***P < 0.001 determined with paired t-test of Student. (D) Versicans (V0 and V1 isoforms), released in the medium of VIC after 48 h of stimulation by TGF-β2, were analysed by western blot and quantified. The results are expressed as the fold induction relative to the control condition (0 ng/mL) taken as one and are the mean ± SD of independent experiments at least in triplicate using VIC from five normal valves. *P < 0.05 and ***P < 0.01 determined with paired t-test of student.

MMV (Supplementary material online, Figure S3) and could be associated with the disease progression since its level was correlated with the leaflet thickness. The key role of this growth factor has been demonstrated during heart valve development and, more precisely, for mammalian endocardial cushion cell transformation.³³ It also regulates the endothelial/mesenchymal plasticity of valvular progenitors.³⁴ Moreover, out of the three different TGF-β isoforms deficient mice, only *Tgfb2*^{-/-} mice display defects in valve remodelling during heart development.³⁵

Pathogenesis of MMV has been correlated with the emergence of myofibroblasts identified histochemically by the expression of α-SMA⁷ and thought to mediate the ECM remodelling observed in MMV. Some studies reported that TGF-β1 was able to initiate the differentiation of VICs into myofibroblasts³⁶ but nothing was known for TGF-β2. Our results showed that VICs, isolated from different donors, consistently responded strongly to TGF-β2, suggesting its active role in the dysregulated ECM remodelling in MMV. The increased production and secretion of versican in the medium of TGF-β2-treated VICs and the abundant deposits of versican in the diseased leaflets, especially in the spongiosa where cells lack MTs, further support this hypothesis. Versican is a major hyaluronan-binding proteoglycan that play a key role in vascular remodelling.³⁷ Besides, its upregulation by TGF-β2 in VICs, as shown here, and in tumoural cells,³⁸ the accumulation of versican observed in MMV, could also result from a repression of its degradation by aggrecanases³⁹ since we found that the expression of ADAMTS-1, -4, -5,

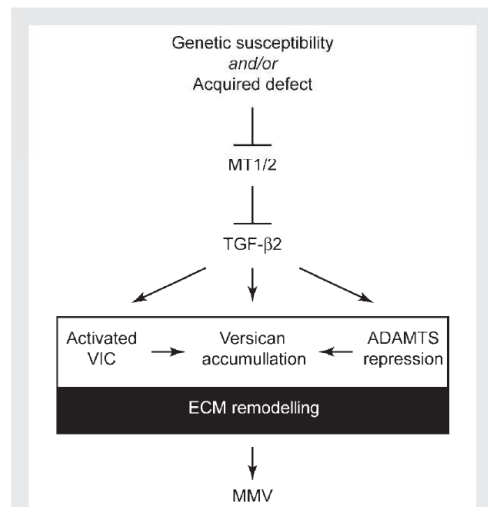


Figure 6 Mechanistic relationships involved in myxomatous mitral valve (MMV) suggested by our results. MT, metallothioneins; ECM, extracellular matrix; VIC, valvular interstitial cells.

and -9 was significantly reduced in MMV. To our knowledge, our study is the first to suggest the implication of an alteration of ADAMTS expression in human MMV. This hypothesis is further strengthened by recent data showing valvular and aortic developmental anomalies due to a decreased cleavage of versican in mouse model of *adams-5* and *adams-9* haploinsufficiency.^{40,41} Thus we can easily suspect that the reduced expression of ADAMTS-1, which is the most expressed aggrecanase in the human mitral valve, predominantly contributes to versican accumulation in MMV. Additionally, ADAMTS-1 was decreased by TGF- β 2 *in vitro*. It is worth noting that altered versican content or ADAMTS level can affect the canonical TGF- β signalling pathway.⁴² These studies, including our, open new fields of investigation about the role of ADAMTS and versican not only in human idiopathic MMV but also in mitral valve disease related to various aetiological factors, genetic disorders, or ischaemic mitral regurgitation. As these conditions share common features of structural and functional alterations of the ECM,²⁵ including excessive TGF- β signalling and proteoglycans accumulation, it would be worth to investigate MTs and ADAMTS in these pathologies.

At the initiation of our work, two families of proteins were found down-regulated in the MMV: the MTs and members of the ADAMTS family involved in the degradation of proteoglycans. By investigating *in vitro* consequences of silencing MT1/2, we highlighted an up-regulation of TGF- β 2 that was remarkably also found increased in the MMV tissues. The activation *in vitro* of VICs by TGF- β 2 resulted in a down-regulation of ADAMTS-1 and a considerable accumulation of versican, a feature of myxomatous degeneration (Figure 6). Altogether, these findings highlight new actors potentially involved in the progression of the mitral disease and propose mechanisms underlying myxomatous degeneration.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We thank M.-J. Nix, A. Hoffmann, and A. Heyeres for their skillful technical assistance. We thank N. Garbacki for her help in editing manuscript. We thank Anne-Françoise Donneau from Department of Biostatistics (University of Liège) for her statistical advices. We acknowledge the friendly help of E. Feyerreisen, J. Detilleux, and N. Rocks from the Laboratory of Tumor and Development Biology (University of Liège) for sharing information and reagents. We thank M.-H. Delbouille, M.-F. Hans, and J. Monard from Department of Abdominal Surgery and Transplantation (CHU Sart-Tilman, University of Liège) for their contribution to the collection of normal mitral valve segments. The skillful assistance of B. Hennuy from the 'Geno-transcriptomic' platform of GIGA-R, University of Liège, is acknowledged.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by grants from the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique, n°1.1.159.08.F and n°3.4518.07 and by the Léon Frédéricq Foundation.

References

1. Freed LA, Levy D, Levine RA, Larson MG, Evans JC, Fuller DL et al. Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med* 1999;**341**:1–7.

2. Grau JB, Pirelli L, Yu PJ, Galloway AC, Ostrer H. The genetics of mitral valve prolapse. *Clin Genet* 2007;**72**:288–295.
3. Nasuti JF, Zhang PJ, Feldman MD, Pasha T, Khurana JS, Gorman JH III et al. Fibrillin and other matrix proteins in mitral valve prolapse syndrome. *Ann Thorac Surg* 2004;**77**:532–536.
4. Gupta V, Barzilla JE, Mendez JS, Stephens EH, Lee EL, Collard CD et al. Abundance and location of proteoglycans and hyaluronan within normal and myxomatous mitral valves. *Cardiovasc Pathol* 2009;**18**:191–197.
5. Hayek E, Gring CN, Griffin BP. Mitral valve prolapse. *Lancet* 2005;**365**:507–518.
6. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* 2007;**171**:1407–1418.
7. 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. *Gravitation* 2001;**104**:2525–2532.
8. Weyman AE, Scherrer-Crosbie M. Marfan syndrome and mitral valve prolapse. *J Clin Invest* 2004;**114**:1543–1546.
9. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991;**352**:337–339.
10. Loeyts BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* 2005;**37**:275–281.
11. Ng CM, Cheng A, Myers LA, Martinez-Murillo F, Jie C, Bedja D et al. TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 2004;**114**:1586–1592.
12. Loardi C, Alamanni F, Trezzi M, Kassam S, Cavallotti L, Tremoli E et al. Biology of mitral valve prolapse: the harvest is big, but the workers are few. *Int J Cardiol* 2011;**151**:129–135.
13. Philippini JA, Klyachko EA, Kenny JPt, Eskin MA, Gorman RC, Gleason TG. Basal and oxidative stress-induced expression of metallothionein is decreased in ascending aortic aneurysms of bicuspid aortic valve patients. *Circulation* 2009;**119**:2498–2506.
14. Lambert CA, Colige AC, Lapiere CM, Nusgens BV. Coordinated regulation of procollagens I and III and their post-translational enzymes by dissipation of mechanical tension in human dermal fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 2001;**80**:479–485.
15. Meloni G, Knipp M, Vasek M. Detection of neuronal growth inhibitory factor (metallothionein-3) in polyacrylamide gels and by Western blot analysis. *J Biochem Biophys Methods* 2005;**64**:76–81.
16. Mizzen CA, Cartel NJ, Yu WH, Fraser PE, McLachlan DR. Sensitive detection of metallothioneins-1, -2 and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for enhanced membrane transfer and retention. *J Biochem Biophys Methods* 1996;**32**:77–83.
17. Ho TT, Merajver SD, Lapiere CM, Nusgens BV, Deroanne CF. RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J Biol Chem* 2008;**283**:21588–21598.
18. Kischel P, Waltregny D, Dumont B, Turtoi A, Greffe Y, Kirsch S et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *Int J Cancer* 2010;**126**:640–650.
19. Murphy BJ, Andrews GK, Bittel D, Discher DJ, McCue J, Green CJ et al. Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcription factor-1. *Cancer Res* 1999;**59**:1315–1322.
20. Andrews GK. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 2000;**59**:95–104.
21. Zhang B, Georgiev O, Haggmann M, Gunes C, Cramer M, Faller P et al. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ *in vitro* is modulated by metallothionein. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:8471–8485.
22. Zbinden S, Wang J, Aderika R, Schmidt M, Tilan JU, Najafi AH et al. Metallothionein enhances angiogenesis and arteriogenesis by modulating smooth muscle cell and macrophage function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;**30**:477–482.
23. Joshi B, Ordonez-Ercan D, Dasgupta P, Chellappan S. Induction of human metallothionein 1G promoter by VEGF and heavy metals: differential involvement of E2F and metal transcription factors. *Oncogene* 2005;**24**:2204–2217.
24. White SJ, Hayes EM, Lehoux S, Jeremy JY, Horrovetts AJ, Newby AC. Characterization of the differential response of endothelial cells exposed to normal and elevated laminar shear stress. *J Cell Physiol* 2011;**226**:2841–2848.
25. Salhiyyah K, Yacoub MH, Chester AH. Cellular mechanisms in mitral valve disease. *J Cardiovasc Transl Res* 2011.
26. 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.
27. Gomez D, Al Haj Zen A, Borges LF, Philippe M, Gutierrez PS, Jondeau G et al. Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *J Pathol* 2009;**218**:131–142.
28. Le Goff C, Morice-Picard F, Dagoneau N, Wang LW, Perrot C, Crow YJ et al. ADAMTSL2 mutations in geophypic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat Genet* 2008;**40**:1119–1123.
29. Aupperle H, Marz I, Thielebein J, Schoon HA. Expression of transforming growth factor-beta1, -beta2 and -beta3 in normal and diseased canine mitral valves. *J Comp Pathol* 2008;**139**:97–107.

30. Haroon ZA, Amin K, Lichtlen P, Sato B, Huynh NT, Wang Z et al. Loss of metal transcription factor-1 suppresses tumor growth through enhanced matrix deposition. *FASEB J* 2004;**18**:1176–1184.
31. Moffatt P, Paa GL, DenizEAU F. Induction of metallothionein gene expression by epidermal growth factor and its inhibition by transforming growth factor-beta and dexamethasone in rat hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, MD)* 1995;**21**:1038–1044.
32. Toh PP, Li JJ, Yip GW, Lo SL, Guo CH, Phan TT et al. Modulation of metallothionein isoforms is associated with collagen deposition in proliferating keloid fibroblasts in vitro. *Exp Dermatol* 2010;**19**:987–993.
33. Townsend TA, Robinson JY, Deig CR, Hill CR, Misfeldt A, Blobe GC et al. BMP-2 and TGFbeta2 shared pathways regulate endocardial cell transformation. *Cells Tissues Organs* 2011;**194**:1–12.
34. Paruchuri S, Yang JH, Aikawa E, Melero-Martin JM, Khan ZA, Loukogeorgakis S et al. Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2. *Circ Res* 2006;**99**:861–869.
35. Azhar M, Brown K, Gard C, Chen H, Rajan S, Elliott DA et al. Transforming growth factor Beta2 is required for valve remodeling during heart development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 2011;**240**:2127–2141.
36. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res* 2004;**95**:253–260.
37. Wight TN. Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican. *Front Biosci* 2008;**13**:4933–4937.
38. Arslan F, Bosserhoff AK, Nickl-Jockschat T, Doerfelt A, Bogdahn U, Hau P. The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor-beta2. *Br J Cancer* 2007;**96**:1560–1568.
39. Salter RC, Ashlin TG, Kwan AP, Ramji DP. ADAMTS proteases: key roles in atherosclerosis? *J Mol Med* 2010;**88**:1203–1211.
40. Dupuis LE, McCulloch DR, McGarity JD, Bahan A, Wessels A, Weber D et al. Altered versican cleavage in ADAMTS5 deficient mice; a novel etiology of myxomatous valve disease. *Dev Biol* 2011;**357**:152–164.
41. Kern CB, Wessels A, McGarity J, Dixon LJ, Alston E, Angraves WS et al. Reduced versican cleavage due to Adamts9 haploinsufficiency is associated with cardiac and aortic anomalies. *Matrix Biol* 2010;**29**:304–316.
42. Hattori N, Carrino DA, Lauer ME, Vasanthi A, Wylie JD, Nelson CM et al. Pericellular versican regulates the fibroblast-myofibroblast transition: a role for ADAMTS5 protease-mediated proteolysis. *J Biol Chem* 2011;**286**:34298–34310.

SUPPLEMENTAL MATERIAL
available at Cardiovascular Research online

Materials and methods

Tissue Collection

Myxomatous mitral valves (MMV) were collected from patients undergoing elective surgery for valvuloplasty to correct mitral regurgitation resulting from isolated prolapse of the median scallop of posterior leaflets (P2). Patients suspected of Barlow's disease, with Marfan syndrome and ischemic heart disease were excluded from the study. Healthy control mitral valves were obtained from hearts of donors rejected for transplantation with no history of cardiovascular pathologies. Chordae were cut off at the insertion level and kept for future analyses. A 2 mm strip of tissue was cut in the median of the P2 leaflet from the free edge to the annulus and fixed for immunohistochemistry. Similar strips covering the full width of the valves were collected from the right and left sides for transcriptomic and proteomic analysis and for isolation of valvular interstitial cells (VIC) and amplification in culture. Demographics of the tissue collections are outlined in Table 1. The study conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and was approved by the ethic committee of Liège University Hospital (B70720071262) and a written consent was obtained from the informed patients.

Primary culture valvular interstitial cells

VIC were isolated by outgrowth from normal and MMV explants. After 2 hours of digestion of valvular tissue fragments in a solution of 0,1% (w/v) collagenase (Sigma), fragments were washed in FBS (Lonza), cut into tiny explants, transferred into culture dishes and covered with growth medium (EBM (Lonza) supplemented with 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Lonza) and 0.1% (v/v) fungizone (Gibco)). Cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂ and propagated by serial passages after trypsinization. Primary VIC cultures were amplified from 7 normal mitral valves and 4 MMV. All experiments were performed using cells at passage four to seven.

Immunocytochemistry

VIC were seeded on coverslips and cultured for two days. They were fixed in 2% (v/v) neutralized paraformaldehyde (Sigma) for 10

min and then permeabilized with 0.1% (v/v) Triton-X100. Coverslips were washed with PBS, blocked with 1% (w/v) bovine serum albumin (Sigma) and incubated with primary antibody: mouse anti-CD31 (1/200, Dako), mouse anti- α -SMA (1/300, Sigma) and mouse anti-vimentin (1/400, Dako). After washing with PBS, the coverslips were incubated with secondary Alexa Fluor 555-labeled goat anti-mouse antibody (Invitrogen) in containing 5 μ g/ml DAPI. Labelled and non-labeled cells were counted in 6 fields at x16 magnification using a Zeiss Axiovert25inverted fluorescent microscope.

RNA extraction

The collected strips of valvular tissues were powdered under liquid nitrogen in a Mikro-Dismembrator S (B. Braun Biotech International) and total RNA was isolated using a RiboPure kit (Ambion) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was isolated from cultures of VIC using the High Pure RNA isolation kit (Roche Molecular Biochemical). Total RNA was quantified by spectrophotometry (Nanodrop ND-1000, Isogene Lifescience) and its integrity was checked with an Agilent 2100 Bioanalyzer.

Microarray analysis

Microarray analysis was performed on total RNA pooled from 3 MMV and 3 normal mitral valves by using the Affymetrix HG-U133A 2.0 chip containing 22000 probe sets. Probe synthesis, hybridization, washing protocols and signals scanning were performed at the Genomics Facility of the GIGA-Research Center, University of Liège with the GeneChip Operating Software. Only the transcripts that were declared present or marginal in at least one pool were taken into account and the genes that revealed significant changes in their expression were selected by using MAS5. Moreover, a cutoff value of 2-fold change was applied to select the modulated genes in MMV.

RT-PCR analysis

5 ng of total RNA were reverse-transcribed and amplified using GeneAmp ThermoStable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR kit (Perkin-Helmer, Boston) and specific pairs of primers (Eurogentec) in an automated thermal cycler (GeneAmp PCR System 9600). The RT step was 70°C for 15 minutes. Denaturation of RNA/DNA heteroduplexes for 2 minutes at 95°C was followed by PCR amplification for the adequate

number of cycles (16 to 35) and a final elongation step of 2 minutes at 72°C. The PCR conditions for amplification were 15s of denaturation at 94°C, 20s of hybridization at 60°C or 66°C and 10s of polymerization at 72°C. The sequences of the primers, number of PCR cycles and size of the RT-PCR products are described in table 1S. The PCR products were analyzed by electrophoresis on 10% polyacrylamide. After staining with GelStar dye (FCM Bioproducts), the signals were quantified using Fluor-S MultiImager and the software Quantity One 4.6 (Biorad). The results were expressed in arbitrary units per unit of 28S rRNA. A synthetic RNA reverse-transcribed and amplified with the primers used for the cellular gene was added in each reaction tube to monitor the efficiency of the reactions^{155, 156}.

Protein extraction

To analyze metallothioneins expression, proteins were extracted from mitral valve samples pulverized under liquid nitrogen (Mikro-Dismembrator S) or from VIC in ice-cold lysis buffer (25mmol/L HEPES pH 7.3, 150mmol/L NaCl, 0.5mmol/L EGTA, 4% glycerol, 5mmol/L DTT, 0.1mmol/L AEBSF, 4µg/ml aprotinin, 0.5% Triton X-100). Supernatants were collected after centrifugation at 16000g for 5 minutes and treated with 1mmol/L bromobimane (Sigma) for 10 minutes as described by Meloni¹⁵⁷. For other proteins analyses, extraction was performed in Laemmli's buffer.

Western Blotting

Protein lysates were denatured in Laemmli's buffer and was separated by 10 to 17.5% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a PVDF membrane (NEN Life Science Products). To detect metallothioneins a modified protocol adapted from Mizzen¹⁵⁸ was used. The transfer buffer was supplemented with 2mmol/L CaCl₂ and membranes were fixed after transfer in 2.5% (v/v) glutaraldehyde for 45 minutes and washed in PBS with 50mmol/L monoethanolamine. Membranes were blocked for 1 hour with 3% dry non-fat milk in TBS-Tween and incubated with the diluted primary antibody for 4 hours at RT or overnight at 4°C. Membranes were then washed three times, incubated in the diluted secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody, and revealed by chemoluminescence using the ECL kit (Amersham Biosciences) and X-ray film exposure. The membranes were reprobated with

anti-GAPDH (1/5000) or anti-Erk1/2 (1/5000) antibodies to control protein loading. Mouse anti-metallothionein1/2 (1/200), mouse anti-GAPDH (1/5000) and secondary horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG and swine anti-rabbit IgG were from Dako. Rabbit anti-smad2 (1/500), rabbit anti-p-smad2 (1/500) and secondary horseradish peroxidase conjugated swine anti-rabbit were from Cell Signaling. Mouse anti-α-SMA (1/5000) and rabbit anti-Erk1/2 (1/5000) were from Sigma.

Immunohistochemistry

The median 2mm strips of myxomatous and normal P2 leaflets, cut from the free edge to the annulus, were fixed in 4% neutralized paraformaldehyde (Sigma) for 2 hours, dipped in 70% (v/v) ethanol and embedded in paraffin.

Metallothionein 1/2

5µm sections were pretreated with 2.5% (v/v) trypsin (Gibco). Endogenous peroxidase activity was quenched with 3% (v/v) hydrogen peroxide (VWR). After blocking non-specific binding by incubation with 10% (v/v) universal blocker (Sigma), tissue sections were incubated with primary mouse anti-metallothionein 1/2 antibody (1/100, Dako). After incubation with the diluted secondary biotinylated-conjugated antibody, the sections were incubated with streptavidin-conjugated peroxidase and detected using AEC substrate (Dako). All samples were counterstained with hematoxylin. The number of metallothionein-positive cells were counted by two blinded observers in five microscopic fields at x40 magnification.

TGF-β2

For TGF-β2 staining, the tissue sections were pretreated by heating with Tris-EDTA Buffer pH 8. The immunohistochemistry was performed as described above by incubating the antibody (1/100, Abcam) overnight at 4°C. The TGF-β2 staining intensity in cells and in the extracellular matrix was scored by four blinded observers on a scale from 0 (no detectable labeling) to 4 (strong labeling). A mean value was established for each tissue section and expressed in arbitrary units (a.u). The standard deviation of the four scores for the same slide was lower than 0.6.

Versican

For versican staining antibody, a pretreatment step with 0.2U/ml chondroitinase ABC (Sigma) was performed at 37°C for 1h. The immunohistochemistry was done as described above by incubating the antibody (1/1000, Developmental Studies Hybridoma Bank) 1h at 37°C. Versican staining was quantified by image analysis using the software OlyVIA (Olympus) and Quantity One 4.6 (BioRad) and expressed in intensity/mm²

siRNA transfection

siRNAs chemically synthesized, desalted, deprotected and PAGE purified were from Eurogentec. The sequences of the siRNA targeting a common sequence in the isoforms of the MT1 and MT2 subgroups metallothioneins used were as follows: S, 5'-GAGUGCAAUUGCACCUCU-3' and AS, 5'-AGGAGGUGCAUUUGCACUC-3'. The irrelevant siRNA used as control was described previously¹⁵⁹. Each pair of oligoribonucleotides was annealed at a concentration of 20 µmol/L in 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5. siRNA transfection was carried out as previously described¹⁶⁰. Briefly, calcium phosphate-mediated transfection was performed overnight (14-16 hours) in DMEM (Lonza) supplemented with 10% FBS (Lonza) on subconfluent VICs, from 3 normal mitral valves, at a final concentration of 20 nmol/L siRNA. VICs were washed twice with PBS and once with EBM with 0.2% BSA (Sigma). This last step was defined as time 0 post-transfection. Cells were lysed for Western blot and RT-PCR analysis 72 hours post-transfection to evaluate the silencing efficiency.

ELISA for TGF-β

Conditioned mediums from si-RNA transfected VIC were harvested after 72h of culture and supplemented with protease inhibitors (1/100, ThermoScientific). In some cases, they were treated by 0.167mol/L HCl to activate latent TGF-β and concentrations of TGF-β1 and TGF-β2 were determined using DuoSet ELISA kits (R&D systems) according to the manufacturers' instructions. In parallel, VIC were washed three times with PBS and sonicated

to quantify DNA by fluorimetry using Hoechts dye reagent according to the technique of Paigen¹⁶¹. There was no difference in the amount of DNA after 72 hours between siMT1/2 and siScr transfected VIC. The concentrations of TGF-β1 and TGF-β2 were expressed as pg/ml.

Cadmium treatment of VIC

VIC from 4 normal mitral valves and 4 MMV were seeded in 6-wells in duplicate. Subconfluent cultures were supplemented with increasing concentrations of CdCl₂, known to induce metallothioneins transcription¹⁶², from 0 to 5µmol/L for 12 and 24 hours. Cells were lysed for RT-PCR analysis of MT1/2 expression.

TGF-β2 treatment of VIC

VIC from 5 normal mitral valves were seeded in 6-wells in triplicate. Subconfluent cultures were starved for 24 hours and supplemented with increasing concentrations (0 to 5 ng/ml) of human recombinant TGF-β2 (T2812, Sigma). Cells were lysed for Western blot or RT-PCR analysis after 1 or 48 hours of stimulation.

Versican analyses

VIC from normal mitral valves were seeded in 6-wells in triplicate with growth medium. Subconfluent cultures were starved for 24 hours and supplemented with increasing concentration of human recombinant TGF-β2 (T2812, Sigma) from 0 to 5ng/ml for 48 hours. Conditioned mediums were collected, concentrated and digested with chondroitinase ABC (0.2 U/100 µg proteins) at 37°C for 3 hours as described by Kischel¹⁶³. 45 µg proteins were subjected to SDS-PAGE in 4-12% gels (Invitrogen) under non-reducing conditions. Membranes were blocked for 1 hour in 3% dry non-fat milk in TBS-Tween and incubated with primary mouse antibody against versican (1/300, Developmental Studies Hybridoma Bank) for 2 hours at RT. Membranes were then washed three times, incubated in the diluted secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody, and revealed by chemoluminescence using the ECL kit (Amersham Biosciences) and X-ray film exposure.

Table 1S : Nucleotide sequence of the primers and number of cycles for amplification

Primers RNA	Primers		Cycle number	
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	In vivo	In vitro
28S	GTTCACCACTAATAGGGAACGTGA	GATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT	15	14
MT2A	TTCAGCTCGCCATGGATCCCA AC	AACGGTCACGGT CAGGGTTGTAC	27	20
MT1E	AAATGCAGCAAATGGCTCAGTGT G	AAA TGCAGCAA TGGCTCAGTGT G	28	23
MT1X	CGT GTT TTC CTC TTG ATC GGGAAC	GTA GCA AACGGGTCAGGG TTGTAC	28	26
ADAMTS1	CAGCCCAAGGTTGTAGATGGTA	TTCACTTCGATGTTGGTGGCTC	25	22
ADAMTS4	CTCTGGTGTCTGGCCACCTCA	GGA GAAC TGGACACCCACCCA	33	33
ADAMTS5	TACCTGCTGACCTGGCTCCCA	GTGTCACATGAATGATGCCACATA	33	31
ADAMTS9	CCAAGTGCCACAGGGTCGTTTT	CCATCCATAATGGCTTCCTCTCA A	33	32
TGF-β1	GGAGAGGGCCCA GCATCTGCA A	TGTACTGCGTGTCCAGGCTCCAA	29	26
TGF-β2	CTCCTACAGACTTGAGTCAAC	CTCCATAAATACGGGCATGCTCC	27	24
Coll 1A1	CCCACCAATCACCTGCGTACAGA	TTCTTGGTCGGTGGGTGACTCTGA	23	
Lumican	AGTATCTGCGTTTATCTACAACG AA	CGGTGAAGACTGGTTTCTGAGAT	24	
HS2	GCATCATGCAAAAATGGGGTGA A A	ACAGGCCCTTCTATATTTAAAAGCCAT	28	
CD44	GTCCCATACCACTCATGGATCTGA A	CTTCGACTGTTGACTGCAATGCAA A	25	
MMP14	GGATACCCAATGCCATTGGCCA	CCATTGGGCATCCAGAAGAGA GC	27	

Table 2S : Selected results of microarray analysis of myxomatous mitral valve (MMV) and control mitral valve.

Gene		Fold change (MMV vs control)
COL1A1	Collagen type I, alpha 1	1.5
HS2	Hyaluronan synthase 2	-2
CD44	CD44	-1.4
MMP14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	-1.5

Results

Transcriptomic analysis.

The individual abundance of the aggrecanases of the ADAMTS family was evaluated in healthy human mitral valves by real-time PCR and expressed as the ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{28S}$). The ADAMTS-1 exhibited the highest expression level ($\Delta Ct = 5.3$). ADAMTS-4 ($\Delta Ct = 8.8$) and ADAMTS-5 ($\Delta Ct = 9.1$) were expressed at the nearly same lower level whereas ADAMTS-9 was weakly expressed ($\Delta Ct = 13.5$).

Besides the observed reduction of MT1/2 and ADAMTS genes in MMV, a modulation of some extracellular matrix genes (Table 2S) has to be pointed out. The expression of type I collagen (COL1A1) was significantly increased in MMV while the hyaluronan synthase 2 (HS2), a critical enzyme driving hyaluronan synthesis, was significantly decreased. A similar decrease was observed for CD44, a hyaluronan receptor, and for MMP14, an extracellular matrix degrading enzyme, involved in MMPs activation and shedding of CD44. These microarray results

were validated by RT-PCR performed on the whole series of myxomatous (n=13) and normal (n=11) mitral valves (Fig.1S).

Induction of metallothioneins expression by cadmium in valvular interstitial cells (VIC) from MMV and control valves.

VIC were exposed to CdCl₂ (0 and 5 μmol/L) for 12 and 24 hours and the mRNA level of metallothioneins isoforms MT2A, MT1E and MT1X was measured by RT-PCR. The basal expression level of these isoforms was similar in control and MMV cells (not shown). Exposure to CdCl₂ resulted in a strong induction of the three investigated metallothionein isoforms at 5 μmol/L, about 4 fold for MT2A and MT1E and 15-20 fold for MT1X, similarly in control and MMV (Fig.2S). These results suggest that the metal-inducible transcriptional regulation of metallothioneins is not altered in MMV.

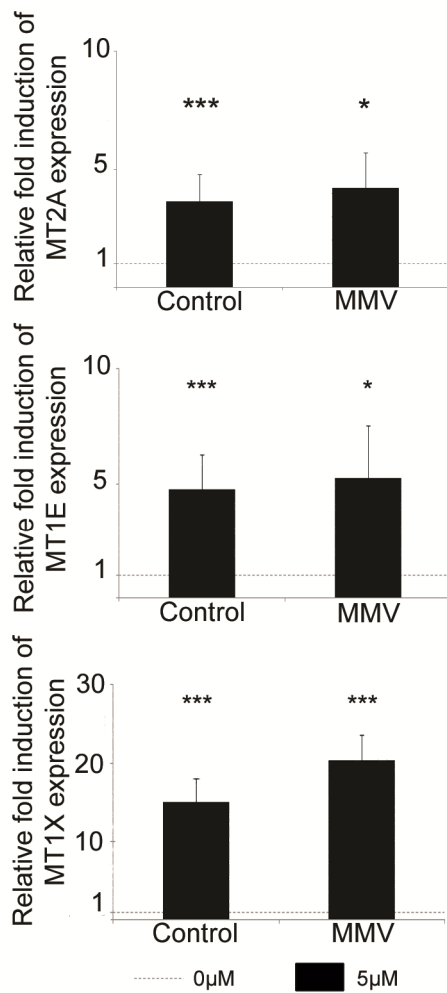


Figure 1S: Induction of metallothioneins expression by Cd²⁺. Healthy (control) and MMV VICs were cultivated in absence or presence of 5µmol/L CdCl₂. MT2A, MT1E and MT1X expression was measured by RT-PCR after a 24 hour treatment and expressed as the fold induction relative to the condition in absence of CdCl₂ (dotted line) taken as 1. Results are the mean ± S.D. of independent experiments using VIC from 4 normal valves and 4 myxomatous valves.* p<0.05 and *** p<0.001 determined with paired t test of Student.

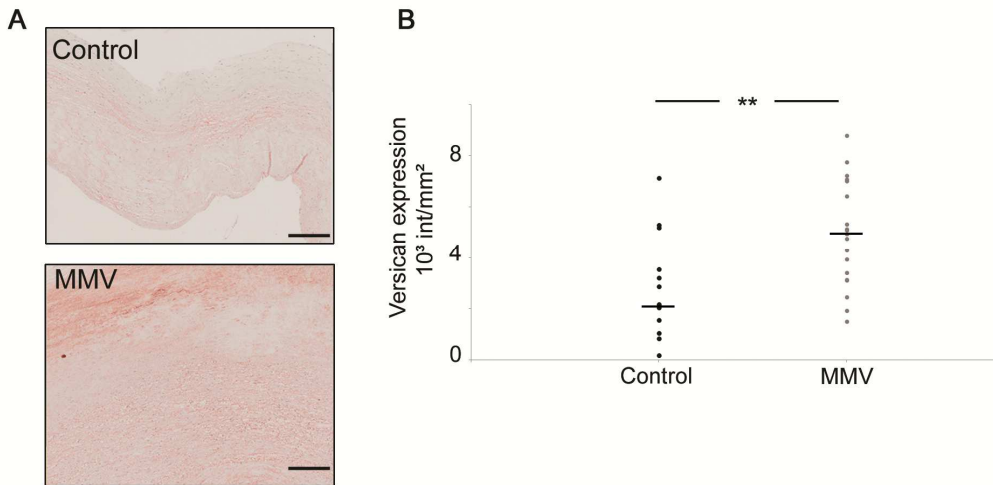


Figure 2S: Versican expression is increased in myxomatous mitral valves (MMV) A: Representative histological sections from healthy and MMV stained with anti-versican antibodies (bar=200µm). **B:** The intensity of versican staining was quantified from MMV (n=18) and control (n=13) mitral valves. The median intensity (intensity/mm²) is indicated by the horizontal bar. **p<0.01 determined with Mann-Whitney test.

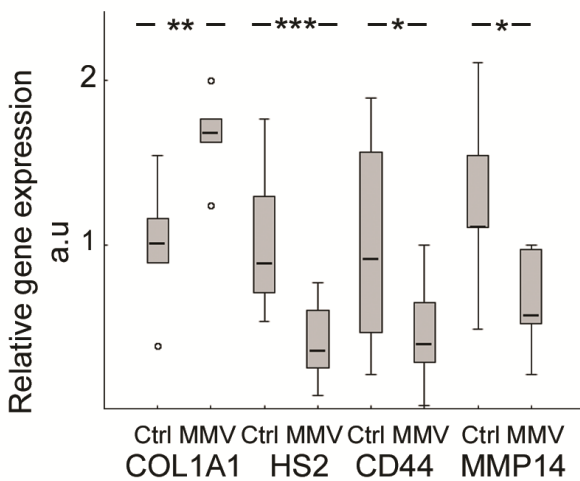


Figure 3S: Extracellular matrix gene expression is modulated in myxomatous mitral valves (MMV). RNA level measured by RT - PCR for the α 1 chain of type I collagen (COL1A1), hyaluronan synthase 2 (HS2), CD44 and MMP14. Results (normalized to 28S rRNA) are reported as box plots where median is indicated by the horizontal bar in myxomatous (MMV, n=13) and normal mitral valves (Ctrl, n=11) taken as 1. * p<0.05 and *** p<0.001 determined with Mann-Whitney test.

Résultats complémentaires

En continuation avec les données décrites dans la publication n°2, où nous avons démontré que la suppression de l'expression des MT1/2 stimulait la production de TGF- β 2 et que, d'autre part, l'ajout dans le milieu de culture de TGF- β 2 recombinant réprimait l'expression d'ADAMTS-1, il convenait dès lors de vérifier si l'hyperproduction de TGF- β 2 endogène suite à la répression des taux de MT1/2 était capable de moduler la synthèse d'ADAMTS-1.

Cinq jours après transfection des VIC par le siMT1/2, la quantité de TGF- β 2 sécrété dans le milieu de culture est significativement accrue par rapport aux cellules contrôles et l'expression de l'ADAMTS-1 est effectivement réduite (Figure 23).

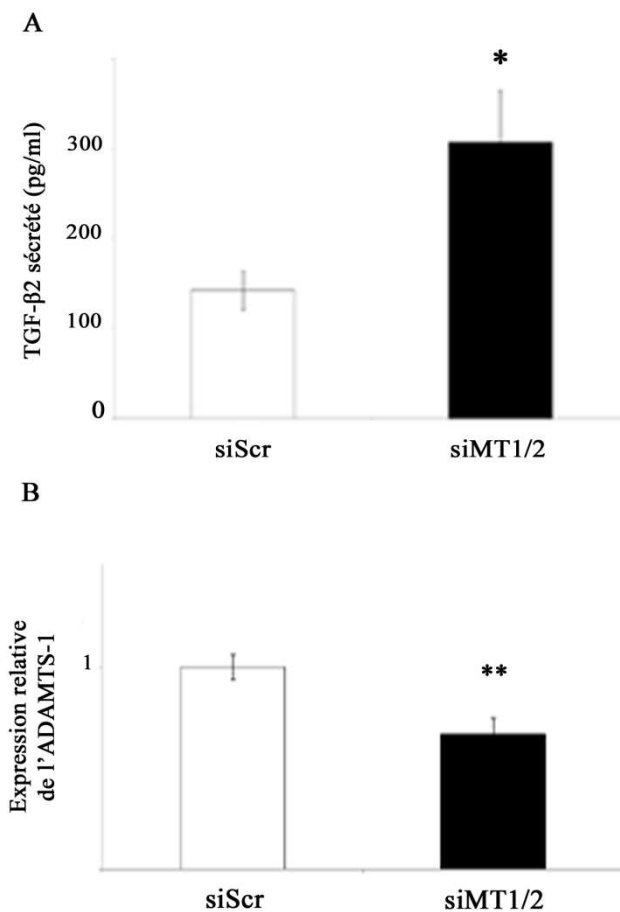


Figure 23: Régulation de l'expression de TGF- β 2 et de l'ADAMTS-1 suite à l'inhibition d'expression des MT1/2. Des VIC provenant de valves saines ont été analysées 5 jours après transfection d'un siARN (20nM) ciblant la famille des MT-1 et MT-2 (siMT1/2) ou d'un siARN non pertinent servant de contrôle (siScr). **A:** Quantité de TGF- β 2, mesurée par ELISA (pg/ml), libérée dans le milieu de VIC normales transfectées avec le siMT1/2 ou le siScr. Les résultats sont rapportés sous forme de la moyenne \pm écart-type des cultures en triplicate. **B:** Expression relative d'ADAMTS-1 par rapport aux cellules contrôles (siScr). Les résultats sont rapportés sous forme de la moyenne du facteur d'induction \pm écart-type des cultures en triplicate. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ déterminé par un t-test de Student.

Le deuxième point que nous souhaitions éclaircir était de savoir si, au même titre que les chondrocytes, les VIC répondaient au TGF- β par une expression accrue de Sox9. Il s'agit d'un facteur de transcription crucial pour la chondrogenèse. Sa présence est rapportée dans les valves myxoïdes en accord avec le processus d'ossification endochondrale qui semble s'y dérouler⁶⁷. Une forte induction de l'expression de Sox9 dans les VIC est effectivement observée en présence de TGF- β 2 (Figure 24) et pourrait participer au processus de chondrogenèse observé dans les valves myxoïdes.

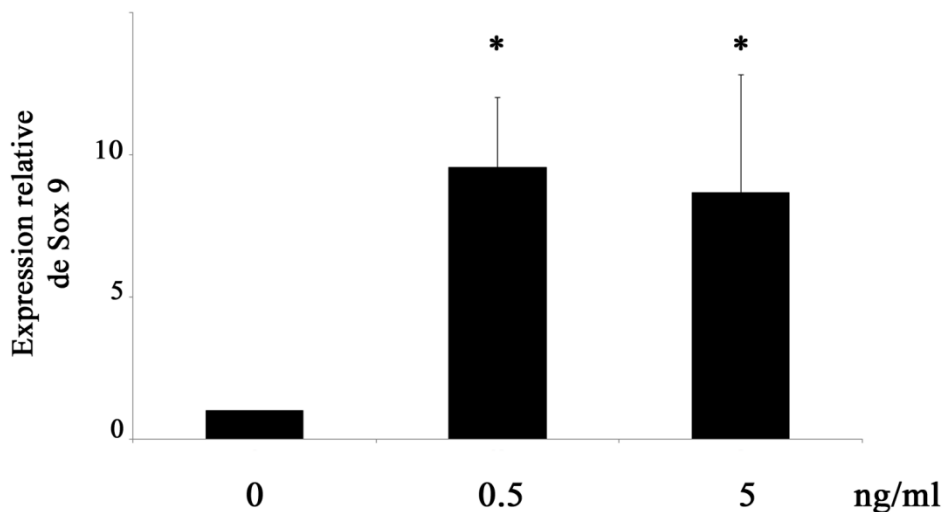


Figure 24 : TGF- β 2 induit l'expression de Sox9. Des VIC sont traitées par des doses croissantes de TGF- β 2 (0 à 5 ng/ml). Après 48h de stimulation, l'expression de Sox9 est exprimée par rapport à l'expression des cellules non traitées (0ng/ml). Les résultats représentent la moyenne du facteur d'induction \pm écart-type pour des cellules provenant de 3 valves mitrales saines. * p <0.05 déterminé par un t-test de Student apparié.

Conclusions

Sur base d'une analyse transcriptomique initiale, dont les résultats ont été par la suite validés par des techniques complémentaires sur tous nos échnatillons, nous avons démontré, pour la première fois, une réduction de l'expression des métallothionéines et des agrécánases de la famille des ADAMTS au sein des valves myxoïdes. L'absence quasi totale de métallothionéines dans les tissus myxoïdes, alors que ces enzymes anti-radicalaires sont présentes dans les cellules de la spongiosa des valves normales, nous a conduit à évaluer les conséquences mécanistiques de la suppression de leur expression dans des cellules valvulaires normales. Nous avons ainsi démontré que la réduction des MT1/2 résultait en une activation de la voie TGF- β 2, un facteur de croissance dont nous avons recherché la présence dans les valves myxoïdes et mis en évidence sa surexpression. Le TGF- β 2 régule le phénotype des VIC, réprime l'expression de l'ADAMTS-1, stimule la production de versican et l'expression de Sox9, un facteur de transcription impliqué dans le développement cardiaque et la chondrogenèse mais également dans la dégénérescence myxoïde. Nos résultats suggèrent donc que la levée de la régulation négative qu'exercent les métallothionéines sur le TGF- β 2 et sa surexpression joueraient un rôle actif dans la dérégulation du remodelage matriciel au cours de la dégénérescence myxoïde. Il serait responsable du dépôt excessif de protéoglycans riche en versican suite à l'action combinée d'une stimulation de leur expression et d'une réduction de leurs enzymes de dégradation, les ADAMTS. Ces résultats mettent en lumière de nouveaux acteurs et de nouvelles voies de régulation potentiellement impliqués dans la développement myxoïde et l'insuffisance mitrale (Figure 25).

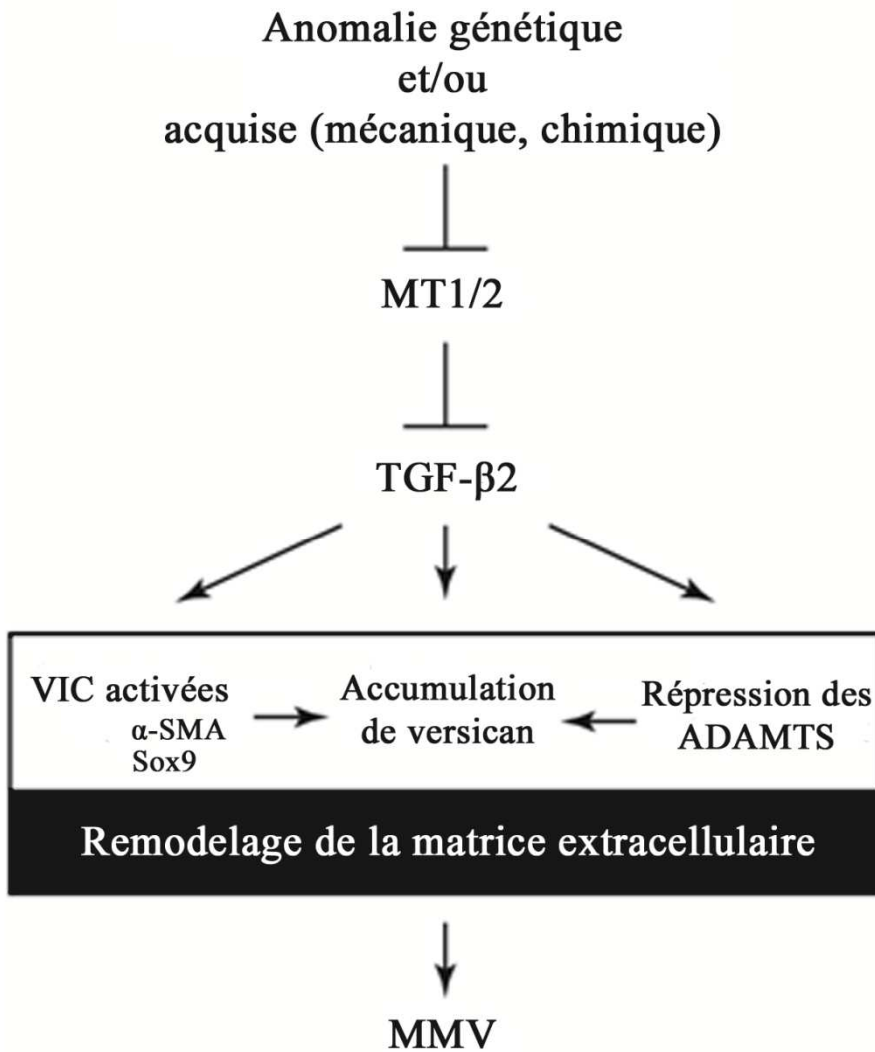


Figure 25: Vue schématique des mécanismes et de leurs interactions, sur base de nos résultats, susceptibles d'induire ou de favoriser la dégénérescence myxoïde de la valve mitrale.

RESULTATS : PARTIE II

Etude des mécanismes potentiels de modulation de l'expression des métallothionéines 1/2 *in vitro*

Introduction

Comme nous venons de le démontrer dans la première partie de nos résultats, une expression réduite des métallothionéines des sous-familles 1 et 2 (MT1/2), plus particulièrement de la MT-2A, MT-1E et MT-1X, a été observée dans les valves myxoïdes. Ces protéines sont connues pour être impliquées dans la chélation et la détoxification des métaux lourds, la protection contre le stress oxydant et, comme nous l'avons rapporté, exerceraient une régulation négative sur le TGF- β 2. Dès lors, l'absence ou la réduction de l'expression des MT1/2 pourrait être un facteur significatif dans la dégénérescence myxoïde.

Les métaux lourds, les glucocorticoïdes, certaines cytokines et le stress oxydatif comptent parmi les régulateurs connus de la transcription des MT1/2¹⁶⁴. Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes attachés à comparer la réponse des VIC, provenant de segments normaux ou myxoïdes, à un stimulus par le cadmium ou le TGF- β 2 afin de détecter d'éventuelles anomalies génétiquement déterminées de la régulation transcriptionnelle des MT1/2. Dans un deuxième volet, nous avons évalué une régulation potentielle de l'expression des MT1/2 par des forces de traction cycliques et, sur base des analyses transcriptomiques, par la voie PI3K/Akt.

Matériels et méthodes

Culture des cellules valvulaires interstitielles (VICs).

Les VICs ont été mises en culture à partir d'explants de valves mitrales saines (n=6) et myxoïdes (n=6) tel que décrit précédemment ¹⁶⁵. Les cellules sont cultivées dans du milieu EBM avec 10% FBS (Lonza). Elles ont été utilisées entre les passages 3 et 7.

Extraction d'ARN et RT-PCR.

L'extraction d'ARN des cultures de VIC et l'analyse d'expression par RT-PCR ont été réalisées comme décrit précédemment ¹⁶⁵.

Extraction protéique et western blotting

Les extraits protéiques et les analyses par western blotting ont été réalisés comme décrit précédemment ¹⁶⁵. Les membranes de transfert ont été incubées avec des anticorps reconnaissant Erk1/2 (1/5000, Sigma), MT1/2 (1/200, Dako), p-Akt (1/1000, Cell Signaling), Akt (1/1000, Cell Signaling), p-smad2 et smad2 (1/500, Cell Signaling).

Traitement des VIC par le CdCl₂

Des VIC provenant de 4 valves mitrales saines et 4 valves myxoïdes ont étéensemencées en plaque 6 puits puis cultivées dans de l'EBM-10%FBS jusqu'à subconfluence avant d'être traitées par du CdCl₂ (0 et 5µM) pendant 12h ou 24h. L'ARN a ensuite été extrait et l'expression des MT-2A, MT-1E et MT-1X analysée par RT-PCR.

Traitement des VIC par le TGF-β₂

Des VIC provenant de 4 valves mitrales saines et 4 valves myxoïdes ont été cultivées en plaques 6 puits puis cultivées dans de l'EBM-10%FBS jusqu'à subconfluence. Après privation de sérum pendant 12h, le traitement par le TGF-β₂ (0,5ng/ml) (T2812, Sigma) a été réalisé pendant 1h ou 48h afin d'analyser respectivement la phosphorylation de smad2 ou l'expression d'ADAMTS-1 et des MT1/2.

Stimulation mécanique dans le Flexercell

Des VIC provenant de valves saines ont étéensemencées, à raison de 6 à 8.10^4 cellules par puit, sur des membranes de silicone recouvertes d'un film de collagène de type I (BioFlex), qui sont ensuite placées sur un appareillage Flexercell FX 4000T (Figure 28A). Ce système crée une pression négative qui provoque l'étirement de la membrane sur un plot central fixe induisant ainsi une déformation biaxiale qui peut aller jusqu'à 30% de la surface initiale. Des VICensemencées sur des membranes identiques mais non stimulées mécaniquement sont utilisées comme contrôle. Dans le cadre de cette étude, des déformations biaxiales de 10% ou 15% d'élongation ont été appliquées de manière cyclique à une fréquence de 1.16Hz pendant 24h et 48h. Au terme de l'expérience, l'ARN a été extrait et l'expression de l'ADAMTS-1, des MT1/2, du TGF- β 2, de l' α -SMA et du CTGF a été analysée par RT-PCR.

Traitement des VIC par un inhibiteur de la PI3K

Des VIC provenant de valves mitrales saines ont été cultivées en plaques 6 puits jusqu'à subconfluence avant d'être privées de sérum durant 12h puis traitées par un inhibiteur de la PI3K, le LY294002 (50 μ M) (9901S, Cell Signaling). Les protéines et l'ARN ont été extraits après 24h de traitement par l'inhibiteur pour analyser l'expression des MT1/2 et la phosphorylation d'Akt

Analyse statistique

Le U test de Mann-Whitney a été utilisé pour évaluer la signification statistique . des données n'ayant pas une distribution gaussienne. Les valeurs présentant une distribution normale ont été analysées avec un t-test de Student.

Résultats

Réponse au cadmium des VIC de valves normales et myxoïdes

Une réduction d'expression des MT1/2 dans les cellules musculaires lisses issues d'anévrismes d'aorte ascendante de patients présentant une valve aortique bicuspidé avait été associée à une réponse affaiblie au stress oxydant par comparaison aux cellules d'aorte contrôles¹⁵³. Les métallothionéines possèdent une affinité plus importante pour les métaux lourds que pour le Zn^{2+} auquel elles sont physiologiquement associées. La

présence de Cd^{2+} provoque la libération du Zn^{2+} qui permet l'activation du facteur de transcription MTF-1 qui, à son tour, stimule l'expression des MT1/2. Le cadmium induit, par ailleurs, la production de radicaux libres et provoque donc, de manière indirecte, un stress oxydant.

L'analyse de l'expression basale des trois isoformes des MT1/2 dans les cultures de VIC saines ou pathologiques révèle une certaine hétérogénéité inter-individuelle, ce qui est attendu dans une population humaine. Contrairement à ce que nous avons observé dans les tissus, il n'existe pas de différence de niveau d'expression entre les cultures provenant de valves saines et pathologiques, suggérant la perte d'une régulation environnementale en culture (Figure 26A). La présence de Cd^{2+} stimule fortement l'expression des MT1/2 de façon similaire dans les cultures de VIC saines et pathologiques, suggérant que la machinerie de régulation transcriptionnelle de MTF1 n'est pas altérée dans les cellules pathologiques (Figure 26B).

Réponse des VIC de valves normales et myxoïdes au TGF- β 2

Nos résultats suggèrent que les métallothionéines exerceraient une régulation négative sur TGF- β 2. Réciproquement, il a été démontré que le TGF- β 1 pouvait induire l'expression des métallothionéines dans les cellules endothéliales et les hépatocytes^{166, 167}. Une réponse inadéquate au TGF- β 2 pourrait être également un facteur significatif dans le développement de la pathologie mitrale. L'effet du TGF- β 2 a donc été évalué sur des VIC provenant de tissus valvulaires pathologiques (n=4) ou sains (n=4). Aucune phosphorylation de smad2 n'est observée dans les VIC non traitées, qu'elles proviennent de valves saines ou myxoïdes (Figure 27A). La stimulation par le TGF- β 2 induit une réponse similaire dans les deux types de cellules en termes de phosphorylation de smad-2 (Figure 27A) et de répression de l'ADAMTS-1 (Figure 27B). Le TGF- β 2 induit une surexpression de MT-2A et, à un moindre niveau, de MT-1E, l'expression de MT-1X n'étant pas modifiée. Les facteurs d'induction sont toutefois équivalents pour les VIC saines et pathologiques.

Ces résultats indiquent que les VIC provenant de valves myxoïdes répondent au TGF- β 2 de façon similaire aux cellules de valves saines.

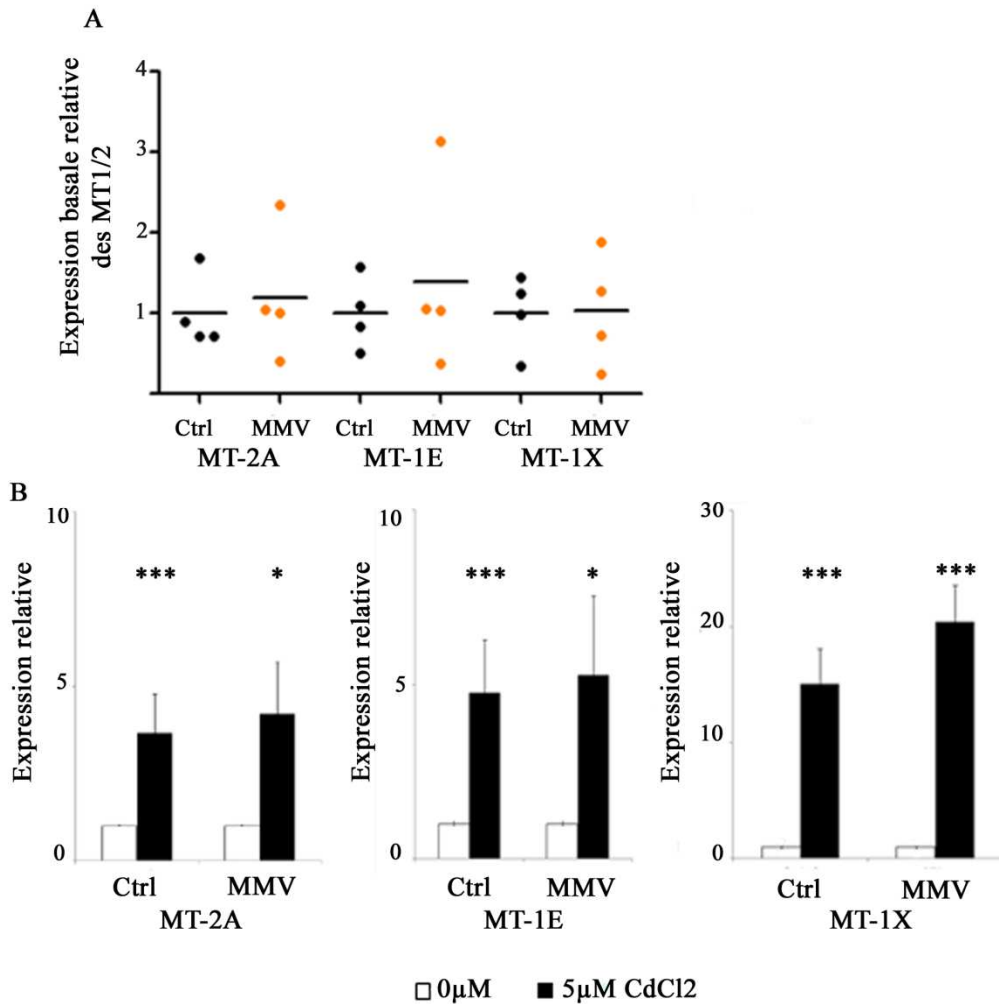


Figure 26: Expression basale des MT1/2 et induction par le Cd²⁺ **A:** Niveau d'expression basale de MT-2A, MT-1E et MT-1X, analysé par RT-PCR, dans des cultures de VIC provenant de valves mitrales saines (Ctrl, n=4) et myxoïdes (MMV, n=4). Les résultats sont présentés en nuage de points et la moyenne d'expression est représentée par la barre horizontale par rapport à la moyenne d'expression dans les cultures de VIC saines mise à 1. $p > 0.05$ déterminé par le U test de Mann-Whitney. **B:** Les VIC saines (Ctrl) et pathologiques (MMV) ont été incubées dans du milieu contrôle (0µM, rectangle blanc) ou contenant 5µM de CdCl₂ (rectangle noir). Après 24h de traitement, le niveau d'expression des 3 isoformes est analysé par RT-PCR et représenté par la moyenne du facteur d'induction ± écart-type par rapport aux cellules non traitées (0µM CdCl₂). * $p < 0.05$ et *** $p < 0.001$ déterminé par un t-test de Student apparié. Les facteurs d'induction entre les cultures de VIC saines et myxoïdes ne sont pas significativement différents (t-test de Student).

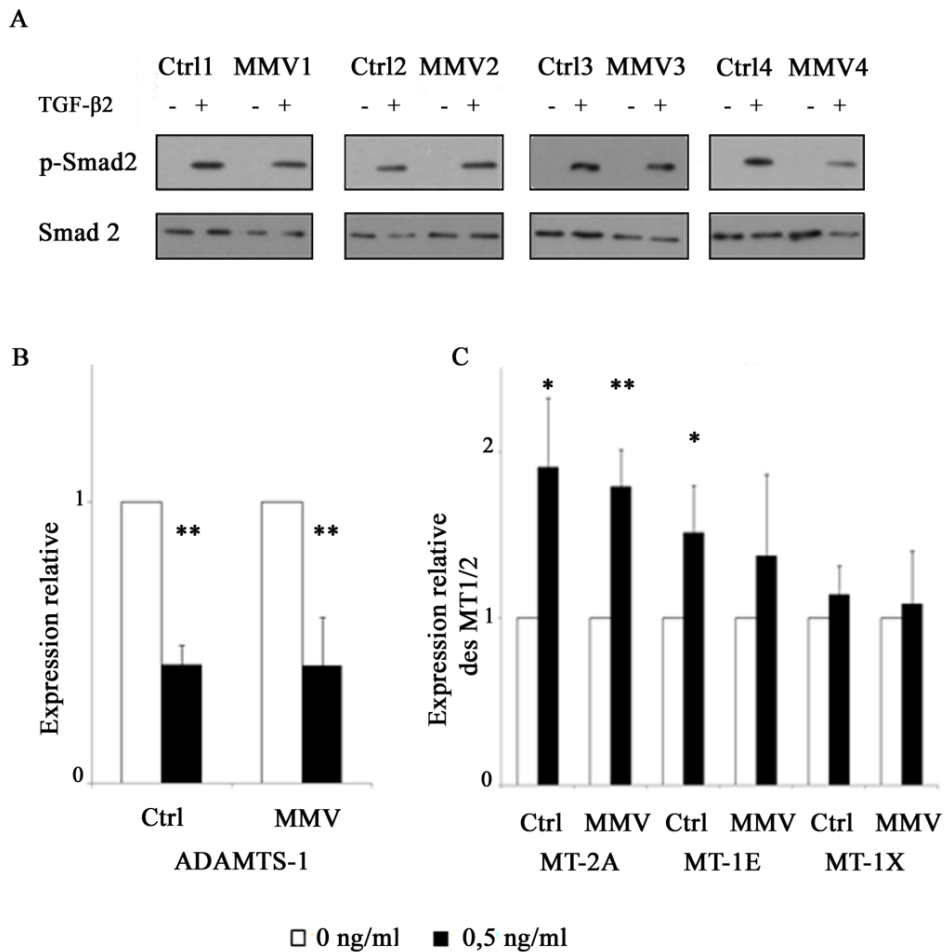


Figure 27: Réponse des VIC saines et myxoïdes au TGF- β 2. Des VIC provenant de valves saines (Ctrl, n=4) et de valves myxoïdes (MMV, n=4) ont été cultivées en conditions contrôle (-) ou traitées par TGF- β 2 (+, 0,5ng/ml). **A:** Après 1h de stimulation, la phosphorylation de smad2 est similaire dans les VIC normales et pathologiques. **B:** Après 48h de stimulation, l'expression d'ADAMTS-1 et des MT-2A, MT-1E et MT-1X est analysée par RT-PCR et représentée par la moyenne du facteur d'induction \pm écart-type (rectangle noir) par rapport à l'expression au sein des cellules non traitées (0ng/ml). * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ déterminé par un t-test de Student apparié. Les facteurs d'induction entre les cultures de VIC saines et myxoïdes ne sont pas significativement différents (t-test de Student).

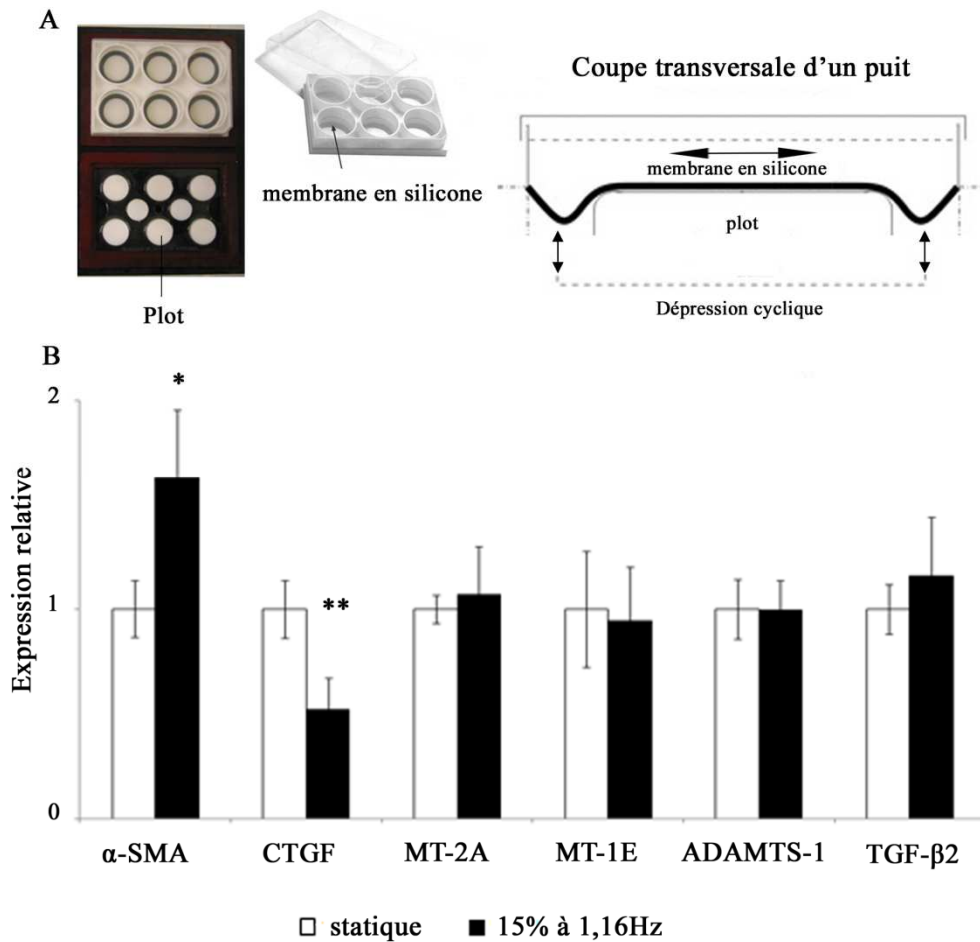


Figure 28: Effet de forces de traction cycliques. **A:** Les VIC provenant de valves saines ont étéensemencées dans des plaques de culture contenant 6 puits individuels dont le fond est constitué d'une membrane élastique en silicone recouverte d'un film de collagène de type I. Une fois les cellules parvenues au niveau de confluence requis, les plaques sont déposées dans l'appareillage de manière à ce que le fond des puits soit au contact de plots fixes. Après ajustement d'un couvercle hermétiquement fermé, la dépression cyclique appliquée dans la partie inférieure de l'appareillage, grâce à une pompe à vide, provoque l'aspiration de la membrane autour du plot fixe induisant une déformation biaxiale de la membrane. **B:** Une traction biaxiale de 15% a été appliquée pendant 48h avec une fréquence de 80 cycles/minute. L'expression d' α -SMA, de CTGF, de MT-2A, MT-1E, ADAMTS-1 et TGF- β 2 a été analysée par RT-PCR et exprimée par rapport à celle des mêmes cellules maintenues en condition statique. Les résultats sont représentés par la moyenne du facteur d'induction \pm écart-type. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ déterminée par un t-test de Student

Effet de forces de traction biaxiales cycliques sur l'expression des métallothionéines

Comme nous l'avons exposé dans l'introduction générale, l'implication directe des forces mécaniques dans l'homéostasie et la dégénérescence des valves mitrales n'a pas encore, à ce jour, été formellement démontrée. De nombreuses études le suggèrent toutefois fortement et montrent notamment leur influence sur le phénotype des VIC *in vitro*. Par ailleurs une modulation d'expression des métallothionéines par les contraintes mécaniques a été montrée dans d'autres types cellulaires^{168, 169}. Le modèle utilisé dans notre étude (Figure 28A) permet de soumettre des cellules ensemencées sur une membrane élastique à des élongations biaxiales cycliques dont l'amplitude et la fréquence sont contrôlées par ordinateur. Des déformations de 10% ont été réalisées sur des VIC pendant 24 ou 48h, à une fréquence de 1.16Hz, proche du rythme cardiaque. Aucune modification de l'expression des MT1/2 et de l'ADAMTS-1 n'a été observée (non montré). Pour des élongations de 15% appliquées à la même fréquence durant 48h, l'expression de l' α -SMA est stimulée alors que celle du CTGF est réduite, ce qui atteste de la réceptivité des VIC aux forces mécaniques. Aucune modulation de l'expression d'ADAMTS-1, de MT-2A, de MT-1E ou de TGF- β 2 n'a toutefois été mesurée dans ces conditions (Figure 28B).

Modulation des métallothionéines par la voie PI3K/Akt

Nous avons mis en évidence, au sein des valves myxoïdes des modifications de l'expression d'un réseau de gènes suggérant l'inactivation des facteurs de transcription FoxO (Figure 29A). Certains de ces gènes (GADD45a, GADD45b, CDK1, CDKN1A, CDKN1C et CCND2) codent pour des protéines impliquées notamment dans la régulation du cycle cellulaire. Les facteurs de transcription FoxO sont désactivés par la kinase Akt qui, en les phosphorylant, induit leur exportation nucléaire et inhibe leur activité transcriptionnelle (Figure 29B)¹⁷⁰. L'hypothèse d'une activation de la voie PI3K/Akt, connue par ailleurs pour réguler les métallothionéines¹⁷¹, dans la pathologie mitrale pourrait être invoquée. Afin de tester cette hypothèse, un inhibiteur spécifique de la PI3K (LY294002) a été utilisé dans des cultures de VIC saines. L'efficacité de cet inhibiteur est démontré par la suppression de la phosphorylation d'Akt (Figure 29C) qui s'accompagne d'un accroissement très significatif de l'expression des MT1/2 (Figure

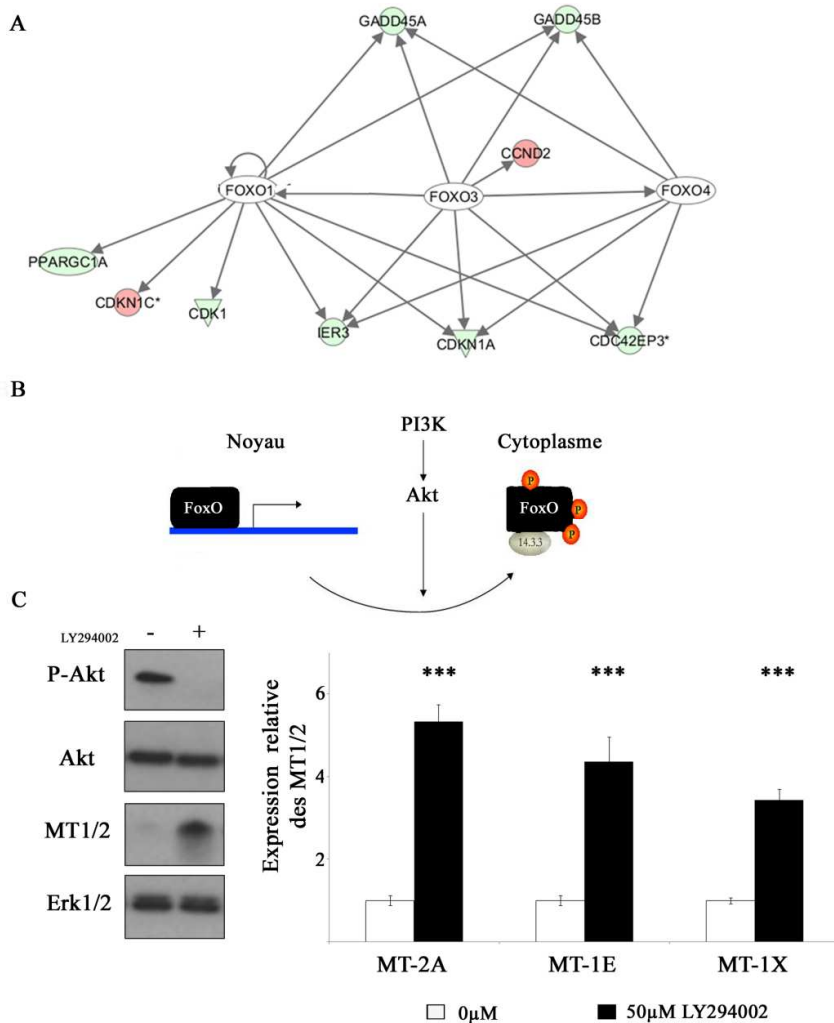


Figure 29: Influence de la voie PI3K/Akt sur l'expression des MT1/2. **A:** L'analyse par microarray du transcriptome de valves myxoides et de valves saines suggère que, au sein des tissus pathologiques, l'inhibition (en vert) et la stimulation (en rouge) de l'expression d'une série de gènes pourraient résulter de l'inactivation de facteurs de transcription FoxO. **B:** La phosphorylation des facteurs FoxO par Akt provoque leur sortie du noyau et inhibe ainsi leur activité transcriptionnelle. **C:** Des VIC normales ont été traitées ou non pendant 24h avec un inhibiteur de la PI3K (LY294002:50µM). La phosphorylation d'Akt et l'expression des MT1/2 ont été analysées par western blotting. Les mesures de Erk1/2 et Akt totaux sont utilisées comme contrôles. **D:** Analyse de l'expression de trois isoformes des MT1/2 après 24h de traitement avec le LY294002 (50µM) exprimée par rapport à l'expression mesurée des cellules non traitées. Les résultats sont présentés comme la moyenne ± écart-type. ***p<0.001 déterminé par un t-test de Student.

29C). Ce résultat a été confirmé, par RT-PCR, au niveau de l'expression de chacune des trois isoformes, MT-2A, MT-1E et MT-1X (Figure 29C).

Conclusions

Une activation de la transcription des métallothionéines est observée, en accord avec la littérature, lorsque les VIC sont mises en présence de métaux lourds et soumises au stress oxydant qu'ils génèrent. Nous montrons ici que le TGF- β 2, à l'instar du TGF- β 1, est également capable de stimuler leur expression. La similitude de réponse des VIC provenant de valves myxoïdes et de valves saines suggère que la machinerie de régulation transcriptionnelle des MT1/2 est fonctionnelle dans les VIC myxoïdes et que la réduction d'expression observée dans le tissu ne dépendrait pas de facteurs génétiquement déterminés. La différence du niveau d'expression des MT1/2 observée entre les tissus valvulaires myxoïdes et sains n'est plus en effet observée dans les cellules en culture suggérant qu'un système de régulation provenant de leur environnement tissulaire, chimique ou mécanique, serait à l'origine de leur répression. L'absence de modulation des MT1/2 par un stress mécanique cyclique alors que d'autres gènes comme l' α -SMA et CTGF sont effectivement régulés semble écarter l'aspect mécanique comme élément régulateur de leur expression. Ces travaux sont toutefois préliminaires et tant le type de stimulation mécanique utilisé dans notre modèle que sa durée s'écartent significativement des conditions rencontrées *in vivo*, ce qui ne permet aucune conclusion définitive. Une hypothèse initialement soulevée par l'analyse du microarray serait une activation de la voie PI3K/Akt dans les tissus pathologiques qui conduirait à une inactivation des facteurs de transcription FoxO et aurait pour conséquence la répression d'expression des MT1/2. Cette dernière proposition nécessite de nombreuses confirmations tant au niveau tissulaire que mécanistique afin de déterminer quels sont les différents acteurs impliqués, leurs interactions et leur intérêt potentiel en tant que cible thérapeutique.

RESULTATS : PARTIE III

Publication 3 : Pathogenic mechanisms in human myxomatous mitral valve : lessons from past and novel data

Alexia Hulin, Christophe F. Deroanne, Charles A. Lambert, Jean-Olivier Defraigne, Betty V. Nusgens, Marc A. Radermecker, and Alain Colige.

Manuscrit en voie de soumission

Review Article

Pathogenic mechanisms in human myxomatous mitral valve : lessons from past and novel data

Alexia Hulin^{a,*}, Christophe Deroanne^a, Charles Lambert^a, Jean-Olivier Defraigne^b, Betty Nusgens^a, Marc Radermecker^{b,f}, and Alain Colige^{a,f}.

^aLaboratory of Connective Tissues Biology, GIGA, University of Liège, Belgium

^bDepartment of Cardiovascular and Thoracic Surgery, CHU Sart Tilman, University of Liège, Belgium.

Abstract

Myxomatous mitral valve (MMV) is one of the most common heart valves diseases and has been well characterized at a functional and morphological level. Diseased valves are thickened as a result of an extracellular matrix remodeling and proteoglycans accumulation. Disruption of the stratified structures of the leaflets is also observed. Pathogenic mechanisms involved in the development of the idiopathic form of the disease has been elusive for many years. Recently emerging studies using microarray analysis have highlighted the potential role of apparently unrelated molecules in MMV such as members of the TGF- β superfamily, aggrecanases of the ADAMTS family and antioxidant molecules. In order to gain insights into pathogenic mechanisms of the disease, we integrate, in this review, recent transcriptomic data, from our laboratory (unpublished data and [1]) and from Sainger *et al* [2], with existing literature and information issued from the study of monogenic syndromes and animal models.

Introduction

Myxomatous mitral valve (MMV) is characterized by an altered architectural organization of the leaflets with disruption of the three-laminar stratification and abnormal accumulation of elastin and collagen that appear as fragmented and disorganized fibers. Another cardinal feature is an excessive deposition of poorly organized proteoglycans mainly in the spongiosa [3]. This extracellular matrix (ECM) remodelling progressively results in thickening of one or both leaflets, the posterior segment being the most frequently affected. They become floppy with excessive redundant tissue. As it is further coupled to a weakening or rupture of the chordae tendinae, this causes a prolapse of mitral leaflet(s) into the left atrium during systole, which progressively leads to an incomplete closure of the valve and, ultimately, to mitral regurgitation and cardiac insufficiency.

The prevalence of mitral valve prolapse is estimated at 2 to 3 % of the general population and increases with age [4, 5].

Although MMV disease is the most frequent cause of non-ischaemic mitral regurgitation in the industrialized countries, effective pharmacological treatment preventing or reducing its progression is currently not available. This might be related to the sparsity of dedicated studies that address the cellular alterations and molecular mechanisms regulating the different phases of the myxomatous degeneration development and worsening [6]. Available data in the literature suggest that cells that reside within the valve, collectively called valvular interstitial cells (VICs), might be the key actors. VICs include cells displaying phenotypic features of fibroblasts, myofibroblasts, smooth muscle cells and progenitors and exchange information with the endothelial layer covering the valvular tissue. VICs are involved in the house-keeping of the valve leaflets and the turnover of the extracellular matrix to maintain their mechanical competence and function. Upon changes in the physical and/or chemical environment, VICs acquire features of activated myofibroblasts, proliferate, and produce increased amounts of collagens, proteoglycans and MMPs, which are most likely responsible for the remodelling of collagen and elastic fibers [7]. Moreover, human MMV is also associated with the acquisition by valvular cells of a cartilaginous phenotype [8]. Until now, no molecular mechanism was proposed to explain this modification of the VIC phenotype. Recently, we

^f Equally promoted the work

* Corresponding Author: Alexia Hulin : Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA-Cancer, University of Liège, Tour de Pathologie, B23/3, B-4000 Sart-Tilman, Belgium. Email: ahulin@ulg.ac.be

and another research group used global transcriptomic analysis as a start-up to investigate potential pathogenic mechanisms in human idiopathic myxomatous mitral valve. These prospective analyses have identified members of the TGF- β superfamily, ADAMTS and a weakening of the protection against oxidative stress as potential key phases in MMV [1, 2]. This article reviews the current knowledge about molecular mechanisms involved in MMV and outlines some promising perspectives in the light of these results.

TGF- β superfamily

In mammals, the TGF- β superfamily comprises thirty three members including the three archetypal TGF- β isoforms (TGF- β 1, 2 and 3) and twenty proteins of the bone morphogenetic sub-family (BMPs). All TGF- β superfamily ligands elicit their cellular effects by binding to a complex of type II and type I serine/threonine kinase transmembrane receptors, sometimes in conjunction with either the type III receptor (TGF β R3/betaglycan) or endoglin acting as facilitating co-receptors. Five type II receptors and seven type I receptors, also termed activin receptor-like kinases (ALKs), are expressed in mammals. TGF- β signals in most cells via TGF- β receptor type II (TGF β RII) and ALK5 while BMPs signaling is mediated through BMP type II receptor (BMPRII) and ALK1, 2, 3 ou 6. Upon TGF- β binding and activation of its signaling receptor, Smad2 and 3 are phosphorylated, associate with Smad4 and translocate to the nucleus to operate transcriptional activity. The signaling of BMPs is mediated through phosphorylation of Smad1, 5 and 8 [9]. In addition of this canonical pathway, TGF- β signals also through several Smad-independent cascades such as calcium-calceineurin and MAPK pathways. Two almost simultaneous transcriptomic studies comparing myxomatous and control mitral valves revealed, for the first time, an increased expression of TGF- β 2 and BMP4 in human MMV. Their significance in the mitral valve disease was further demonstrated by investigating the effect of these growth factors on VIC *in vitro* [1, 2].

TGF- β 2

The lesson learned from heritable connective tissue disorders was that MMV might be associated with a dysregulation of TGF- β signaling. Indeed, MMV was observed in a few

monogenic connective tissue disorders such as Loews-Dietz syndrome caused by excessive TGF- β signaling resulting from activating mutations in TGF β RI or II[10]. Mutations in ADAMTSL2 cause a rare autosomal recessive disorder called geleophysic dysplasia. Affected patients present dilatation and thickening of heart valves and the mutated fibroblasts are characterized by an increased in total and active TGF- β 1 [11]. Due to its interaction with LTBP1 and fibrillin-1 (fbn1), the molecular consequence of ADAMTSL2 mutations is an alteration of microfibrils which, in turn, interferes with TGF- β sequestration[12]. Abnormal valves are also frequently observed in patients with Marfan syndrome. This dominant heritable disease is caused by mutations affecting the fbn1, resulting as for geleophysic dysplasia, in activation of TGF- β signaling. MMV is also observed in homozygous and heterozygous mice with a fully expressed missense mutation in *Fbn1*[13]. An efficient treatment of these mice was obtained with a TGF- β neutralizing antibody [13] or with losartan, a selective angiotensin II type 1 receptor (AT1) antagonist that interacts with TGF- β signaling [14], further supporting the involvement of excessive TGF- β signaling in MMV. While one single study showed a high expression of TGF- β 1 and TGF- β 3 in canine myxomatous mitral valve [15], no study had shown so far an association between TGF- β dysregulation and idiopathic MMV in humans. We recently demonstrated that TGF- β 2 is expressed at a higher level in MMV (Table1) and is also deposited, in some patients, in the extracellular matrix. Most interestingly, TGF- β 2 level was correlated by an the leaflet thickness suggesting its implication during the progression of the disease [1]. An increased expression of LTBP-4, a protein forming and stabilizing latent TGF- β complexes and acting as local regulator of TGF- β activation[16] was also evidenced in MMV. Upon treatment with TGF- β 2, a significant percentage of VICs in culture acquired a myofibroblastic phenotype accompanied by an excessive accumulation of versican, a constant feature of MMV tissues. At the light of this finding, it is worthnoting that elevated TGF- β 2 was reported in the mitral valves of fbn1-deficient mice [13] and the aorta of Marfan syndrome patients [17].

Valvulogenesis is initiated by an endothelial-mesenchymal transformation (EMT) that forms the endocardial cushions. These valvular primordia then further develop into mature structures through valve remodeling. Data

collected using both *in vitro* and *in vivo* models show that TGF- β 2 is an important player in heart valve formation. It is highly expressed in cushion mesenchyme throughout valve development whereas TGF- β 3 expression occurs only during the last stages and TGF- β 1 is only weakly expressed [18]. Out of the three TGF- β isoforms deficient mice, only *tgfb2*^{-/-} mice exhibited abnormal EMT and enlarged valves besides other congenital cardiovascular malformations. Collectively, these data indicate that TGF- β 2 is the major isoform that mediates EMT by regulating both its initiation and cessation stages [19, 20]. Further analyses of the *tgfb2*^{-/-} mice revealed that TGF- β 2 promotes also valve remodeling, is required for ECM organization and represses the differentiation of the cushion mesenchyme into cartilage cell lineage during heart valve development. The remodeling cushions of *tgfb2*^{-/-} mice are notably characterized by a decreased expression of CD34, a marker expressed on most immature progenitors and stem cells of the hematopoietic system [21]. Its expression is modulated during differentiation and progenitors gradually lose CD34 positivity when entering any specific differentiation lineage [22]. The positive regulation operated by TGF- β 2 on CD34 expression is suspected on the basis of the up-regulation of CD34 by TGF- β 1 to maintain cells in an immature hematopoietic stage [23]. Interestingly, CD34 expression seems slightly higher in MMV tissues than in control samples (Table 1). This needs to be confirmed on a larger number of patients but is consistent with a study reporting an increased density of CD34+ fibrocytes in human MMV [24]. In view of all these convergent data it is clear that the relationship between TGF- β 2 and the differentiation of valvular cells in MMV would be worth to be further investigated.

BMP

Recent studies have demonstrated the existence of shared or similar regulatory pathways operating during heart valve formation and development of cartilage, tendon, and even bone [25]. Pathologic processes that mimic osteogenesis and chondrogenesis have been observed respectively in degenerative aortic and mitral valve diseases [26]. These processes involve the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (Lrp5), an important receptor in the activation of bone formation by binding the secreted glycoprotein Wnt. MMV does not display a full osteoblastic

phenotype, but an early cartilage phenotype with positive Alcian blue staining and Sox9 expression [8]. This was further confirmed by Sainger *et al* who showed an overexpression of Sox9 and the cartilaginous glycoproteins COMP and CRTAC1 in MMV (Table1) [2]. As their microarray analyses highlighted an increased BMP4 expression in MMV, they suggest that BMP4 could be a major inducer of the phenotypic activation of VIC without osteogenic differentiation since osteogenic markers such as Runx2, osteopontin and osterix were not expressed in MMV and not induced in BMP4-treated myxomatous VICs [2]. In agreement with these data, we found a decreased expression of osteopontin (Spp1) (Table1). This could be related to the increased expression of Sox9, a factor able to act as a transcriptional repressor of osteopontin expression and bone formation. Sox9 could therefore favor the cartilage phenotype characteristic of MMV [27]. Although an increased BMP2, BMP4 and BMP6 expression as well as phosphorylation of smad1, 5, 8 have been reported in calcific aortic valve diseases [28, 29], this was the first time that BMPs were associated with human MMV, a role that is reinforced by their upregulation in the mouse model of Marfan [13].

Similarly to TGF- β , BMPs have been investigated during development and emerged as key factors in heart valve formation and morphogenesis [30, 31]. BMP4 is important in the local proliferation and migration of cardiac neural crest cells and therefore for outflow tract valve development [32, 33]. It does not seem to be required for the initiation of endocardial cushions formation, but it regulates the proliferation of atrioventricular cushion mesenchyme [34]. BMP2 appears as one of the major myocardium-derived inductive molecule able to regulate EMT, partly through the stimulation of TGF- β 2 expression [35, 36]. Surprisingly, however, periostin, which is a common target gene of TGF- β and BMP, does not seem to be significantly altered in human MMV. This shows that the tissue context and the regulatory pathways operating in valves would deserve further characterizations.

Gene		Fold change (MMV vs control)	
		[1]	[2]
CD34	CD34 molecule		1.7
<i>Extracellular matrix</i>			
TGF-β2	Transforming growth factor beta 2	1.7	
LTBP4	Latent transforming growth factor beta binding protein 4		2.6 8.0
BMP4	Bone morphogenetic protein 4		2.3 8.0
Sox9	SRY (sex determining region Y)-box 9		1.4 6.0
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein		6.7
CRTAC1	Cartilage acidic protein 1		21
SPP1	Osteopontin	-3.3	
BGN	Biglycan		4.1
DCN	Decorin		2.1
VSCN	Versican		3.0
XYLT-1	Xylosyltransferase I		1.6
ADAMTS-1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	-2.5	
ADAMTS-5	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5	-3.3	
ADAMTS-9	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9	-2.0	
<i>Antioxidant system</i>			
MT1E	metallothionein 1E	-3.2	
MT1F	metallothionein 1F	-5.7	
MT1G	metallothionein 1G	-4.6	
MT1M	metallothionein 1M	-6.5	
MT1P2	metallothionein 1 pseudogene 2	-3.3	
MT1X	metallothionein 1X	-4.6	
MT2A	metallothionein 2A	-3.2	
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1		-2.0
SOD2	superoxide dismutase 2	-4.9	
GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)	-2.3	
TXN	Thioredoxin		-1.7

Table 1: Results of microarray analysis of myxomatous mitral valve (MMV) and control mitral valve (control). Our transcriptomic data (published [1] and unpublished*) and those published by Sainger *et al* [2] obtained by microarray analysis comparing human P2 segment of posterior leaflet of myxomatous mitral valves and healthy P2 segments.

Proteoglycans and ADAMTS

Versican, a major hyaluronan-binding proteoglycan playing a crucial role in the regulation of cardiovascular cells, but also biglycan and decorin are more abundant in myxomatous leaflets than in normal valves [3]. This accumulation could result from an increased synthesis as suggested by the higher expression of the core protein mRNA detected by Sainger *et al* in their microarray analysis (Table1) [2]. In agreement with this possibility, we showed indeed a slight increase of xylosyltransferase I (XYLT-1) (Table1), the enzyme that initiates the binding of the first sugar residue of the polysaccharide side chain to the core protein. Surprisingly, however, we did not detect any significant increase in

versican, biglycan or decorin expression, suggesting that, at least in some conditions, the excessive accumulation of proteoglycans could also depend on a reduced degradation. This is a relevant alternative since we observed a decreased expression of ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5 and ADAMTS-9 in MMV (Table1) [1]. These ADAMTS ("a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats I") are metalloproteinases belonging to the adamalysins family and function as proteoglycanases, one of their recognized substrate being versican. During development, ADAMTS-1 is expressed in the atrioventricular cushion and overlaps with versican and its cleavage product [37]. Alteration of versican proteolysis is at the origin of valvular development anomalies as suggested by the occurrence of MMV in mouse models of ADAMTS-5 deficiency and ADAMTS-9 haploinsufficiency [38, 39]. Therefore versican accumulation in the MMV spongiosa, as we and others showed [1, 3], could result from its reduced degradation by aggrecanases.

In vitro treatment of VICs with TGF-β2, which is increased in human MMV, results in a decreased ADAMTS-1 and ADAMTS-5 expression and an enhanced accumulation of versican further suggesting a causal relationship between the activated TGF-β2 signaling, the reduced ADAMTS-1 and -5 levels and the abundance of versican in human MMV tissues. In turn, it would be worth to evaluate the effect of reduced versican proteolysis on TGF-β signaling as it was recently shown that increased pericellular versican in adams5^{-/-} fibroblasts affects the canonical TGF-β signaling pathway and the fibroblast-myofibroblast transition [40].

Oxidative stress

Reactive oxygen species (ROS) include hydroxyl radicals, superoxide anion, hydrogen peroxide and nitric oxide. They are produced during normal cellular functions and are very transient species due to their high chemical reactivity that leads to lipid peroxidation and oxidation of DNA and proteins. When ROS generation is increased and overcomes the cellular antioxidant mechanisms, cells experience oxidative stress [41]. In MMV, several protective pathways seem to be altered as we noticed a decreased expression of NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1), superoxide dismutase 2 (SOD2), glutaredoxin (GLRX), thioredoxin (TXN) and metallothioneins (MTs)

(Table1). Antioxidant enzymes can either directly decompose ROS or facilitate the antioxidant reactions. NQO1 has a antioxidant role by catalyzing the reduction of quinone and by scavenging superoxide [42]. GRLX and TXN are small oxidoreductases structurally similar. Their anti-oxidant function is mediated via their redox-active thiol groups [43]. SOD2 contains manganese in its active site and is located in the mitochondria. It converts free radical superoxide into peroxide. The reaction is mediated by successive oxidation and reduction of the transition metal ion at the active site [41]. MTs are small proteins rich in cysteine residues that confer antioxidant function [44]. They are involved in zinc homeostasis, but the full spectrum of their biological functions is not fully elucidated yet. Under hypoxia, oxidative stress, or metal exposure, MTs are transcriptionally activated upon nuclear translocation of the zinc finger factor MTF1 and its binding to the metal response elements (MREs) present in their promoters [45]. A key feature of our study was the demonstration of a direct relationship between several different types of actors involved in MMV[1]. By silencing the expression of MTs in VICs, an up-regulation of TGF- β 2, but not TGF- β 1 or -3, was induced, which, in turn, may be responsible for the down-regulation of ADAMTS-1 and -5 and the accumulation of versican as observed in human MMV. In agreement with these novel mechanisms, data from the literature show that a reduced expression of MTs caused by the loss of MTF1 is correlated to an increased expression and activation of TGF- β 1 and to an enhanced matrix deposition in tumours [46]. A low expression of MTs in the ascending aortic aneurysm in patients with bicuspid valve (BAV) is also thought to be associated with the remodelling of ECM [47]. Dysregulation of MTs expression is also expected to contribute to the inadequate response to oxidative stress observed in smooth muscle cells of BAV patients. Finally increased oxidative stress resulting from alteration in the antioxidant mechanisms is reported in calcified regions of stenotic aortic valves[48]. Although the balance between ROS and the protective mechanisms was never directly evaluated in human MMV, it could be a major factor for maintaining the abnormal extracellular matrix in MMV.

Gene		Fold change (MMV vs control)
<i>Muscle proteins</i>		
MYH6	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha	-1663
MYH7	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta	-10.6
TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)	-19.7
TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)	-42
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	-8.6
TPM2	tropomyosin 2 (beta)	-2.5
TPM3	tropomyosin 3	-2.1
DES	desmin	-9.2
SMTN	smoothelin	-1.6
ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle	-111
ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1	-45
ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, cardiac	-32
ACTN2	actinin, alpha 2	-64
MYH11	myosin, heavy chain 11, smooth muscle	-14
MYL2	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow	-147
MYL3	myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	-4.9
MYL4	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic	-17
MYL7	myosin, light chain 7, regulatory	-416
MYL9	myosin, light chain 9, regulatory	-2.3
MYLK	myosin, light chain kinase	-3.0
CKM	creatine kinase, muscle	-85
MYOM1	myomesin 1	-2.3
MYOM2	myomesin 2	-3.0
MYOZ1	myozenin 1	-3.0
MYOZ2	myozenin 2	-4.0
FLNC	filanin C, gamma	-3.2
TAGLN	transgelin	-1.8
NEBL	nebulin	-24
<i>Calcium binding proteins</i>		
CALM1	calmodulin 1	-1.6
S100A8	S100 calcium binding protein A8	-11
S100A9	S100 calcium binding protein A9	-4.3
TNNC1	troponin C type 1 (slow)	-74
CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle	-4.0
<i>Calcium homeostasis</i>		
CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)	-416
ATP2A2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, phospholamban	-2.6
PLN	phospholamban	-315
<i>Endothelin receptor</i>		
EDNRA	endothelin receptor type A	-4.6
<i>Serotonin signaling</i>		
HT2AR	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	3.3
TPH1	Tryptophan hydroxylase 1	3.0

Table 2: Results of microarray analysis of myxomatous mitral valve (MMV) and control mitral valve (control). Our unpublished transcriptomic data obtained by performing microarray analysis comparing human P2 segment of posterior leaflet of myxomatous mitral valves and healthy P2 segments.

Muscle structural proteins and calcium homeostasis

VICs have been shown to express a range of muscular structural proteins such as myosin heavy chain (MYH6 and MYH7) for example. They express also skeletal and cardiac muscle components of the troponin complex α and β - (troponin T, I and C : TNNT, TNNI and TNNC), as well as α and β tropomyosins (TPM1 and TPM2) [49-51]. The presence of these muscle markers suggests that normal valve leaflets possess the required machinery for contractile response in concordance with a previous work showing that endothelin-1 can stimulate heart valve leaflet contraction [49, 50]. *In vivo*, this mechanical function might participate to the maintenance of the leaflets tone. It could be due to the presence of contractile smooth muscle cells characterized by smoothelin expression at the atrialis side of mitral leaflets, especially in the anterior leaflets. Our transcriptomic data indicate that mechanical function might be strongly impaired in MMV since a large number of proteins forming the structural and contractile apparatus, as well as desmin and smoothelin are decreased (Table2). Not only the structural and contractile proteins are down-regulated but also calcium binding proteins and proteins involved in the translocation of calcium between sarcoplasmic reticulum lumen and cytosol (Table2). Finally the decreased endothelin receptor type A (EDNRA) expression is another feature that could participate to the alteration of the mechanical function (Table1). Whether these down-regulations are the cause or the consequence of the floppy movements of the leaflets and their prolapse remain to be understood but they most probably explain part of the functional deficiency of affected valves.

Serotonin signaling

Serotonin (5-HT) is able to exert a wide variety of biological effects by interacting with specific membrane-bound receptors (HTR). At least 13 distinct HTR have been cloned and characterized. With the exception of the HTR3, which is a transmitter-gated ion. HTR are members of the 7-transmembrane G protein-coupled receptors superfamily [52]. In our MMV patients, the expression of HTR2A, the most functionally active member of the HTR2 family in cultured aortic VIC [53] as well as the expression of an enzyme involved in the synthesis of serotonin, tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), were both

increased in MMV (Table2). This is in accordance with an increased concentration of TPH1 in canine and human myxomatous mitral valves [54] and the increased abundance of the HTR2B[55]. The hypothesis of an implication of 5-HT signaling in MMV is further strengthened by the occurrence of valvular heart disease in patients with elevated plasma 5-HT either upon administration of serotonergic drugs [56] or due to carcinoid heart disease [57, 58]. The causal implication of serotonin was even more directly demonstrated by the occurrence of valvulopathies in rats chronically injected with serotonin [59]. Additional data obtained in a model of cultured sheep mitral valve indicate that 5-HT can be produced locally in the tissue, in response to cyclic tensile strain and that it can regulate myofibroblastic activation and glycosaminoglycans synthesis [60].

Conclusions

The identification of MMV in patients with heritable connective tissue disorders and the use of transgenic mouse models have allowed the identification of key genes for valve development, homeostasis and function. Despite these advances, the mechanisms leading to the idiopathic form of myxomatous mitral valves are still poorly understood. Two global transcriptomic analyses were recently performed comparing healthy and diseased tissues. Members of the TGF- β superfamily were identified as likely central actors in MMV, which would reflect the pathological mechanisms altering valves in Marfan and Loeys-Dietz syndromes. It has to be noticed however that these two independent studies pointed to two different, although related factors TGF- β 2 or BMP4 that were increased in the two transcriptomic analyses. The implication of different factors of the same family and the expected induced regulation of similar, but not identical, signaling pathways would partly account for the phenotypic variations observed in patients with idiopathic myxomatous mitral valves. A major contribution of our study was the identification of a potential direct relationship between pathways that are altered in MMV although they were initially independent from each other: oxidative stress, TGF- β signaling, ADAMTS repression and versican accumulation. The loss of expression of muscle contractile protein in MMV is also an intriguing observation. Future studies will be required to determine

whether all these modifications are the causes or the consequences of a primary and still unidentified defect. Furthermore, a modulation of these pathways by mechanical stimuli is most likely and should be considered in future studies. It is clear however that these data bring more perspectives and improve the understanding of the pathogenic mechanisms in MMV that should help identifying relevant targets for future effective pharmacological treatments.

Bibliography

1 Hulin A, Deroanne CF, Lambert CA, Dumont B, Castronovo V, Defraigne JO, Nusgens BV, Radermecker MA and Colige AC. Metallothionein-dependent up-regulation of TGF-beta2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve. *Cardiovasc Res* 2012;**93**:480-9.

2 Sainger R, Grau JB, Brauchetti E, Poggio P, Seefried WF, Field BC, Acker MA, Gorman RC, Gorman JH, 3rd, Hargrove CW, 3rd, Bavaria JE and Ferrari G. Human myxomatous mitral valve prolapse: Role of bone morphogenetic protein 4 in valvular interstitial cell activation. *J Cell Physiol* 2012;**227**:2595-604.

3 Gupta V, Barzilla JE, Mendez JS, Stephens EH, Lee EL, Collard CD, Laucirica R, Weigel PH and Grande-Allen KJ. Abundance and location of proteoglycans and hyaluronan within normal and myxomatous mitral valves. *Cardiovasc Pathol* 2009;**18**:191-7.

4 Freed LA, Levy D, Levine RA, Larson MG, Evans JC, Fuller DL, Lehman B and Benjamin EJ. Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med* 1999;**341**:1-7.

5 d'Arcy JL, Prendergast BD, Chambers JB, Ray SG and Bridgewater B. Valvular heart disease: the next cardiac epidemic. *Heart* 2011;**97**:91-3.

6 Salihiyyah K, Yacoub MH and Chester AH. Cellular mechanisms in mitral valve disease. *J Cardiovasc Transl Res* 2011;**4**:702-9.

7 Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P and Schoen FJ. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation* 2001;**104**:2525-32.

8 Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH and Rajamannan NM. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol* 2006;**47**:1707-12.

9 Goumans MJ, Liu Z and ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 2009;**19**:116-27.

10 Judge DP, Rouf R, Habashi J and Dietz HC. Mitral valve disease in marfan syndrome and related disorders. *J Cardiovasc Transl Res* 2011;**4**:741-7.

11 Le Goff C, Morice-Picard F, Dagonneau N, Wang LW, Perrot C, Crow YJ, Bauer F, Flori E, Prost-Squarcioni C, Krakow D, Ge G, Greenspan DS, Bonnet D, Le Merrer M, Munnich A, Apte SS and

Cornier-Daire V. ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat Genet* 2008;**40**:1119-23.

12 Le Goff C and Cornier-Daire V. The ADAMTS(L) family and human genetic disorders. *Hum Mol Genet* 2011;**20**:R163-7.

13 Ng CM, Cheng A, Myers LA, Martinez-Murillo F, Jie C, Bedja D, Gabrielson KL, Hausladen JM, Mechem RP, Judge DP and Dietz HC. TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 2004;**114**:1586-92.

14 Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, Myers L, Klein EC, Liu G, Calvi C, Podowski M, Neptune ER, Halushka MK, Bedja D, Gabrielson K, Rifkin DB, Carta L, Ramirez F, Huso DL and Dietz HC. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 2006;**312**:117-21.

15 Aupperle H, Marz I, Thielebein J and Schoon HA. Expression of transforming growth factor-beta1, -beta2 and -beta3 in normal and diseased canine mitral valves. *J Comp Pathol* 2008;**139**:97-107.

16 Hyytiäinen M, Penttinen C and Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004;**41**:233-64.

17 Nataatmadja M, West J and West M. Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm. *Circulation* 2006;**114**:I371-7.

18 Camenisch TD, Molin DG, Person A, Runyan RB, Gittenberger-de Groot AC, McDonald JA and Klewer SE. Temporal and distinct TGFbeta ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis. *Dev Biol* 2002;**248**:170-81.

19 Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL and Doetschman T. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1997;**124**:2659-70.

20 Azhar M, Runyan RB, Gard C, Sanford LP, Miller ML, Andringa A, Pawlowski S, Rajan S and Doetschman T. Ligand-specific function of transforming growth factor beta in epithelial-mesenchymal transition in heart development. *Dev Dyn* 2009;**238**:431-42.

21 Azhar M, Brown K, Gard C, Chen H, Rajan S, Elliott DA, Stevens MV, Camenisch TD, Conway SJ and Doetschman T. Transforming growth factor Beta2 is required for valve remodeling during heart development. *Dev Dyn* 2011;**240**:2127-41.

22 Krause DS, Fackler MJ, Civin CI and May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;**87**:1-13.

23 Pierelli L, Marone M, Bonanno G, Rutella S, de Ritis D, Mancuso S, Leone G and Scambia G. Transforming growth factor-beta1 causes transcriptional activation of CD34 and preserves haematopoietic stem/progenitor cell activity. *Br J Haematol* 2002;**118**:627-37.

- 24 Barth PJ, Koster H and Moosdorf R. CD34+ fibrocytes in normal mitral valves and myxomatous mitral valve degeneration. *Pathol Res Pract* 2005;**201**:301-4.
- 25 Lincoln J, Lange AW and Yutzey KE. Hearts and bones: shared regulatory mechanisms in heart valve, cartilage, tendon, and bone development. *Dev Biol* 2006;**294**:292-302.
- 26 Loardi C, Alamanni F, Trezzi M, Kassem S, Cavallotti L, Tremoli E, Pacini D and Parolari A. Biology of mitral valve prolapse: The harvest is big, but the workers are few. *Int J Cardiol* 2010.
- 27 Peacock JD, Huk DJ, Ediriweera HN and Lincoln J. Sox9 transcriptionally represses Sppl to prevent matrix mineralization in maturing heart valves and chondrocytes. *PLoS One* 2011;**6**:e26769.
- 28 Mohler ER, 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG and Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001;**103**:1522-8.
- 29 Ankeny RF, Thourani VH, Weiss D, Vega JD, Taylor WR, Nerem RM and Jo H. Preferential activation of SMAD1/5/8 on the fibrosa endothelium in calcified human aortic valves--association with low BMP antagonists and SMAD6. *PLoS One* 2011;**6**:e20969.
- 30 Yamagishi T, Ando K and Nakamura H. Roles of TGFbeta and BMP during valvulo-septal endocardial cushion formation. *Anat Sci Int* 2009;**84**:77-87.
- 31 Conway SJ, Doetschman T and Azhar M. The inter-relationship of periostin, TGF beta, and BMP in heart valve development and valvular heart diseases. *ScientificWorldJournal* 2011;**11**:1509-24.
- 32 Liu W, Selever J, Wang D, Lu MF, Moses KA, Schwartz RJ and Martin JF. Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:4489-94.
- 33 McCulley DJ, Kang JO, Martin JF and Black BL. BMP4 is required in the anterior heart field and its derivatives for endocardial cushion remodeling, outflow tract septation, and semilunar valve development. *Dev Dyn* 2008;**237**:3200-9.
- 34 Jiao K, Kullessa H, Tompkins K, Zhou Y, Batts L, Baldwin HS and Hogan BL. An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes Dev* 2003;**17**:2362-7.
- 35 Ma L, Lu MF, Schwartz RJ and Martin JF. Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. *Development* 2005;**132**:5601-11.
- 36 Sugi Y, Yamamura H, Okagawa H and Markwald RR. Bone morphogenetic protein-2 can mediate myocardial regulation of atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in mice. *Dev Biol* 2004;**269**:505-18.
- 37 Kern CB, Iwal WO, Mjaatvedt CH, Fairey SE, Toole BP, Iruela-Arispe ML and Argraves WS. Proteolytic cleavage of versican during cardiac cushion morphogenesis. *Dev Dyn* 2006;**235**:2238-47.
- 38 Dupuis LE, McCulloch DR, McGarity JD, Bahan A, Wessels A, Weber D, Diminich AM, Nelson CM, Apte SS and Kern CB. Altered versican cleavage in ADAMTS5 deficient mice: a novel etiology of myxomatous valve disease. *Dev Biol* 2011;**357**:152-64.
- 39 Kern CB, Wessels A, McGarity J, Dixon LJ, Alston E, Argraves WS, Geeting D, Nelson CM, Menick DR and Apte SS. Reduced versican cleavage due to Adamts9 haploinsufficiency is associated with cardiac and aortic anomalies. *Matrix Biol* 2010;**29**:304-16.
- 40 Hattori N, Carrino DA, Lauer ME, Vasanji A, Wylie JD, Nelson CM and Apte SS. Pericellular versican regulates the fibroblast-myofibroblast transition: a role for ADAMTS5 protease-mediated proteolysis. *J Biol Chem* 2011;**286**:34298-310.
- 41 Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000;**153**:83-104.
- 42 Dinkova-Kostova AT and Talalay P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys* 2010;**501**:116-23.
- 43 Oh YK, Lee TB and Choi CH. Anti-oxidant adaptation in the AML cells supersensitive to hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**319**:41-5.
- 44 Xue W, Liu Q, Cai L, Wang Z and Feng W. Stable overexpression of human metallothionein-IIA in a heart-derived cell line confers oxidative protection. *Toxicol Lett* 2009;**188**:70-6.
- 45 Sutherland DE and Stillman MJ. The "magic numbers" of metallothionein. *Metallomics* 2011;**3**:444-63.
- 46 Haroon ZA, Amin K, Lichtlen P, Sato B, Huynh NT, Wang Z, Schaffner W and Murphy BJ. Loss of metal transcription factor-1 suppresses tumor growth through enhanced matrix deposition. *FASEB J* 2004;**18**:1176-84.
- 47 Phillippi JA, Klyachko EA, Kenny JPt, Eskay MA, Gorman RC and Gleason TG. Basal and oxidative stress-induced expression of metallothionein is decreased in ascending aortic aneurysms of bicuspid aortic valve patients. *Circulation* 2009;**119**:2498-506.
- 48 Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Pena-Silva R and Heistad DD. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol* 2008;**52**:843-50.
- 49 Brand NJ, Roy A, Hoare G, Chester A and Yacoub MH. Cultured interstitial cells from human heart valves express both specific skeletal muscle and non-muscle markers. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;**38**:30-42.
- 50 Chester AH and Taylor PM. Molecular and functional characteristics of heart-valve interstitial cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007;**362**:1437-43.
- 51 Roy A, Brand NJ and Yacoub MH. Molecular characterization of interstitial cells isolated from human heart valves. *J Heart Valve Dis* 2000;**9**:459-64; discussion 64-5.
- 52 Hoyer D, Hannon JP and Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;**71**:533-54.
- 53 Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S, McGonigle P, Levy RJ and

- Liang B. Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol* 2002;**161**:2209-18.
- 54 Disatian S, Lacerda C and Orton EC. Tryptophan hydroxylase 1 expression is increased in phenotype-altered canine and human degenerative myxomatous mitral valves. *J Heart Valve Dis* 2010;**19**:71-8.
- 55 Disatian S and Orton EC. Autocrine serotonin and transforming growth factor beta 1 signaling mediates spontaneous myxomatous mitral valve disease. *J Heart Valve Dis* 2009;**18**:44-51.
- 56 Rothman RB and Baumann MH. Serotonergic drugs and valvular heart disease. *Expert Opin Drug Saf* 2009;**8**:317-29.
- 57 Hutcheson JD, Setola V, Roth BL and Merryman WD. Serotonin receptors and heart valve disease--it was meant 2B. *Pharmacol Ther* 2011;**132**:146-57.
- 58 Robiolio PA, Rigolin VH, Wilson JS, Harrison JK, Sanders LL, Bashore TM and Feldman JM. Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* 1995;**92**:790-5.
- 59 Gustafsson BI, Tommeras K, Nordrum I, Loennechen JP, Brunsvik A, Solligard E, Fossmark R, Bakke I, Syversen U and Waldum H. Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation* 2005;**111**:1517-22.
- 60 Lacerda CM, Kisiday J, Johnson B and Orton EC. Local serotonin mediates cyclic strain-induced phenotype transformation, matrix degradation, and glycosaminoglycan synthesis in cultured sheep mitral valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012.

DISCUSSION GENERALE

La dégénérescence myxoïde de la valve mitrale (MMV) est une cause majeure d'insuffisance mitrale chez l'Homme. Cette pathologie dégénérative est actuellement considérée comme impliquant des mécanismes cellulaires, moléculaires et mécaniques contrôlant l'expression de molécules effectrices clé. L'ensemble conduit à une dérégulation de l'homéostasie de la matrice extracellulaire, qui impliquerait au premier plan les cellules valvulaires interstitielles (VIC), et une perte progressive des compétences mécaniques de la valve.

Sélection des patients

Les patients sélectionnés dans le cadre de cette étude présentaient une MMV uniquement au niveau du segment P2 avec rupture des cordages (feuillet "flail"). Les autres lésions valvulaires, y compris les formes familiales, ont été exclues par souci d'accroître l'homogénéité du groupe de patients. Les segments P2 du feuillet postérieur de la valve mitrale ont été débarrassés des cordages ou résidus de cordage dont les cellules présentent un phénotype plus proche de celui des ténocytes. Ces cordages ont été, pour la plupart, conservés à -80°C et pourraient être étudiés ultérieurement. Certaines études ont en effet montré un remodelage matriciel ¹⁷² et une néovascularisation à l'origine de leur rupture ¹⁷³. Bien que l'insuffisance mitrale puisse être diagnostiquée précocement, l'intervention chirurgicale ne se révèle nécessaire que lorsque la MMV devient symptomatique, ce qui peut prendre plusieurs années. Les tissus collectés correspondant dès lors à un état d'avancement tardif de la pathologie, il se révèle difficile de mettre en évidence les évènements déclencheurs. Par ailleurs, une conséquence de la régurgitation mitrale peut également se marquer, au cours du temps, par des altérations tissulaires comme cela a été observé dans un modèle ovin¹³⁴. Une meilleure compréhension de la progression de la pathologie a cependant été rendue possible par l'étude de la MMV qui se déclare spontanément chez le chien vieillissant. Les MMV canine et humaine partagent de nombreuses caractéristiques, suggérant une étiologie commune. Dans ce contexte, il est intéressant de noter qu'une analyse récente

réalisée chez le chien a comparé l'expression protéique globale au sein de valves mitrales saines et de tissus myxoïdes à des stades de dégénérescence précoces (épaisseur modérée sans rupture de cordages) ou avancés (fortement épaissis et ayant perdu l'attachement aux muscles papillaires). Sur base de cette étude, il semblerait que les modifications d'expression observées dans les étapes précoces de la maladie persistent dans les stades tardifs ¹⁷⁴. L'extension à l'Homme de cette persistance des altérations initiales est cependant difficilement vérifiable.

Le groupe de patients sains de notre étude était composé d'une plus grande proportion de femmes et était significativement plus jeune que l'ensemble des patients atteints de MMV. Cet échantillonnage nous a cependant semblé parfaitement adéquat. Aucun donneur ne souffrait de maladie cardiovasculaire diagnostiquée et les segments P2 utilisés comme contrôles ont été prélevés sur des cœurs récusés pour transplantation, après examen par un chirurgien cardiaque, en raison de la pratique d'une réanimation ou de la présence de contusions. Etant donné qu'aucun lien entre nos données, l'âge et le sexe n'a pu être mis en évidence, les légères différences démographiques entre le groupe contrôle et le groupe de patients MMV ne semblent donc pas porter à conséquence.

Les segments P2 ont été partagés en quatre bandes de tissu de 3-4mm de largeur jusqu'au bord libre du voile afin de tenir compte de l'hétérogénéité histologique valvulaire. Ces échantillons comparables ont servi à la mise en culture des cellules interstitielles (VIC) et à la réalisation des analyses histologiques, protéiques et transcriptomiques.

Isolement et caractérisation des cellules valvulaires interstitielles

Les VIC ont été isolées à partir de segments P2 de valves myxoïdes et saines par la technique dite "d'explants". Elle consiste à déposer dans une boîte de culture de très petits fragments de tissu prétraités par de la collagénase bactérienne afin de favoriser la migration des cellules hors des explants. Celles-ci pourront ensuite proliférer pour donner naissance aux collections de cultures qui ont été utilisées dans nos diverses expérimentations. Une des caractéristiques morphologiques assez unique de ces cellules, qu'elles soient originaires de valves saines ou pathologiques, est la formation de très

longues protrusions filopodiales établissant des interactions cellule-cellule, particulièrement développées en culture tri-dimensionnelle (données personnelles non publiée et ¹⁷⁵). Les VIC formant une population hétérogène, nous ne pouvons exclure que la technique de mise en culture n'induit une sélection d'une sous-population du tissu valvulaire provenant éventuellement plus spécifiquement d'une des trois couches du feuillet⁶⁰. Afin de remédier à ces biais éventuels de sélection et de limiter l'impact des variabilités inter-individuelles, nos expériences *in vitro* ont été réalisées sur des VIC provenant de plusieurs patients et dans la mesure du possible d'âges différents. Les écarts-types raisonnables dans les réponses de ces différentes souches cellulaires aux divers traitements *in vitro* semblent indiquer que les populations isolées se comportent de façon similaire.

L'expression des protéines du cytosquelette dans les cellules en culture a été comparée à celle des VIC dans le tissu valvulaire. En accord avec leur caractère mésenchymateux, toutes les cellules *in vitro* expriment la vimentine tandis que l' α -SMA n'est présente que dans une faible proportion des VIC isolées de valves saines (14±6 %). Cette proportion est largement inférieure à celle rapportée dans d'autres études portant également sur des VIC mitrales humaines ^{61, 176, 177} ou porcines ^{178, 179} où elle est de l'ordre de 60 à 70%. En accord avec la littérature, nous avons observé que, dans le tissu valvulaire sain, la majorité des VIC expriment également la vimentine. Seule une population réduite de cellules localisées au sein d'une fine couche tissulaire située juste en-dessous de l'endothélium dans l'atrialis, est positive pour l' α -SMA^{65, 175, 179}. Les caractéristiques que nous observons en culture semblent donc assez proche du phénotype des VIC dans le tissu. Par contre, nous n'observons pas dans les VIC isolées des feuillets myxoïdes l'accroissement d'expression d' α -SMA décrit dans le tissu pathologique par Rabkin ³³ et *in vitro* par certains auteurs¹⁸⁰. Nous avons personnellement remarqué que l'expression d' α -SMA est très facilement modulée par les conditions de culture (confluence, qualité de sérum,...) ce qui pourrait être à l'origine de ces divergences.

Pathogénie de la MMV

La biologie des valves cardiaques est un domaine de recherche qui a fortement évolué grâce à la mise au point et à l'utilisation *in vitro* des cultures des VIC, à l'étude approfondie de la valvulogénèse et au développement de nombreux modèles animaux ciblant la compréhension des mécanismes physiologiques et pathologiques déterminant la fonction valvulaire. Les études visant à créer des substituts de valves humaines par des techniques d'ingénierie tissulaire ont également contribué de manière significative à élargir ces connaissances. L'ensemble de ces approches a permis d'appréhender l'influence de la matrice extracellulaire et le rôle des VIC dans la fonction valvulaire et l'évolution des mécanismes pathogéniques associés⁴. Même si la valve aortique et sa sténose sont indéniablement les sujets les plus étudiés, ces dernières années ont vu un intérêt grandissant pour la biologie de la valve mitrale et de sa pathologie la plus répandue, la dégénérescence myxoïde.

Les feuillets myxoïdes épaissis ont d'abord été largement caractérisés par des techniques histochimiques et immunochimiques. Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, les feuillets myxoïdes sont le siège d'un remodelage matriciel caractérisé, entre autres, par un dépôt excessif de plusieurs protéoglycans. La décorine, colocalisée avec les fibres de collagène et connue pour contrôler la fibrillogenèse, s'accumule dans la fibrosa tandis que le biglycan, appartenant à la même famille des SLRPs, se retrouve également en abondance dans les régions riches en fibres élastiques (atrialis). Ces deux SLRPs pourraient ainsi participer à la désorganisation des fibres élastiques et du réseau fibrillaire de collagène⁷⁶. Le dépôt de versican est surtout localisé dans la spongiosa, riche en glycosaminoglycans⁸⁸. Ce remodelage matriciel a été attribué à une activation des VIC en myofibroblastes³³. D'autres auteurs ont proposé l'implication d'un processus d'ossification endochondrale caractérisé par l'expression d'un phénotype cartilagineux dans les valves mitrales myxoïdes et d'un phénotype osseux dans les valves aortiques⁶⁷. A ce jour, aucun mécanisme pathogénique sous-tendant ces altérations matricielles n'a toutefois été identifié.

Dans le but d'améliorer les connaissances de la dégénérescence myxoïde humaine, notre premier objectif a été d'établir une vue d'ensemble du profil transcriptionnel global au sein des tissus pathologiques et normaux. Cette analyse comparative a fait ressortir des données originales suggérant l'implication potentielle de plusieurs familles de protéines. Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la diminution d'expression des protéoglycanases en raison de l'accumulation anormale de protéoglycans dans le feuillet myxoïde et de l'intérêt de longue date que porte le LBTC à la famille des ADAMTS^{94, 181}. La suppression quasi totale de l'expression de tous les membres de la famille des métallothionéines et la parution dans une publication de l'implication de ces molécules dans les remodelages de l'aorte chez les patients porteurs d'une valve bicuspide a également orienté notre choix¹⁵³. D'autres modulations mériteraient cependant d'être étudiées sur un plus grand nombre de patients et évaluées dans le cadre du développement de la MMV. Ces résultats ont été intégrés avec les données transcriptomiques d'une publication récente¹⁸⁰ et ont fait l'objet d'une troisième publication, en voie de soumission (Publication n°3).

Les métallothionéines

Les métallothionéines sont des petites protéines riches en résidus cystéine. Elles se retrouvent impliquées dans de nombreux processus physiologiques parmi lesquels l'homéostasie des métaux, plus particulièrement du zinc, ainsi que la protection contre les métaux lourds et le stress oxydatif. Leur absence d'expression dans les feuillets myxoïdes combinée à la répression de la NADP(H) déshydrogénase quinone (NQO1), la superoxyde dismutase 2 (SOD2), la glutarédoxine (GLRX) et la thiorédoxine suggèrent une faiblesse de la protection contre les radicaux libres dans la MMV. En concordance avec nos résultats, la concentration plasmatique du malondialdéhyde chez les patients atteints de MMV est plus élevée que chez les sujets sains indiquant un stress oxydatif accru¹⁸² qui serait d'ailleurs corrélé à la sévérité de l'insuffisance mitrale¹⁸³. En dehors de l'étude d'Arocha *et al*¹⁸², ce mécanisme oxydatif et sa conséquence fonctionnelle restent cependant très peu évoqués dans la MMV humaine.

Les analyses transcriptomiques par microarray montraient que 6 gènes des sous-familles MT-1 et MT-2 (MT1/2) étaient largement sous-exprimés dans la MMV. Cette réduction a été confirmée, sur l'ensemble des patients, tant au niveau transcriptomique que protéique. Nous avons dès lors entrepris une série d'expériences *in vitro* comparant les VIC saines et pathologiques et visant à déterminer les mécanismes de régulation impliqués et l'impact de la sous-expression des MT1/2 sur le phénotype des VIC.

Une réduction du taux basal des métallothionéines et une réponse inadéquate à un stress oxydant, produit par le cadmium, avaient été observées dans les cellules musculaires lisses de patients présentant une bicuspidie aortique, anomalies potentiellement impliquées dans le remodelage de la paroi aortique et sa dilatation anévrysmale¹⁵³. La situation semble différente dans les MMV puisque l'induction d'expression des MT1/2 par le cadmium est d'une intensité similaire dans les cultures de VIC provenant de valves myxoïdes ou saines. Cette observation suggère que les cellules pathologiques ne présentent pas d'altération du facteur de transcription MTF1 ou de sa séquence spécifique de fixation dans le promoteur des MT1/2 (MRE)¹⁵⁴. Il existe cependant des voies d'activation alternative¹⁸⁴ et leur implication dans la réduction d'expression des MT1/2 dans le tissu myxoïde ne doit donc pas être exclue. Par ailleurs, nous avons noté une absence de corrélation entre des données obtenues *in vitro* et *in vivo*, avec notamment une expression basale des MT1/2 bien plus élevée en culture qu'au sein des valves pathologiques. Comme il est peu probable que nous ayons sélectionné lors de la mise en culture les quelques rares cellules qui expriment les MT1/2 au sein des feuillets myxoïdes, il apparaît donc que la réexpression des MT1/2 en culture soit liée à la perte d'un signal de régulation négative spécifique au tissu valvulaire myxoïde. Diverses hypothèses concernant la nature de ces mécanismes ont été avancées.

Les contraintes mécaniques sont souvent considérées comme des facteurs pathogéniques directement impliqués dans la progression de la MMV. Au cours d'essais préliminaires, des VIC ont été soumises à des tractions cycliques d'une fréquence de 1.16Hz mimant le rythme cardiaque et donc la fréquence de sollicitation des tissus valvulaires *in vivo*. Bien que des modulations de l'expression de plusieurs gènes, dont l' α -SMA et le CTGF aient été mises en évidence, aucune régulation significative n'a pu

être démontrée pour les MT1/2. Ces résultats négatifs ne démontrent toutefois pas de manière définitive l'absence d'implication des forces mécaniques dans la régulation d'expression des MT1/2. D'autres conditions expérimentales devront être évaluées prenant mieux en compte les niveaux de contraintes et conditions rencontrées localement *in vivo* par les VIC et en nous inspirant de travaux récents, dont celui rapportant que des cellules endothéliales soumises à des forces de cisaillement surexpriment les MT1/2.^{169, 185}

Une hypothèse alternative repose sur une régulation paracrine des VIC par les cellules endothéliales. Ces cellules sont largement impliquées dans le développement des valves cardiaques et leur contribution dans les pathologies valvulaires fait l'objet d'un nombre grandissant d'études¹⁸⁶. Une production excessive de NO résultant d'une activité accrue de la NO synthase a été corrélée à la dégénérescence myxoïde des valves mitrales porcines^{187, 188}. Il a, par ailleurs, été montré, dans un modèle *in vitro* de co-culture, que des cellules endothéliales cultivées en conditions statique ou soumises à des forces de cisaillement régulaient de manière différente le phénotype des VIC¹⁸⁹. Au vu de ces derniers résultats, il est maintenant clair que certaines de nos expériences mériteraient d'être répétées dans diverses conditions de co-culture afin de dégager des synergies éventuelles entre les régulations opérées par les cellules entre-elles et les sollicitations mécaniques.

Nos résultats de transcriptomique ont également été analysés en détail grâce au logiciel "Ingenuity Pathway". Celui-ci permet notamment, sur base de l'activation et de la répression de groupes de gènes, de prédire quels sont les voies de signalisation et les facteurs de transcription les plus susceptibles d'être impliqués dans les régulations étudiées. Cette approche bioinformatique a permis d'identifier l'axe de régulation PI3K/Akt. La phosphorylation des facteurs de transcription FoxO par Akt favorise leur délocalisation du noyau ce qui résulte en une inhibition de la transcription de ses gènes cibles, dont les MT1/2 et des protéines régulatrices du cycle cellulaire¹⁷⁰. Les réductions d'expression de PTEN (-1.3x) et SM22 α (-1.7x) dans les valves myxoïdes sont deux arguments supplémentaires en faveur d'une activation de la voie PI3K/Akt dans les tissus myxoïdes. PTEN est en effet un antagoniste de la PI3K et sa répression pourrait favoriser l'activation de Akt. De son côté, SM22 α est une protéine du cytosquelette des

cellules musculaires lisses et sa surexpression induit l'expression des MT1 par inhibition de IGF-1Rbeta/Akt¹⁹⁰. Nous avons confirmé que l'axe PI3K/Akt était en effet impliqué dans la régulation des MT1/2 puisque l'ajout d'un inhibiteur de cette voie dans des cultures de VIC stimule la synthèse des MT1/2. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur des cellules de carcinomes hépatiques où l'activation de la voie PI3K/Akt induit la répression transcriptionnelle des MT1/2¹⁷¹. Dans cette étude toutefois, l'inhibition ne semble pas dépendre du facteur de transcription FoxO mais bien de C/EBP¹⁷¹. Dans ce contexte, il faut souligner qu'une diminution de la transcription de l'isoforme C/EBP delta a été observée dans nos échantillons de valves myxoïdes (-3.2x). Il est intéressant de noter que C/EBP peut, au même titre que PTEN, interagir avec le facteur de transcription MTF1 pour moduler son activité transcriptionnelle¹⁵⁴. Par ailleurs, au-delà de la régulation de MT1/2, l'activation de la voie PI3K/Akt pourrait expliquer l'accroissement de densité cellulaire observée dans les valves myxoïdes murines par réduction de l'apoptose⁷⁷. Nos tentatives de mesure du niveau de phosphorylation d'Akt dans les tissus valvulaires normaux et myxoïdes par western-blot n'ayant pas abouti, une approche immunohistochimique devra être tentée dans le futur.

Outre une association des MT1/2 à une dégradation de la paroi aortique chez les patients porteurs d'une bicuspidie¹⁵³, l'absence d'expression de leur facteur de transcription MTF1 a été corrélée à une production accrue de TGF-β1 ainsi qu'à un dépôt de protéines matricielles par les cellules tumorales¹⁹¹. Dès lors, un rôle significatif des MT1/2 dans le remodelage matriciel de la MMV a été suspecté d'autant qu'elles sont principalement exprimées par les VIC dans la spongiosa où l'accumulation de versican est majoritaire. Afin de déterminer l'implication de ces protéines dans le phénotype des VIC nous avons eu recours à de petits ARN interférentiels (siRNA). Notre approche fut d'inhiber à la fois les MT-1 et MT-2 afin de créer une situation comparable à ce que nous observions dans les tissus myxoïdes. Dans ces conditions, aucune modification des niveaux de TGF-β1 et TGF-β3 n'a été détectée mais par contre la transcription et la sécrétion de TGF-β2 étaient toutes deux significativement accrues. Ces données rapportent pour la première fois une régulation du TGF-β2 par les MT1/2, qui pourrait

avoir un impact significatif dans le développement de la pathologie myxoïde. Les voies de signalisation intermédiaires restent cependant à déterminer.

Implication du TGF- β 2 dans la MMV

Ces résultats *in vitro* ont été directement exploités pour explorer cette voie *in vivo* qui s'est révélée plausible puisque nous avons également mis en évidence une présence accrue de TGF- β 2 dans les tissus myxoïdes et corrélé son expression avec l'épaisseur du feuillet. Par ailleurs, les effets du TGF- β 2 *in vitro* tels que l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique par les VIC, l'expression accrue de Sox9 et l'accumulation du versican suggèrent qu'il contribue effectivement à l'acquisition de ces trois signes distinctifs de la MMV humaine idiopathique. Enfin, un argument supplémentaire supportant le rôle actif du TGF- β 2 dans la MMV est le développement d'une dégénérescence myxoïde valvulaire mitrale dans des pathologies génétiques humaines^{115, 128} associées à une stimulation de la voie de signalisation du TGF- β . Cette activation résulte de mutations d'éléments intrinsèques de la voie de signalisation, que sont les récepteurs et les smads, ou d'altérations de protéines de structure des microfibrilles régulant sa biodisponibilité. Le TGF- β est en effet séquestré sous sa forme latente par les LTBPs qui interagissent avec la fibrilline-1¹⁰⁸ et indirectement avec d'autres molécules tels que le versican, l'ADAMTS10 et l'ADAMTSL2, l'ensemble régulant l'activité du TGF- β ^{97, 192, 193}. L'accumulation de versican et la désorganisation structurelle de la matrice des valves myxoïdes sont des éléments qui devraient dès lors participer activement à la régulation du TGF- β .

Il est important de préciser, qu'en dehors du TGF- β 1, une quantité accrue de TGF- β 2 est également décrite dans les valves myxoïdes de souris déficientes pour la fibrilline-1⁷⁷ et dans les aortes de patients souffrant du syndrome de Marfan¹⁹⁴. Chez ces patients, la paroi de l'aorte ascendante est d'ailleurs caractérisée par un dépôt matriciel de type myxoïde riche en protéoglycans et par une activation de smad2¹⁹⁵.

Le TGF- β 2, contrairement au TGF- β 1 et TGF- β 3, ne se lie pas directement au récepteur de type II du TGF- β (TGF β RII) mais forme d'abord un complexe avec le récepteur de type III (TGF β RIII ou betaglycan)¹⁹⁶. Le rôle unique de ce récepteur au cours du développement a été mis clairement en évidence dans des modèles expérimentaux^{197, 198} et par délétion de son gène chez la souris¹⁹⁹. La spécificité de sa régulation pourrait également découler de la présence ou l'absence de certains cofacteurs¹¹¹. C'est le TGF- β 2 qui est majoritairement impliqué dans le développement des valves cardiaques²⁰⁰ en régulant la EMT²⁰¹ et le remodelage matriciel du bourrelet endocardique et en modulant l'expression de gènes matriciels, mais également en contrôlant la différenciation des cellules mésenchymateuses en lignées valvulaires²¹. Une densité accrue de cellules progénitrices CD34-positives observée dans les valves myxoïdes humaines²⁰² semble confirmer cette hypothèse. Notre analyse par microarray met d'ailleurs en évidence un accroissement d'expression de CD34 dans la MMV (publication n°3). Le TGF- β 2 pourrait faire progresser la MMV en réactivant une sous-population de cellules progénitrices endothéliales présentes dans la valve adulte^{55, 58} ou en déclenchant la différenciation de cellules progénitrices mésenchymateuses.

L'implication de la voie de signalisation du TGF- β dans la MMV idiopathique pourrait, si elle se confirme, justifier l'utilisation de "losartan" qui a déjà fait ses preuves dans le cadre du traitement du syndrome de Marfan^{119, 120, 203}, en réprimant de manière indirecte la synthèse de TGF- β .

Les ADAMTS et le clivage des protéoglycans

Une des caractéristiques majeures de la MMV est une accumulation de protéoglycans. Celle-ci pourrait résulter d'une stimulation de la transcription accrue des gènes codant pour les coeurs protéiques (versican, décorine, biglycan) ainsi que le suggère l'analyse de Sainger *et al*¹⁸⁰. Dans notre groupe de patients, hormis un léger accroissement de la xylosyltransferase I, une enzyme qui initie la synthèse de la chaîne polysaccharidique sur la protéine, aucune modulation significative de l'expression des protéoglycans n'a été mesurée. Dans ces conditions, l'accumulation de versican pourrait donc résulter d'une réduction de sa dégradation, une hypothèse qui cadre parfaitement

avec la réduction d'expression des enzymes à activité protéoglycanase dans les tissus myxoïdes. Les protéoglycanases, dont font partie les ADAMTS-1, -4, -5 et -9⁹⁶, clivent les isoformes du versican à un site bien spécifique⁷⁸ tandis que le biglycan et la décorine sont des substrats des ADAMTS-4 et -5²⁰⁴⁻²⁰⁶. La réduction d'expression de ces enzymes que nous avons observée dans nos échantillons pathologiques apparaît dès lors comme un facteur significatif dans la biologie de la MMV. La stratégie la plus pertinente pour évaluer leur implication dans la MMV consistait à utiliser un modèle de délétion dirigée chez la souris. Etant donné que l'expression de l'ADAMTS-4 était la plus fortement réduite dans les tissus humains myxoïdes par rapport aux valves saines, notre premier choix s'est porté sur cette enzyme. Grâce à une collaboration avec l'équipe de M. Tortorella et A.M. Malfait, travaillant sur l'ostéoarthrite, nous avons obtenu des souris déficientes pour l'ADAMTS-4 âgées de 16 à 20 mois. Elles ont été soumises à des échocardiographies permettant de réaliser des mesures de la fonction cardiaque et d'observer une éventuelle insuffisance mitrale. Ces travaux, qui ne sont pas rapportés dans ce mémoire, ont été réalisés par S. Margagliotti et C. Beauoye, CARD, UCL. Aucune altération fonctionnelle du système cardiovasculaire et aucune modification histologique du feuillet mitral n'ont été décelées. Nous avons interprété cette absence d'altération par un processus compensatoire dû à l'activité de l'ADAMTS-5 qui est décrite comme la principale aggrécanase dans le cartilage murin²⁰⁷ ou à une autre ADAMTS présentant une activité similaire. Quelques mois après cette tentative, deux études utilisant des modèles murins de déficience en ADAMTS-5 ou d'haploinsuffisance en ADAMTS-9, démontraient l'impact de l'absence de clivage du versican et de son accumulation dans le développement des valves cardiaques et l'apparition de MMV^{9, 26}. Dans la pathologie humaine, nous suggérons que la réduction par le TGF- β 2 de l'activité des protéoglycanases principalement l'ADAMTS-1 qui est la plus exprimée, et l'ADAMTS-5, serait un des mécanismes participant à l'accumulation de versican dans les feuillets myxoïdes²⁰⁸.

Plus que la seule altération de la structure tri-laminée typique des valves, qui est indispensable à leur bon fonctionnement, l'accumulation de versican non clivé joue probablement un rôle actif dans la MMV. En effet, le versican intact et ses fragments clivés sont distribués de façon asymétrique au cours du développement et de la maturation de la valve mitrale²⁵. Par ailleurs, le fragment clivé du versican est impliqué dans le contrôle de l'apoptose²⁰⁹. Un manque de clivage pourrait donc contribuer à la densification cellulaire qui s'observe dans les feuillets myxoïdes. Le versican est également capable de fixer le hyaluronan et de nombreuses protéines matricielles telles que, la fibronectine, les fibulines et la fibrilline-1. Il est donc évident que des modulations de sa protéolyse devraient influencer de nombreuses voies de signalisation. A titre d'exemple, le versican non clivé est capable d'activer la voie de signalisation TGF- β et d'induire la transition de fibroblastes en myofibroblastes¹⁹².

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La dégénérescence myxoïde est l'affection principale de la valve mitrale et la cause majeure de son dysfonctionnement. En dépit de son impact clinique majeur, les causes initiales de cette pathologie fréquente et les mécanismes guidant sa progression demeurent peu connus. Notre travail, portant à la fois sur la caractérisation de prélèvements tissulaires de valves saines et myxoïdes et sur l'étude *in vitro* des cellules qui en sont issues, a contribué à identifier de nouveaux acteurs potentiellement impliqués dans la progression de la pathologie. Ce mémoire a ainsi permis de mettre en évidence une cascade de signalisation liant, dans les valves myxoïdes idiopathiques, les métallothionéines, le TGF- β 2, certaines ADAMTS et l'accumulation de protéoglycans.

Une analyse transcriptomique globale avait d'abord permis de mettre en évidence deux familles de gènes dont l'expression est altérée dans les tissus myxoïdes: les ADAMTS possédant une activité protéoglycanase et les métallothionéines. Une activité protéoglycanase réduite semble à l'origine de l'accumulation de versican qui est une caractéristique des feuillets pathologiques, tandis qu'une expression insuffisante de métallothionéines stimulerait la synthèse de TGF- β 2 dans la MMV. Les effets du TGF- β 2, tels que nous les avons mis en évidence *in vitro* dans des cultures de cellules valvulaires interstitielles et tels que rapportés dans un cadre plus large dans la littérature, supportent un rôle actif dans la MMV idiopathique. Il est d'ailleurs intéressant de considérer que, bien que la MMV soit sans conteste multifactorielle, une activation de la voie de TGF- β semble être un aboutissement commun et le désigne comme une cible thérapeutique prometteuse. L'implication spécifique des différents acteurs participant aux cascades intracellulaires de signalisation régulées par les facteurs de la famille du TGF- β reste cependant à être identifiée dans le cadre de la MMV idiopathique.

La suite de notre travail a consisté à comprendre quels pouvaient être les mécanismes responsables d'une absence d'expression de MT1/2 dans les valves myxoïdes. Ces travaux préliminaires ont été réalisés à l'aide de cellules mises en culture à partir de valves saines et pathologiques. Ils semblent indiquer que ce défaut

d'expression résulterait d'un signal spécifique au sein du tissu valvulaire myxoïde et non d'une altération de réponse des cellules qui en sont issues puisque les deux types cellulaires se comportent de manière similaire *in vitro*.

Enfin, les causes primaires des altérations observées restent encore à être déterminées. Bien que la diversité des étiologies potentielles rende malaisée l'incrimination spécifique des facteurs déclenchants, il est clair que les sollicitations mécaniques jouent un rôle à la fois central et très précoce. Par ailleurs, l'influence de l'endothélium n'a pas été directement étudié dans le cadre de ce mémoire alors que ses interactions avec les cellules valvulaires interstitielles sont bien établies notamment dans le développement. Ce domaine mériterait dès lors d'être approfondi afin de déterminer si les cellules endothéliales participent activement dans la perception des sollicitations mécaniques, la régulation du phénotype des cellules interstitielles et le développement de la MMV.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hinton RB, Yutzey KE. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol* 2011;**73**:29-46.
2. Latif N, Sarathchandra P, Taylor PM, Antoniwi J, Yacoub MH. Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J Heart Valve Dis* 2005;**14**:218-227.
3. Schoen FJ. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annu Rev Pathol* 2012;**7**:161-183.
4. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation* 2008;**118**:1864-1880.
5. Grande-Allen KJ, Calabro A, Gupta V, Wight TN, Hascall VC, Vesely I. Glycosaminoglycans and proteoglycans in normal mitral valve leaflets and chordae: association with regions of tensile and compressive loading. *Glycobiology* 2004;**14**:621-633.
6. Wirrig EE, Yutzey KE. Transcriptional regulation of heart valve development and disease. *Cardiovasc Pathol* 2011;**20**:162-167.
7. Hinton RB, Jr., Lincoln J, Deutsch GH, Osinska H, Manning PB, Benson DW, Yutzey KE. Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ Res* 2006;**98**:1431-1438.
8. Lincoln J, Yutzey KE. Molecular and developmental mechanisms of congenital heart valve disease. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;**91**:526-534.
9. Dupuis LE, McCulloch DR, McGarity JD, Bahan A, Wessels A, Weber D, Diminich AM, Nelson CM, Apte SS, Kern CB. Altered versican cleavage in ADAMTS5 deficient mice; a novel etiology of myxomatous valve disease. *Dev Biol* 2011;**357**:152-164.
10. Butcher JT, Markwald RR. Valvulogenesis: the moving target. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007;**362**:1489-1503.
11. Lincoln J, Lange AW, Yutzey KE. Hearts and bones: shared regulatory mechanisms in heart valve, cartilage, tendon, and bone development. *Dev Biol* 2006;**294**:292-302.
12. Luna-Zurita L, Prados B, Grego-Bessa J, Luxan G, del Monte G, Benguria A, Adams RH, Perez-Pomares JM, de la Pompa JL. Integration of a Notch-

- dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J Clin Invest* 2010;**120**:3493-3507.
13. Verhoeven MC, Haase C, Christoffels VM, Weidinger G, Bakkers J. Wnt signaling regulates atrioventricular canal formation upstream of BMP and Tbx2. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;**91**:435-440.
 14. Combs MD, Yutzey KE. Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circ Res* 2009;**105**:408-421.
 15. Combs MD, Yutzey KE. VEGF and RANKL regulation of NFATc1 in heart valve development. *Circ Res* 2009;**105**:565-574.
 16. Chakraborty S, Combs MD, Yutzey KE. Transcriptional regulation of heart valve progenitor cells. *Pediatr Cardiol* 2010;**31**:414-421.
 17. Chakraborty S, Wirrig EE, Hinton RB, Merrill WH, Spicer DB, Yutzey KE. Twist1 promotes heart valve cell proliferation and extracellular matrix gene expression during development in vivo and is expressed in human diseased aortic valves. *Dev Biol* 2010;**347**:167-179.
 18. Norris RA, Moreno-Rodriguez RA, Sugi Y, Hoffman S, Amos J, Hart MM, Potts JD, Goodwin RL, Markwald RR. Periostin regulates atrioventricular valve maturation. *Dev Biol* 2008;**316**:200-213.
 19. Norris RA, Potts JD, Yost MJ, Junor L, Brooks T, Tan H, Hoffman S, Hart MM, Kern MJ, Damon B, Markwald RR, Goodwin RL. Periostin promotes a fibroblastic lineage pathway in atrioventricular valve progenitor cells. *Dev Dyn* 2009;**238**:1052-1063.
 20. Conway SJ, Doetschman T, Azhar M. The inter-relationship of periostin, TGF beta, and BMP in heart valve development and valvular heart diseases. *ScientificWorldJournal* 2011;**11**:1509-1524.
 21. Azhar M, Brown K, Gard C, Chen H, Rajan S, Elliott DA, Stevens MV, Camenisch TD, Conway SJ, Doetschman T. Transforming growth factor Beta2 is required for valve remodeling during heart development. *Dev Dyn* 2011;**240**:2127-2141.
 22. Lockhart M, Wirrig E, Phelps A, Wessels A. Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;**91**:535-550.
 23. Camenisch TD, Schroeder JA, Bradley J, Klewer SE, McDonald JA. Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors. *Nat Med* 2002;**8**:850-855.

24. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* 2000;**106**:349-360.
25. Kern CB, Twal WO, Mjaatvedt CH, Fairey SE, Toole BP, Iruela-Arispe ML, Argraves WS. Proteolytic cleavage of versican during cardiac cushion morphogenesis. *Dev Dyn* 2006;**235**:2238-2247.
26. Kern CB, Wessels A, McGarity J, Dixon LJ, Alston E, Argraves WS, Geeting D, Nelson CM, Menick DR, Apte SS. Reduced versican cleavage due to Adamts9 haploinsufficiency is associated with cardiac and aortic anomalies. *Matrix Biol* 2010;**29**:304-316.
27. Grande-Allen KJ, Borowski AG, Troughton RW, Houghtaling PL, Dipaola NR, Moravec CS, Vesely I, Griffin BP. Apparently normal mitral valves in patients with heart failure demonstrate biochemical and structural derangements: an extracellular matrix and echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 2005;**45**:54-61.
28. Lancellotti P, Moura L, Pierard LA, Agricola E, Popescu BA, Tribouilloy C, Hagendorff A, Monin JL, Badano L, Zamorano JL. European Association of Echocardiography recommendations for the assessment of valvular regurgitation. Part 2: mitral and tricuspid regurgitation (native valve disease). *Eur J Echocardiogr* 2010;**11**:307-332.
29. Salhiyyah K, Yacoub MH, Chester AH. Cellular mechanisms in mitral valve disease. *J Cardiovasc Transl Res* 2011;**4**:702-709.
30. Fedak PW, McCarthy PM, Bonow RO. Evolving concepts and technologies in mitral valve repair. *Circulation* 2008;**117**:963-974.
31. McCarthy KP, Ring L, Rana BS. Anatomy of the mitral valve: understanding the mitral valve complex in mitral regurgitation. *Eur J Echocardiogr* 2010;**11**:i3-9.
32. Barber JE, Kasper FK, Ratliff NB, Cosgrove DM, Griffin BP, Vesely I. Mechanical properties of myxomatous mitral valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;**122**:955-962.
33. 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.

34. Tamura K, Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Yamanaka N, Ferrans VJ. Abnormalities in elastic fibers and other connective-tissue components of floppy mitral valve. *Am Heart J* 1995;**129**:1149-1158.
35. d'Arcy JL, Prendergast BD, Chambers JB, Ray SG, Bridgewater B. Valvular heart disease: the next cardiac epidemic. *Heart* 2011;**97**:91-93.
36. 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.
37. Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, Flachskampf F, Hall R, Jung B, Kasprzak J, Nataf P, Tornos P, Torracca L, Wenink A. Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007;**28**:230-268.
38. Freed LA, Levy D, Levine RA, Larson MG, Evans JC, Fuller DL, Lehman B, Benjamin EJ. Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med* 1999;**341**:1-7.
39. Hepner AD, Ahmadi-Kashani M, Movahed MR. The prevalence of mitral valve prolapse in patients undergoing echocardiography for clinical reason. *Int J Cardiol* 2007;**123**:55-57.
40. Flack JM, Kvasnicka JH, Gardin JM, Gidding SS, Manolio TA, Jacobs DR, Jr. Anthropometric and physiologic correlates of mitral valve prolapse in a biethnic cohort of young adults: the CARDIA study. *Am Heart J* 1999;**138**:486-492.
41. Chikwe J, Adams DH. State of the art: degenerative mitral valve disease. *Heart Lung Circ* 2009;**18**:319-329.
42. Richards JM, Farrar EJ, Kornreich BG, Mosmall yi UNS, Butcher JT. The mechanobiology of mitral valve function, degeneration, and repair. *J Vet Cardiol* 2012;**14**:47-58.
43. Adams DH, Rosenhek R, Falk V. Degenerative mitral valve regurgitation: best practice revolution. *Eur Heart J* 2010;**31**:1958-1966.
44. Guy TS, Hill AC. Mitral valve prolapse. *Annu Rev Med* 2012;**63**:277-292.
45. Carpentier A. Cardiac valve surgery--the "French correction". *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;**86**:323-337.
46. Grande-Allen KJ, Liao J. The heterogeneous biomechanics and mechanobiology of the mitral valve: implications for tissue engineering. *Curr Cardiol Rep* 2011;**13**:113-120.

47. Sutherland FW, Perry TE, Yu Y, Sherwood MC, Rabkin E, Masuda Y, Garcia GA, McLellan DL, Engelmayr GC, Jr., Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE, Jr. From stem cells to viable autologous semilunar heart valve. *Circulation* 2005;**111**:2783-2791.
48. Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, Breyman T, Kallenbach K, Maniuc L, Batrinac A, Repin O, Maliga O, Ciubotaru A, Haverich A. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* 2006;**114**:I132-137.
49. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer JE, Jr. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* 2000;**102**:III44-49.
50. De Visscher G, Vranken I, Lebacqz A, Van Kerrebroeck C, Ganame J, Verbeken E, Flameng W. In vivo cellularization of a cross-linked matrix by intraperitoneal implantation: a new tool in heart valve tissue engineering. *Eur Heart J* 2007;**28**:1389-1396.
51. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* 2007;**171**:1407-1418.
52. Butcher JT, Penrod AM, Garcia AJ, Nerem RM. Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:1429-1434.
53. Butcher JT, Tressel S, Johnson T, Turner D, Sorescu G, Jo H, Nerem RM. Transcriptional profiles of valvular and vascular endothelial cells reveal phenotypic differences: influence of shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:69-77.
54. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res* 2005;**96**:792-799.
55. Paruchuri S, Yang JH, Aikawa E, Melero-Martin JM, Khan ZA, Loukogeorgakis S, Schoen FJ, Bischoff J. Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2. *Circ Res* 2006;**99**:861-869.
56. Dal-Bianco JP, Aikawa E, Bischoff J, Guerrero JL, Handschumacher MD, Sullivan S, Johnson B, Titus JS, Iwamoto Y, Wylie-Sears J, Levine RA, Carpentier A. Active adaptation of the tethered mitral valve: insights into a

- compensatory mechanism for functional mitral regurgitation. *Circulation* 2009;**120**:334-342.
57. Wylie-Sears J, Aikawa E, Levine RA, Yang JH, Bischoff J. Mitral valve endothelial cells with osteogenic differentiation potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;**31**:598-607.
58. Bischoff J, Aikawa E. Progenitor cells confer plasticity to cardiac valve endothelium. *J Cardiovasc Transl Res* 2011;**4**:710-719.
59. 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.
60. Blevins TL, Carroll JL, Raza AM, Grande-Allen KJ. Phenotypic characterization of isolated valvular interstitial cell subpopulations. *J Heart Valve Dis* 2006;**15**:815-822.
61. Taylor PM, Allen SP, Yacoub MH. Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. *J Heart Valve Dis* 2000;**9**:150-158.
62. Brand NJ, Roy A, Hoare G, Chester A, Yacoub MH. Cultured interstitial cells from human heart valves express both specific skeletal muscle and non-muscle markers. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;**38**:30-42.
63. Roy A, Brand NJ, Yacoub MH. Molecular characterization of interstitial cells isolated from human heart valves. *J Heart Valve Dis* 2000;**9**:459-464; discussion 464-455.
64. Kershaw JD, Misfeld M, Sievers HH, Yacoub MH, Chester AH. Specific regional and directional contractile responses of aortic cusp tissue. *J Heart Valve Dis* 2004;**13**:798-803.
65. Rabkin-Aikawa E, Farber M, Aikawa M, Schoen FJ. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis* 2004;**13**:841-847.
66. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res* 2004;**95**:253-260.
67. Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH, Rajamannan NM. Human degenerative

- valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol* 2006;**47**:1707-1712.
68. Aikawa E, Whittaker P, Farber M, Mendelson K, Padera RF, Aikawa M, Schoen FJ. Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation* 2006;**113**:1344-1352.
69. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res* 2010;**339**:247-257.
70. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;**3**:a004978.
71. Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem* 2006;**281**:3494-3504.
72. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 2004;**20**:33-43.
73. Hubmacher D, Tiedemann K, Reinhardt DP. Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions. *Curr Top Dev Biol* 2006;**75**:93-123.
74. Kielty CM, Stephan S, Sherratt MJ, Williamson M, Shuttleworth CA. Applying elastic fibre biology in vascular tissue engineering. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007;**362**:1293-1312.
75. Cole WG, Chan D, Hickey AJ, Wilcken DE. Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves. *Biochem J* 1984;**219**:451-460.
76. Nasuti JF, Zhang PJ, Feldman MD, Pasha T, Khurana JS, Gorman JH, 3rd, Gorman RC, Narula J, Narula N. Fibrillin and other matrix proteins in mitral valve prolapse syndrome. *Ann Thorac Surg* 2004;**77**:532-536.
77. Ng CM, Cheng A, Myers LA, Martinez-Murillo F, Jie C, Bedja D, Gabrielson KL, Hausladen JM, Mecham RP, Judge DP, Dietz HC. TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 2004;**114**:1586-1592.
78. Stanton H, Melrose J, Little CB, Fosang AJ. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta* 2011;**1812**:1616-1629.
79. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2010;**277**:3904-3923.

80. Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 2010;**339**:237-246.
81. Kirn-Safran C, Farach-Carson MC, Carson DD. Multifunctionality of extracellular and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Cell Mol Life Sci* 2009;**66**:3421-3434.
82. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J* 2010;**277**:3876-3889.
83. Lambaerts K, Wilcox-Adelman SA, Zimmermann P. The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol* 2009;**21**:662-669.
84. Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res* 2005;**15**:483-494.
85. Merline R, Schaefer RM, Schaefer L. The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). *J Cell Commun Signal* 2009;**3**:323-335.
86. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 1994;**302** (Pt 2):527-534.
87. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J* 2010;**277**:3864-3875.
88. Gupta V, Barzilla JE, Mendez JS, Stephens EH, Lee EL, Collard CD, Laucirica R, Weigel PH, Grande-Allen KJ. Abundance and location of proteoglycans and hyaluronan within normal and myxomatous mitral valves. *Cardiovasc Pathol* 2009;**18**:191-197.
89. Stocker W, Bode W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr Opin Struct Biol* 1995;**5**:383-390.
90. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;**8**:221-233.
91. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. *Amino Acids* 2011;**41**:271-290.
92. Shiomi T, Lemaitre V, D'Armiento J, Okada Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int* 2010;**60**:477-496.

93. Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* 1997;**272**:556-562.
94. Colige A, Li SW, Sieron AL, Nusgens BV, Prockop DJ, Lapiere CM. cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:2374-2379.
95. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 2005;**386**:15-27.
96. Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 2009;**284**:31493-31497.
97. Le Goff C, Cormier-Daire V. The ADAMTS(L) family and human genetic disorders. *Hum Mol Genet* 2011;**20**:R163-167.
98. Hubmacher D, Apte SS. Genetic and functional linkage between ADAMTS superfamily proteins and fibrillin-1: a novel mechanism influencing microfibril assembly and function. *Cell Mol Life Sci* 2011;**68**:3137-3148.
99. Togashi M, Tamura K, Nitta T, Ishizaki M, Sugisaki Y, Fukuda Y. Role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor of metalloproteinases in myxomatous change of cardiac floppy valves. *Pathol Int* 2007;**57**:251-259.
100. Disse S, Abergel E, Berrebi A, Houot AM, Le Heuzey JY, Diebold B, Guize L, Carpentier A, Corvol P, Jeunemaitre X. Mapping of a first locus for autosomal dominant myxomatous mitral-valve prolapse to chromosome 16p11.2-p12.1. *Am J Hum Genet* 1999;**65**:1242-1251.
101. Freed LA, Acierno JS, Jr., Dai D, Leyne M, Marshall JE, Nesta F, Levine RA, Slaughter SA. A locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 11p15.4. *Am J Hum Genet* 2003;**72**:1551-1559.
102. Nesta F, Leyne M, Yosefy C, Simpson C, Dai D, Marshall JE, Hung J, Slaughter SA, Levine RA. New locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 13: clinical insights from genetic studies. *Circulation* 2005;**112**:2022-2030.
103. 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.

104. Lardeux A, Kyndt F, Lecointe S, Marec HL, Merot J, Schott JJ, Le Tourneau T, Probst V. Filamin-a-related myxomatous mitral valve dystrophy: genetic, echocardiographic and functional aspects. *J Cardiovasc Transl Res* 2011;**4**:748-756.
105. Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, Watanabe K. Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 2001;**276**:17871-17877.
106. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;**113**:685-700.
107. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;**67**:753-791.
108. Kaartinen V, Warburton D. Fibrillin controls TGF-beta activation. *Nat Genet* 2003;**33**:331-332.
109. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003;**116**:217-224.
110. Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 2009;**19**:116-127.
111. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000;**19**:1745-1754.
112. Zwijsen A, Verschueren K, Huylebroeck D. New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett* 2003;**546**:133-139.
113. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009;**19**:128-139.
114. Ramirez F, Dietz HC. Marfan syndrome: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Curr Opin Genet Dev* 2007;**17**:252-258.
115. Judge DP, Rouf R, Habashi J, Dietz HC. Mitral valve disease in marfan syndrome and related disorders. *J Cardiovasc Transl Res* 2011;**4**:741-747.
116. Attias D, Stheneur C, Roy C, Collod-Beroud G, Detaint D, Faivre L, Delrue MA, Cohen L, Francannet C, Beroud C, Claustres M, Iserin F, Khau Van Kien P, Lacombe D, Le Merrer M, Lyonnet S, Odent S, Plauchu H, Rio M, Rossi A, Sidi D, Steg PG, Ravaud P, Boileau C, Jondeau G. Comparison of clinical presentations and outcomes between patients with TGFBR2 and FBN1 mutations in Marfan syndrome and related disorders. *Circulation* 2009;**120**:2541-2549.

117. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008;**134**:215-230.
118. Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, Bedja D, Chen Y, van Erp C, Lindsay ME, Kim D, Schoenhoff F, Cohn RD, Loeys BL, Thomas CJ, Patnaik S, Marugan JJ, Judge DP, Dietz HC. Noncanonical TGFbeta signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science* 2011;**332**:358-361.
119. Matt P, Schoenhoff F, Habashi J, Holm T, Van Erp C, Loch D, Carlson OD, Griswold BF, Fu Q, De Backer J, Loeys B, Huso DL, McDonnell NB, Van Eyk JE, Dietz HC. Circulating transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Circulation* 2009;**120**:526-532.
120. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, Myers L, Klein EC, Liu G, Calvi C, Podowski M, Neptune ER, Halushka MK, Bedja D, Gabrielson K, Rifkin DB, Carta L, Ramirez F, Huso DL, Dietz HC. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 2006;**312**:117-121.
121. Radonic T, de Witte P, Baars MJ, Zwinderman AH, Mulder BJ, Groenink M. Losartan therapy in adults with Marfan syndrome: study protocol of the multi-center randomized controlled COMPARE trial. *Trials* 2010;**11**:3.
122. Detaint D, Aegerter P, Tubach F, Hoffman I, Plauchu H, Dulac Y, Faivre LO, Delrue MA, Collignon P, Odent S, Tchitchinadze M, Bouffard C, Arnoult F, Gautier M, Boileau C, Jondeau G. Rationale and design of a randomized clinical trial (Marfan Sartan) of angiotensin II receptor blocker therapy versus placebo in individuals with Marfan syndrome. *Arch Cardiovasc Dis* 2010;**103**:317-325.
123. Moberg K, De Nobele S, Devos D, Goetghebeur E, Segers P, Trachet B, Vervaet C, Renard M, Coucke P, Loeys B, De Paepe A, De Backer J. The Ghent Marfan Trial - A randomized, double-blind placebo controlled trial with losartan in Marfan patients treated with beta-blockers. *Int J Cardiol* 2011.
124. Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM, Aziz H, Schoenhoff F, Bedja D, Chen Y, Modiri AN, Judge DP, Dietz HC. Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science* 2011;**332**:361-365.
125. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, Dietz HC. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* 2005;**37**:275-281.

126. van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, Roos-Hesselink JW, de Graaf BM, Verhagen JM, Hoedemaekers YM, Willemsen R, Severijnen LA, Venselaar H, Vriend G, Pattynama PM, Collee M, Majoor-Krakauer D, Poldermans D, Frohn-Mulder IM, Micha D, Timmermans J, Hilhorst-Hofstee Y, Bierma-Zeinstra SM, Willems PJ, Kros JM, Oei EH, Oostra BA, Wessels MW, Bertoli-Avella AM. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet* 2011;**43**:121-126.
127. Andrabi S, Bekheirnia MR, Robbins-Furman P, Lewis RA, Prior TW, Potocki L. SMAD4 mutation segregating in a family with juvenile polyposis, aortopathy, and mitral valve dysfunction. *Am J Med Genet A* 2011;**155A**:1165-1169.
128. Le Goff C, Morice-Picard F, Dagoneau N, Wang LW, Perrot C, Crow YJ, Bauer F, Flori E, Prost-Squarcioni C, Krakow D, Ge G, Greenspan DS, Bonnet D, Le Merrer M, Munnich A, Apte SS, Cormier-Daire V. ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat Genet* 2008;**40**:1119-1123.
129. Koo BH, Le Goff C, Jungers KA, VasANJI A, O'Flaherty J, Weyman CM, Apte SS. ADAMTS-like 2 (ADAMTSL2) is a secreted glycoprotein that is widely expressed during mouse embryogenesis and is regulated during skeletal myogenesis. *Matrix Biol* 2007;**26**:431-441.
130. Le Goff C, Mahaut C, Wang LW, Allali S, Abhyankar A, Jensen S, Zylberberg L, Collod-Beroud G, Bonnet D, Alanay Y, Brady AF, Cordier MP, Devriendt K, Genevieve D, Kiper PO, Kitoh H, Krakow D, Lynch SA, Le Merrer M, Megarbane A, Mortier G, Odent S, Polak M, Rohrbach M, Sillence D, Stolte-Dijkstra I, Superti-Furga A, Rimoin DL, Topouchian V, Unger S, Zabel B, Bole-Feysot C, Nitschke P, Handford P, Casanova JL, Boileau C, Apte SS, Munnich A, Cormier-Daire V. Mutations in the TGFbeta binding-protein-like domain 5 of FBN1 are responsible for acromicric and geleophysic dysplasias. *Am J Hum Genet* 2011;**89**:7-14.
131. Sainger R, Grau JB, Branchetti E, Poggio P, Seefried WF, Field BC, Acker MA, Gorman RC, Gorman JH, 3rd, Hargrove CW, 3rd, Bavaria JE, Ferrari G. Human myxomatous mitral valve prolapse: Role of bone morphogenetic protein 4 in valvular interstitial cell activation. *J Cell Physiol* 2011.
132. Mahimkar R, Nguyen A, Mann M, Yeh CC, Zhu BQ, Karliner JS, Lovett DH. Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression induces myxomatous valve degeneration: a potential model of mitral valve prolapse disease. *Cardiovasc Pathol* 2009;**18**:253-261.
133. Stephens EH, Timek TA, Daughters GT, Kuo JJ, Patton AM, Baggett LS, Ingels NB, Miller DC, Grande-Allen KJ. Significant changes in mitral valve leaflet

- matrix composition and turnover with tachycardia-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2009;**120**:S112-119.
134. Stephens EH, Nguyen TC, Itoh A, Ingels NB, Jr., Miller DC, Grande-Allen KJ. The effects of mitral regurgitation alone are sufficient for leaflet remodeling. *Circulation* 2008;**118**:S243-249.
135. Ryan LP, Jackson BM, Eperjesi TJ, Plappert TJ, St John-Sutton M, Gorman RC, Gorman JH, 3rd. A methodology for assessing human mitral leaflet curvature using real-time 3-dimensional echocardiography. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;**136**:726-734.
136. Gould RA, Chin K, Santisakultarn TP, Dropkin A, Richards JM, Schaffer CB, Butcher JT. Cyclic strain anisotropy regulates valvular interstitial cell phenotype and tissue remodeling in three-dimensional culture. *Acta Biomater* 2012.
137. Ku CH, Johnson PH, Batten P, Sarathchandra P, Chambers RC, Taylor PM, Yacoub MH, Chester AH. Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch. *Cardiovasc Res* 2006;**71**:548-556.
138. Gupta V, Werdenberg JA, Blevins TL, Grande-Allen KJ. Synthesis of glycosaminoglycans in differently loaded regions of collagen gels seeded with valvular interstitial cells. *Tissue Eng* 2007;**13**:41-49.
139. Gupta V, Werdenberg JA, Mendez JS, Jane Grande-Allen K. Influence of strain on proteoglycan synthesis by valvular interstitial cells in three-dimensional culture. *Acta Biomater* 2008;**4**:88-96.
140. Pedersen HD, Haggstrom J. Mitral valve prolapse in the dog: a model of mitral valve prolapse in man. *Cardiovasc Res* 2000;**47**:234-243.
141. Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H. Effects of transforming growth factor-beta3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. *Am J Vet Res* 2011;**72**:194-202.
142. Han RI, Black A, Culshaw GJ, French AT, Else RW, Corcoran BM. Distribution of myofibroblasts, smooth muscle-like cells, macrophages, and mast cells in mitral valve leaflets of dogs with myxomatous mitral valve disease. *Am J Vet Res* 2008;**69**:763-769.
143. Disatian S, Ehrhart EJ, 3rd, Zimmerman S, Orton EC. Interstitial cells from dogs with naturally occurring myxomatous mitral valve disease undergo phenotype transformation. *J Heart Valve Dis* 2008;**17**:402-411; discussion 412.

144. Aupperle H, Marz I, Thielebein J, Schoon HA. Expression of transforming growth factor-beta1, -beta2 and -beta3 in normal and diseased canine mitral valves. *J Comp Pathol* 2008;**139**:97-107.
145. Xue W, Liu Q, Cai L, Wang Z, Feng W. Stable overexpression of human metallothionein-IIA in a heart-derived cell line confers oxidative protection. *Toxicol Lett* 2009;**188**:70-76.
146. Garrett SH, Somji S, Todd JH, Sens MA, Sens DA. Differential expression of human metallothionein isoform I mRNA in human proximal tubule cells exposed to metals. *Environ Health Perspect* 1998;**106**:825-831.
147. Sutherland DE, Stillman MJ. The "magic numbers" of metallothionein. *Metallomics* 2011;**3**:444-463.
148. Dalton TP, Li Q, Bittel D, Liang L, Andrews GK. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. Occupancy in vivo of metal response elements in the metallothionein-I gene promoter. *J Biol Chem* 1996;**271**:26233-26241.
149. Saydam N, Georgiev O, Nakano MY, Greber UF, Schaffner W. Nucleo-cytoplasmic trafficking of metal-regulatory transcription factor 1 is regulated by diverse stress signals. *J Biol Chem* 2001;**276**:25487-25495.
150. Lim D, Jocelyn KM, Yip GW, Bay BH. Silencing the Metallothionein-2A gene inhibits cell cycle progression from G1- to S-phase involving ATM and cdc25A signaling in breast cancer cells. *Cancer Lett* 2009;**276**:109-117.
151. Yap X, Tan HY, Huang J, Lai Y, Yip GW, Tan PH, Bay BH. Over-expression of metallothionein predicts chemoresistance in breast cancer. *J Pathol* 2009;**217**:563-570.
152. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol* 2011;**9**:54.
153. Phillippi JA, Klyachko EA, Kenny JPt, Eskay MA, Gorman RC, Gleason TG. Basal and oxidative stress-induced expression of metallothionein is decreased in ascending aortic aneurysms of bicuspid aortic valve patients. *Circulation* 2009;**119**:2498-2506.
154. Gunther V, Lindert U, Schaffner W. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta* 2012.
155. Lambert CA, Colige AC, Lapiere CM, Nusgens BV. Coordinated regulation of procollagens I and III and their post-translational enzymes by dissipation of

- mechanical tension in human dermal fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 2001;**80**:479-485.
156. Nusgens BV, Humbert P, Rougier A, Colige AC, Haftek M, Lambert CA, Richard A, Creidi P, Lapiere CM. Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *J Invest Dermatol* 2001;**116**:853-859.
157. Meloni G, Knipp M, Vasak M. Detection of neuronal growth inhibitory factor (metallothionein-3) in polyacrylamide gels and by Western blot analysis. *J Biochem Biophys Methods* 2005;**64**:76-81.
158. Mizzen CA, Cartel NJ, Yu WH, Fraser PE, McLachlan DR. Sensitive detection of metallothioneins-1, -2 and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for enhanced membrane transfer and retention. *J Biochem Biophys Methods* 1996;**32**:77-83.
159. Ho TT, Merajver SD, Lapiere CM, Nusgens BV, Deroanne CF. RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J Biol Chem* 2008;**283**:21588-21598.
160. Deroanne C, Vouret-Craviari V, Wang B, Pouyssegur J. EphrinA1 inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway. *J Cell Sci* 2003;**116**:1367-1376.
161. Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 1980;**102**:344-352.
162. Smirnova IV, Bittel DC, Ravindra R, Jiang H, Andrews GK. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem* 2000;**275**:9377-9384.
163. Kischel P, Waltregny D, Dumont B, Turtoi A, Greffe Y, Kirsch S, De Pauw E, Castronovo V. Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *Int J Cancer* 2010;**126**:640-650.
164. Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* 2003;**533**:211-226.
165. Hulin A, Deroanne CF, Lambert CA, Dumont B, Castronovo V, Defraigne JO, Nusgens BV, Radermecker MA, Colige AC. Metallothionein-dependent up-regulation of TGF-beta2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve. *Cardiovasc Res* 2012;**93**:480-489.

166. Kaji T, Yamamoto C, Tsubaki S, Ohkawara S, Sakamoto M, Sato M, Kozuka H. Metallothionein induction by cadmium, cytokines, thrombin and endothelin-1 in cultured vascular endothelial cells. *Life Sci* 1993;**53**:1185-1191.
167. Moffatt P, Plaa GL, Denizeau F. Induction of metallothionein gene expression by epidermal growth factor and its inhibition by transforming growth factor-beta and dexamethasone in rat hepatocytes. *Hepatology* 1995;**21**:1038-1044.
168. Cui W, Bryant MR, Sweet PM, McDonnell PJ. Changes in gene expression in response to mechanical strain in human scleral fibroblasts. *Exp Eye Res* 2004;**78**:275-284.
169. White SJ, Hayes EM, Lehoux S, Jeremy JY, Horrevoets AJ, Newby AC. Characterisation of the differential response of endothelial cells exposed to normal and elevated laminar shear stress. *J Cell Physiol* 2011.
170. Roy SK, Srivastava RK, Shankar S. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J Mol Signal* 2010;**5**:10.
171. Datta J, Majumder S, Kutay H, Motiwala T, Frankel W, Costa R, Cha HC, MacDougald OA, Jacob ST, Ghoshal K. Metallothionein expression is suppressed in primary human hepatocellular carcinomas and is mediated through inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha by phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade. *Cancer Res* 2007;**67**:2736-2746.
172. Grande-Allen KJ, Griffin BP, Ratliff NB, Cosgrove DM, Vesely I. Glycosaminoglycan profiles of myxomatous mitral leaflets and chordae parallel the severity of mechanical alterations. *J Am Coll Cardiol* 2003;**42**:271-277.
173. Kimura N, Shukunami C, Hakuno D, Yoshioka M, Miura S, Docheva D, Kimura T, Okada Y, Matsumura G, Shin'oka T, Yozu R, Kobayashi J, Ishibashi-Ueda H, Hiraki Y, Fukuda K. Local tenomodulin absence, angiogenesis, and matrix metalloproteinase activation are associated with the rupture of the chordae tendineae cordis. *Circulation* 2008;**118**:1737-1747.
174. Lacerda CM, Disatian S, Orton EC. Differential protein expression between normal, early-stage, and late-stage myxomatous mitral valves from dogs. *Proteomics Clin Appl* 2009;**3**:1422-1429.
175. Barth M, Schumacher H, Kuhn C, Akhyari P, Lichtenberg A, Franke WW. Cordial connections: molecular ensembles and structures of adhering junctions connecting interstitial cells of cardiac valves in situ and in cell culture. *Cell Tissue Res* 2009;**337**:63-77.

176. Latif N, Sarathchandra P, Thomas PS, Antoniow J, Batten P, Chester AH, Taylor PM, Yacoub MH. Characterization of structural and signaling molecules by human valve interstitial cells and comparison to human mesenchymal stem cells. *J Heart Valve Dis* 2007;**16**:56-66.
177. Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;**35**:113-118.
178. Stephens EH, Durst CA, West JL, Grande-Allen KJ. Mitral valvular interstitial cell responses to substrate stiffness depend on age and anatomic region. *Acta Biomater* 2011;**7**:75-82.
179. Blevins TL, Peterson SB, Lee EL, Bailey AM, Frederick JD, Huynh TN, Gupta V, Grande-Allen KJ. Mitral valvular interstitial cells demonstrate regional, adhesional, and synthetic heterogeneity. *Cells Tissues Organs* 2008;**187**:113-122.
180. Sainger R, Grau JB, Branchetti E, Poggio P, Seefried WF, Field BC, Acker MA, Gorman RC, Gorman JH, 3rd, Hargrove CW, 3rd, Bavaria JE, Ferrari G. Human myxomatous mitral valve prolapse: Role of bone morphogenetic protein 4 in valvular interstitial cell activation. *J Cell Physiol* 2012;**227**:2595-2604.
181. Colige A, Vandenberghe I, Thiry M, Lambert CA, Van Beeumen J, Li SW, Prockop DJ, Lapiere CM, Nusgens BV. Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J Biol Chem* 2002;**277**:5756-5766.
182. Arocha F, Diez-Ewald M, Durango AI, Sulbaran T. Platelet activity in mitral valve prolapse: a study of platelet aggregation, malondialdehyde production, and plasma beta-thromboglobulin. *Am J Hematol* 1985;**19**:21-25.
183. Chen MC, Chang JP, Liu WH, Yang CH, Chen CJ, Fang CY, Hsieh YK, Wang YH, Chang HW. Increased serum oxidative stress in patients with severe mitral regurgitation: a new finding and potential mechanism for atrial enlargement. *Clin Biochem* 2009;**42**:943-948.
184. Joshi B, Ordonez-Ercan D, Dasgupta P, Chellappan S. Induction of human metallothionein 1G promoter by VEGF and heavy metals: differential involvement of E2F and metal transcription factors. *Oncogene* 2005;**24**:2204-2217.
185. Conway DE, Lee S, Eskin SG, Shah AK, Jo H, McIntire LV. Endothelial metallothionein expression and intracellular free zinc levels are regulated by shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;**299**:C1461-1467.

186. Tao G, Kotick JD, Lincoln J. Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells. *Curr Top Dev Biol* 2012;**100**:203-232.
187. Moesgaard SG, Olsen LH, Viuff BM, Baandrup U, Pedersen LG, Thomsen PD, Pedersen HD, Harrison AP. Increased nitric oxide release and expression of endothelial and inducible nitric oxide synthases in mildly changed porcine mitral valve leaflets. *J Heart Valve Dis* 2007;**16**:67-75.
188. Olsen LH, Mortensen K, Martinussen T, Larsson LI, Baandrup U, Pedersen HD. Increased NADPH-diaphorase activity in canine myxomatous mitral valve leaflets. *J Comp Pathol* 2003;**129**:120-130.
189. 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.
190. Kim TR, Moon JH, Lee HM, Cho EW, Paik SG, Kim IG. SM22alpha inhibits cell proliferation and protects against anticancer drugs and gamma-radiation in HepG2 cells: involvement of metallothioneins. *FEBS Lett* 2009;**583**:3356-3362.
191. Haroon ZA, Amin K, Lichtlen P, Sato B, Huynh NT, Wang Z, Schaffner W, Murphy BJ. Loss of metal transcription factor-1 suppresses tumor growth through enhanced matrix deposition. *FASEB J* 2004;**18**:1176-1184.
192. Hattori N, Carrino DA, Lauer ME, Vasanthi A, Wylie JD, Nelson CM, Apte SS. Pericellular versican regulates the fibroblast-myofibroblast transition: a role for ADAMTS5 protease-mediated proteolysis. *J Biol Chem* 2011;**286**:34298-34310.
193. Ramirez F, Rifkin DB. Extracellular microfibrils: contextual platforms for TGFbeta and BMP signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2009;**21**:616-622.
194. Nataatmadja M, West J, West M. Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm. *Circulation* 2006;**114**:I371-377.
195. Gomez D, Al Haj Zen A, Borges LF, Philippe M, Gutierrez PS, Jondeau G, Michel JB, Vranckx R. Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *J Pathol* 2009;**218**:131-142.
196. Rodriguez C, Chen F, Weinberg RA, Lodish HF. Cooperative binding of transforming growth factor (TGF)-beta 2 to the types I and II TGF-beta receptors. *J Biol Chem* 1995;**270**:15919-15922.

197. Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 1999;**283**:2080-2082.
198. Townsend TA, Robinson JY, Deig CR, Hill CR, Misfeldt A, Blobe GC, Barnett JV. BMP-2 and TGFbeta2 Shared Pathways Regulate Endocardial Cell Transformation. *Cells Tissues Organs* 2011;**194**:1-12.
199. Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, Kountouri N, Amatayakul-Chantler S, Grail D, Small C, Weinberg RA, Sizeland AM, Zhu HJ. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:4371-4385.
200. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1997;**124**:2659-2670.
201. Azhar M, Runyan RB, Gard C, Sanford LP, Miller ML, Andringa A, Pawlowski S, Rajan S, Doetschman T. Ligand-specific function of transforming growth factor beta in epithelial-mesenchymal transition in heart development. *Dev Dyn* 2009;**238**:431-442.
202. Barth PJ, Koster H, Moosdorf R. CD34+ fibrocytes in normal mitral valves and myxomatous mitral valve degeneration. *Pathol Res Pract* 2005;**201**:301-304.
203. Matt P, Habashi J, Carrel T, Cameron DE, Van Eyk JE, Dietz HC. Recent advances in understanding Marfan syndrome: should we now treat surgical patients with losartan? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;**135**:389-394.
204. Gendron C, Kashiwagi M, Lim NH, Enghild JJ, Thogersen IB, Hughes C, Caterson B, Nagase H. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. *J Biol Chem* 2007;**282**:18294-18306.
205. Didangelos A, Mayr U, Monaco C, Mayr M. Novel role of ADAMTS-5 in proteoglycan turnover and lipoprotein retention in atherosclerosis. *J Biol Chem* 2012.
206. Melching LI, Fisher WD, Lee ER, Mort JS, Roughley PJ. The cleavage of biglycan by aggrecanases. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;**14**:1147-1154.
207. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM, Fosang AJ. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 2005;**434**:648-652.

208. Fosang AJ, Rogerson FM, East CJ, Stanton H. ADAMTS-5: the story so far. *Eur Cell Mater* 2008;**15**:11-26.
209. McCulloch DR, Nelson CM, Dixon LJ, Silver DL, Wylie JD, Lindner V, Sasaki T, Cooley MA, Argraves WS, Apte SS. ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Dev Cell* 2009;**17**:687-698.

LISTE DES PUBLICATIONS PERSONNELLES

Hulin A, Deroanne CF, Lambert CA, Dumont B, Castronovo V, Defraigne JO, Nusgens BV, Radermecker MA, Colige AC. Metallothionein-dependent up-regulation of TGF-beta2 participates in the remodelling of the myxomatous mitral valve. *Cardiovascular research* 2012;**93**:480-489.

Radermecker MA, Boulanger K, Hulin A, Lambert C, Limet R, Ch L, Nusgens B. [Myxomatous mitral valve degeneration: biochemical aspects and physiopathological considerations]. *Revue medicale de Liege* 2008;**63**:187-192.

