

Université de Montréal

## **Modélisation des maladies cardiovasculaires**

**Établissement d'un nouveau modèle de souris pour étudier les cellules valvulaires interstitielles :  
ADAMTS19-Cre-ert2**

**Reconstruction du réseau vasculaire de la rétine en 3D**

Par Johanna Comes

Département de biochimie et de médecine moléculaire  
Faculté de médecine  
Université de Montréal

Mémoire présentée  
En vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
En Biochimie  
Option Génomique humaine

Septembre, 2020

© Johanna Comes, 2020

*Ce mémoire (ou cette thèse) intitulé(e)*

## **Modélisation des maladies cardiovasculaires**

**Établissement d'un nouveau modèle de souris pour étudier les cellules valvulaires interstitielles :  
ADAMTS19-Cre-ert2**

**Reconstruction du réseau vasculaire de la rétine en 3D**

*Présenté par*

**Johanna Comes**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Alain Moreau**

Président-rapporteur

**Gregor Andelfinger**

Directeur de recherche

**Piet Van Vliet**

Superviseur

**Pierre-Marie Dubé**

Membre du jury

# Table des matières

|  |            |
|--|------------|
| <b>TABLE DES MATIÈRES</b>  | <b>I</b>   |
| <b>RÉSUMÉ</b>  | <b>IV</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>V</b>   |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b>  | <b>VI</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES</b>   | <b>VII</b> |
| <b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b>   | <b>IX</b>  |
| <b>REMERCIEMENTS</b>   | <b>XII</b> |
| <b>INTRODUCTION</b>  | <b>13</b>  |
| <b>CHAPITRE I REVUE DE LITTÉRATURE</b>   | <b>2</b>   |
| <b>1.1 QUE SAVONS-NOUS SUR LA FAMILLE DES ADAMTSS ?</b>  | <b>2</b>   |
| 1.1.1 ÉMERGENCE DES ADAMTSS  | 2          |
| 1.1.2 STRUCTURE DES ADAMTSS  | 3          |
| 1.1.3 FONCTION DES ADAMTSS   | 3          |
| 1.1.4 IMPLICATION CONNUE DES ADAMTSS   | 4          |
| 1.1.5 ZOOM SUR ADAMTS19  | 6          |
| <b>1.2 LES VALVES CARDIAQUES PENDANT LE DÉVELOPPEMENT</b>  | <b>8</b>   |
| 1.2.1 LE CŒUR  | 8          |
| 1.2.2 IMPORTANCE DES VALVES CARDIAQUES EN SANTÉ  | 10         |
| 1.2.3 LE DÉVELOPPEMENT ANATOMIQUE ET CELLULAIRE DES VALVES CARDIAQUES  | 11         |
| 1.2.4 LES VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUÉES DANS LE DÉVELOPPEMENT DES VALVES CARDIAQUES                       | 13         |
| <b>1.3 UTILISATION DES MODÈLES DE SOURIS TRANSGÉNIQUES POUR L'ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DES VALVES CARDIAQUES</b> | <b>17</b>  |
| 1.3.1 CRÉATION DE SOURIS TRANSGÉNIQUE  | 18         |
| 1.3.2 LES SOURIS TRANSGÉNIQUES INDUCTIBLES   | 22         |
| 1.3.3 TRAÇAGE DE LIGNÉE CELLULAIRE   | 23         |
| 1.3.4 EXEMPLE DE MODÈLE DE SOURIS TRANSGÉNIQUE UTILISÉ DANS LE DÉVELOPPEMENT DES VALVES CARDIAQUE              | 28         |
| <b>CHAPITRE II HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS</b>   | <b>31</b>  |
| <b>2.1 LES HYPOTHÈSES DE RECHERCHE</b>   | <b>31</b>  |
| <b>2.2 LES OBJECTIFS DE RECHERCHE</b>  | <b>31</b>  |
| <b>CHAPITRE III MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>  | <b>32</b>  |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.1 LES MODÈLES DE SOURIS UTILISÉES</b>   | <b>32</b> |
| 3.1.1 LA SOURIS ADAMTS19-CREERT2   | 32        |
| 3.1.2 LES SOURIS TdTOMATO  | 34        |
| 3.1.3 LES SOURIS WT  | 34        |
| 3.1.4 GÉNOTYPAGE   | 35        |
| <b>3.2 STRATÉGIE DE CROISEMENT</b>   | <b>37</b> |
| 3.2.1 CROISEMENT DE MAINTENANCE  | 38        |
| 3.2.2 CROISEMENT D'EXPÉRIENCE  | 38        |
| 3.2.3 ANALYSE DU RENDEMENT ET PRÉVISION DU NOMBRE DE SOURIS NÉCESSAIRE   | 38        |
| <b>3.3 TAMOXIFEN : DOSAGE ET ADMINISTRATION</b>  | <b>38</b> |
| 3.3.1 FABRICATION DU TAMOXIFEN   | 38        |
| 3.3.2 OPTIMISATION DES DOSES ET DE LA VOIE D'ADMINISTRATION  | 39        |
| <b>3.4 PRÉLÈVEMENT DES CŒURS</b>   | <b>39</b> |
| 3.4.1 SACRIFICES   | 39        |
| 3.4.2 EXTRACTION DES EMBRYONS  | 39        |
| 3.4.3 EXTRACTION DES CŒURS   | 40        |
| 3.4.4 FIXATION ET STOCKAGE   | 40        |
| <b>3.6 CRYO-SECTION</b>  | <b>40</b> |
| 3.6.1 ENCASTREMENT ET AJUSTEMENT DE L'HOMÉOSTASIE DES CŒURS  | 40        |
| 3.6.2 COUPE DE CŒUR AU CRYOSTAT  | 41        |
| 3.7 MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE   | 41        |
| 3.8 IMAGERIE À FLUORESCENCE  | 41        |
| <b>3.9 SÉQUENÇAGE NANO-PORE</b>  | <b>42</b> |
| 3.9.1 EXTRACTION D'ADN À HAUT POIDS MOLÉCULAIRE  | 42        |
| 3.9.2 CONTROL DE LA QUALITÉ ET LA QUANTITÉ DE L'ADN  | 42        |
| 3.9.3 FRAGMENTATION DE L'ADN   | 43        |
| 3.9.3 CONTRÔLE DE L'INTÉGRITÉ DE L'ADN   | 43        |
| 3.9.4 PRÉPARATION DE LA LIBRAIRIE  | 43        |
| 3.9.5 SÉQUENÇAGE ET ANALYSE  | 44        |
| <br>   |           |
| <b>CHAPITRE IV RÉSULTATS</b>   | <b>44</b> |
| <hr/>  |           |
| <b>4.1 OPTIMISATION ET ÉTABLISSEMENT D'UNE STRATÉGIE D'EXPÉRIMENTATION POUR TESTER UN NOUVEAU MODÈLE DE SOURIS CRE-ERT2</b>                        | <b>44</b> |
| <b>4.2 CARACTÉRISATION DU MOTIF D'EXPRESSION ET ÉTABLISSEMENT DE LA REPRODUCTIBILITÉ AU TRAVERS DES GÉNÉRATIONS</b>                                | <b>47</b> |
| 4.2.1 LA LIGNÉE 1 REPRODUIT PARTIELLEMENT LE PATRON D'EXPRESSION DE LA SOURIS ADAMTS19 KO/KO : UNE NOUVELLE LIGNÉE POUR LES FIBROBLASTES CARDIAQUE | 47        |
| 4.2.2 LA LIGNÉE 2 REPRODUIT PARTIELLEMENT LE PATRON D'EXPRESSION DE LA SOURIS ADAMTS19 KO/KO MAIS LE PATRON D'EXPRESSION N'EST PAS TRANSMISSIBLE   | 54        |
| 4.2.4 LA LIGNÉE 3 MONTRE UN PATRON D'EXPRESSION REPRODUCTIBLE INCONNU : L'ARTÈRE PULMONAIRE EFFÉRENTE  | 55        |
| <b>4.3 INVESTIGATION DE LA RAISON DERRIÈRE LES DIFFÉRENTS MOTIFS D'EXPRESSION</b>  | <b>61</b> |
| <br>   |           |
| <b>CHAPITRE V DISCUSSION ET PERSPECTIVE</b>  | <b>63</b> |
| <hr/>  |           |
|  | <b>66</b> |
| <br>   |           |
| <b>CHAPITRE VI CONCLUSION</b>  | <b>67</b> |
| <hr/>  |           |
| <b>CHAPITRES VI PROTOCOL RAPIDES POUR RECONSTRUIRE LE RÉSEAU VASCULAIRE DE L'ŒIL EN 3D</b>   | <b>68</b> |

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>6.1 INTRODUCTION</b>           | <b>69</b> |
| <b>6.2 RÉSULTATS</b>              | <b>70</b> |
| 6.2.1 PROTOCOL                    | 70        |
| <b>6.3. DISCUSSION\CONCLUSION</b> | <b>76</b> |

---

**CHAPITRE VII DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES** **I**

---

**II**

## Résumé

**INTRODUCTION :** Les maladies valvulaires du cœur surviennent dans 2% de la population, impliquant souvent un reflux sanguin dû au rétrécissement de la valve. Nous avons récemment identifié deux familles non apparentées étant atteintes par une sténose aortique. Le séquençage exomique des familles a révélé une mutation entraînant une perte de fonction homozygote pour le gène *ADAMTS19*. La relation entre la perturbation du gène *ADAMTS19* et la sténose a été reproduite et donc confirmée grâce à une souris *ADAMTS19-LACZ KO/KO*. Cette souris montre également que *ADAMTS19* est spécifiquement exprimé dans les cellules valvulaires interstitielles (VICs) dans les valves. Le rôle d'*ADAMTS19* durant le développement des valves reste inconnu. Pour analyser le patron d'expression d'*ADAMTS19* pendant le développement du cœur, nous avons obtenu un modèle de souris transgénique contenant une CRE-tamoxifen inducible (Cre-ERT2) qui est exprimé sous l'influence du promoteur humain *ADAMTS19*. **HYPOTHESE/OBJECTIF :** Nous émettons l'hypothèse que le promoteur humain d'*ADAMTS19* inséré dans la souris *ADAMTS19-Cre-ERT2* contient toutes les séquences régulatrices permettant d'exprimer le gène *ADAMTS19* et que *ADAMTS19* est principalement exprimé au niveau des cellules valvulaires interstitielles dans les valves. L'objectif est de caractériser le patron d'expression d'*ADAMTS19* en analysant sa distribution durant le développement grâce à une souris reportrice tdTomato. Comme *ADAMTS19* est spécifiquement exprimé dans les VICs, cet outil transgénique permettrait d'étudier ces cellules durant le développement. **METHODE/RESULTAT :** Suite à une étude *in silico* le promoteur *ADAMTS19* est apparu comme extrêmement conservé. Par conséquent, pour analyser l'expression d'*ADAMTS19* nous avons obtenu une souris BAC *ADAMTS19-Cre-ERT2* contenant la séquence conservée que nous avons croisé avec une souris reportrice tdTomato. Le Tamoxifen est administré aux femelles gestantes par gavage aux jours embryonnaires E9,5, E11,5 ainsi que E13,5, et les cœurs sont extraits à E16,5. Des coupes de cœurs embryonnaires vont permettre d'identifier la localisation et la morphologie des cellules marquées. L'expression d'*ADAMTS19* dans les cellules valvulaires interstitielles est consistant avec le fait qu'*ADAMTS19* est connu pour affecter les valves durant le développement et dans le cas de maladie valvulaire. Cependant, le patron des valves n'est pas reproductible au travers des générations. De plus, nous observons qu'*ADAMTS19* est marqué dans des cellules des oreillettes et ventricule dans une lignée et dans une sous population de cellules de l'artère pulmonaire dans une autre. **CONCLUSION :** L'analyse des séquences de chaque lignée par séquençage permet de investiguer la raison de ses différents patrons et de mettre en évidence des régulateurs spécifiques. **MOTS-CLÉS:** *ADAMTS19*, sténose aortique, développement des valves, souris transgénique, technologie recombinante Cre-lox, génétique.

## Abstract

**BACKGROUND:** Valvular heart disease (VHD) occurs in ~2% of the general population, often resulting in reduced or disturbed blood flow. We recently identified two unrelated families with recessive inheritance patterns of progressive polyvalvular heart disease in absence of any clear syndromic phenotype. Exome sequencing revealed homozygous, rare, loss of function (LOF) alleles in both families for the gene *ADAMTS19*. The relation between *ADAMTS19* mutation and aortic stenosis were confirmed via an *ADAMTS19*-LacZ KO/KO mouse model. This model also shows that *ADAMTS19* is specific of VICs during valve development. The ADAMTS protein family includes 19 proteases that are involved in matrix remodeling, and tissue homeostasis in development and disease. However, the role of *ADAMTS19* specifically during valve development remains unknown. We aim to characterize *ADAMTS19* expression using a BAC transgenic *ADAMTS19*-CREERT2 mouse. **HYPOTHESE/OBJECTIVE** We hypothesize that the BAC used to make the *ADAMTS19*-CREERT2 mouse contains all the regulatory elements to express it and also that its expression will be specific to the VICs. The objective is to establish the *ADAMTS19*-CREERT2 and therefore to create a new tool to study VICs *in vivo*. **METHODS/RESULTS:** *In silico* analysis of the human and mouse *ADAMTS19* genomic regions showed a high level of conservation. Thus, to analyze *ADAMTS19* expression patterns during mouse development, we obtained a BAC transgenic mouse model containing a tamoxifen inducible Cre (CreERT2) that is expressed under the influence of the human *ADAMTS19* promoter and surrounding genomic region. We crossed males from several lines created in parallel with Rosa-tdTomato reporter females to generate offspring in which expression of the fluorescent tdTomato reporter is activated in *ADAMTS19*-expressing cells upon tamoxifen administration. Surprisingly, whole mount imaging of embryos induced at E13.5 and isolated at E16.5 revealed strong, but distinct labelling patterns in offspring from different *ADAMTS19*CreERT2 sublines. Whereas one line exclusively labelled VICs, consistent with *ADAMTS19* *in situ* RNA expression data from the Eurexpress database, another line specifically labelled cells in atrial and ventricular, but not VICs. A third line seems to label only a subset of cells in the pulmonary artery. Labeling of *ADAMTS19*-positive VICs is consistent with *ADAMTS19* affecting valve development and VHD. In addition, we observed exclusive *ADAMTS19*-dependent labelling in atrial and ventricular cells or in a subset of pulmonary artery cells in two different sublines. **CONCLUSION:** The distinct expression patterns in offspring from different *ADAMTS19*-Cre-ERT2 lines indicates that although regulation of *ADAMTS19* is conserved between human and mouse, expression in VICs versus other cells may be dependent on mutually exclusive regulatory mechanisms. **KEYWORDS:** *ADAMTS19*, aortic stenosis, valve development, Transgenic mouse, Cre-lox recombinant technology, genetic.

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Table 1</b> Fabrication du mix de PCR.....                                       | 36 |
| <b>Table 2</b> Programme utilisé pour la PCR.....                                   | 36 |
| <b>Table 3</b> Récapitulatif de l'efficacité des principales lignées analysées..... | 66 |

# Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> <i>ADAMTS19</i> est exprimé dans les quatres valves cardiaques pendant le remodelage des valves et l'élongation (adaptée de.....)   | 7  |
| <b>Figure 2</b> Différentes étapes de la transgènèse par la methode PiggyBac-on-BAC. Le tranposon PB (PBase) excise le transgene au niveau de séquences ITR et va l'intégrer dans le genome a l'endroit d'un site TTAA.....   | 21 |
| <b>Figure 3</b> Information sur le BAC et le gène d'intérêt (A)Information sur le BAC (B) Cartographie du vecteur de clonage (C) Position du clone RP11-81L23 utilisé pour la génération de la souris.....  | 32 |
| <b>Figure 4</b> Informations sur le gène d'interet (A) carte d'identité du gène (B) Transcrit choisis pour la transgènese NM_133638.3 .....   | 33 |
| <b>Figure 5</b> Stratégie d'insertion de la Cre-ERT2.....   | 33 |
| <b>Figure 6</b> Introduction des ITR dans la structure du vecteur de clonage par recombinaison homologue. 34  |    |
| <b>Figure 7</b> Établissement d'une nouvelle lignée ADAMTS19-Cre-ERT2. A .....  | 46 |
| <b>Figure 8</b> Le patron d'expression de la lignée 3344 est reproductible au travers des générations. ....   | 50 |
| <b>Figure 9</b> Patron d'expression dans les oreillettes et les ventricules lorsque l'on administre le tamoxifen a E13.5 et que l'on analyse les cœurs a E16.5. ....  | 51 |
| <b>Figure 10</b> Patron d'expression dans les oreillettes et les ventricules lorsque l'on administre le tamoxifen a E11.5 et que l'on analyse les cœurs a E16.5.....  | 52 |
| <b>Figure 11</b> Morphologie et localisation des cellules exprimant la tdTomato.....  | 53 |
| <b>Figure 12</b> Le patron d'expression de la lignée 3339 est n'est pas reproductible à travers les générations. ....   | 54 |
| <b>Figure 13</b> Morphologie et localisation des cellules exprimant la TdTomato dans la lignée 3339.....  | 55 |
| <b>Figure 14</b> Le patron d'expression de la lignée 3341 est reproductible au travers des générations bien que deux patrons d'Expression soient présents dans la lignée F0 ; dans les valves et l'artère pulmonaire efférente, seule l'expression dans l'artère pulmonaire efférente va subsister..... | 58 |
| <b>Figure 15</b> Le patron d'expression est dans l'artère pulmonaire lorsque l'on administre le tamoxifen a 11,5 et 13,5 mais change totalement lorsque l'administration se fait à E 9,5 (A, B, C).....   | 59 |
| <b>Figure 16</b> Morphologie et localisation des cellules exprimant la TdTomato dans la lignée 3341. Bleu :Dapi, Rouge : Tdtomato, Vert : WGA. Échelle 100um. ....  | 60 |
| <b>Figure 17</b> Ditubution de la taille des fragments. NS50 = 2,49 Kb.....   | 62 |
| <b>Figure 18</b> Retine clarifier avec CUBIC et imagé au microscope confocol. IB4 ne semble pas avoir bien fonctionné. ....   | 72 |

**Figure 19** Comparaison en 2D de l'imagerie par microscopy confocal et light-sheet (Grossissement 5X). Le temps d'aquisition pour la mircroscopie confoczl est de 23 minutes et le temps dacquisition pour le light-sheet est de 4 minutes. Le niveau de détail en profondeur semble plus optimal avec le lighsheet.. 72

**Figure 20** Comparaison en 3D de la reconstruction a partir du logiciel Imaris et du logiciel Leica. Imaris nous permet de voir la rétine dans son intégralité avec un niveau de détails extrêmement précis. Le lociel leica montre une reconstruction partielle du réseau vasculaire et la rétine n'est pas dans son intégralité. .... 73

**Figure 21** Comparison between P6 Cdh5-cre-tdtomato normoxia Vs hyperoxia ..... 74

**Figure 22** Comparison between 11 Cdh5-cre-tdtomato normoxia Vs hyperoxia ..... 75

**Figure 23** Zoom sur la rétine marqué avec IB4- 488 (A, C) et IB4 – 647 (B, D). Lorsque le temps de clearing et réduit les anticrop fonctionne..... 75

# Liste des abbreviations

|   |        |
|---|--------|
| ADAMs : A disintegrin and metalloproteinase .....                                 | 2      |
| ADAMTS: extracellular matrix .....  | 1      |
| ADAMTS19 : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 19..... | 1      |
| ADN : Acide désoxyribonucléique.....  | 24     |
| AH : hyaluronic acid.....   | 22     |
| ALK3 : Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A .....                          | 20     |
| ARN : Acide ribonucléique .....   | 24     |
| AVC : atrio-ventricular canal.....  | 16     |
| Bac : Bacterial artificial chromosome.....  | 1      |
| BMP : Bone morphogenetic protein .....  | 19, 20 |
| BMP-2 : Bone morphogenic protein 2.....   | 20     |
| BMP-4 : Bone morphogenic protein 4.....   | 20     |
| BMP6 : Bone morphogenic protein 6 .....   | 20     |
| BMP7 : Bone morphogenic protein 7 .....   | 20     |
| CD31 : PECAM protein.....   | 19     |
| CRC : Cancer colorectal .....   | 9      |
| Cre : Cyclic recombinase .....  | 1      |
| Cx45 : connexine 45 .....   | 22     |
| Dkk1 : Dickkopf 1 .....   | 19     |
| Down syndrome critical région : down syndrome critical région 1.....              | 21     |
| Dr : Docteur .....  | xi     |
| ECFP : enhanced cyan fluorescent proteine .....                                   | 34     |
| ECM : extracellular matrix .....  | 1      |
| EMT : endothelial to mesenchymal transition .....                                 | 16     |
| ER : Eostrogen receptor .....   | 1      |
| ERbB : Epidermal growth factor receptor .....                                     | 22     |
| EYFP : enhanced yellow fluorescent protéine.....                                  | 34     |
| flt-1: VEGFR1 .....   | 21     |
| GFP : Green fluorescente protein .....  | 34     |
| HAS2 : Hyaluronan Synthase 2 .....  | 22     |
| Homology Directed Repair.....   | 29     |

|   |    |
|---|----|
| Kb : Kilobase .....   | 1  |
| KDR : Kinase Insert Domain Receptor ou VEGFR2 .....         | 21 |
| loxP : Locus of X-over P1 .....                             | 30 |
| MMPs : matrix metalloproteinase.....                        | 2  |
| NFAT : Nuclear factor of activated T-cells .....            | 21 |
| NFAT1 : Nuclear factor of activated T-cells 1 .....         | 21 |
| NFAT2 : Nuclear factor of activated T-cells 2 .....         | 21 |
| Non Homologous End joining .....                            | 28 |
| Notch.....  | 20 |
| OFT : outflow tract .....                                   | 16 |
| OTps : Outflow tract proximal.....                          | 19 |
| Over night .....  | 49 |
| Piggy Bac .....   | 24 |
| RISC : RNA-induced silencing complex .....                  | 26 |
| RTK : Receptor tyrosine kinases .....                       | 22 |
| siRNA : Small interfering ARN.....                          | 26 |
| tet-OFF. Tetracycline off .....                             | 29 |
| tet-ON : Tetracyclin ON .....                               | 30 |
| tet-On : Tétracycline On .....                              | 19 |
| TGF B2 : Transforming growth factor Beta 2 .....            | 20 |
| TGF B3 : Transforming growth factor Beta 3 .....            | 20 |
| TGF-B : Transforming growth factor .....                    | 20 |
| TGF- $\beta$ : ransforming growth factor Beta .....         | 16 |
| TSRs : The thrombospondin type 1 repeat .....               | 3  |
| VEGF : Vascular growth factor .....                         | 19 |
| VEGFR : Vascular endothelial growth facteur receptor.....   | 21 |
| VEGFR1 : Vascular endothelial growth factor receptor 1..... | 21 |
| VEGFR2 : Vascular endothelial growth factor receptor 2..... | 21 |
| VICs : valvular interstitial cells .....                    | 1  |
| Wnt : Wingless/integrated.....                              | 19 |

*A Charly pour son soutien inconditionnel*

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Gregor Andelfinger pour m'avoir donné la chance incroyable de découvrir et d'explorer les frontières de la génétique cardiovasculaire au sein de son laboratoire, je le remercie pour m'avoir lancé le défi de mener un projet complexe et novateur. Un projet qui m'a énormément appris, autant en connaissances scientifiques qu'en connaissances en gestion et organisation. J'ai pu profiter d'une exposition internationale lors de congrès, notamment aux États-Unis et faire des rencontres incroyables qui m'ont ouvert de nouvelles portes. D'autres part, la liberté laissée par le Dr. Andelfinger m'a permis d'élargir mes connaissances techniques, d'essayer de nouvelles directions expérimentales, de partager des collaborations et donc en conséquence de m'épanouir scientifiquement et de développer un amour pour la recherche. Je remercie également Dr. Piet Van Vliet pour son soutien lors de ma maîtrise. Il m'a éclairé de ses 15 années d'expériences en biologie du développement et conseillé sur l'aspect expérimental, sur la planification de mes expériences et aussi sur d'importantes décisions visant à optimiser mon projet. De longues discussions avec lui, m'ont permis de mieux comprendre ce que signifie réellement travailler dans la recherche et comment se positionner pour mettre toutes les chances de son côté. Je suis extrêmement reconnaissante au Dr. Alexandre Dubrac pour son implication dans notre collaboration. Autant que pour son soutien que son accessibilité. Il m'a d'avantage transmis cette passion pour la recherche et m'a initié aux principes fondamentaux de la biologie vasculaire, en me faisant notamment découvrir les modèles utilisés, les maladies associées, les nouvelles pistes de recherche et les récentes découvertes. Merci! Je remercie également Dr. Séverine Leclerc pour m'avoir aidé à trouver mes marques dans le laboratoire et dans le centre de recherche et aussi pour s'être occupé de commander tous les réactifs nécessaires au bon déroulement de mon projet pendant 2 ans. Je remercie aussi Dr. Andrea Oneglia et Dr. Jessica Piché pour toutes les discussions intéressantes autour du projet SGO1 et pour m'avoir appris de nombreuses expériences de biologie moléculaire. Merci à Dr. Martin Smith et son associé Dr. Marieke pour leur soutien et leur accessibilité lors de notre collaboration autour du séquençage nanopore. Je remercie Véronique et Karine qui ont fait un travail acharné pour prendre soin de mes précieuses colonies de souris. Je remercie Dr. Marie Kmita pour sa gentillesse, sa générosité et son aide. Je remercie Dr. Elke Kuster pour m'avoir initié aux techniques de microscopie de manière claire et structurée. Aussi je souhaite remercier ma famille pour m'avoir donné la force de me lancer dans cette aventure canadienne. Mes parents pour m'avoir donné les clefs qui m'ont permis de trouver ma voie, ma sœur tout simplement pour exister mais aussi pour ses encouragements, son soutien et sa présence ainsi que mes grands-mères pour leur exemple de détermination. Et bien sûr mon conjoint pour m'avoir accompagné, soutenu, aidé, conseillé et supporté dans cette aventure.

# Introduction

Les malformations cardiaques sont les maladies congénitales les plus communes. Elles représentent quatre à six naissances sur 1000. Entre 25% et 30% sont des maladies valvulaires ce qui en fait la sous classe la plus représentée (Armstrong and Bischoff 2004). Récemment, nous avons découvert une forme monogénique de sténose aortique grâce à l'étude de deux familles ayant toutes deux des membres atteints par cette pathologie. L'analyse de leur génome a mis en évidence une micro-délétion du gène A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 19 (*ADAMTS19*) qui a pour conséquence la dégradation de la protéine et donc la perte de fonction total du gène. Nous avons validé la relation de cause à effet *in vivo* grâce à un modèle de souris de délétion de fonction génique qui effectivement reproduisait la sténose aortique observés chez les patients. Avec le même modèle, nous avons mis en évidence le fait qu'*ADAMTS19* est exprimé dans les cellules valvulaires interstitielles durant la phase de remodelage de la matrice extracellulaire (ECM : extracellular matrix) (Wünnemann et al. 2020). Ce gène fait partie d'une grande famille de protéase : les ADAMTSs, dont la fonction n'est pas bien connue. De plus aucun outil n'existe pour étudier les VICs spécifiquement. Durant ma maîtrise, le but été d'établir un nouvel outil qui permet de visualiser les cellules qui exprime *ADAMTS19* dans l'espace et le temps: une souris inductible *ADAMTS19 – Cre – ERT2*. Il s'agit du premier outil développé mondialement permettant d'étudier les cellules valvulaires interstitielles *in vivo* spécifiquement. A l'aide d'une souris rapporteuse TdTomato, j'ai analysé plusieurs lignées *ADAMTS19* conçu *in vitro* de manière indépendante. Ces lignées ont été conçu *in vitro* à partir du même BAC contenant les séquences promotrices en 5' de la séquence d'*ADAMTS19* et son premier exon. Étonnamment, trois patrons d'expression distincts ont été observés : (I) dans les valves cardiaques, (II) dans la voie de chasse de l'artère pulmonaire et enfin (III) dans les ventricules et les oreillettes uniquement. La cause de ces patrons d'expression qui différent reste encore inconnu mais cela pourrait être dû à la longueur du Bac qui mesure plus de 200 Kb, en effet il aurait pu se scinder durant la création des lignées ou pourrait avoir été inséré dans des régions épi-génétiquement fermées. La revue de littérature met en exergue les connaissances actuelles sur le gène *ADAMTS19*, le développement valvulaire sous tous ses aspects et étaye les technologies disponibles pour étudier *ADAMTS19* durant le développement valvulaire *in vivo*. Ensuite, les hypothèses et objectifs seront décrit, suivit de la méthode utilisée pour établir cette lignée. Enfin, les résultats seront présentés et discutés, avant de conclure.

# Chapitre I Revue de littérature

## 1.1 Que savons-nous sur la famille des ADAMTSs ?

### 1.1.1 Émergence des ADAMTSs

La super famille des ADAMTSs (A Disintegrin And Metalloproteinase With Trombospondin motifs) comprend 19 métalloprotéinases sécrétées et 7 ADAMTS-like (protéines similaires des ADAMTSs mais qui n'ont pas d'activité enzymatique). Chacune de ces protéines est le produit de gènes distincts (Dubail and Apte 2015). Les ADAMTSs font partie de la super famille de protéase Metzincin nommé comme cela pour la conservation d'un résidu méthionine à côté du site actif métalloprotéinase dépendant de l'ion Zinc (Huxley-Jones et al. 2007). Les Metzincins incluent les Metalloprotéinase de matrice (MMPs : Matrix métalloprotéinase) (matrix métalloproteinase), les ADAMs (A disintegrin and metalloproteinase), les BMP1/TLL (Bone morphogenic protein 1/ Tolloid-like protéine) et les Meprin. Contrastant avec la localisation des gènes de MMPs bien définis sur le chromosome humain 11q22, les gènes des ADAMTSs sont largement dispersés dans tout le génome murin et humain (Koo et al. 2007). L'étude de la phylogénie des ADAMTSs des mammifères a permis de déterminer que son expansion est dû à sa duplication qui explique que certains gènes ont une sous fonction et d'autre une nouvelle fonction (Huxley-Jones et al. 2005). Le dendrogramme de regroupement de gènes humains pour les protéines ADAMTS de Brocker et al nous montre qu'ils peuvent être classés en quatre sous-groupes. Le groupe A contient les ADAMTS avec le plus grand nombre de répétitions de groupe trombospondin (TS), le groupe B est le plus grand groupe contenant des ADAMTSs avec de cinq à huit domaines TS. Les ADAMTSs du groupe C contiennent quatre TS. Les gènes du groupe D sont très différents des autres groupes, en effet les groupes A, B et C semblent dérivés d'un ancêtre plus proche que le groupe D. Pour des informations plus détaillées sur chaque groupe se référer à l'article (Brocker, Vasiliou, and Nebert 2009).

### **1.1.2 Structure des ADAMTSs**

Les ADAMTSs sont des enzymes dites protéases extracellulaires sécrétées comprenant un site N-terminal avec un domaine protéase responsable de l'activité catalytique composé d'un peptide signal suivis d'une pro région de longueur variable, d'un domaine métallo protéinase, d'un domaine désintégrine like, puis d'un motif central de séquence répétée trombospondin de type 1 (TSRs), un domaine riche en cystéine et enfin d'une région d'espacement cela constitue la partie commune à toutes les ADAMTSs. En position C- terminale il y a une région qui est différente en fonction des ADAMTSs. En effet dans cette partie aussi appelée région auxiliaire, on trouve un nombre variable de motifs de trombospondin de type 1 et aussi des motifs propres à la fonction spécifique des ADAMTSs. Par exemple, ADAMTS 2, 3 et 14 ont des motifs protocollagen N-propeptidase que les autres ADAMTS n'ont pas. Un autre exemple sont ADAMTS 9 et 20 qui ont des domaines GON-1 (Zhong and Khalil 2019). ADAMTS19 n'a pas de motif propre à sa fonction mais il a cinq motifs TSR-1, tout comme ADAMTS17. ADAMTS19 et ADAMTS17 sont les plus semblable structurellement parlant.

### **1.1.3 Fonction des ADAMTSs**

La plupart des substrats des ADAMTSs sont des composants de la matrice extracellulaire tandis que les ADAMTSs-like ont un rôle de régulateur de l'assemblage de l'ECM. Le contrôle de la structure et la fonction de la matrice extracellulaire (ECM) et donc un thème central dans la biologie des ADAMTSs (Kelwick et al. 2015). Des données de la structure 3D indique que les protéases ADAMTS ont un mécanisme similaire aux MMPs et au ADAMS qui emploie un atome de zinc en combinaison avec trois histidines (Lee et al. 2006), c'est d'ailleurs pour cela qu'elles font partie de la famille de Metzincin comme décrit précédemment. Grâce à des études génétiques, nous avons de nouvelles connaissances sur les ADAMTSs, effectivement elles semblent participer à l'assemblage et la dégradation de la matrice extracellulaire mais aussi à d'autres processus biologiques comme la structure des tissus connectifs, l'angiogenèse et la migration cellulaire. Elles jouent également un rôle dans des processus pathologiques comme le cancer (Binder et al. 2017), ou encore des désordres de la fertilité et dans certains dysfonctionnements du système nerveux. Les ADAMTSs peuvent être classées en sous-groupe sur la base de leur fonction. Il y a les aggrecanases ou proteoglycanase (ADAMTS 1,4,5,8,9,15 et 20), les ADAMTSs qui coupent les protéines de la matrice du cartilage oligomérique (ADAMTS 7 et 12), un groupe ( ADAMTS 2, 3

et 14) qui sont pro collagène N-propeptidases, et un groupe d'enzyme orphelines (ADAMTS 6, 10, 16,17,18,19) (Rodríguez-Manzanares, Fernández-Rodríguez, Rodríguez-Baena, & Iruela-Arispe, 2015). ADAMTS 19 est donc une enzyme orpheline dont les connaissances quant à sa fonction sont extrêmement limitées. Le champ de recherche ADAMTS n'est présent que depuis un peu plus de dix ans, ce sont donc des connaissances très récentes. Cela explique le fait que nous ne connaissons pas le mécanisme d'action de toutes les ADAMTSs. De nouvelles études doivent être effectuées pour approfondir les connaissances quant à leurs fonctions.

### **1.1.4 Implication connue des ADAMTSs**

L'implication des ADAMTS dans le cœur n'a quasiment pas été étudiée à l'exception de l'implication d'ADAMTS5 dans la dilatation aortique. ADAMTS5 s'inscrit en effet comme la protéase clef pour la régulation du versican (Fava et al. 2018). Dans le but de comprendre comment les ADAMTSs fonctionnent dans le cœur, il est important de connaître leur implication dans les autres organes et pathologies.

#### **1.1.4.1 Cancer et angiogenèse**

Les ADAMTSs jouent un rôle clef dans le cancer notamment lors de la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration, l'invasion et l'angiogenèse. Sauf les ADAMTSs 3, 6, 7, 10, 11 et 17 toutes les autres sont connues pour être impliquées dans le cancer. Et souvent dans plusieurs types de cancers (Binder et al. 2017). A titre d'exemple, ADAMTS 5 est impliqué dans le cancer du sein, le cancer colorectal, les mélanomes et le cancer de la prostate. Les études montrent que son expression diminue dans les cellules cancéreuses et de récentes études lui attribuent aussi une fonction anti-angiogénique. ADAMTS19 est impliqué dans le cancer du côlon et aussi gastro-intestinal où il apparaît comme étant plus méthylé que chez les patients non atteints (Nakada et al. 2005). ADAMTS1 est capable d'augmenter l'angiogenèse et de promouvoir la progression de la tumeur dans le carcinome des poumons et les cellules néoplasiques de sein. A contrario lorsque ADAMTS1 subit un clivage autolytique la protéine résultante agit comme un inhibiteur anti-angiogénique de croissance tumorale (Liu, Xu, and Yu 2006).

Le premier mécanisme étudié liant les ADAMTSs avec le cancer est le remodelage de la matrice extracellulaire, émergent comme un facteur clef dans la progression du cancer. Les protéoglycannes, incluant versican et d'autres hyaléctanes représentent les principaux éléments de

l'ECM, ils interagissent avec d'autres molécules importantes comme le glycosaminoglycane hyaluronane et le récepteur de surface cellulaire CD44. Les protéoglycanes hyaluronanes sont régulées au travers du clivage protéolytique par les ADAMTSs. Une dérégulation de l'équilibre entre les hyaluronane proteoglycanes et les ADAMTSs a été proposé comme étant un facteur important dans la progression du cancer. Les membres de la famille des ADAMTSs sont également impliquées dans l'angiogenèse tumorale et montrent des fonctions variées et même parfois opposées qui peuvent être dépendante ou dépendante de l'activité protéolytique. L'angiogenèse tumorale a lieu lorsque la tumeur acquiert la capacité d'induire l'angiogenèse pour favoriser son apport en nutriments. Des ADAMTSs régulent négativement l'angiogenèse et d'autres favorisent son induction.

A titre d'exemple mécanistique, trois mécanismes sont capables d'expliquer la fonction anti-angiogénique des ADAMTSs. Le premier implique le clivage de large trombospondin TSP1 et TSP2 qui résulte en la relâche de région anti-angiogénique 3TSR de l'ECM et ainsi réduit l'angiogenèse, ce qui suggère que l'activité protéolytique est importante pour la fonction angiogénique (Lee et al. 2006). Le second est la séquestration de VEGF par son domaine de liaison heparin qui va affecter la phosphorylation de VEGFR2 et par conséquent supprimer la prolifération des cellules endothéliales (Luque, Carpizo, and Iruela-Arispe 2003). Le troisième mécanisme implique le clivage de la protéase « facteur Von Willebrand factor » (vWF: von willebrand factor).

#### **1.1.4.2 La reproduction et la fertilité**

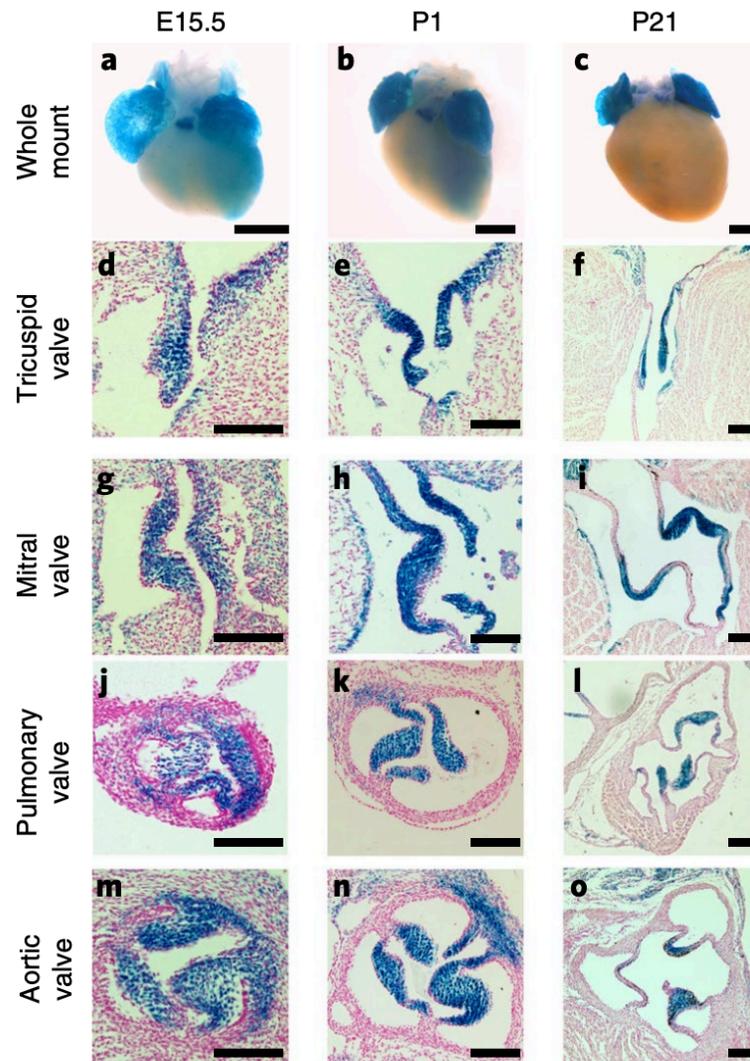
La famille des ADAMTSs joue un rôle multifacette dans la fertilité des mâles et des femelles. Treize ADAMTSs ont été démontrées comme participant dans au moins un des processus essentiels requis pour la morphogénèse des gonades. Le tissu des organes de reproduction doivent continuellement être remodelés. En effet, leur remodelage constitue un aspect critique de leur fonctionnement normal. La maturation, la fertilisation, la relâche des gamètes, l'implantation, la formation de placenta, la gestation et la parution impliquent le développement cyclique et la régression de tissu qui doivent constamment régénérer pour assurer la fertilité. La dérégulation des ADAMTSs est associée avec des désordres de la reproduction comme les ovaires polycystiques et la défaillance prématurée des ovaires (Russell, Brown, and Dunning 2015).

### 1.1.5 Zoom sur ADAMTS19

Cette année *ADAMTS19* a été découverte comme impliquée dans une sténose aortique par notre laboratoire. Grâce à cette étude nous avons appris que *ADAMTS19* est exprimé dans les VICs durant la phase de remodelage de la matrice extracellulaire mais aussi que dans les souris récapitulant la perte de fonction d'*ADAMTS19* ont leur matrice extracellulaire (EMC) désorganisée (**Figure 5**). Ces découvertes laissent à penser qu'*ADAMTS19* participe à l'organisation de l'EMC, peut-être en participant à sa dégradation. Une hypothèse qui expliquerait l'épaississement des valves serait que les protéines de la matrice extracellulaire non clivées s'accumuleraient dû à la perte de fonction d'*ADAMTS19* qui fait partie d'une famille de protéase. Allant dans le sens de cette hypothèse, *ADAMTS19* est exprimé durant la phase de remodelage qui est la phase où la matrice extracellulaire subit des changements permettant aux coussins de l'endocarde de devenir de fines valves matures, notamment des clivages. Le mécanisme détaillé reste à investiguer. Notamment quelle sont le type de protéines que *ADAMTS19* clive précisément ou encore quels signaux active sont expression. Cependant, une analyse informatique du réseau de gènes régulateurs (GRN : gene regulatory network) a permis de déceler que *ADAMTS19* fait partie d'un régulon médié par *Lef1* un médiateur transcriptionnel de la voie de signalisation Wnt/ Beta-Catenin (Wünnemann et al. 2020). Cette étude est la seule sur l'implication d'*ADAMTS19* dans les valves présente dans la littérature.

Cette protéine semble aussi impliquée dans deux autres pathologies : le cancer colorectal (CRC) et la défaillance prématurée de l'ovaire. La méthylation des îlots CpG du promoteur *ADAMTS19* a été regardé dans 252 tumeurs colorectal, 33 tumeurs du sein, 65 tumeurs pancréatiques et 169 tumeurs d'ovaires, 70 CRC métastatique, et enfin 10 lignées cellulaire CRC. Et il semblerait que *ADAMTS19* soit fréquemment mit en silence épigénétiquement dans le CRC et le cancer ovarien mucineux. Depuis la découverte de l'inactivation épigénétique de gènes suppresseurs de tumeur comme Rb, l'hyper méthylation du promoteur de nombreux gènes a été mise en évidence dans les cancers humains. Ces gènes ont la plupart du temps une fonction de suppresseur de tumeur ou de réparation de l'ADN (Russell, Brown, and Dunning 2015). Dans ce cas *ADAMTS19* jouerait un rôle anti-tumorale, une hypothèse possible serait qu'il joue un rôle dans la dégradation des protéines de l'ECM présent dans le microenvironnement de la tumeur. Sa sous régulation favoriserait donc la croissance de la tumeur.

Pour le moment nous avons très peu d'informations sur la fonction, la régulation et le mécanisme générale d'ADAMTS19. Cependant le développement de la souris ADAMTS19- Cre-ERT2 va nous permettre d'investiguer cela dans les valves cardiaques.



**Figure 1** *ADAMTS19* est exprimé dans les quatre valves cardiaques pendant le remodelage des valves et l'élongation (adaptée de *Wünnemann et al. 2020*).

## **1.2 Les valves cardiaques pendant le développement**

### **1.2.1 Le cœur**

Notre cœur bat 100 000 fois par jour propulsant le sang à travers notre corps dans le but d'apporter des nutriments et de l'oxygène mais aussi d'éliminer les déchets. Le cœur est le premier organe fonctionnel à se développer. Chez l'humain, il commence à battre et à pomper le sang entre le jour 21/22 après la fertilisation.

#### **1.2.1.1 Anatomie du cœur**

Les cœurs humains et murins consistent en quatre chambres : Le côté gauche et le côté droit du cœur ont chacun une oreillette et un ventricule. Chacune des chambres supérieures, l'oreillette gauche et droite, reçoivent le sang et le pousse vers les chambres inférieures, le ventricule gauche et le ventricule droit. Les ventricules ont un rôle de pompe très important dans le cœur, en effet ils propulsent le sang vers les poumons et le reste du corps. Il y a deux circulations: la circulation pulmonaire et la circulation systémique. Le circuit pulmonaire transporte le sang vers le poumon et en dehors des poumons, où il prend de l'oxygène et laisse le dioxyde de carbone pour l'exhalation. Le circuit systémique transporte le sang oxygéné vers tous les tissus du corps et renvoie le sang sans oxygène vers le cœur qui va être envoyé vers le circuit pulmonaire ("Heart Anatomy | Anatomy and Physiology" n.d.). Les valves cardiaques se situent à la sortie de chacune des chambres et assurent que la circulation est maintenue dans une seule direction. Le sang circule des oreillettes aux ventricules à travers l'ouverture des valves mitrales et tricuspides. Lorsque les ventricules sont pleins ces valves se ferment, évitant au sang de retourner dans les oreillettes pendant que les ventricules se contractent. Lorsque les ventricules commencent à se contracter, les valves pulmonaires et aortiques sont forcées de s'ouvrir et le sang est propulsé en dehors des ventricules, respectivement vers l'artère pulmonaire et puis vers le reste du corps. En termes d'anatomie cellulaire, le cœur est principalement composé de cardiomyocytes qui sont les cellules musculaires du cœur, de fibroblastes, de cellules endothéliales et de cellules péri-vasculaires (P. Zhou and Pu 2016). Les parois du cœur sont composées de trois couches : l'endocarde, le myocarde et le péricarde. L'endocarde borde l'intérieur du cœur et aussi les valves cardiaques. Il est composé de tissus conjonctifs et de simple tissu épithéliaux. Le myocarde est le tissu musculaire du cœur,

il est responsable du battement du cœur. Le péricarde est la couche la plus externe du cœur. Elle est composée de tissu connectif et de gras (“The Heart Wall - TeachMeAnatomy” n.d.).

### **1.2.1.2 Le fonctionnement du cœur et la circulation sanguine**

Le ventricule droit pompe le sang non oxygéné vers le tronc pulmonaire qui mène aux poumons et bifurque en artères pulmonaires droite et gauche. Ces vaisseaux forment des embranchements à de nombreuses reprises avant d’atteindre les capillaires pulmonaires, où les échanges de gaz se font: le dioxyde de Carbone sort et l’oxygène entre. Les veines pulmonaires conduisent le sang dans l’oreillette gauche, qui pompe le sang vers le ventricule gauche qui va à son tour propulser le sang dans l’aorte et toutes les autres branches du circuit systémique. Ces vaisseaux vont mener au capillaires où les échanges avec les organes et les cellules du corps se font. L’oxygène et les nutriments vont sortir des capillaires pour être utilisés par les cellules et le dioxyde de carbone et les autres déchets vont entrer dans le sang. Les capillaires s’unissent pour former des veinules, qui se transforme en veine encore plus large et vont éventuellement aller dans les veines systémiques majeures, la veine cave supérieure et la veine cave inférieure, qui renvoie le sang vers l’oreillette droite. Le sang est alors pompé vers le ventricule droit. Cette circulation continue tout au long de la vie de l’individu (“Heart Anatomy | Anatomy and Physiology” n.d.).

Le cœur bat grâce au système de conduction qui permet la propagation d’impulsions électriques à travers les oreillettes et les ventricules. En effet, le myocarde est stimulé pour se contracter sans stimulation extérieure. Ce phénomène est possible car les cardiomyocytes sont connectés par des jonctions cellulaires appelé « jonction gap ». Tous les cardiomyocytes dans le cœur sont conducteurs pour les impulsions cardiaques ce qui signifie que la stimulation électrique d’un seul cardiomyocyte peut conduire à la contraction de tout le myocarde. Durant le fonctionnement normal du cœur, l’origine de l’impulsion cardiaque vient des cellules pacemaker dans le nœud sino-auriculaire (SA) et se propage uniformément dans les oreillettes. L’impulsion cardiaque est conduite vers le nœud atrio-ventriculaire, via la voie internodale, où il va se propager au travers du système de conduction des ventricules (Kennedy et al. 2016).

#### 1.2.1.4 Le développement du cœur

Chez l'humain, le cœur se forme à partir d'un tissu embryonnaire appelé mésoderme en fin de gastrulation. Il prend forme dans la région cardiogénique situé près de la tête. Tout d'abord les cellules pro-génitrices du cœur prennent une forme de croissant appelé communément le croissant cardiaque (E15 chez l'humain). Ensuite, la région cardiogénique commence à former les tubes endocardiques qui vont migrer pour fusionner ensemble et ainsi former un seul tube cardiaque primitif composé d'une couche antérieure de cellules endothéliales entouré d'une couche de cellules myocardiales (E18 et E20) (Harvey 2002). Le tube cardiaque primitif est une structure transitoire qui comprend cinq régions distinctes. De la tête à la queue: *truncus arteriosus*, *bulbus cordis*, ventricule primitif, atrium primitif et *sinus venosus*. Le *truncus arteriosus* va se diviser et former l'aorte ascendante et le tronc pulmonaire. Le *Bulbus Cordis* va se développer en ventricule gauche. L'atrium primitif va donner la portion antérieure des oreillettes droite et gauche ainsi que les deux auricules. Enfin le *Sinus Venosus* va se développer en la portion postérieure de l'oreillette droite, en nœud sinusale et en sinus coronaire. Durant le développement, le sang circule en partant du *Sinosus Venus* et des contractions le propulse vers le *Truncus arteriosus*. Entre le jour 23 et 30, le tube primitif va s'allonger et se plier en forme de « S » alignant les compartiments et les vaisseaux de la même manière que chez le cœur adulte. La compartimentation des oreillettes et des ventricules par le septum inter-atrial, le septum inter-ventriculaire et le septum atrio-ventriculaire est complété à la fin de la cinquième semaine de gestation. Les valves atrio-ventriculaires se forment entre la cinquième et la huitième semaine. Les valves semi-lunaire entre la cinquième semaine et la neuvième (“19.5 Development of the Heart – Anatomy and Physiology” n.d., 5). Chez la souris, les mêmes étapes sont observées mais a un âge gestationnel différent.

#### 2.2.2 Importance des valves cardiaques en santé

Chez l'homme, les valves jouent un rôle essentiel dans la formation du cœur qui est le premier organe formé au cours du développement embryonnaire. Quatre valves sont présentes au sein du cœur : la valve aortique et la valve pulmonaire séparant les artères et les oreillettes ainsi que les valves mitrales et tricuspides situées entre les oreillettes et ventricules. Les valves cardiaques permettent la circulation du sang dans une seule direction avec un minimum d'obstruction et de régurgitation. Au cours d'une vie, les valves se ferment trois milliards de fois

permettant ainsi le bon fonctionnement du cœur. Leurs ouvertures et fermetures est le résultat de forces mécaniques exercées par le sang environnant ayant une pression différente de chaque côté des valves (“A Method for Lineage Tracing of Corneal Cells Using Multi-color Fluorescent Reporter Mice | Protocol” n.d.). Le bon développement des valves est donc critique et sa perturbation peut avoir de graves conséquences pour le reste du développement embryonnaire.

Le remplacement des valves est la seconde opération cardiaque la plus commune dans les pays développés ce qui en fait un problème de santé publique majeur. Des malformations congénitales sont présentées sur la majorité des valves aortiques remplacées. Et elles sont associées à de nombreux syndromes comme celui de la trisomie 21, de Noonan et de Holt-Oram, Williams et Marfan. Certaines mutations isolées ont aussi été découvertes comme associées à des défauts valvulaires. Cependant dans de nombreux cas la cause de dysfonction n’a pas été identifié (Hinton and Yutzey 2011). *ADAMTS19* est un exemple de gène récemment découvert comme associé à une malformation congénitale des valves. En effet, des patients atteints de sténose aortique provenant de famille distincte montrent tous deux une perte de fonction du gène *ADAMTS19*. Il s’agissait d’une micro-délétion pour une famille et d’une mutation non-sens pour l’autre. Comme cité précédemment, les études du phénotype à l’aide d’une souris transgénique knock-out ont permis de confirmer la relation de cause à effet entre la perte de fonction d’*ADAMTS19* et la sténose aortique. Et aussi, de mettre en évidence qu’*ADAMTS19* est exprimé dans les cellules valvulaires interstitielles durant la période de remodelage de la matrice.

### **1.2.3 Le développement anatomique et cellulaire des valves cardiaques**

#### **1.2.3.1 Apparition des coussins endocardiques et Transition endothélio - mésenchymateuse**

Au début du développement, le cœur forme un tube primitif composé d’une couche de cellules myocardiales entourées d’une couche de cellules endothéliales avec à l’intérieur une structure composée de matrice extracellulaire appelé gelée cardiaque. La première étape du développement valvulaire chez les vertébrés est la formation d’une protubérance qui se forme dans l’artère pulmonaire et l’aorte dites les voies efférentes (OFT) : outflow tract) et dans les canaux atrio-ventriculaires (AVC) : atrio-ventricular canal). Ce gonflement de la gelée cardiaque est communément appelé « coussin endocardique » (Hinton and Yutzey 2011). Les coussins endocardiques sont localement induit pas la voie de signallement TGF- $\beta$  et d’autres facteurs de

différenciations provenant du myocarde sous-jacent résultant en l'augmentation de la synthèse de gelée cardiaque et en l'induction de la transition des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuse (EMT) : endothelial to mesenchymal transition) (Camenisch, Runyan, and Markwald 2010) (Hinton and Yutzey 2011; Hurle, Colveé, and Blanco 1980; Lin et al. 2012).

L'EMT initie la morphogénèse des coussins endocardiques immédiatement après le looping du cœur au cours de duquel le tube linéaire subit une inflexion pour former un S. L'EMT est une étape importante qui accompagne l'apparition de précurseurs valvulaires au sein du coussin endocardique. En effet, durant l'EMT les cellules endothéliales vont perdre leur adhérence avec les autres cellules, ensuite elles vont migrer vers l'intérieur du coussin et proliférer tout en acquérant un phénotype de cellules mésenchymateuses (Kovacic et al. 2019). Le mésenchyme des coussins vient de deux origines différentes. Les coussins endocardiques dans le AVC et dans l'OFT proximal dérivent leur mésenchyme des cellules endocardiques bordant les coussins comme le même en évidence la souris reportrice Cre Tie2; ROSA26R (Snarr, Kern, and Wessels 2008). A contrario, des études de traçage de lignées avec la Cre- Wnt1 ont démontré que les coussin des voies efférentes distales sont peuplés de cellules mésenchymateuse qui proviennent de cellules de la crête neurale distante (Lin et al. 2012).

Bien que les coussins endocardiques soient les précurseurs des valves, ils jouent déjà un rôle dès leur apparition. En effet, ils sont exposés à de constante forces hémodynamiques et mécaniques qui augmentent durant le développement (Menon et al. 2015). Les premières investigations sur des embryons de poulet ont révélées que le mouvement de ces coussins allait de pair avec les battements du myocarde et qu'ils jouaient un rôle similaire aux valves matures en assistant la propulsion du sang vers l'avant (Patten, Kramer, and Barry 1948). Ces forces exercées sur les coussins sont aussi connues pour induire l'expression de certains gènes et donc de participer à la formation des valves matures (Butcher Jonathan T. et al. 2006).

### **1.2.3.2 Prolifération, expansion et remodelage**

Les cellules mésenchymateuses générées lors de l'EMT sont les progénitrices des VICs. Les VICs prolifèrent rapidement durant la phase croissance du coussin endocardique (Schroeder et al. 2003). Ensuite ces coussins endocardiques maintenant composés de cellules valvulaires interstitielles entourées par des cellules valvulaires endothéliales s'allongent et se remodelent pour former des valves primitives qui matureront en fines valvules. Les VICs activées (aVICs) sécrètent

des protéines de la matrice extracellulaire qui vont donner la fibrosa, la spongiosa et la ventricularis. Enfin les Vics deviennent quiescentes (qVICs) et la structure valvulaire est maintenue tout au long de la vie. La phase d'élongation correspond à la croissance vers le lumen et à l'apoptose des cellules situées à la base des valves (Hurle, et al. 1980; Lin, et al. 2012). Le remodelage de l'ECM implique son enrichissement en élastine, en collagène fibrillaire et en protéoglycanes qui sont générés par les cellules valvulaires interstitielles activées. La prolifération des cellules valvulaires interstitielles ralentit voire s'arrête pendant la phase de remodelage (Aikawa et al. 2006). De manière générale, la matrice extracellulaire est un réseau macromoléculaire acellulaire dont les composants se lient les uns aux autres permettant aux cellules environnantes d'envoyer des signaux aux cellules qui résident dans l'ECM. Ces signaux régulent des fonctions comme la survie, la croissance, la migration, la différenciation qui sont vitales pour maintenir une homéostasie normale. La sécrétion, la compaction et l'alignement du collagène va former des couches stratifiées de matrice extracellulaire. La maturation de l'ECM est un processus progressif qui mène à une organisation tri-laminaire chez l'humain. En effet, trois couches horizontales sont observées dans la valve mature : la fibrosa (collagène), la Spongiosa (protéoglycane) et la ventricularis (Elastin). A ce stade les VICs sont quiescentes ("Oxidative Stress in Cardiac Valve Development | SpringerLink" n.d.). Chez la souris, il n'y a pas de structure tri-laminaire aussi apparente que chez l'humain mais plutôt l'apparition de structure de collagène servant de squelette (Hinton et al. 2006). La description anatomique du développement valvulaire permet d'acquérir une orientation pour mieux comprendre les voies de signalisation impliquées (Tao, Kotick, and Lincoln 2012).

## **1.2.4 Les voies de signalisations impliquées dans le développement des valves cardiaques**

Les voies de signalisation les plus étudiées, jouant un rôle critique dans le développement des valves vont être présentées : VEGF, NFATc1, Notch, Wnt  $\beta$ -catenin, BMP/TGF- $\beta$  et ErbB.

### **1.2.3.1 Wnt/ $\beta$ -caténine**

La voie de signalisation des « Wingless/integrated » dites Wnt via la bêta-caténine s'inscrit comme la voie canonique cependant d'autres voies existent mettant en œuvre des récepteurs tyrosine kinase. La famille des glycoprotéines sécrétées Wnt se lie au co-activateur

transcriptionnelle  $\beta$ -caténine pour contrôler le développement embryonnaire (MacDonald, Tamai, and He 2009). Dans le poisson zèbre, lorsqu'on inhibe la  $\beta$ -caténine, on observe la mort de l'embryon à 96h qui correspond au développement des valves. On observe alors que les coussins endocardiques sont étendus à l'ensemble du cœur. L'absence de cellules mésenchymateuses suggère le non-lieu de l'EMT et donc que la  $\beta$ -caténine participe ou active des gènes importants pour l'EMT. La voie de signalisation Wnt est également connue pour réprimer la formation du cœur dans l'embryon de poulet. En plus des Wnt, la  $\beta$  - caténine semble être régulée par la voie de signalisation VEGF. En effet, VEGF augmente la phosphorylation de  $\beta$ -caténine qui fait croître l'association de celle-ci avec CD31. CD31 est une protéine exprimée au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales. Cela pourrait être un mécanisme de rétention empêchant la croissance des coussins endocardiques (Marvin et al. 2001). Allant dans ce sens, le récepteur CD31 est régulé négativement durant l'EMT. Une hypothèse serait que la  $\beta$ -caténine active le programme mésenchymateux des cellules de la gelée cardiaque. En 2015, de nouvelles études menées grâce à un modèle de souris arborant le système transgénique tet-On a permis l'inhibition spatio-temporelle de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine par l'induction chimique de Dkk1. Étonnamment, il montre que la voie canonique de Wnt est présente uniquement dans les OTps (pOT : Outflow tract proximal) et non dans les AVC. De plus, Wnt active l'EMT dans les pOFT et proviendrait des cellules antérieurement impliquées dans le développement : les cellules myocardiales ou leur pro-géniteurs. La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine joue donc un rôle crucial dans la valvulogénèse. Cependant il reste encore beaucoup à découvrir sur ses voies de régulation. Il semblerait que cette voie soit à l'origine de la régulation d'*ADAMTS19*.

### 1.2.3.2 Notch

Notch est une protéine transmembranaire, qui une fois liée à son ligand passe de récepteur transmembranaire à coactivateur transcriptionnel (Luxán, D'Amato, and de la Pompa 2016). Une récente analyse d'un mutant de NOTCH met en évidence son rôle dans le contrôle de l'EMT. En effet la région endocardique souris NOTCH *-/-* ne subit pas d'EMT (Timmerman et al. 2004). À l'inverse l'injection du domaine intracellulaire de Notch dans le poisson zèbre augmente la mitose endocardiale et cause l'hyperplasie des valves. De plus, dans le mutant l'expression de TGF-B dans le myocarde est réduite ainsi que SNAIL. Il semblerait que Notch induise TGF-B, puis l'activation de l'EMT suivrait (Westin and Lardelli 1997)

### 1.2.3.3 BMP/TGFB

La famille des cytokines TGF-B est composée des protéines morphogéniques d'os (BMP : bone morphogenetic proteins) et des TGF-B. Les membres de cette famille jouant un rôle important dans le développement du cœur sont BMP-2, BMP-4, TGF B2 et TGF B3 (Conway, Doetschman, and Azhar 2011). Des données de motifs d'expression et des études d'explants ont mis en évidence l'implication de BMP dans l'EMT. BMP 4 est plus exprimé dans l'OT tandis que BMP2 l'est dans l'AVC. Si on traite un explant avec BMP2 on observe l'induction de TGF-B, ce qui laisse à penser que BMP2 initie l'EMT en activant TGF-B (Lyons, Pelton, and Hogan 1990) . De plus, la génération de mutants BMP6<sup>-/-</sup> et BMP7<sup>-/-</sup> a pour conséquences un retard de formation de l'OT et des coussins cardiaque réduits. La perturbation génétique des récepteurs de BMPs comme ALK3 mène également à des coussins endocardiques défectueux. Aussi, BMP-2 semble induire l'expression de SMAD6 *in vitro*, ce qui pourrait jouer un rôle de feedback en limitant le nombre de cellules endocardiales qui subissent l'EMT (Garside et al. 2013; Takase et al. 1998). Les effets en aval des voies de signalisation TGF-B et BMP ne sont pas encore bien définis mais ils semblent inclure la transcription des facteurs Snail/Slug et E-cadhérine. Les Snail/Slug sont des protéines à doigt de zinc, elles sont des répresseurs transcriptionnels et régulent l'EMT (Carmona et al. 2000). E-cadhérine est un type de molécule d'adhésion cellulaire qui est importante dans la formation des jonctions adhérentes qui lient les cellules les unes aux autres (Braga 2016, 201). Grâce à un mutant Notch1<sup>-/-</sup>, l'expression de E-cadherin est observé comme similaires à SNAIL, de plus ce mutant n'est pas capable d'exprimer SNAIL et garde une forte expression de V-cadherin. En résumé, TGF-B induit par la voie de signalisation Notch activerait SNAIL, ce qui ferait décroître l'expression de molécule d'adhésion cellulaire et permet aux cellules de l'endocarde d'initier l'invasion dans la gelé cardiaque (Timmerman et al. 2004). Une étude a récemment montré que TGF B 2 été nécessaire au remodelage des valves durant le développement (Timmerman et al. 2004).

### 1.2.3.4 VEGF

VEGF (vascular endothelial growth facteur) est impliqué dans le contrôle du développement des coussins endocardiques : le signal passe par le complexe de récepteur VEGFR comprenant VEGFR1/flt-1, VEGFR2/KDR et neuropilin 1 (Ferrara, Gerber, and LeCouter 2003). VEGF est exprimé spécifiquement dans les cellules endocardiales du OT et AVC a E9.5. Une

surexpression de VEGF dans la souris a pour effet l'augmentation du nombre de cellules endothéliales et par conséquent la dérégulation du processus de différenciation en cellule du mésenchyme. VEGF est impliqué dans la prolifération des cellules endothéliales (Dor et al. 2001). En 2010, une étude a montré que VEGF aurait d'autres rôles notamment dans la différenciation des cellules de l'endocarde durant l'EMT dans l'OFT et plus tard dans la morphogénèse durant la maturation des valves en fines valvules. VEGFR1 contribuerait au rôle de différenciation et VEGFR2 au rôle morphogénique. De plus, il démontre que VEGF module le micro-ARN miR-126 qui joue un rôle durant la phase d'élongation. En conclusion, la voie de signallement VEGF dans le développement des valves implique distinct set de ligands, récepteurs et modulateur intracellulaire qui contribuent au changement du rôle cellulaire et à la réponse de VEGF aux différents stades de développement (Stankunas et al. 2010).

#### **1.2.3.5 NFACTC1**

La famille NFAT est composée de cinq facteurs de transcription (NFAT 1-5). A l'exception de la drosophile les gènes codant pour les protéines NFAT sont présent uniquement chez les vertébrés (Crabtree and Olson 2002). Les souris mutant NFAT1  $-/-$  et NFAT2  $-/-$  meurent à E13.5 des suites d'un défaut dans la formation du coussin endocardique. NFACTC1 est exprimé dans les cellules bordant le coussin endocardique. L'expression de NFACTC1 semble stopper durant l'EMT ou il semblerait que la sous population exprimant NFACTC1 ne subisse pas l'EMT. Effectivement les cellules ayant déjà subi l'EMT n'ont pas de marqueur NFACTC1 (Ranger et al. 1998). Il s'agit d'un marqueur de cellules endothéliales. NFACTC1 semble être lié à d'autres voies de signalisation : VEGF, DSCR1 (down syndrome critical région) et interagit avec les connexines 45. Il est démontré que VEGF passant par VEGF-R2 augmente la localisation nucléaire de NFATc1 et cela uniquement dans les cellules endothéliales. DSCR1 quant à lui est exprimé durant le développement des coussins endocardique chez la souris. Il a été suggéré qu'il est en compétition avec NFAT pour se lier à la calcineurine. En effet, la surexpression de DSCR1 inhibe la translocation dépendant de  $Ca^{2+}$  de NFAT dans le myocyte cardiaque. A l'inverse, l'augmentation du  $Ca^{2+}$  cytosolique stimule DSR1 qui réagit comme un régulateur négatif de la voie de signallement NFAT. Enfin, les connexines sont des protéines transmembranaires qui s'associent à la membrane plasmique pour former les gap junctions entre les cellules. Une souris mutante connexine 45  $-/-$  (Cx45) a un nombre réduit de cellules endocardiques exprimant NFACTC1 par

rapport aux souris Wild type. Cx45 semble fonctionner en amont de NFACTC1 et pourrait fournir une route transcellulaire pour diffuser le Ca<sup>2+</sup> entre les cellules du coussin endocardique (Vega et al. 2002).

### **1.2.3.6 ErbB**

La voie de signallement ErbB participe à l'intégration des signaux de la matrice extracellulaire en remodelant les valves en fine valvule fibreuse. La famille de protéines ErbB sont des récepteurs de tyrosine kinase (RTK). Plusieurs études ont montré le rôle crucial de la gelée cardiaque dans l'approvisionnement en signaux qui initie l'EMT. En effet, la matrice extracellulaire régule l'activité des facteurs de croissance. Les voies de signallement semblent être médié par l'acide hyaluronique (AH) qui est un gel hydraté régulant la disponibilité des ligands et interagissant avec des protéines de l'EMC comme le protéoglycane Versican (McDonald and Camenisch 2002). Dans le mutant Has2 <sup>-/-</sup>, qui inhibe le gène pour la synthèse d'AH, on observe la mort de l'embryon à E13.5 et l'absence complète de gelée cardiaque mais lorsque l'on ajoute de l'AH une partie de la voie ErbB est restaurée.

## **1.3 Utilisation des modèles de souris transgéniques pour l'étude du développement des valves cardiaques**

La souris (*Mus Musculus*) s'inscrit comme l'animal le plus utilisé pour la recherche expérimentale, en effet elle représente plus de 60 % des animaux utilisés. Cet animal a de nombreuses similarités avec l'humain au niveau anatomique, génétique et physiologique. Ce modèle présente de nombreux avantages pour l'élevage en laboratoire. Un de ses atouts est qu'elles se multiplient rapidement et en grand nombre, en produisant une portée toutes les trois semaines avec généralement entre 6 et 12 nouveaux nés. Ensuite, c'est un animal de petite taille ce qui permet la réduction des espaces et donc des coûts d'élevages. Enfin son développement est rapide permettant une utilisation sur le court terme. ("Guide des souris les plus utilisées au laboratoire" n.d.). Ces dernières années la souris est devenu le modèle de prédilection pour les études génétiques, notamment avec le développement des souris transgéniques. Le génome de la souris a été séquencé en 2002. Cela a mis en exergue que 99% du génome de la souris est identique à celui de l'humain et la plupart des gènes de l'humain a son homologue chez la souris. De plus

l'établissement de lignée consanguine, c'est-à-dire d'animaux homozygote pour tous les loci, a permis de réduire la variabilité génétique entre animaux et par conséquent a amélioré la précision des études phénotypiques. ("Why use the mouse in research?" n.d.) (Hickman-Davis and Davis 2006).

### **1.3.1 Création de souris transgénique**

L'utilisation de souris transgéniques est devenue une voie privilégiée pour l'analyse de la fonction génique lors du développement normale et pathologique. La possibilité d'introduire une nouvelle information génétique dans la lignée germinale d'organisme complexe a révolutionné l'étude de leur biologie. Par définition, « transgénique » signifie que de l'ADN étranger a été inséré dans le génome. La création d'une souris transgénique peut être possible grâce à plusieurs approches (Babinet and Cohen-Tannoudji 2000) (Hickman-Davis & Davis, 2006) : L'injection pro-nucléaire dites transgènes additive et la recombinaison homologue qui permet une transgènes ciblée en utilisant la technologie des cellules souches embryonnaires sont les deux méthodes les plus utilisées. Utilisé de l'ARN interférence pour mettre la fonction génique sous silence est aussi possible bien que cette méthode soit moins fréquente . De nouvelles méthodes d'édition du génome qui ont récemment émergées seront également discutés. Deux méthodes sont particulièrement utilisées pour leur efficacité et leur facilité d'utilisation. Il s'agit de l'utilisation d'une version hyperactive transposon Piggy-bac (PB) qui permet plus de control sur le nombre d'insertions dans un site d'intégration. C'est cette méthode que nous avons choisi pour la création de notre modèle de souris. Il y a aussi le système de nucléase guidée par ARN, CRISPR CAS 9 qui créer des mutations pouvant supprimer l'effet d'un gène ou tout simplement reproduire un changement observé dans une maladie.

#### **1.3.1.1 Injection pro-nucléaire**

L'injection pro-nucléaire est une des premières méthodes utilisées. Elle implique une micro-injection d'ADN cloné dans le pronucléus d'un zygote de souris. Le terme pronucléus désigne les deux noyaux mâles et femelles présent lors de la fécondation juste avant leur fusion dans l'ovule, l'un provenant donc du spermatozoïde et l'autre de l'ovule ("Pronucleus" n.d.). L'ADN introduit par cette méthode est intégré de manière stable dans la lignée germinale car il est présent lors des premières divisions cellulaires du développement embryonnaire et par conséquent

se transmet aux cellules filles à chaque division. La lignée germinale a pour caractéristique de transmettre à la descendance les mutations qu'elle aurait subi. En effet, l'effet d'une mutation est différent selon qu'elle affecte l'ADN de cellules somatiques ou germinales. Lorsque c'est la lignée somatique qui est atteinte la cellule se divise pour former des clones pouvant résulter en cancer mais ce n'est pas héréditaire, à l'inverse de la lignée germinale qui sera transmise par les gamètes à la descendance. Cette méthode peut présenter des désavantages comme générer une surexpression du gène d'intérêt, la production d'une nouvelle protéine ou la perturbation du génome de l'hôte. La souche de souris FVB/N est fréquemment utilisée pour l'injection pro-nucléaire car elle répond très bien à la super ovulation et se reproduit en grand nombre. Les étapes expérimentales nécessaires pour la création d'une souris transgénique par injection pro-nucléaire sont : la purification de l'ADN, l'injection de l'ADN dans un zygote donneur, le transfert des zygotes injectés dans une souris nourricière, le génotypage des descendances pour confirmer la présence du transgène et enfin l'établissement de la lignée transgénique (Ittner and Götz 2007).

### **1.3.1.2 La recombinaison homologue**

Cette technique repose sur le fait de pouvoir accéder à une partie connue du génome de la souris et sur le développement des cellules souches embryonnaires. Un vecteur cible contenant un marqueur de sélection est créé avec des « flanking sequence » homologues au gène d'intérêt. Le vecteur est ensuite transfecté dans les cellules pluripotentes et va s'insérer dans le gène cible ou il va le remplacer par recombinaison. Les cellules pluripotentes contribuent à la lignée germinale et donc les mutations sont transmissibles d'une génération à l'autre. Cette méthode permet l'ablation complète d'un gène ou son altération mineure. Dans le cas de l'injection pro-nucléaire et la recombinaison homologue la mutation est présente lors du début du développement de l'embryon et par conséquent le transgène est exprimé dans toutes les cellules. Cette expression consécutive peut avoir un désavantage pour étudier la fonction génique car l'expression du transgène peut engendrer la mort de l'embryon ou une mort post-natal prématurée. Pour ces raisons des systèmes de mutagenèses conditionnels ont été mis en place permettant d'induire la perturbation ou la délétion d'un gène à un temps choisi. Les deux systèmes les plus utilisés pour les souris transgéniques sont le système Cre/lox et le système tétracycline-inductible. L'utilisation de ces systèmes *in vivo* requiert l'usage de deux souches de souris transgéniques.

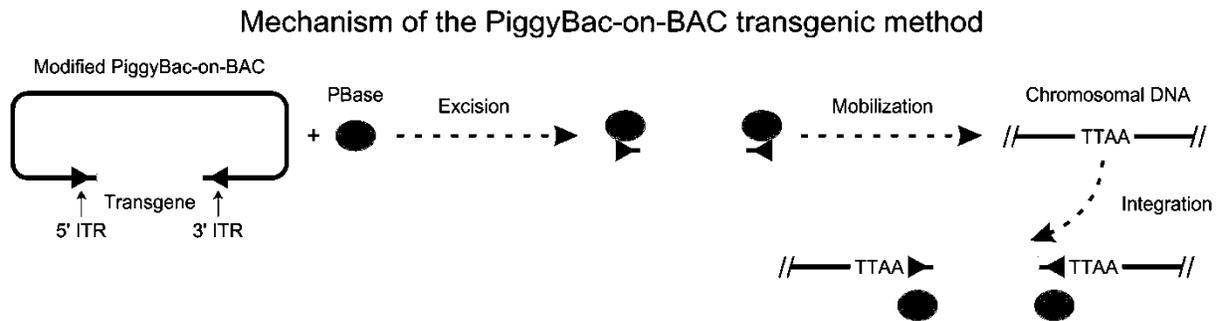
### 1.3.1.3 L'ARN interférant

La technologie de l'ARN interférant a récemment été appliquée à la technologie des souris transgéniques. Cette méthode repose sur le fait que l'ARN double brin est capable de mettre en silence un gène spécifique dans les cellules de mammifère. La présence d'un ARN double brins dans une cellule, active la famille de nucléase des RNase III qui va cliver l'ARN étranger en petits ARNs interférant (siRNA). Les siRNA générés interagissent avec le complexe de mise en silence induit par l'ARN (RISC : RNA-induced silencing complex) qui en plus de dégrader les siRNA vont identifier et attaquer les séquences homologues. Les éléments nécessaires pour la mise en silence du gène sont donc : la séquence du gène cible, un siRNA optimisé et une méthode efficace de livraison du siRNA à sa cible. Pour transmettre le phénotype de perte de fonction dans la lignée germinale de la souris, un oligonucléotide contenant les séquences sens et anti-sens homologue à l'ARN messager est cloné dans un vecteur d'expression a shRNA qui est injecté dans les pronucléus d'oocyte fertilisés. L'oocyte est ensuite transféré dans une mère porteuse et les souris transgéniques sont identifiées dans la portée (Gao and Zhang 2007).

### 1.3.1.4 Transposon piggy BAC (PB)

Un transposon est un segment d'ADN qui est capable de changer de position et de se relocaliser dans le génome entier de la cellule. Le transposon PB a la capacité de se transposer d'un vecteur au génome de la souris par un mécanisme de « couper-coller ». Le transposon va reconnaître des séquences appelées « répétitions terminales inversés » (: ITRs : inverted terminal repeats) localisées aux deux extrémités du vecteur et va le déplacer de sa position d'origine et l'intégrer dans un site TTAA du chromosome. Le transposon PB a attiré l'attention ces dernières années dû à sa stabilité et son efficacité. Dans le cas de ce projet nous avons choisi une stratégie de design appelé « Piggy-Bac on Bac » qui consiste à premièrement modifier le BAC d'intérêt. Ici, il s'agit d'un BAC contenant les premiers exons d'ADAMTS19 et sa région 5'. La modification correspond à l'ajout de la Cre-ERT2 par recombinaison homologue. Deuxièmement, le BAC est inséré dans le génome d'un pronucléus grâce au transposon PB via injection. Il y a des avantages à l'utilisation du transposon PB par rapport l'injection pro nucléaire classique (*Figure 12*). Par exemple, chaque site d'intégration aura une seule copie du bac d'intérêt. De plus, il n'y a moins de chance que le squelette du vecteur soit intégré ou qu'il y ait une perte de transgène (Zhao et al. 2016).

Le choix du BAC à insérer est une étape importante. En effet, nous avons choisi un BAC humain contenant une séquence très conservée à travers les espèces. Plus une séquence est conservée, plus elle code pour des éléments indispensables du métabolisme des espèces, or les éléments régulateurs permettant la transcription d'un gène sont indispensables. Aussi, le BAC mesure 180kb ce qui est une taille conséquente et contient des séquences en 5' du gène (potentiellement les séquences régulatrices) et le premier exon du gène *ADAMTS19*. Comme le gène n'est pas entier, il est donc non fonctionnel et il n'y a pas d'effet de sur-expression. Bien que la séquence soit très conservée il est possible que le fait que le BAC provienne d'une autre espèce pose problème.



**Figure 2** Différentes étapes de la transgénèse par la méthode PiggyBac-on-BAC. Le transposon PB (PBbase) excise le transgène au niveau de séquences ITR et va l'intégrer dans le génome à l'endroit d'un site TTAAT.

### 1.3.1.5 Crispr Cas9

Crispr Cas 9 est une autre méthode récente, qui repose sur une nucléase que l'on utilise en génie génomique pour modifier l'ADN. La première étape est le design d'un ARN guide qui va orienter la nucléase au locus d'intérêt, ensuite celle-ci va couper l'ADN double brin. Après avoir été clivé l'ADN peut subir deux processus de réparation, soit « le error-prone NHEJ » ou « le high-fidelity HDR ». Il est possible de choisir quel mécanisme activé en fonction du résultat d'édition du génome voulu. Dans le cas où aucune séquence appelé « repair template » n'est introduite, le mécanisme de NHEJ va lier l'ADN préalablement coupée. Cependant quelques nucléotides se perdent durant le processus et engendre des glissements du cadre de lecture. Cela permet de générer des souris Knock-out pour le gène désiré. La voie HDR est une alternative, elle permet de générer

des mutations précises grâce à l'insertion du «repair template» qui contient le changement souhaité et va se recombiner au génome de la souris (Inui et al. 2014). Nous n'avons pas choisi cette méthode au vu de la taille de notre fragment à insérer (180 kb). Une fois que l'ADN est transfecté dans la cellule, une longue insertion peut faciliter la reconnaissance du fragment homologue avant la recombinaison. Cependant, il est difficile de transférer un fragment de cette taille de manière efficace (Ran et al. 2013).

### **1.3.2 Les souris transgéniques inductibles**

Les souris transgéniques inductibles permettent l'activation de gène à un temps et dans un type de cellule spécifique. Elles permettent de contourner le majeur désavantage du système de Cre consécutive dont le gène est exprimé sans arrêt à partir du moment où son expression commence et peut donc résulter en létalité précoce empêchant l'étude phénotypique au stade voulu. Dans le cas des souris inductibles, le niveau d'expression et le moment dépendra de l'administration de l'agent activateur. Il est donc possible de contrôler le stade de l'activation. Les deux systèmes de souris inductible majoritairement utilisés vont être décrits : Le système inductible tétracycline et le système Cre-lox.

#### **1.3.2.1 Le système inductible tétracycline**

Ce système requiert une souris dite trans-activatrice, avec un trans-activateur de tétracycline sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique et une souris « réponse » avec le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur dépendant à la tétracycline. La reproduction de ces deux souris génère des descendants avec les deux transgènes dans chacune de leurs cellules répondant à la tétracycline ou à ses dérivées (doxycycline). Deux systèmes peuvent exister : Le premier est appelé tet-OFF, dans ce cas l'absence de tétracycline permet la transcription du transgène et l'addition de celle-ci résulte en une sous régulation. Le second système est nommé tet-ON, il fonctionne à l'inverse, c'est-à-dire que c'est la présence de doxycycline qui active le transgène (Das, Tenenbaum, and Berkhout 2016).

### **1.3.2.2 Le système inductible Cre-ERT /loxP**

Le système Cre/lox est le système que nous avons choisi d'utiliser. Il nécessite également deux lignées de souris. La première contient le gène cible avec deux segments de 34 pb de chaque côté (LoxP site) dans la même orientation. La seconde souris contient le gène de la recombinase « Cre » qui est un gène pour l'enzyme recombinase provenant d'un phage P1. Cette enzyme reconnaît les sites loxP et les recombine de façon à supprimer une séquence choisie de manière consécutive. Lorsque ces deux lignées de souris sont croisées, le gène dit floxé (entre les deux sites loxP) est alors supprimé. Le sens des sites loxP influence l'action de la Cre. Si les sites loxP sont dans le même sens le résultat sera une excision, si les sites sont face à face l'élément entre les sites loxP va être inversé et certains sites loxP peuvent aussi servir de site d'intégration. Des méthodes ont été développées pour contrôler l'expression de la Cre incluant la fusion d'une protéine contenant la « Cre » et ayant un domaine de liaison à un ligand : un récepteur modifié d'œstrogène « ERT » (Feil et al. 1997). Le développement de la Cre dépendant d'un ligand a été une avancée majeure en terme d'inductibilité génique *in vivo*. L'activation du domaine de liaison « ERT » est possible exclusivement grâce au Tamoxifène et à son métabolite le 4-hydroxytamoxifène. Celle-ci engendre l'activation de l'enzyme « Cre » qui va alors migrer dans le noyau pour recombinaison des sites loxP. Ainsi en fonction, du type d'expérience la recombinaison des sites LoxP vont créer une mutation nulle dans le cas des études phénotypiques ou l'activation de la fluorescence dans le cas de traçage de lignée cellulaire. Le projet porte sur la Cre-ERT2 qui est aujourd'hui la version de la Cre-ERT ayant le plus de succès (Renninger et al. 2011). En conclusion, les souris inductibles ont ouvert une nouvelle porte à l'étude phénotypique anatomiquement restreinte et à l'évaluation de mutation létale embryonnaire dans les animaux aux stades post-natal.

### **1.3.3 Traçage de lignée cellulaire**

Dans le but d'établir notre nouvelle lignée de souris transgénique nous devons analyser les lignées reçues à l'aide de souris reportrices qui vont permettre de tracer les cellules exprimant *ADAMTS19* au cours du temps. Et donc de visualiser les patrons d'expression de chaque lignée.

Le traçage de lignée cellulaire correspond à l'identification de toutes les cellules progénitrices à partir d'une cellule unique. Il a vu le jour au cours du dix-neuvième siècle notamment

grâce à Charles O. Whitman et ses collègues ainsi que ses successeurs. Ils étaient inspirés par la réalisation que les cellules se forment à partir de cellule déjà existante et non par le processus de génération spontanée (Whitman 1887). Le traçage de lignées cellulaires est un outil essentiel à l'étude des propriétés de cellules souches dans les tissus de mammifère. Il s'agit d'un moyen puissant pour l'étude du développement, de l'homéostasie et des maladies, notamment lorsqu'il est combiné avec la manipulation expérimentale de signaux régulant les décisions de destin cellulaire. Récemment, la combinaison de recombinaison inductible, de souris reportrice multicolore et d'imagerie de cellule vivante a permis d'ouvrir de nouvelles portes dans le domaine des cellules souches.

Le traçage de lignée cellulaire permet en effet de fournir des informations sur le comportement cellulaire dans le contexte d'un tissu intact ou d'un organisme entier en opposition à l'isolation de cellule suivis de transplantation ou encore à la culture *in vitro*. Il existe différentes techniques de traçage de lignée cellulaires qui vont être détaillées avant de décrire plus en détail la méthode choisie.

### **1.3.3.1 L'observation directe**

Aux dix-neuvième siècle, Charles O. Whitman a été le pionnier du traçage de lignée cellulaires par observation directe notamment avec l'étude du développement de la sangsue par microscopie à lumière. Il a révélé le destin de cellule individuelle à partir de l'œuf non clivé jusqu'à la formation des couches germinales embryonnaires. Il a mis en évidence qu'à partir du premier clivage le destin des cellules individuelles est distinct durant le développement, avec chacune des cellules ayant un rôle spécifique dans le développement plus tardif (Whitman 1886). Il y a différentes manières de faire du traçage de lignées cellulaires en observation directe. Par exemple chez le *C. elegans* des cellules sont irradiées au laser à microfaisceaux et les cellules qui ne se forment pas sont les cellules descendantes des cellules irradiées. Les avantages de l'observation directe sont la facilité et la rapidité avec laquelle les expériences sont réalisées. Cependant pour un organisme intact l'observation continu requière un embryon transparent avec peu de cellules. D'autres limitations seraient l'accessibilité du tissu qui peut être restreinte lors de l'études d'embryons de mammifères post-implanté.

### **1.3.3.2 Marquage cellulaire avec des colorations ou des traceurs radioactifs**

Lorsque le traçage de lignée cellulaire par observation directe n'est pas possible, des techniques de marquages de cellules d'intérêts sont utilisées. Au début du vingtième siècle les « colorations vitales » sont apparues permettant de marquer les cellules sans les tuer. Par exemple, les cellules peuvent être marquées physiquement par des colorations imprégnées dans des petits morceaux d'agarose. Les colorations de lipide soluble à la carbocyanine sont également utilisées : ils sont incorporés dans la membrane plasmique et utilisés pour le traçage de lignée cellulaire. Cette technique de traçage de lignée cellulaires a servi pour étudier la crête neurale d'embryon de poulet ou encore la plaque neurale chez la grenouille (Carradori, Barreau, and Eyer 2016). Il existe également la possibilité de directement injecter les cellules avec des colorations comme le dextran conjugué à la fluorescéine qui ne diffuse pas entre les cellules ou encore la peroxidase horseradish (HRP) qui peut être visualiser en ajoutant un substrat. Le marquage cellulaire permet donc d'effectuer le traçage de lignée cellulaire là où l'observation directe ne serait pas possible. Les limitations de cette approche seraient la perte des marqueurs par diffusion ou dilution après de multiple étapes de division cellulaire.

### **1.3.3.3 Introduction de marqueurs génétiques par transfection ou transduction virale**

Les marqueurs génétiques ont largement surpassé l'utilisation des colorations vitales ou encore de la peroxidase horseradish. Les marqueurs génétiques inclus par exemple des protéines fluorescentes comme la protéine fluorescente verte (GFP : green fluorescente protéine) ou encore la B galactosidase de la bactérie *E.coli* qui peut être visualisée suite à l'exposition a un substrat appelé X-galactose (“Gfp Green Fluorescent Protein [*Neisseria gonorrhoeae*] - Gene - NCBI” n.d.). Les marqueurs génétiques peuvent être introduits dans les cellules par transfection ou par transduction. La transfection repose sur le fait que les pores de la membrane cellulaire sont ouverts par des techniques chimiques ou physiques comme l'électrolocation, la transfection par liposomes ou encore le bombardement d'ADN couplé à des matériaux inertes comme l'or. La transduction est une méthode biologique de transfert d'ADN lors de laquelle le virus va infecter la cellule hôte, insérer son matériel génétique et recombiner un fragment d'ADN dans le génome de la cellule hôte (“Difference Between Transfection and Transduction” n.d.).

#### **1.3.3.4 Transplantation de cellules et tissus**

La transplantation de tissu ou de cellules vers un hôte différent est aussi un moyen utilisé pour le traçage de lignée cellulaire. Une illustration classique de cette technique serait l'expérience de Spemann et Mangold qui ont utilisés la transplantation pour étudier le rôle d'un morceau de tissu d'un embryon de grenouille au stade de la gastrulation et ont mis en évidence un centre organisateur de cellule capable de se dériver pour former un embryon au complet. Ils ont pu distinguer l'embryon donneur de l'embryon receveur grâce à la pigmentation des cellules. La cartographie du destin cellulaire par transplantation peut-être étudié en pigmentant l'embryon hôte mais aussi le transplanté (Cousin 2019). Les avantages principaux de la transplantation pour le traçage de lignée cellulaire sont les nombreuses options pour discernés entre les hôtes et les donneurs cependant cette approche inclue des étapes qui peuvent changer les propriétés cellulaires comme la chirurgie, les radiations, la création d'une cicatrice (Rosenquist, Kirby, and van Mierop 1989)

#### **1.3.3.5 Mosaïque génétique**

Le mosaïsme génétique est un outil classique pour la cartographie du destin cellulaire qui contribue à une variété d'applications encore aujourd'hui. Tarkowski et Mintz ont été les pionniers dans l'analyse du destin cellulaire en utilisant des souris chimériques. Ils ont formé un seul embryon en utilisant deux embryons différents au stade 8 cellules qui a été inséré dans une mère porteuse pour permettre son développement à terme (Tarkowski 1998). Leurs études ont permis de comprendre l'origine clonale des mélanocytes et les bases de la couleur du pelage des souris. Les souris chimériques continuent d'être utilisés pour examiner l'organisation du tissu en créant des chimères entre des souris exprimant la GFP dans tous les tissus et d'autre non. L'organisation des cellules souches de tissu complexe peut ainsi être visualiser. (Yanai, Tanaka, and Ueno 2013).

#### **1.3.3.6 Marquage cellulaire par recombinaison génétique**

La recombinaison génétique est utilisée pour le traçage de lignée cellulaire depuis le début des années 1990 et il s'agit maintenant de l'approche favorite dans la plupart des cas. Cette approche est en parti détaillé dans la section 1.1.2.2, ou l'on met l'emphase sur les souris inductible qui sont un des modèles de souris nécessaire pour effectuer du traçage de lignée cellulaire. Dans notre cas c'est le système Cre-lox inductible que nous avons choisi d'utiliser pour effectuer le

traçage de lignée cellulaire. La souris inductible contient donc le gène de la Cre derrière le promoteur d'*ADMATS19*. Le second modèle de souris nécessaire est une souris dites reportrice qui peut contenir un ou plusieurs gènes fluorescents avec un codon stop entouré de site lox P en amont. Le croisement de ces deux souris permet d'avoir les deux transgènes dans toutes les cellules des descendants. Toutes les cellules où le gène *ADAMTS19* sera exprimé vont aussi exprimer la Cre. La Cre va être activée lors de l'administration du Tamoxifène et recombiner les sites lox P qui vont libérer la fluorescence rouge de la protéine Tdtomato. Ce processus permet d'observer l'expression d'*ADAMTS19* au cours du temps. En effet, toutes les cellules filles provenant d'une cellule recombinée seront aussi rouges. Ici, nous avons opté pour la souris reportrice Tdtomato qui exprime une protéine rouge fluorescente 6 fois plus brillante que la GFP mais il existe d'autres reporters.

Le premier gène reporteur utilisé était celui de la  $\beta$ -galactosidase cependant il ne pouvait pas être utilisé pour la cytométrie en flux. Le gène reporteur fluorescent GFP est alors apparu ainsi que de nombreux autres fluorophores comme la protéine fluorescente jaune améliorée (EYFP : enhanced yellow fluorescent protein) ou encore la protéine fluorescente bleue améliorée (ECFP: enhanced cyan fluorescent protein) (Mahaut Smith, Evans, and Vial 2019) ("Nucleolin Modulates Compartmentalization and Dynamics of Histone 2B-ECFP in the Nucleolus" n.d.). La souris reportrice Rosa26-CAG-tdTomato contient le promoteur CAG qui renforce l'expression et peut être élevée pour atteindre l'homozygotie ce qui accroît également le signal ("A Transgenic TdTomato Rat for Cell Migration and Tissue Engineering Applications" n.d.). La souris Cre-ER recombinase a été continuellement améliorée dans le but de réduire l'activité de la Cre en l'absence d'un agent activateur et d'améliorer la sensibilité et l'efficacité de la recombinaison induite par le Tamoxifène. La recombinase Cre-ERT2, qui contient les domaines de liaison du récepteur œstrogène ayant une triple mutation G400V/M543A/L544A, et en ce moment l'outil le plus puissant dans la boîte à outils CreER. Son usage est extrêmement recommandé pour la mutagenèse inductible dans la souris (Feil et al. 1997). De nombreuses lignées de souris qui expriment la CreERT2 dans des types cellulaires spécifiques ont déjà démontré leur utilité pour répondre à des questions biologiques. Il est important d'optimiser la dose de l'agent activateur de la Cre. Les doses extrêmement faibles peuvent être utilisées pour étudier la densité clonale pour déterminer l'origine de population cellulaire particulière et les doses élevées favorisent le marquage de l'ensemble des populations.

Les souris reportrices multicolores sont de plus en plus utilisées pour le traçage de lignée cellulaire, elles peuvent contenir deux ou plusieurs marqueurs. Par exemple, la souris mTmG est un reporteur fluorescent avec deux couleurs. Avant la recombinaison, la fluorescence tdTomato ( Tm ) est localisé au niveau de la membrane cellulaire et après la recombinaison les cellules contenant la Cre recombinase c'est la fluorescence GFP (mG) qui est exprimé au niveau de la membrane ("007576—STOCK Gt(ROSA)26Sor<tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo>/J," n.d.). La technologie Cre/lox et FLP/FRT a aussi été combiné pour former la souris Cre/FLP qui va conditionnellement exprimer la  $\beta$ -Galactosidase et EGFP. Les constructions génétiques « brainbow » (Br) illustrent la puissance du traçage de lignée cellulaire et permet la combinaison de plusieurs protéines fluorescentes (XFPs) grâce à l'utilisation de variants loxP incompatibles et de la Cre (Weissman and Pan 2015). Cette technique a entre autres permis de visualiser les circuits synaptiques mais aussi d'analyser l'expansion clonal des cardiomyocytes durant le développement du cœur.

Les principales différences entre les souches Br comprennent : des différences dans le nombre de gènes fluorescents, la présence de sites loxP réciproquement orientés pour permettre l'inversion de gène type de sites loxP utilisées et l'expression ou de silence de l'expression du gène fluorescent avant l'activation Cre. Récemment, la construction brainbow 2.1 a été placé dans le gène Rosa26 pour créer une souris rapporteuse exprimant le transgène de manière ubiquitaire. Il s'agit de la souris Rosa26-Confetti("013731 - STOCK Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle>/J" n.d.). Un aspect important de l'utilisation de souris reporteurs fluorescents pour le traçage de lignée cellulaire et la préparation du tissu qui doit préserver la fluorescence. La limitation principale de l'utilisation de reporteur multicolore l'impossibilité de marqué le tissu avec des anticorps.

### **1.3.4 Exemple de modèle de souris transgénique utilisé dans le développement des valves cardiaque**

De nombreux modèles de souris ont contribué de façon majeure à l'étude du développement des valves cardiaques. Ici, plusieurs exemples extrêmement utilisés dans le développement valvulaire vont être présentés.

### 1.3.4.1 Les souris Cre spécifique des cellules endothéliales: Cre-Tie2 et Cre-Nfact1

#### a) La souris Cre-Tie2

La souris Cre-Tie2 contient un promoteur du récepteur spécifique aux cellules endothéliales appelé Tek ou Tie2, qui dirige la Cre recombinase. Elle permet la délétion d'un gène floxé dans les cellules endothéliales durant l'embryogénèse et la vie adulte (008863—B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J, n.d.). Cependant Tie2 marque également les cellules valvulaires interstitielles en plus des cellules endothéliales. Christoffels M. V. et collègues ont utilisés cette souris pour investiguer la contribution des cellules endothéliales à la structure finale des valves cardiaques. En effet, ils ont utilisé la souris Tie2-Cre/R26R couplé avec une souris reportrice B-galactosidase pour comprendre la participation de l'endocarde et des cellules mésenchymateuses dérivées de l'endocarde lors du développement valvulaire. Au stade E17.5, ils observent que les feuillets des valves tricuspides, mitrale, aortique et pulmonaire sont presque entièrement positifs pour la B-galactosidase. De plus, la continuité fibreuse atrio-ventriculaire exprime aussi la b-galactosidase. L'expression de Tie2 spécifique aux cellules endothéliales et le système Cre-lox qui marque toutes les cellules filles d'une cellule marquée ont donc permis de mettre en évidence l'implication des cellules endothéliale dans le développement valvulaire (de Lange Frederik J. et al. 2004). La souris Cre-Tie2 a aussi été utilisée pour supprimer la fonction du gène TBX20 durant le développement. Elle a permis de mettre en évidence que l'ablation du gène TBX20 cause des malformations des coussins cardiaques et des defaults de septation a E13.5.

#### b) La souris Cre- Nfatc1

Nfatc-1 est connu pour être un activateur de transcription pour les gènes cytokines dans les cellules lymphoïdes activées ("Transcription Factors of the NFAT Family: Regulation and Function. - PubMed - NCBI" n.d.). Cependant, Il est également exprimé dans l'embryon de souris lors du développement embryonnaire, son expression est notamment restreinte à la couche de cellules de l'endocarde à E8.5 (Ranger et al. 1998). Entre E9.5 et E11.5 lorsque l'EMT a lieu, l'expression de Nfatc-1 est accentuée dans l'endocarde de l'AVC et de l'OFT. Durant, l'élongation des valves l'expression de Nfatc-1 dans les cellules de l'endocarde reste très forte. Aucune expression de Nfatc-1 dans l'endothélium en dehors du cœur embryonnaire n'est observée. De

plus, aucune expression n'est détectée dans les cellules de l'endocarde qui ont subi l'EMT dans l'OFT et l'AVC (Azhar et al. 2011). En concordance, avec son expression Nfatc-1 est découvert comme responsable du destin des cellules endothéliales lors de l'EMT. ("Endothelial-Specific Cre Mouse Models | Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology" n.d.). L'expression spatio-temporellement régulé de Nfatc-1 durant le développement du cœur ainsi que son rôle essentiel dans la formation des valves font de ce marqueur un outil moléculaire unique. En effet, la souris Cre Nfatc-1 permet l'étude de la différenciation des cellules de l'endocarde, le traçage des lignées cellulaires durant la formation des valves et aussi l'étude de gènes spécifiques aux valves notamment au travers de la souris. ("Nfatc1 Directs the Endocardial Progenitor Cells to Make Heart Valve Primordium" n.d.).

#### **1.3.4.2 La souris marquant les cellules valvulaires interstitielles**

Les cellules valvulaires interstitielles sont aussi connues sous le nom de fibroblastes valvulaires. En effet, ces cellules expriment des marqueurs de fibroblastes. C'est pour cela que certaines lignées utilisées pour l'étude des fibroblastes dans le cœur marquent également les Vics des valves aortique et pulmonaire, l'AV sulcus ou encore l'annulus fibrosus. En effet, plusieurs lignées de fibroblastes connus et établis comme la Col1a2-CreER<sup>T</sup>, Tcf21<sup>mCre</sup>, et plusieurs lignées Cre-Wt1 locus et Cre-periostine. (Swonger et al. 2016). Il n'existe cependant pas de souris inductible spécifique pour les Vics. La souris ADAMTS19-Cre-ERT2 que nous établissons permettra de remédier à ce manque.

## **Chapitre II Hypothèses et objectifs**

Le but de ce projet est d'établir un nouveau modèle de souris qui va permettre d'étudier spécifiquement *ADAMTS19* et qui servira également à l'étude des cellules valvulaires interstitielles.

### **2.1 Les hypothèses de recherche**

Mes hypothèses de recherche sont:

- 1) Le BAC utilisé pour créer la souris contient les séquences régulatrices nécessaire à l'expression d'*ADAMTS19* dans la souris
- 2) Le BAC sera spécifiquement exprimé dans les cellules valvulaires interstitielles.

### **2.2 Les objectifs de recherche**

Les objectifs sont de caractériser le patron d'expression d'*ADAMTS19* en analysant la distribution de TdTomato au cours du développement cardiaque et de montrer que ce patron est reproductible au travers des générations.

Plus spécifiquement les objectifs pour l'établissement du modèle sont :

- 1) Ajuster la dose Tamoxifen et le mode d'administration
- 2) Prendre des photos de cœurs entiers et de sections des valves mettant en évidence les parties marquées par TdTomato.
- 3) Montrer que les patrons d'expression sont transmissibles au travers des générations.

# Chapitre III Matériels et Méthodes

## 3.1 Les modèles de souris utilisées

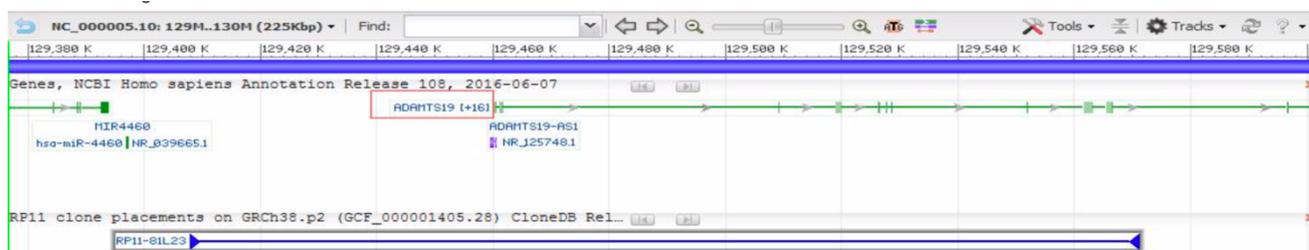
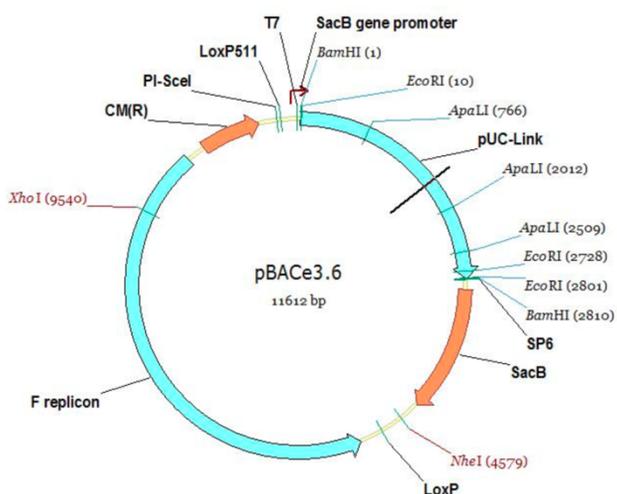
### 3.1.1 La souris ADAMTS19-CreERT2

La souris ADAMTS19-CreERT2 a été conçue par l'entreprise CYAGEN. La création de cette souris consistait en deux étapes : la modification du BAC d'intérêt et son insertion dans le génome de la souris.

#### 3.1.1.1 Information sur le BAC et le gène d'intérêt

Le BAC d'intérêt contient une partie du gène ADAMTS19 humain ainsi que la région intronique en amont. Le vecteur de Clonage contient un site LoxP mutant et un site LoxP sauvage (**Figure 18**).

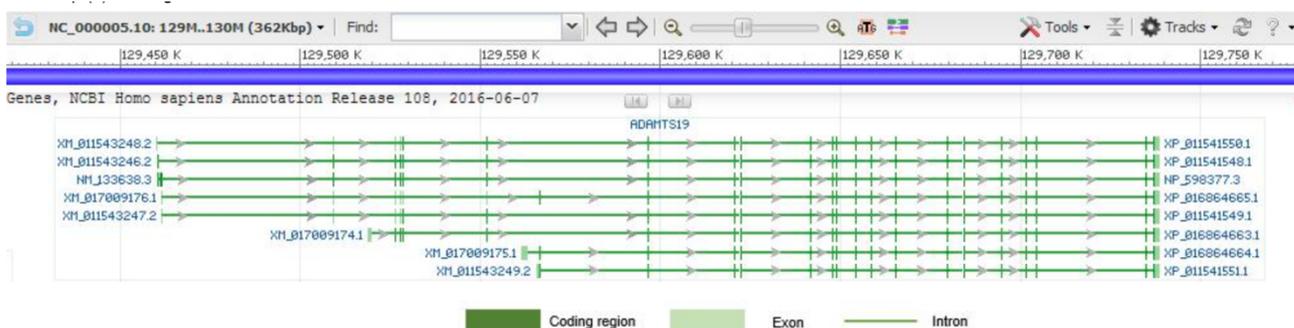
|                |            |
|----------------|------------|
| BACClone ID    | RP11-81L23 |
| Cloning Vector | pBACe3.6   |
| Cloning Site   | EcoRI      |
| Insert Length  | 278,403 bp |



**Figure 3** Information sur le BAC et le gène d'intérêt (A) Information sur le BAC (B) Cartographie du vecteur de clonage (C) Position du clone RP11-81L23 utilisé pour la génération de la souris.

Le gène d'intérêt ADAMTS19 est décrit dans la figure ci-dessous et le transcrit choisie est le NM\_133638.3 (**Figure 4**).

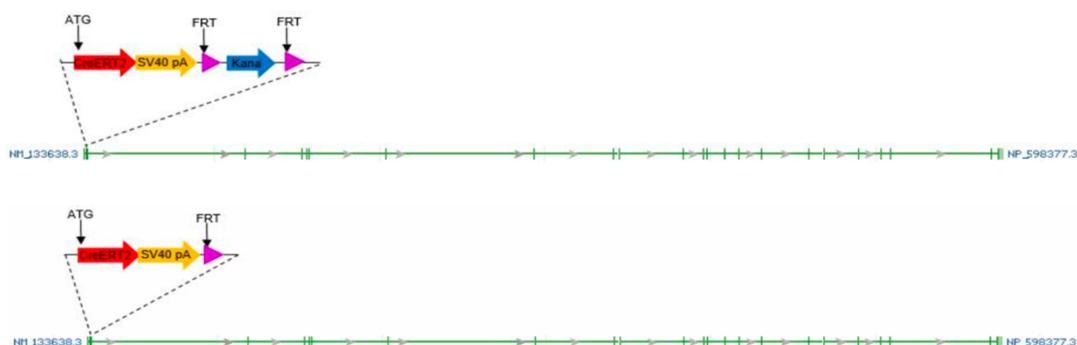
|                |  |
|----------------|--|
| Gene Symbol    | ADAMTS19   |
| Gene Full Name | ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 19   |
| Gene ID        | 171019   |
| Species        | human  |
| Location       | GRCh38.p7, Chromosome 5, NC_000005.10 (129460281..129738683) |
| Exon Count     | 23   |



**Figure 4** Informations sur le gène d'intérêt (A) carte d'identité du gène (B) Transcrit choisie pour la transgénèse NM\_133638.3

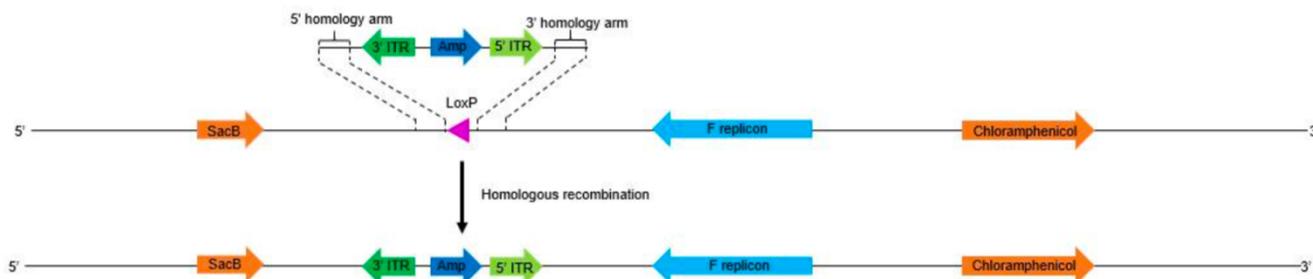
### 3.1.1.2 La stratégie de Modification du BAC

Dans un premier temps, un fragment contenant une cassette CreERT2 :SV40 pA avec une cassette FRT-Kanamycin - FRT est insérée par recombinaison homologue après le codon Start ATG dans l'exon 1 du gène humain ADAMTS19. Les sites FRT sont ensuite supprimés par une recombinaison médiée par FLP. (**Figure 5**)



**Figure 5** Stratégie d'insertion de la Cre-ERT2

Dans un second temps, des paires ITR piggyBAC sont introduites dans la structure du vecteur de clonage du BAC grâce à la recombinaison homologue. Le loxP site va donc être remplacé par une cassette ITR- Ampicilin – ITR (**Figure 6**).



**Figure 6** Introduction des ITR dans la structure du vecteur de clonage par recombinaison homologue

### 3.1.2 Les souris TdTomato

La souris TdTomato ou B6. Cg-Gt (*ROSA*)26Sortm14(*CAG-tdTomato*) Hze/J est une souris dite Cre reportrice qui a une cassette STOP entouré de séquence loxP empêchant la transcription d'un promoteur CAG, initiateur de l'expression d'une protéine rouge (Tdtomato). Le tout est inséré dans le locus Gt (*ROSA*)26Sor locus. Cette souris exprime la fluorescence TdTomato après avoir été recombiné par une Cre. Cette souche est consanguine sur le fond génétique C57BL/6J. Cette souris a été achetée chez jackson laboratory ("007914 - B6.Cg-Gt(*ROSA*)26Sor<tm14 (*CAG*-TdTomato)Hze>/J" n.d.).

### 3.1.3 Les souris WT

Aussi connu sous le nom de B6/NJ la souris C57BL/6NJ est la souris consanguine la plus utilisée et la première à avoir été séquencée. Malgré que cette souche soit réfractaire a de nombreuses tumeurs son fond génétique permissif permet l'expression maximal de toutes les mutations. Cette souris a été achetée chez Jackson laboratory ("000664 - C57BL/6J" n.d.)

### 3.1.4 Génotypage

#### 3.1.1.3 Validation par génotypage

##### a) Génotypage des souris *Adamts19-cre-ERT2*

Lors de la réception des souris nous avons dû valider l'insertion de la Cre-ERT2 dans le génome des souris fondatrices par Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR: polymerase chain reaction) et électrophorèse.

##### Extraction d'ADN :

L'Extraction de l'ADN à partir de bout de queue a été faite avec le « Molecular biology Kit » (*BS628, BioBasic*).

##### PCR :

Ensuite nous avons effectué une PCR qui consiste à utiliser l'enzyme polymérase pour amplifier une séquence d'ADN in vitro. Cette technique nécessite dans un premier temps de générer un master mix de molécules chacune ayant un rôle à jouer dans l'amplification de la séquence d'intérêt. Préparez le master mix dans le même tube 1.5 ml (*87-B150-C, progène*) pour toutes les souris à tester et ensuite séparer dans des tubes à PCR (*87-C200-F, Progène*). Ajoutez les oligos GTACAGCATGAAGTGCAAGAACG (sens) et ACCTGAAACGATCCCATTCGAC (antisens) qui délimitent une séquence du BAC à amplifier de 579 bp (*invitrogene*), Une taq polymérase appelé Easy taq (*AP11103, Civicbio*), le tampon de l'Easy taq 10X (*AP11103, Civicbio*), des nucléotides ou dNTPs (*R0191, Thermo Fisher*) et de l'eau (*miliQ machine*). Les proportions sont détaillées dans le tableau ci-dessous (**Table 1**). Il faut toujours compter un tube en plus pour la marge d'erreur et prendre en compte le control négatif et positif. Une fois tous les réactifs ajoutés dans le tube, mélanger le master mix à l'aide d'un vortex. Ensuite, transférer 19 µl du master mix dans chaque tube et ajouter 1 µl d'ADN d'intérêt par tube.

**Table 1** Fabrication du mix de PCR.

| Réactifs        | Quantité pour 1 échantillons (ul) |
|-----------------|-----------------------------------|
| DNA             | 1                                 |
| H2O             | 15,8                              |
| Taq buffer 10X  | 2                                 |
| dNTPS 10mM      | 0,2                               |
| Oligo sens      | 0,4                               |
| Oligo anti-sens | 0,4                               |
| Easy Taq        | 0,2                               |
| TOTAL           | 19                                |

Les échantillons sont ensuite centrifugés et placés dans un thermocycler (*Mastercycler, Eppendorf*). Le programme lancé est décrit dans le tableau ci-dessous.

**Table 2** Programme utilisé pour la PCR

| Phase                   | Température | Temps                                    | Répétition    | But  |
|-------------------------|-------------|--|---------------|--|
| Dénaturation initiale   | 94          | 2-5 min                                  | 1             | Déshydrider ADN double brin, casser les structure secondaire, homogénéiser le milieu thermiquement et inactiver des enzymes non voulues. |
| Dénaturation            | 94          | 30 sec                                   | 30– 35 cycles | Déshydrides les ADN double brin et décrocher les polymérase.   |
| Appariement des amorces | 62          | 30 sec                                   |               | Hybridation des amorces avec une température proche du Tm des deux amorces   |
| élongation              | 72          | 1-2 kb/min                               |               | Synthèse du brin complémentaire d'ADN par les polymérase   |
| Fin élongation          | 72          | 5-10                                     | 1             | Fin élongation   |
| stockage                | 15          | Jusqu'à la récupération de l'échantillon | 1             | Stocker l'ADN a une température correcte   |

Électrophorèse :

Pour analyser les résultats, nous avons ensuite fait une électrophorèse qui consiste à faire migrer l'ADN sur un gel d'agarose. *Analyse* : Une fois que l'échelle a complètement migré, arrêtez la machine et exposez le gel au UV dans la Gbox (*G* : box F3 gel doc système, SYNGENE) pour voir le résultat. Les puits ayant une bande à la longueur 579bp sont positifs pour la CRE et les puits qui n'ont pas de signal représentent les souris que n'ont pas le transcrit. A noter que le fluo dye peut faire varier légèrement la taille d'échantillon.

### **b) Les souris TdTomato**

Les souris TdTomato sont génotypées en suivant le même protocole que pour les souris ADAMTS19 mais les oligos sont différents. La première paire d'oligos est: AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA et CCGAAAATCTGTGGGAAGTC (297bp) amplifie une séquence dans le gène Rosa26 qui est enlevé lorsque la TdTomato est présente. Il ne devrait donc pas y avoir de bande apparente. La seconde paire d'oligos est: GGCATTAAGCAGCGTATCC et CTGTTCTGTACGGCATGG qui amplifie une partie de la séquence TdTomato.

## **3.2 Stratégie de croisement**

Dans le but d'un management précis et optimal des colonies de souris, les stratégies de croisement ont été mises en place grâce à un fichier Excel regroupant toutes les informations sur chaque souris. Par exemple, leurs dates de naissance, leurs parents, leur fond génétique, leurs partenaires ou aussi des informations importantes pour la maintenance comme la présence de maladies génétiques (ex:). Les souris comportant des défauts génétiques ne sont pas choisies pour maintenir la colonie. Étant donné le nombre important de souris ADAMTS19-Cre\_ERT2 reçues (13 lignées) la colonie de souris TdTomato a dû être fortement augmentée pour pouvoir tester un maximum de lignées possibles. Les mâles ont été testés et les femelles ont été par la suite croisées avec des mâles et leur descendance a été analysée.

### **3.2.1 Croisement de maintenance**

Dans le but de maintenir la colonie les mâles ADAMTS19-Cre-ERT2 sont retro croisés avec des femelles WT du même fond génétique avant 7 mois. Le but étant de générer des hétérozygotes. En effet, avoir des souris hétérozygotes permet d'avoir des souris contrôle dans la portée, de plus la Cre peut agir spontanément et causer un phénotype, avoir des souris hétérozygotes réduit ce risque. Les souris TdTomato sont croisées entre elles, dans le but de générer des doubles homozygotes.

### **3.2.2 Croisement d'expérience**

Les souris mâles ADAMTS-Cre-ERT2 ont été obtenus par l'entreprise *Cyagen* et les souris TdTomato (jackson laboratory) ont été mise ensemble et les bouchons vaginaux ont été vérifiées tous les jours. Le jour où le bouchon a été trouvé correspond au jour E0.5 du développement embryonnaire de la souris. Grace à la vérification des bouchons vaginaux il est possible de choisir à quel stade embryonnaire administrer une substance voulue où extraire des organes d'intérêt. Dans notre cas nous administrons le tamoxifen aux jours embryonnaires E11.5 et E13.5 qui correspondent aux étapes du développement d'intérêt.

### **3.2.3 Analyse du rendement et prévision du nombre de souris nécessaire**

## **3.3 Tamoxifen : Dosage et Administration**

### **3.3.1 Fabrication du tamoxifen**

Le stock Tamoxifen (T5648-5G, Sigma) a été préparé à différentes concentrations 10mg/ml, 20mg/ml et 15mg/ml en fonction des doses requises. A titre d'exemple, pour obtenir la concentration 10mg/ml, dissoudre 100 mg dans de l'ETOH 100% (64-17-5, Sigma), agitez pendant 2h à 37 ° C jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de cristaux apparents, Diluer 1:10 avec de l'huile de sésame stérile (S3547, Sigma), entreposer les aliquots a -20 ° C. Pour obtenir la concentration 15mg/ml la méthodologie reste la même. Cependant pour la concentration 20mg/ml les cristaux ne se dissout pas facilement et la sonication est une option. Le but d'augmenter la concentration

est de donner la dose optimale souhaitée sans blesser l'estomac de l'animal avec un volume trop élevé.

### **3.3.2 Optimisation des doses et de la voie d'administration**

Une période d'optimisation a permis de tester différentes voies d'administration du Tamoxifen et différentes doses. Le gavage oral avec une aiguille d'intubation (18061-22, fine science) a été choisi comme voie d'administration favorite. En effet, l'injection péritonéale avec une aiguille à insuline (1188528012, Covidien) n'a pas été aussi efficace. La dose de référence de tamoxifen est de 40 mg par kilo cependant à cette dose là le signal était très faible. Des tests ont permis d'évaluer différentes doses : 2X, 3X et 4X la dose de référence. La dose qui résultait en un signal fort et qui limitait le taux de mortalité est 3X la dose de référence. Plusieurs stades de gavage ont également été testés. Les stades retenus sont E11.5 et E13.5.

## **3.4 Prélèvement des cœurs**

### **3.4.1 Sacrifices**

Dans un premier temps les femelles sont observées pour vérifier qu'elles soient bien gestantes. Les sacrifices des femelles sont réalisés en suivant les règles du CCPA et selon des protocoles approuvés par le Comité des Bonnes Pratiques en Recherche Animale (CIBPAR) du CHU Sainte-Justine. Les souris sont endormies à l'isofluorane avant d'être euthanasiées par asphyxie avec du CO<sub>2</sub> et pour finir la dislocation des cervicales est pratiquée par sécurité.

### **3.4.2 Extraction des embryons**

Les femelles sont épinglées sur le dos à l'aide d'aiguilles (305175, BD). Ensuite une incision est faite du bas du ventre jusqu'à la base de la cage thoracique avec un ciseau. La couche de peau et les muscles abdominaux sont coupés à l'aide du ciseau et des pinces. Il est important de bien tenir les ciseaux parallèles au corps de la souris pour éviter de perforer un embryon. Aussi, il faut être vigilant de bien regarder dans l'ensemble de la cage thoracique pour ne pas laisser d'embryons. Il faut ensuite couper les vaisseaux reliant les embryons à la mère. Les embryons sont ensuite mis dans un tube de 15ml (07-200-886, Fisher Scientifique) dans du PBS froid et

maintenu dans la glace jusqu'à l'extraction des cœurs et à l'abris de la lumière par éviter que le signal de la protéine TdTomato ne soit affecté.

### **3.4.3 Extraction des cœurs**

Mettre de la glace dans une boîte en polystyrène et y déposer le tube contenant les embryons, ainsi qu'un tube de 50 ml contenant du PBS 1X et une boîte de culture de 24 puits. Les embryons sont placés dans une boîte de pétri (353003, Corning) ouverte remplis de PBS préalablement réfrigéré. La boîte est placée sous le microscope M165 C, Leica). A l'aide de pince à bout ultrafin (16-100-121, Fisher Scientifique) l'embryon est immobilisé, la tête est coupée, la cage thoracique ouverte et le cœur et les poumons sont ensuite prélevés. Cette étape demande de l'entraînement sur des échantillons non important. Le PBS est changé régulièrement au besoin car il doit rester clair pour pouvoir observer les détails de la dissection. Une fois le cœur délicatement séparé des poumons, il est mis dans un puit de boîte de 24 puits. Il est important de noter sur le couvercle les numéros des embryons et de garder un bout de queue pour chacun d'eux dans un tube 1.5ml avec le numéro correspondant noté, pour le génotypage.

### **3.3.4 Fixation et stockage**

Les cœurs sont fixés O/N (over night) dans du PFA (paraformaldéhyde) 4%. Ils sont ensuite conservés dans une solution de PBS-glycine 0,1M- sodium azide 0,025% à 4°C.

## **3.6 Cryo-section**

### **3.6.1 Encastrement et ajustement de l'homéostasie des cœurs**

Une solution-mère de 50% de sucrose dans l'OCT (FL-03-0297, Fisher chemical) est initialement préparée (3801480, Leica). Par la suite, des tubes de 50ml avec de l'OCT dilué dans du PBS au concentration suivante: 5%,10%, 15%, 25 % sont préparés. Attendre 1 jour et mettre les cœurs dans une plaque 24 puits (93018C, Thermo Scientifique), enlevez le PBS-glycine-Sodium Azide et le remplacer par la solution de chaque concentration (1h). Utiliser 5ml de « OCT + Sucrose » dans les moules en plastique l'encastrement. Utiliser une plaque de glace sèche (CDSLAB2-LB, Praxair) et orientez les cœurs de la même manière pour chaque moule. Garder a -80 ° C.

### **3.6.2 Coupe de cœur au cryostat**

Les sections congelées de 10uM ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (CrostarNX50, *Thermo Fisher*)

### **3.7 Marquage immunologique**

Les lames sont séchées une heure à température ambiante. Par la suite elles sont lavées 5 minutes avec du PBS 1X pour enlever les restes de sucrose toujours à température ambiante. Les sections histologiques sont perméabilisées dans du PBS-triton 0.5 % (Triton 100X : T9284, Sigma) à température ambiante. Par la suite les sections sont bloquées avec du tampon de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Le tampon de blocage est constitué de 1% de BSA (800-D95-EG, Wisent), 10% sérum de chèvre (50095 S26, Millipore) ou d'âne (50095 S30, Millipore) en fonction de l'anticorps secondaire utilisé (5% +5% si utilisation de plusieurs sérum), d'anti-mouse igg (1 :100) (715007003, Jackson Laboratory), dans du PBS-Triton 0.1 %). Préparer les anticorps primaires dans du tampon de blocage (1 :100) pendant ce temps. Nous utilisons les anticorps Alpha Actin sarcomeric (A-SAA, A7811, Sigma), Troponin I (Trop I, ab47003, Abcam), Troponin T (Trop T, MS295, Thermofisher), PdgfrAlpha (PdgfrA, AF1062-SP, RandD). Laisser incuber les lames avec l'anticorps primaire O/N à 4°C. Le lendemain laver 3 fois 5 minutes dans du PBS-triton 0.1% et incubez 2 heures avec les anticorps secondaires et Dapi 1ug/ml (1 :500-1000) (D-21490, Thermo Fisher) dans le tampon de blocage. Possibilité d'ajouter du wga (wheat germ agglutinin) (W112611, Thermofisher) (1 :1000) pour marquer la membrane cellulaire en vert. Laver 3 fois dans le PBS-triton 0.1% et 1 fois avec du PBS pour enlever les excès de Triton. Préparez les échantillons à l'imagerie les recouvrant avec du Dako (53023-C, Dako) et une lame en verre (22266882, Fisher scientifique), laissez sécher O/N avant d'imager.

### **3.8 Imagerie à fluorescence**

L'imagerie des cœur intact et entier se fait à l'aide du microscope. Les cœurs sont transvasés dans une boîte de pétri ouverte et sont imagé grâce au stéréo microscope (M165 C, Leica). Le filtre utilisé pour capter la fluorescence provenant de la protéines tdTomato est le filtre TexasRed. Les stacks sont utilisés dans le but d'obtenir une image focus sur tous les plans. Pour

les cryo-coupes la microscopie a fluorescence a été réalisée avec un microscope DMI8 Leica en utilisant les objectifs sec X10, X20 et X40.

## **3.9 Séquençage Nano-pore**

### **3.9.1 Extraction d'ADN à haut poids moléculaire**

Pour obtenir de l'ADN à haut poids moléculaire nous utilisons une technique d'extraction très basique qui est l'extraction phénol-chloroforme. Elle permet de garder le contrôle sur la composition de tous les réactifs en comparaison au Kit utilisé aujourd'hui ainsi que d'éviter l'utilisation de colonne qui pourrait fragmenter l'ADN. Quelques modifications pour l'adapter au nanopore sont cependant nécessaire. Ajoutez le tissu dans 0.5 ml de tampon de digestion avec 0.5mg/ml de protéinase K (V061, Trans) (A joutez frais) et 20mg/ml d'RNase A (thermofisher, EN0531). Incubez sur la nuit à 55°C. C. Le tampon de digestion correspond à 50mM de Tris-HCL, 100mM d'EDTA, 100mM NACL et 1% SDS. Centrifugez rapidement pour enlever la solution du capuchon. Remplir le capuchon de graisse d'aspiration (46355 D, Dow Corning) a l'aide d'une seringue. Ajoutez 0.7ml de phenol/chloroform/iso-amyl alcohol neutralisé (25:24:1) (15593-031, Invitrogen). Mélangez vigoureusement à l'aide d'un rotateur clinique. Ne pas vortexer. Centrifugez à la vitesse maximale pendant 5 minutes et transférer 0.5 ml de la phase supérieur dans un nouveau tube. Ajoutez 1ml d'éthanol 100 % à température ambiante et inversez plusieurs fois le tube jusqu'à ce que l'ADN précipite. Centrifugez 5 minutes et doucement enlever le surnageant. Ajoutez 0.5-1ml d'éthanol 70% (- 20°C) et inversez le tube plusieurs fois. Centrifugez 5 minutes et doucement jeter le surnageant. Centrifuger rapidement pour enlever les traces d'éthanol. Possibilité d'utiliser une pipette ou un capillaire pour enlever les dernières gouttes sans endommager la pastille d'ADN. Laisser sécher à température ambiante O\N. Ajouter 100-200 µl de tampon d'élution (10mM Tris-CL pH 8.0) et incubé a 65 ° C pour 15minutes pour suspendre l'ADN.

### **3.9.2 Control de la qualité et la quantité de l'ADN**

Il est important de contrôler pour la pureté de l'ADN et aussi pour la quantité de l'ADN cela dans le but d'éviter le blocage des pores lors du séquençage provenant d'impuretés et de confirmé la présence d'ADN suite à son extraction. Pour cela, quantifiez l'ADN à l'aide du

nanodrop 8000 (ND-8000-GL, thermo Fisher), la quantité est donné en ng par  $\mu\text{l}$  mais en fonction de la taille de l'échantillon la quantité peut aussi être en  $\mu\text{g}$  par  $\mu\text{l}$ . Pour évaluer la pureté, le ratio A260/280 doit être  $> 1,8$ , cela indique que la solution ne contient pas de protéines. Le ratio A260/230 doit se situer entre 2,0 et 2,2, cela indique l'absence d'autre contaminant qui absorbe à 230nm.

### **3.9.3 Fragmentation de l'ADN**

Le but de fragmenter l'ADN est d'homogénéiser la taille des fragments. En se basant sur des résultats précédemment obtenus partagés dans la communauté Nanopore ("Nanopore Community" n.d.). Nous avons opté pour une fragmentation par « needle shearing » (Cisaillement par aiguille). Lorsque l'ADN passe à travers la jauge de l'aiguille plusieurs fois cela va la fragmenter physiquement l'ADN. La taille de la jauge et le nombre de passes peuvent donc influencer la taille des fragments. Nous avons choisi d'utiliser une aiguille 26G avec 20 passes qui ont précédemment montré un NS50 de 50 kb dans des résultats partagés sur la communauté (50% du génome est contenu dans des fragments de 50kb). Plus les fragments sont longs, plus la couverture de séquençage sera élevée et le temps d'analyse réduit.

### **3.9.3 Contrôle de l'intégrité de l'ADN**

Cette étape n'a pas été réalisé pour cette expérience due à la Covid- 19. Toutefois, elle a été réalisée lors de précédentes expériences. Pour évaluer l'intégrité de l'ADN, c'est-à-dire la distribution de la taille des fragments la technique de « Pulsed field electrophoresis gel » (PFEG) a été utilisée. Cette étape consiste à faire migrer l'ADN fragmenté grâce au PFEG, technique utilisée pour faire migrer des fragments  $> 15\text{kpb}$ .

### **3.9.4 Préparation de la librairie**

Le protocole pour la librairie utilisé est « Bead-free long fragment LSK109 » c'est une variante du protocole de librairie LSK109 qui est sans billes proposé par John Tyson, un pionnier en la matière.

### **3.9.5 Séquençage et analyse**

Cette partie a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Dr. Smith. La librairie a été mélangée au tampon de séquençage et le flowcell lavé. Ensuite la librairie est chargée sur le flowcell du séquenceur MinION contenant 512 réseaux de pores et pouvant générer jusqu'à 30 GB de données de séquençage. L'analyse a été effectuée grâce au logiciel MinKNOW qui collecte les données brutes et les convertit en lecture de base. Le logiciel EPI2ME permet d'affiner l'analyse en appliquant des filtres de contrôle de qualité, par exemple en filtrant les séquences répétées. De plus, nous avons comparé la séquence obtenue à la séquence du BAC inséré dans la souris dans le but d'avoir une idée du nombre d'insertion et de si les insertions sont complètes.

## **Chapitre IV Résultats**

### **4.1 Optimisation et établissement d'une stratégie d'expérimentation pour tester un nouveau modèle de souris Cre-ERT2**

Une fois que le génotype des souris ADAMTS19-Cre-ERT2 a été confirmé par PCR et électrophorèse les croisements pour caractériser les lignées ont pu commencer (*Figure 22.D*). Nous avons reçu treize souris et nous en avons analysé onze. Uniquement les lignées dont la recombinaison a fonctionné sont décrites dans ce manuscrit. Toutes les souris utilisées sont sur le fond génétique C57BL/6.

Dans un premier temps, nous avons testé différentes possibilités d'administration de Tamoxifen ainsi que de dosage pour assurer une activation optimale de la Cre-ERT2 et une mortalité minimum due à l'interaction endogène du Tamoxifen. Cet équilibre n'est pas parfait et le système Cre-ert/lox a encore besoin d'amélioration cependant, suite à une période de mise au point et d'optimisation, nous avons réussi à obtenir une recombinaison totale de la Cre-ERT2 avec un taux de mortalité suffisamment bas pour assurer des résultats. Pour la même dose donnée, les injections n'ont jamais résulté en un signal aussi fort que lorsque le Tamoxifen est

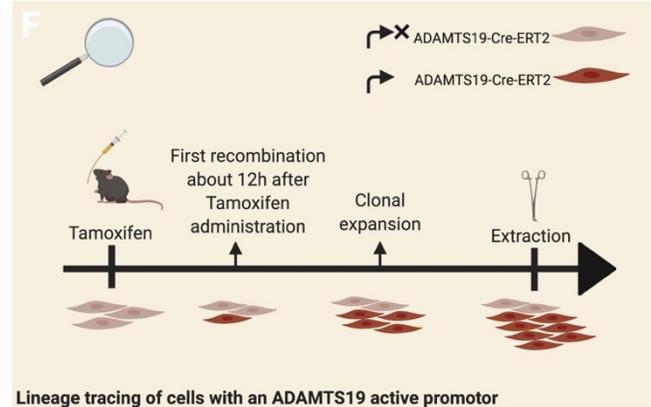
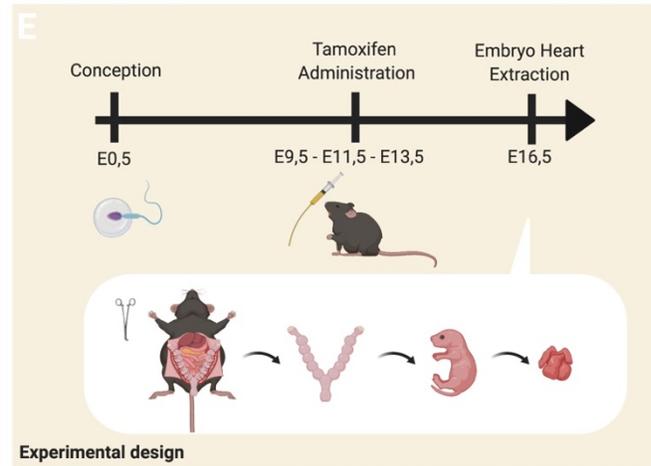
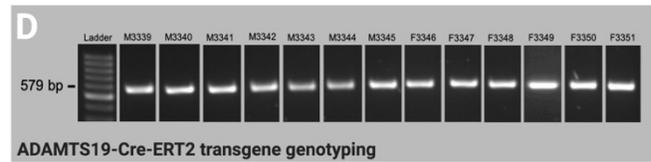
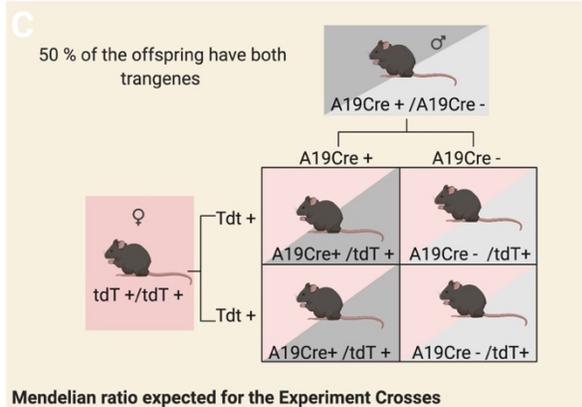
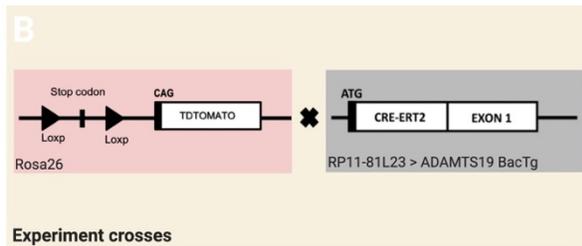
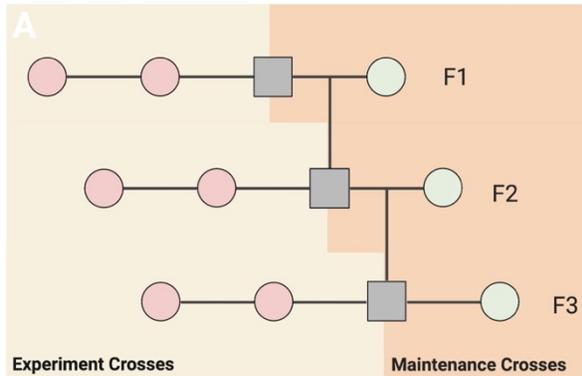
administré par voie orale à la mère gestante. Nous avons donc choisi d'utiliser la voie d'administration par gavage pour le reste des expériences.

La dose référence que nous avons utilisé est la dose de 40 mg de Tamoxifen pour 1000 mg de poids de souris adultes. 1 fois et 2 fois la dose n'ont soit un signal très faible soit pas de signal. Le signal le plus fort que nous avons pu avoir et lorsque l'on utilise 4 fois cette dose, cependant la mortalité est extrêmement élevée donc nous avons opté pour 3 fois la dose référence. Cette dose nous a permis d'obtenir davantage de signal.

En ce qui concerne le temps d'administration de Tamoxifen, nous avons opté pour E13.5. ADAMTS19 est exprimé dans les cellules valvulaires interstitielles durant la période de remodelage qui commence à E12.5 et s'étend jusqu'aux stades post-nataux. De plus, une fois ingéré le Tamoxifen peut prendre environ 12h pour recombinaison la Cre ce qui allumera les cellules exprimant ADAMTS19 à E14,5 et des données de séquençage à cellule unique montre qu'au stade E14.5 l'ARN de ADAMTS19 est le plus exprimé. Par la suite, nous avons montré que le motif d'expression est reproductible sur plusieurs générations et dans différentes portées par génération (**Figure 22.A**). Une fois la reproductibilité démontrée, nous avons exploré d'autres périodes du développement valvulaire en administrant le Tamoxifen aux jours embryonnaires E9.5 et E11.5 (**Figure 22.E**). Les embryons sont récoltés au jour embryonnaire E16.5.

Les souris hétérozygotes *Adamts19-Cre-ert2* ont été croisées avec les souris homozygote *Rosa26-TdTomato* assurant la présence des deux constructions génétiques dans 50% de la descendance. La recombinaison des sites lox P médiée par la Cre-ERT2 sous l'activation du Tamoxifen se passe donc dans 50% des embryons (**Figure 22.B, C**). La recombinaison des sites loxP entraîne l'émission de la protéine TdTomato dans les cellules où le promoteur ADAMTS19 est ouvert. De plus toutes les cellules descendantes émettront également la fluorescence rouge TdTomato (**Figure 22.F**). Nous nous attendons au même motif d'expression que celui obtenu avec la souris ADAMTS19 KO/KO ou ADAMTS19 se trouve dans les valves (uniquement les cellules valvulaires interstitielles), les oreillettes et les ventricules comme cité dans l'introduction.

Homozygous Rosa26 tdTomato Mice  
 Heterozygous ADAMTS19-Cre-ERT2 Mice  
 Wild type mice



**Figure 7** Établissement d'une nouvelle lignée ADAMTS19-Cre-ERT2. **A.** Les Mâles ADAMTS19-Cre-ERT2 sont croisés avec des femelles Sauvage pour la maintenance et des femelles Rosa26-TdTomato pour les analyses de patrons d'Expression. **B.** Constructions génétique des souris nécessaires à l'analyse des patrons d'expressions **C.** Ratio Mendélien du nombre d'embryons avec les deux constructions génétiques. **D.** Résultats de PCR amplifiant une partie du transgène ADAMTS19-Cre-ERT2. **E.** Stratégie d'analyse des embryons **F.** Expansion clonale via le système inductible Cre-lox.

## **4.2 Caractérisation du motif d'expression et établissement de la reproductibilité au travers des générations**

### **4.2.1 La lignée 1 reproduit partiellement le patron d'expression de la souris ADAMTS19 KO/KO : Une nouvelle lignée pour les fibroblastes cardiaque**

La lignée 1 provient du mâle 3344, il s'agit d'une lignée qui donne fréquemment des résultats en comparaison aux autres lignées analysées ce qui signifie que les mâles sont de bons reproducteurs et donc que le transgène n'influe pas sur la reproduction. De plus, le motif d'expression observé est reproductible au travers des générations (*Figure 23*). Vingt-deux couples ont permis de caractériser la lignée. Sur ces 22 expériences : 31,82 % des femelles étaient non gestante, 13,64 % des embryons étaient soit mort soit perdus lors de fausses couches, 13,64 % des embryons étaient négatifs et 40,91 % des embryons étaient positifs et analysables. Les femelles non gestantes ont aussi pu subir des fausses couches et perdre leurs embryons mais cela peut passer inaperçu. 66,6% des embryons négatifs appartiennent au même mâle utilisé en seconde génération et ce mâle n'a pas donné de résultats positifs. Il est possible que le transgène de ce mâle soit compromis. Le ratio mendélien attendu est de 50% d'embryons positifs par portée est le ratio obtenu lorsque l'on regarde l'ensemble des portées positives est de 47, 30% et 41,39 % lorsque que l'on regarde le total des expériences en enlevant le mâle possiblement compromis (*Figure 1. Supplémentaires*). Malgré que le nombre de portée soit faible pour être statistiquement représentatif cela nous permet tout de même d'avoir un ordre d'idée quant à la ségrégation du transgène. Le transgène ADAMTS19-Cre-ERT2 semble donc ségréguer selon les lois de Mendel.

Dans un premier temps, nous avons montré que le patron d'expression est reproductible en utilisant le design expérimentale « Administration Tamoxifen E13.5 – Extraction des cœur E16.5 » (*Figure 24*). Les images des cœurs d'embryons entiers prisent via un microscope à fluorescence révèlent un patron d'expression ou des cellules dans les ventricules et les oreillettes sont illuminées mais pas dans les valves cardiaques. Le motif ne reproduit donc que partiellement les résultats obtenus avec la souris ADAMST19 KO/KO.

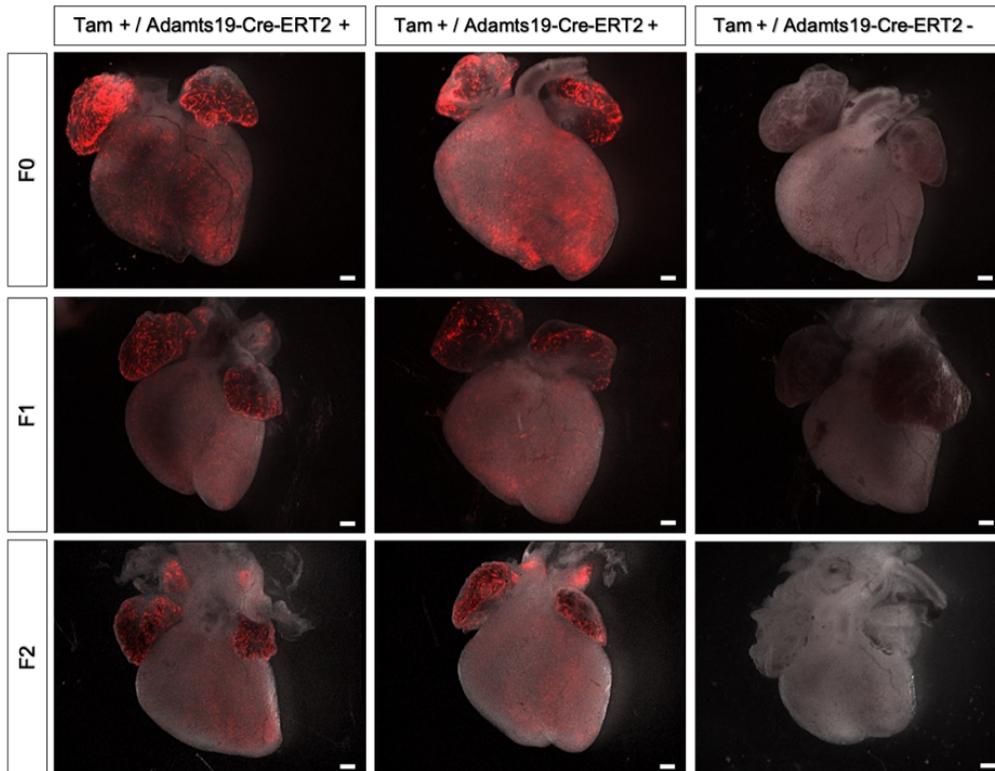
Nous avons ensuite exploré de nouveaux temps de recombinaison notamment en administrant le tamoxifen à E9.5 et à E11.5. Nous avons eu un trop haut taux de mortalité à E9.5 pour avoir des résultats cependant l'administration de Tamoxifen à E11.5 a fonctionné et nous avons obtenu trois portées contenant des embryons positifs (Figure 4). Ces portées montrent un patron d'expression similaire lorsque l'activation de la Cre-ERT2 est initié à E13.5. Les cellules positives pour la protéine tdTomato sont réparties de manière homogène dans les ventricules gauches et droits lorsque que la recombinaison a lieu à E14.5 (Administration tamoxifen E13.5-Extraction E16.5) mais la fluorescence est plus forte dans les ventricules droits lors de la recombinaison à E12.5 (Administration tamoxifen E11.5-Extraction 16.5). Cela signifie que les cellules exprimant ADAMTS19 sont plus nombreuses dans le ventricule droit au début de la phase de remodelage des valves qui correspond également au moment où la septation ventriculaire commence. On remarque, en effet une fluorescence plus dense au niveau du septum interventriculaire. Il n'y a pas de différence entre l'oreillette gauche et l'oreillette droite (*Figures. 24,25*).

Lorsque le gavage est effectué à E11.5, nous pouvons constater le sens de l'expansion clonal facilement. En effet, le Tamoxifen active la recombinaison des cellules exprimant ADAMTS19 à E12.5 et chaque cellules filles s'illuminent de façon permanente jusqu'au jour de l'extraction des cœurs permettant ainsi d'observer des traits rouges qui sont le résultat de cinq jours de division cellulaire à partir de la première cellule recombinée. Ces traits rouges représentent donc les lignées cellulaires et suivent le sens de l'expansion du tissu cardiaque. L'emplacement des valves est visible sur ces images et l'on peut constater que les valves ne sont pas allumées. (*Figure 25*).

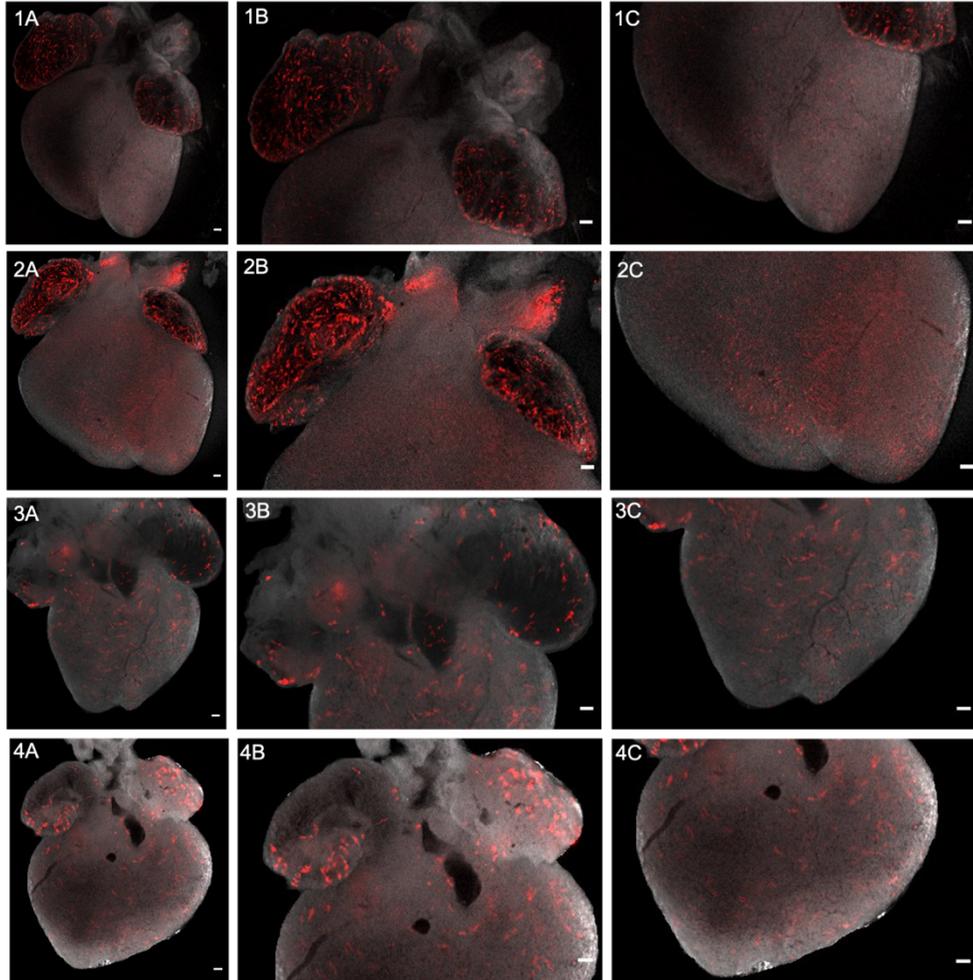
Enfin, nous avons voulu mettre en lumière le type cellulaire exprimant ADAMTS19 grâce à des cryo-coupes pour observer la morphologie cellulaire. Nous observons des formes de cellules allongées et rondes ce qui indique que la morphologie est hétérogène or les fibroblastes sont connus pour avoir une morphologie hétérogène au sein d'un même tissu (Ravikanth et al. 2011) (*Figure 26*). De plus, des données de séquençage a cellules uniques indique que ADAMTS19 est exprimé dans les fibroblastes cardiaques ce qui semble logique car les fibroblastes sont des cellules de maintien qui produisent des protéines de matrices extracellulaires et ADAMTS19 fait partie d'une famille de protéase de la matrice extracellulaire.

Pour beaucoup de lignée de fibroblastes déjà établies notamment Col1a2-Cre-ERT, Tcf2l mCrem et plusieurs lignées de Cre-Wt1 et Cre-periostin il y a également de l'expression dans les cellules interstitielles des valves pulmonaires et aortiques (Lindsley et al. 2007)(Wessels et al. 2012)(B. Zhou et al. 2010)(Acharya et al. 2011). Cette lignée est donc plus spécifique que les lignées déjà existantes car elle ne présente pas d'expression autre part que dans les fibroblastes des ventricules et des oreillettes. Cela est un atout considérable permettant d'utiliser cette lignée pour créer des pertes de fonctions dans les fibroblastes avec la garantie que le phénotype cardiaque observé ne provient que de la perte de fonction du gène d'intérêt dans ces cellules et non dans les cellules valvulaires. Nous avons effectué des marquages immunologiques avec des marqueur de fibroblastes et de cardiomyocytes pour confirmer qu'il s'agit bien de fibroblastes et non de cardiomyocytes. Cependant, les marquages n'ont pas fonctionné de manière optimale et l'expérience est illustrée à la **Figure 2 supplémentaire**.

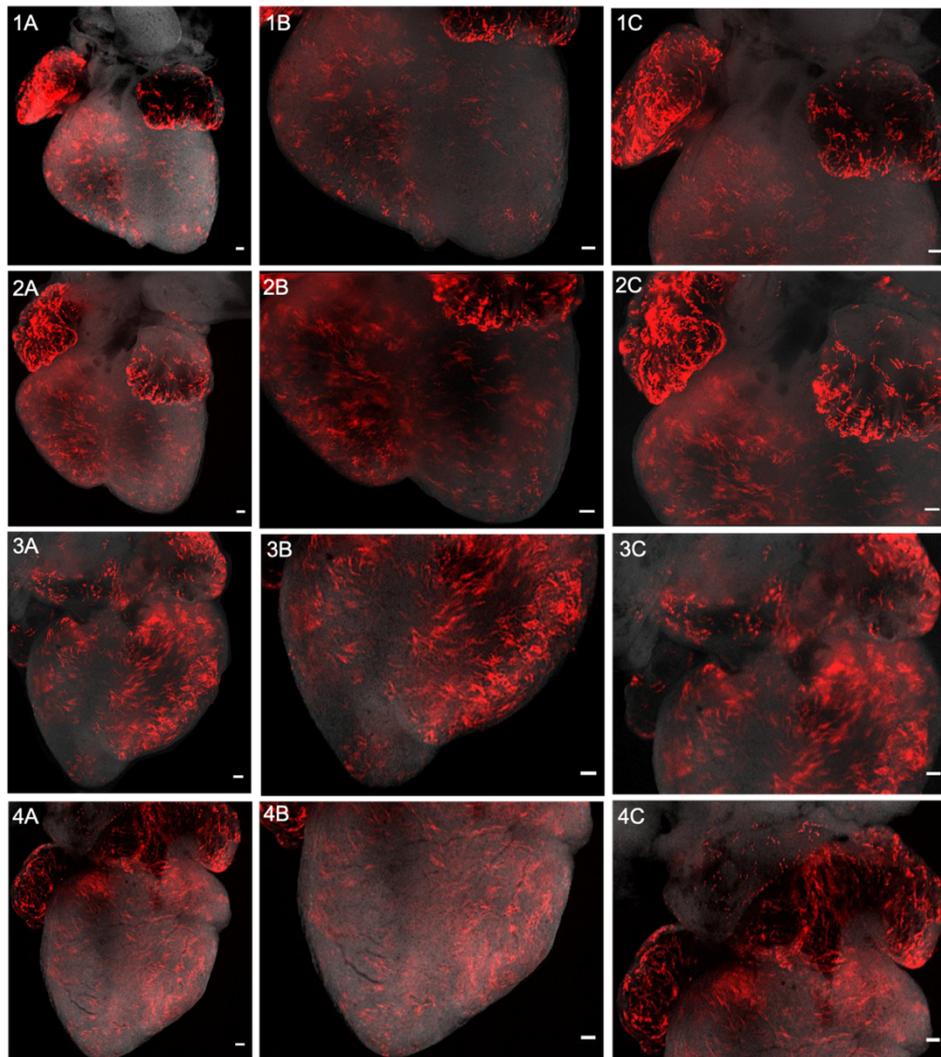
En conclusion, bien que cette lignée ne reproduise pas totalement le patron d'expression voulu elle peut être très utile pour l'étude des fibroblastes dans le cœur notamment durant le développement.



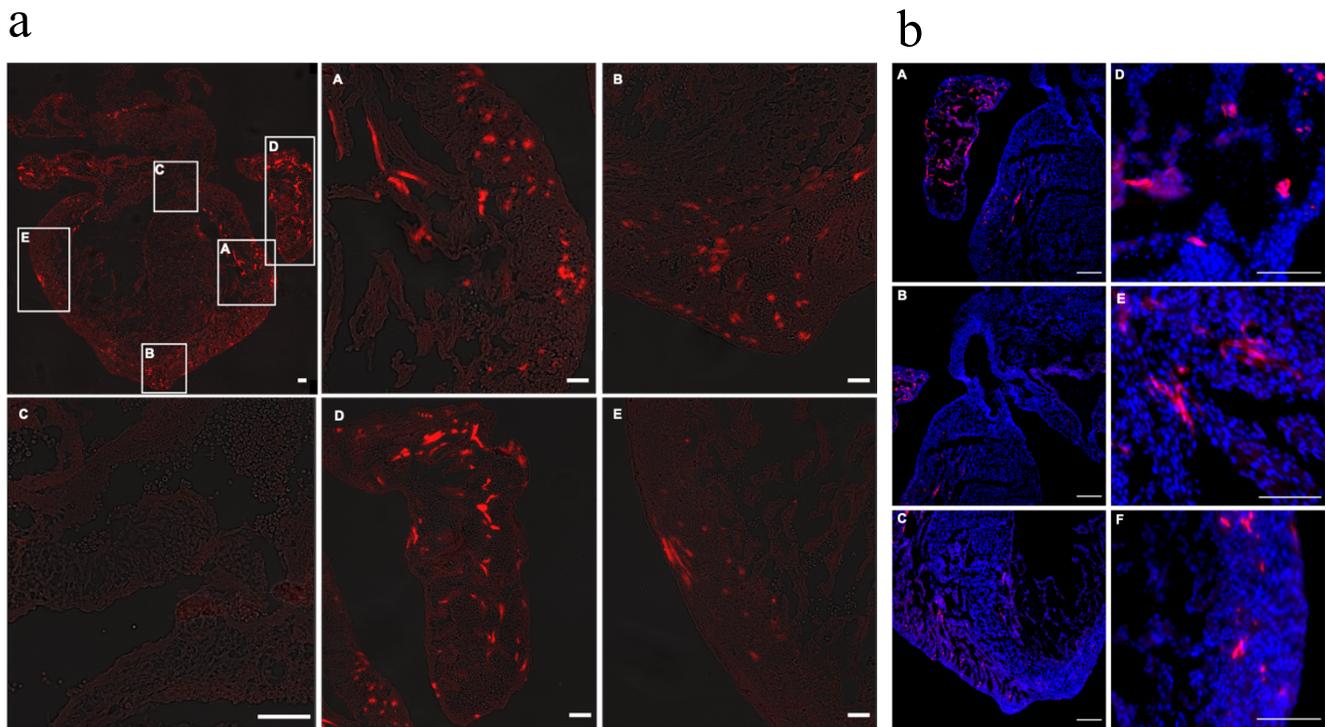
**Figure 8** Le patron d'expression de la lignée 3344 est reproductible au travers des générations. (Souris fondatrice = F0, génération 1 = F1, génération 2 = F2). Les cœurs ont été imagés avec un microscope à fluorescence et l'image obtenue est une superposition de l'image champs lumineux et de l'image à fluorescence. Pour chaque génération deux cœurs illustrent les patrons obtenus chez les souris qui ont reçu le tamoxifène et qui sont positives pour le gène ADAMTS19. Un troisième cœur illustre l'absence d'expression chez les souris qui ont reçu le tamoxifène mais qui sont négatives pour le transgène Adamts19. Échelle 100µm.



**Figure 9** Patron d'expression dans les oreillettes et les ventricules lorsque l'on administre le tamoxifen a E13.5 et que l'on analyse les cœurs a E16.5. Les embryons **1** et **3** représente une vue de face et les embryons **3** et **4** une vue de dos. La fluorescence est répartie de manière homogène dans l'ensemble du cœur. **A** étant une vue d'ensemble **B** une agrandissant sur les oreillettes et **C** un agrandissement sur les ventricules. Échelle 100um.



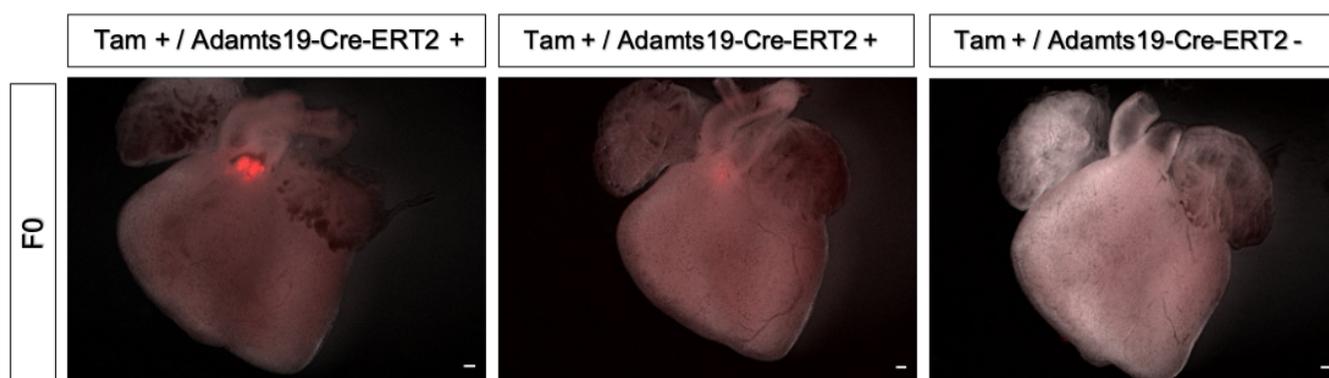
**Figure 10** Patron d'expression dans les oreillettes et les ventricules lorsque l'on administre le tamoxifen a E11.5 et que l'on analyse les cœurs a E16.5. Les embryons 1 et 3 représente une vue de face et les embryons 3 et 4 une vue de dos. La fluorescence est répartie de manière homogène dans l'ensemble du cœur. A étant une vue d'ensemble B une agrandissant sur les oreillettes et C un agrandissement sur les ventricules. Échelle 100um.



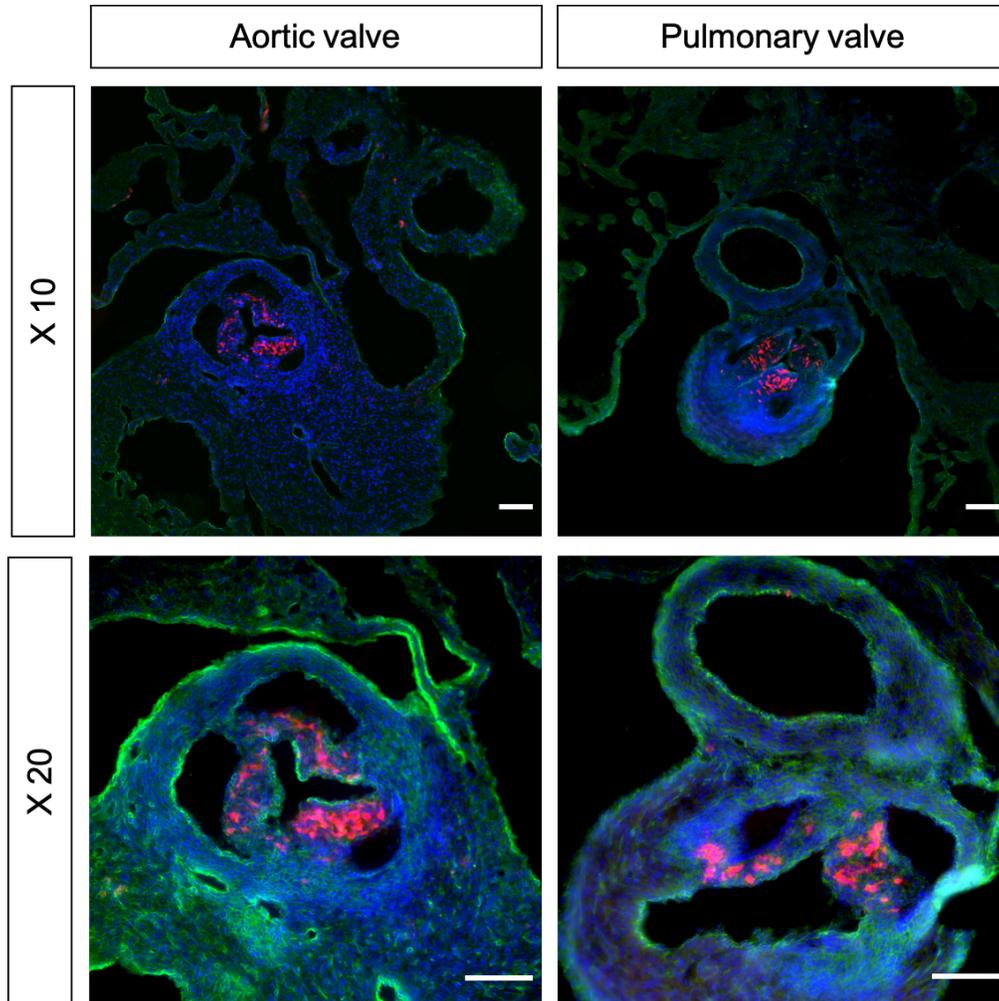
**Figure 11** Morphologie et localisation des cellules exprimant la tdTomato. *A et b* sont deux cœurs proviennent de portée différente mais dans les deux cas le design expérimental est gavage E11.5 – Extraction E16.5. La forme hétérogène des cellules qui sont rondes et allongé par endroit est caractéristique des fibroblastes. Il n’y a pas de fluorescence dans les valves aortique est pulmonaire (*aC, bB*) Cependant on remarque des cellules de formes allongées à l’extrémité de la valves tricuspide (*aE*). Échelle 100um.

#### 4.2.2 La Lignée 2 reproduit partiellement le patron d'expression de la souris ADAMTS19 KO/KO mais le patron d'expression n'est pas transmissible

La lignée 2 provenant du mâle 3339 est une lignée extrêmement intéressante exprimant ADAMTS19 dans les cellules valvulaires interstitielles uniquement avec un signal très fort (*Figure 28*). Malheureusement cette lignée n'a pas donnée de descendance (*Figure 27*). Par conséquent, il n'est pas possible de confirmer que le patron d'expression est reproductible au travers des générations. Il a fallu trois croisements pour obtenir ces résultats (*Figure supplémentaire 3*).



**Figure 12** Le patron d'expression de la lignée 3339 est n'est pas reproductible à travers les générations. Les cœurs ont été imagés avec un microscope à fluorescence et l'image obtenue est une superposition de l'image à champs lumineux et de l'image a fluorescence. (Souris fondatrice = F0) Pour la génération F0, deux cœurs illustrent les patrons obtenus chez les souris qui ont reçu le tamoxifen et qui sont positives pour le gène ADAMTS19. Un troisième cœur illustre l'absence d'expression chez les souris qui ont reçu le tamoxifen mais qui sont négatives pour le transgène Adamts19.



**Figure 13** Morphologie et localisation des cellules exprimant la TdTomato dans la lignée 3339. Les cellules illuminées dans les valves sont les cellules valvulaires interstitielles. Bleu : Dapi, Rouge : Tdtomato, Vert : WGA. Échelle 100um.

#### **4.2.4 La lignée 3 montre un patron d'expression reproductible inconnu : L'artère pulmonaire efférente**

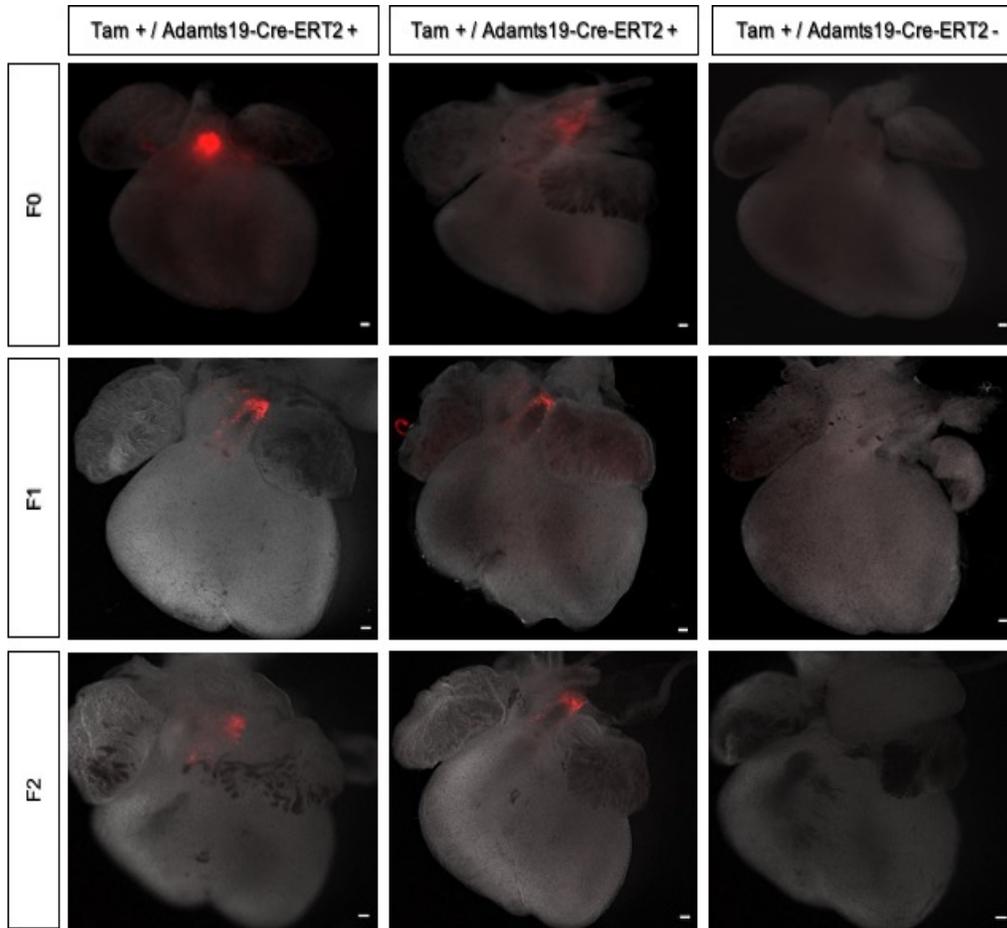
La lignée 3 provient du mâle 3341. Cette lignée donne fréquemment des résultats en comparaison aux autres lignées analysées signifiant que les mâles de cette lignée sont de bons reproducteurs et donc que le transgène n'influe pas sur la reproduction. Cependant, le motif d'expression semble avoir divergé. En effet, lors de l'analyse des souris fondatrices (F0) nous avons découvert deux motifs d'expression au sein d'une même portée : de l'expression dans les valves dans deux embryons et dans l'artère pulmonaire dans deux autres. Le patron des valves qui été le plus intéressant a malheureusement disparu. Lors de l'analyse des générations suivantes (F1 et F2) seul le patron d'expression dans l'artère pulmonaire a persisté et s'est montré reproductible (*Figure 29*).

Vingt-trois couples ont permis de caractériser la lignée. Sur ces vingt-trois expériences : 30,43 % des femelles étaient non gestante, 13,04 % des embryons était soit mort soit perdu lors de fausses couches, 8,70 % des embryons étaient négatifs et 47,83 % des embryons étaient positifs et analysables. Tout comme la lignée 1, les femelles non gestantes ont aussi pu subir des fausses couches et perdre leurs embryons mais cela peut passer inaperçu. Cela est dû à l'effet endogène du Tamoxifen. Le Tamoxifen administré peut réagir avec les récepteurs d'œstrogènes internes et perturber la physiologie de l'animal en induisant notamment des fausses couches. Le ratio mendélien attendu est de 50% d'embryons positifs par portée est le ratio obtenu lorsque l'on regarde l'ensemble des portées positives est de 39,75% et 33,64 % lorsque que l'on regarde le total des croisements (*Figure 4. Supplémentaires*). S'intéresser au ratio mendélien avec un si petit nombre de portée n'est pas significatif statistiquement, cependant nous avons un ordre d'idée de l'efficacité des croisements.

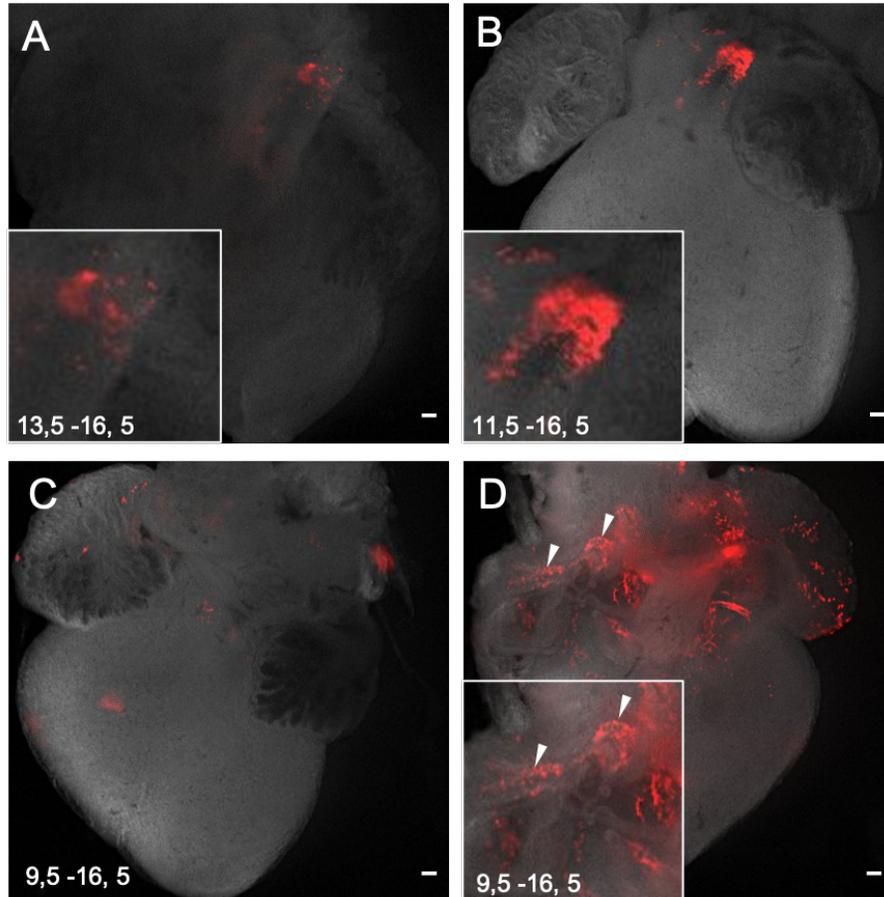
Les résultats expérimentaux obtenus lors de l'administration du Tamoxifen à E11.5 et E13.5 ont montré un patron d'expression similaire qui s'apparente à un anneau autour de l'artère pulmonaire au même endroit. Indiquant que les cellules illuminées de E11.5 à E13.5 participent probablement au même évènement développemental (*Figure. 30. A, B*). Étonnement, lorsque le traçage des cellules exprimant ADAMTS19 est initié à E9,5 les cellules illuminées en vue antérieure semble se disperser dans l'ensemble du cœur (*Figure. 30.C*). La vue postérieure

indique que la fluorescence se situe au niveau des artères et veines, notamment celles allant vers les poumons (*Figure. 30. D*).

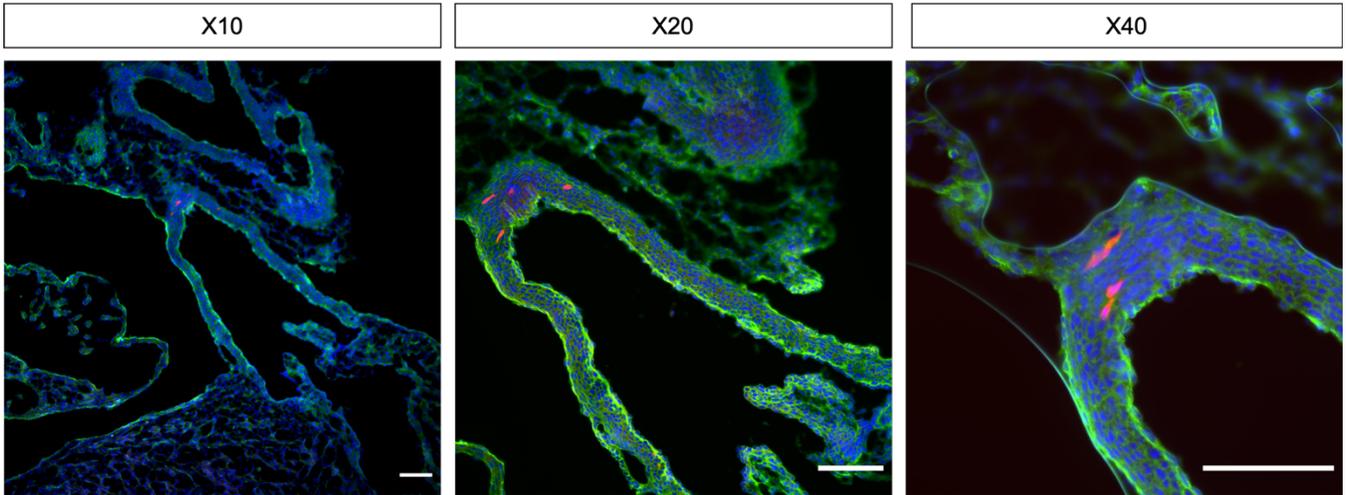
Des cryo-coupes effectuées sur des cœurs à E13.5 nous permettent d'observer la morphologie et la localisation des cellules avec plus de précision. Les cellules positives pour la TdTomato sont situées au sein même des couches cellulaires composant l'artère pulmonaire (*figure 31*). Des marquages de fibroblastes et de cellules musculaires lisses permettraient de confirmer le type cellulaire illuminée.



**Figure 14** Le patron d'expression de la lignée 3341 est reproductible au travers des générations bien que deux patrons d'Expression soient présents dans la lignée F0 ; dans les valves et l'artère pulmonaire efférente, seule l'expression dans l'artère pulmonaire efférente va subsister. (Souris fondatrice = F0, génération 1 = F1, génération 2 = F2). Les cœurs ont été imagés avec un microscope à fluorescence et l'image obtenue est une superposition de l'image champs lumineux et de l'image à fluorescence. Pour chaque génération deux cœurs illustrent les patrons obtenus chez les souris qui ont reçu le tamoxifen et qui sont positives pour le gène ADAMTS19. Un troisième cœur illustre l'absence d'expression chez les souris qui ont reçu le tamoxifen mais qui sont négatives pour le transgène Adamts19. Échelle 100um.



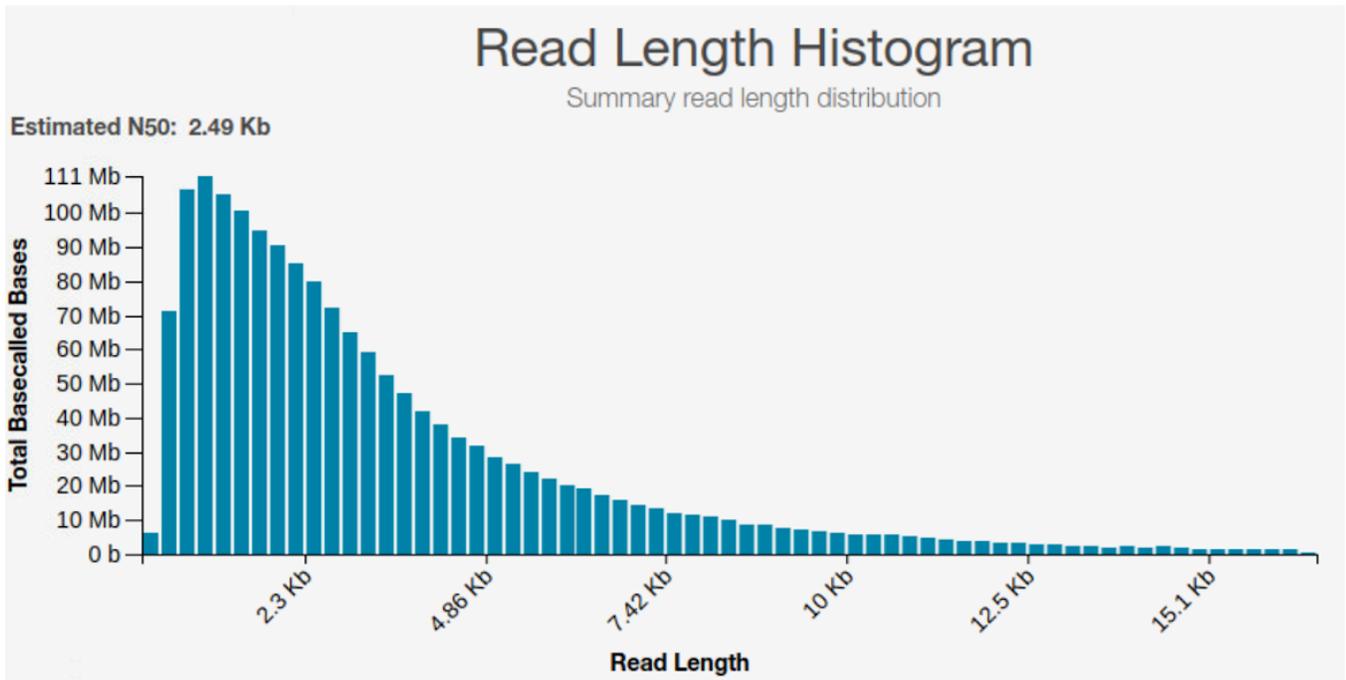
**Figure 15** Le patron d'expression est dans l'artère pulmonaire lorsque l'on administre le tamoxifen a 11,5 et 13,5 mais change totalement lorsque l'administration se fait à E 9,5 (A, B, C). Il n'y a pas de cellules illuminées par la TdTomato vue de dos pour les cœurs dont l'artère pulmonaire est illuminée cependant on constate que de nombreuses cellules sont illuminées en vue postérieure lorsque le gavage est effectué à E9,5 (D). Échelle 100µm.



**Figure 16** Morphologie et localisation des cellules exprimant la TdTomato dans la lignée 3341. Bleu :Dapi, Rouge : Tdtomato, Vert : WGA. Échelle 100um.

### 4.3 Investigation de la raison derrière les différents motifs d'expression

Le but est d'investiguer la raison pour laquelle à partir de la même construction génétique nous avons obtenu des patrons d'expression différents. Nous avons décidé de séquencer le génome entier des trois lignées de souris transgénique à l'aide de séquençage nanopore. Une fois séquencé nous allons comparer cette séquence à celle du BAC inséré pour déterminer si l'insertion est complète, s'il y a plusieurs insertions et le site d'intégration. Cette technique qui utilise des pores de protéines synthétique couplées au plus petit détecteur au monde permet de lire entre 250 et 450 bases par seconde. Les pores sont immergés dans un liquide conducteur et lorsque l'ADN passe à travers les pores, le courant est perturbé. Cette perturbation est différente s'il s'agit d'un A, T, C ou G et la détection et l'enregistrement de changement de courant permet le « base calling », c'est-à-dire de déterminer de quelle base il s'agit. Dans notre cas nous avons effectué un premier essai avec la lignée 3341 et la longueur des fragments obtenus n'était malheureusement pas optimale pour une couverture de séquençage de 5X. En effet, nous avons obtenu un NS50 de 2,49 kb (**Figure 32**). 1,4 millions de fragments ont été séquencés générant ainsi 2,1Gb de donnée, et donc une couverture approximative de 0,3X. Cela signifie que nous avons 30% de chance de trouver le site d'intégration. Après une analyse comparative aucune homologie n'a été trouvée. Pour la prochaine analyse il faudra améliorer la préparation de l'ADN dans le but d'obtenir des fragments plus longs.



**Figure 17** Distribution de la taille des fragments. N50 = 2,49 Kb.

## Chapitre V Discussion et perspective

La technologie Cre a fourni la capacité unique de perturber l'expression génétique de manière relativement contrôlée cependant il y a d'importants aspects méthodologiques à prendre en considération. Par exemple, un de ces aspects serait que la manipulation génétique pour créer la souris pourrait donner un phénotype en elle-même, et cela de manière indépendante à la Cre. Le transgène peut également devenir silencieux avec le temps ou même devenir silencieux dû à l'emplacement de son insertion. Pour ces raisons il est conseillé de vérifier s'il y a de la recombinaison dans les gamètes et de maintenir l'allèle portant la Cre dans les reproducteurs mâles chez qui la transmission de l'activité de la Cre dans les gamètes est moins fréquente.

L'induction du système Cre-lox par le tamoxifène vient rajouter une couche de complexité. En effet, la dose et le mode d'administration du tamoxifène peut directement interagir avec l'efficacité de la recombinaison de la Cre. L'efficacité de la Cre va dépendre de l'accès au tamoxifène du tissu, du niveau de protéines Cre et de l'accessibilité du locus entouré par les sites lox P. De plus certaines lignées Cre peuvent être permissives, c'est-à-dire que la recombinaison a lieu spontanément sans ajout de tamoxifène rendant la lignée non utilisable. La détection de ces événements est devenue plus fréquente grâce à des lignées Cre indicatrices.

Malgré toutes ces précautions à prendre de nouvelles lignées sont fréquemment établies et permettent d'améliorer la compréhension de l'origine des cellules et des études phénotypiques. Chaque lignée que nous avons tenté d'établir nous donne des patrons d'expressions et une reproductibilité différente (Davis et al. 2012) (Swonger et al. 2016b). (Tableau 3)

La lignée 1 provenant du mâle 3344 est facile d'utilisation et donne régulièrement des résultats. Ce qui signifie que le système Cre-lox est bien fonctionnel. Cependant le patron d'expression observé est différent du patron attendu tel qu'observé chez la souris ADAMTS19 Ko / Ko. En effet, le patron attendu est dans les ventricules, les oreillettes et les valves mais nous observons uniquement de la fluorescence dans les ventricules et les oreillettes. Le patron d'expression de cette lignée reproduit donc partiellement celui de la souris ADAMTS19 Ko / Ko.

La lignée 2, 3 et 4 montre un patron d'expression dans les valves ce qui reproduit également partiellement le patron d'expression de la souris ADAMTS19 Ko / Ko et cela de

manière complémentaire avec la lignée 1. Cependant, la lignée 2 ne donne pas d'embryon positif pour le transgène lors des croisements de maintenance ce qui ne permet pas d'obtenir la génération F1 et par conséquent d'affirmer que le patron d'expression des valves est reproductible au travers des générations pour cette lignée. Pour la lignée 3, le patron d'expression des valves est visible lorsque l'on analyse les souris fondatrices (F0). On observe deux embryons ayant de la fluorescence dans les valves en F0, les valves sont illuminées ainsi que des cellules de l'artère pulmonaire. Cependant, les patrons d'expression des valves vont disparaître et seulement le patron d'expression de l'artère pulmonaire va perdurer à travers les générations. Pour la lignée 4, les patrons des valves a été observé deux fois sur 41 croisements et elle ne montre pas de ratio mendélien. Bien qu'obtenir une lignée avec de la fluorescence uniquement dans les cellules valvulaires interstitielles aurait été une lignée parfaite et spécifique pour l'étude de ces cellules, le patron d'expression n'est pas reproductible au travers les générations et donc inutilisable pour les études phénotypiques.

Toutes les souris reçues proviennent d'une injection pro-nucléaire différente mais le transgène inséré est le même dans chaque pronucléus. Le patron d'expression observé devrait être le même dans chaque lignée cependant nous observons trois patrons d'expressions distincts : dans le ventricule et les oreillettes, dans les valves cardiaques et dans l'artère pulmonaire.

L'insertion du transgène dans le génome ne peut pas être garanti à 100 % lors de la conception d'une nouvelle lignée de souris transgénique. Aussi, lorsque l'insertion du transgène fonctionne, il se peut également que le transgène soit partiellement inséré ou encore qu'il s'insère dans une région qui réduit ou annule son expression.

Le transgène pourrait être partiellement transmit ou bien être coupé durant les divisions cellulaires des cellules germinales. En effet, le BAC inséré mesure 180 Kpb ce qui est une taille considérable et il est possible qu'il ne ségrégue pas dans son intégralité. Cela pourrait expliquer pourquoi il y a deux patrons d'expression complémentaire. Le BAC aurait pu se diviser avec d'un côté la séquence contenant les motifs de régulation pour l'expression dans les cellules valvulaires interstitielles et d'un autre coté les motifs de régulation pour l'expression dans les fibroblastes. Cette hypothèse aurait dû être vérifié grâce au séquençage nanopore des lignées

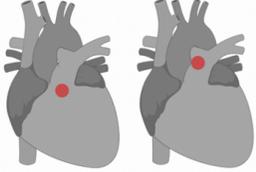
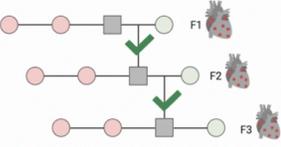
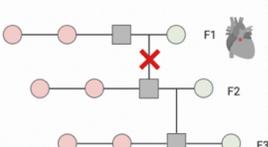
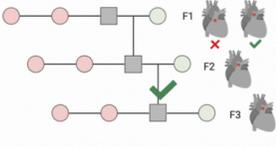
mais cela n'a pas pu être terminé du a la crise sanitaire du Corona virus (Lu, Giordano, and Ning 2016).

Une autre explication pour les lignés qui n'émettent pas de fluorescence malgré que le transgène soit présent est que le transgène a pu être inséré dans une région épigénétique fermée. Ou encore derrière un promoteur plus puissant que celui d'ADMATS19 qui est régulé négativement. Enfin, il est aussi possible que lors de l'injection pro-nucléaire le transgène n'a pas été injecté au stade une cellule mais au stage de 2 ou 4 cellules ce qui a pour conséquence du mosaïsme. Une partie des cellules de l'embryon contiendra le transgène et l'autre non. Mais lorsque la génération F1 est générée à partir d'embryon de souris F0 positifs celui-ci aura le transgène dans toutes ces cellules.

Il est aussi important de souligner que dans la souris ADAMTS19 Ko/ Ko c'est le gène Adamts19 endogène qui est modifié alors que dans notre cas il s'agit de l'insertion d'un BAC humain. Bien que le BAC choisis contienne une partie du génome humain très conservé à travers les espèces notamment chez la souris, il s'agit tout de même d'une séquence exogène d'une autre espèce et il est possible que le patron d'expression ne soit pas identique pour cette raison.

Le choix du gène ADAMTS19 pour créer un modèle de souris Cre-ERT2 pour étudier spécifiquement les cellules valvulaires interstitielles est justifiable du fait que les données préliminaires de la souris Adamts19 Ko /Ko montre une expression spécifiquement dans les cellules valvulaires interstitielles au sein des valves. Cependant, la souris montre également qu'ADAMTS19 est exprimé dans d'autre endroit du cœur ce qui rend le modèle non spécifique aux cellules valvulaires interstitielles dans l'ensemble du cœur. Aujourd'hui, dans mon laboratoire grâce au séquençage de cellules uniques et aux techniques d'hybridation in situ tel que le RNA scope, de nouveaux gènes d'avantage spécifique aux cellules valvulaires interstitielles ont été mis en évidence. L'utilisation de ces gènes pour établir un nouveau modèle pour étudier les cellules valvulaires interstitielles semble de rigueur.

**Table 3** Récapitulatif de l'efficacité des principales lignées analysées

| Lignée de souris               | 1   | 2  | 3  |
|--------------------------------|---|--|--|
| <b>Localisation expression</b> | <p>Oreillette/ventricules</p>  | <p>Valves</p>  | <p>Valves et artère pulmonaire</p>                                      |
| <b>Reproductibilité</b>        | <p>Oui</p>                   | <p>Non</p>   | <p>Seule l'expression dans l'artère pulmonaire est transmissible</p>  |

## Chapitre VI Conclusion

En conclusion, la lignée marquant spécifiquement les cellules valvulaires interstitielles n'a pu être établie cependant nous avons deux autres nouvelles lignées ADAMTS19-Cre-ERT2 qui ont un patron transmissible, dont une extrêmement spécifique aux fibroblastes cardiaques. La lignée 1 qui est spécifique aux fibroblastes dans les ventricules et oreillettes pourrait servir dans l'étude des fibroblastes durant le développement mais aussi dans les études de fibrose cardiaque. La fibrose cardiaque correspond à la déposition de matrice extracellulaire dans le cas d'une blessure, d'une inflammation ou du vieillissement. Adamts19 est une protéine de matrice extracellulaire, qui est nous le savons exprimé durant le développement mais il se pourrait aussi que son expression augmente lors de l'induction de la maladie. Cette lignée est plus spécifique que la plupart des lignées existantes. La lignée 3 semble spécifique aux cellules de muscle lisse ou de fibroblaste de l'adventitia - couche cellulaire de la paroi des artères de l'artère pulmonaire et aux veines pulmonaire. Il serait intéressant de regarder l'expression d'ADAMTS19 dans les poumons. De plus ample analyses du type cellulaire ont besoin d'être effectuées. De plus, il serait intéressant de séquencer l'ADN de ces lignées dans le but de comprendre la raison pour laquelle à partir du même transgène, des patrons d'expressions différents sont observés. Une hypothèse possible est que le transgène a été coupé et que par conséquent un bout de transgène contenant une séquence d'éléments régulateurs spécifiques au patron d'expression visible soit présent dans chaque lignée. En comparant ces séquences nous mettrons en évidence de nouveaux éléments régulateurs dépendant du type cellulaire.

## Chapitres VI Protocol rapides pour reconstruire le réseau vasculaire de l'œil en 3D

**Contexte :** Initialement je souhaitais obtenir une visualisation 3D des valves de la lignée 3339 exprimant ADAMTS19. J'ai mis au point des techniques de « tissue clearing » c'est-à-dire des techniques visant à faire devenir les cœurs transparents dans le but d'imager uniquement les cellules marquées pour la Tdtomato dans les valves. Cependant, les patrons d'expressions des valves cardiaques n'était pas transmissible au travers des générations ce qui a invalidé la lignée. Au même moment, Dr. Dubrac avait besoin d'imager le réseau vasculaire de l'œil en 3D à l'aide des mêmes techniques d'histologie et microscopie de light-sheet. Nous avons donc entamé une collaboration.

**Résumé :** La quantification au niveau d'un réseau cellulaire complet et l'analyse du réseau vasculaire de l'œil nécessite le développement et l'optimisation d'un Protocole rapide et facile d'utilisation. Ici, nous proposons un nouveau protocole pour la quantification de la rétine de souris et des hyaloïdes en utilisant une méthode modifiée de tissue clearing combiné avec la microscopie à nappe de lumière. Nous sommes capables d'imager le réseau dans son ensemble à l'aide d'une reconstruction 3D. Cette technique va nous permettre de quantifier la régression des hyaloïdes et les vaisseaux de la rétine dans le même plan et de les analyser avec une haute résolution et donc permettre une meilleure compréhension de la transition entre réseau hyaloïde et rétinien.

**Abstract:** System level quantification and analysis of vascular network in retina require the development and optimization of an easy and rapid protocol. Here, we propose a new protocol to quantify mouse retina and hyaloid blood vessels using a based- method of clearing and light sheet microscopy. We were able to image the whole retina and reconstruct the vascular system in 3D. This technic has allowed us to quantify the hyaloid regression and observe the retinal and hyaloid vasculature interaction while avoiding any dissection that could damage the retina structure. Observe the hyaloid vessel and the retinal vessel on the same plan as well as analyzing them at a single resolution level will give deeper insight on the transition from a hyaloid vasculature to a retinal one.

## 6.1 Introduction

Les avancées techniques en microscopie et en histologie, notamment l'invention de la microscopie à nappe de lumière (ligh-sheet) (Chatterjee et al. 2018) mais aussi par l'apparition des diverses améliorations en clarification des tissus (Susaki et al. 2015) nous ont permis de trouver un moyen rapide de reconstruire la structure du réseau vasculaire de la rétine et des hyaloïdes en 3D. La clarification du tissu permet d'éviter la réfraction des laser du à l'équilibration de l'indice de réfraction. Malgré que la microscopie à nappe de lumière soit décrite comme un processus complexe impliquant de longues phases d'optimisation nous décrivons ici un Protocol utilisant une technique de clarification simplifié. La rétine est la partie de l'œil la plus étudiée car il s'agit d'un modèle bien établi pour étudier les defaults vasculaires. Elle porte aussi le nom de fenêtre sur le cerveau. De plus, elle joue un rôle central dans plusieurs maladies humaines communes comme la rétinopathie du diabète, la rétinopathie du prématuré mais aussi les maladies maculaires lié à l'âge. La rétine contient 55 types de cellules neuronales qui travaille ensemble pour détecter la lumière et la transformer en impulsion électrique. Elle contient également un réseaux vasculaire dense composé principalement de cellule murale et de cellules endothéliales. La vascularisation du tissu oculaire durant le développement joue un rôle très important en délivrant nutriment et oxygène durant la formation de l'œil, la dépendance de la rétine a son approvisionnement en sang la rend exposé à des anomalies vasculaires. Lorsque ces anomalies apparaissent durant le développement elles peuvent mener à des rétinopathies comme la persistance des hyaloïdes ou encore à des rétinopathies prolifératives due à la prématurité. Nous nous intéressons particulièrement à la persistance des hyaloïdes. La persistance des vaisseaux hyaloïdes est une maladie listée dans 3% des enfants né pré-terme et dans 95% des enfants nés prématurés. Les vaisseaux hyaloïdes représentent un système vasculaire fetal temporaire, dont la partie distale va régresser après la naissance chez les souris et après le cinquième mois de gestation chez l'humain laissant le réseau vasculaire de la rétine en charge de la capture de l'oxygène et des nutriments (Wang et al. 2019). Au travers de mécanismes partiellement connus, la régression d'hyaloïde peut cesser et résulter en une maladie de la rétine appelé la persistance des artère hyaloïdes menant à des hémorragies et une perte de la vision.

## 6.2 Résultats

La souris Cdh5-Tdtomato a été utilisé pour la mise au point du protocole qui marque tous les vaisseaux en rouge (“006137 - B6.FVB-Tg(Cdh5-Cre)7Mlia/J” n.d.).

### 6.2.1 Protocol

#### 6.2.1.1 Mise au point d’un protocole de reconstruction du réseau vasculaire en 3D

Contexte : Je recevais les rétines prête pour passer à l’étape 2. Je n’ai donc pas effectué les injections de tamoxifen ni l’extraction du tissu.

1) Extraction du tissu : Disséquer la rétine sans la coupe avec le cristallin et fixer les rétines 30 minutes en 4% PFA. (30525-89-4, Sigma).

2) Clarification et Marquage immunologique : Après avoir tester les protocoles CLARITY et CUBIC nous avons opté pour CUBIC qui est plus rapide et facile d’utilisation. Nous avons modifié la deuxième phase ou nous utilisons du focus Clear (FC-101, Cerdarlane) à la place de la solution CUBIC 2 (Sucrose et Urea).

*CUBIC 1 (50 ml)*: 12,5 g UREA (25wt) ( TR12421, Thermofisher) , 12,5 ml N,N,N’,N’-tetrakis (2-hydropropyl) ethylenediamine (25wt) (162-60-3, Sigma), 4,5 ml of triton x-100 (15wt) (13,444259, Fisher Scientific), 17,5 ml of H<sub>2</sub>O

Lavez les rétines au PBS. Incubez les rétines 1 jour dans la solution CUBIC 1. Lavez dans du PBS 3 x 5 minutes. Incubez dans du tampon de blocage 1h, Incubez 5 heures avec les lectines couplés IB4 (1 :100), IB4-488 (L2895, Sigma) et IB4-657 (L32478, Sigma) qui marque les cellules endothéliales. Incubez 1 jour dans la solution de clearing optique.

**Résultats:** La tdTomato est visible cependant le marquage avec IB4 n’apparaît pas comme optimal (*Figure 1*)

4) Microscopie confocal: Pour tester si la fluorescence a fonctionné nous avons. Utilisez une boite optique (D35-20-0-TOP, Cellvis) et mettre la rétine à l’intérieur nerf optique face au fond de la dish. Ajoutez quelques goutte de la solution de focus clear mais pas trop car la gravité doit permettre à la rétine de rester stable Trouvez la rétine en brighfield et faire le focus. Réglez les lasers. Utilisez « auto scale » pour régler chaque laser et évite

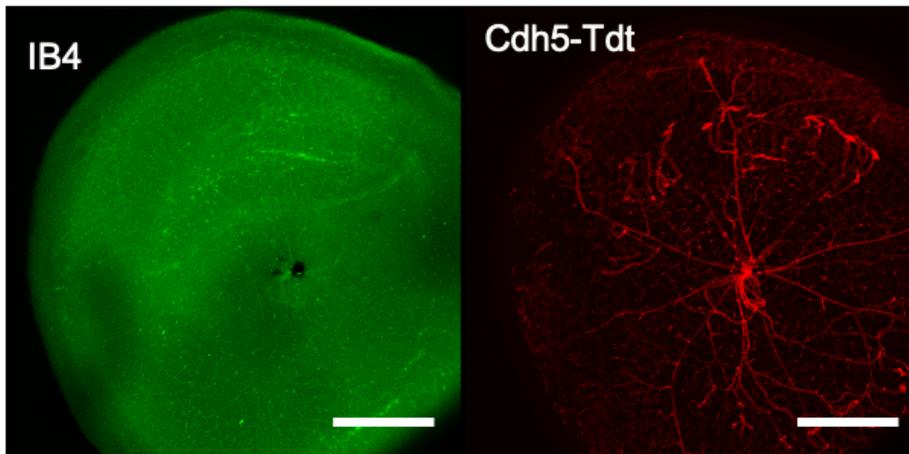
la saturation de l'échantillon. Utilisez le curseur pour s'orienter, déterminer la taille de la rétine et régler le début et la fin du stack. Utilisez Z wide et non Z Galvo qui va faire bouger l'échantillon. Ajustez la résolution. Imagez.

- 5) Microscopie à nappe de lumière : Dans un premier temps il faut monter l'échantillon dans le microscope (lightsheet Z1). Utilisez du low melting agarose (1%) (16520050, Thermofisher) préalablement dissout dans de la solution de clearing optique. Laissez 2 secondes dans micro-onde. Aspirer le low melting agarose dans une seringue d'1ml ou le bout a été préalablement coupé et laissez refroidir. Insérez la rétine et la positionner. Utilisez le logiciel ZEN, une fois ouvert utiliser « locate capillaries » pour localiser l'échantillon, Réglez le chemin de lumière. Allumez les lasers. Ajustez les miroirs de chaque côté. Sélectionnez « dual side ». Imagez.

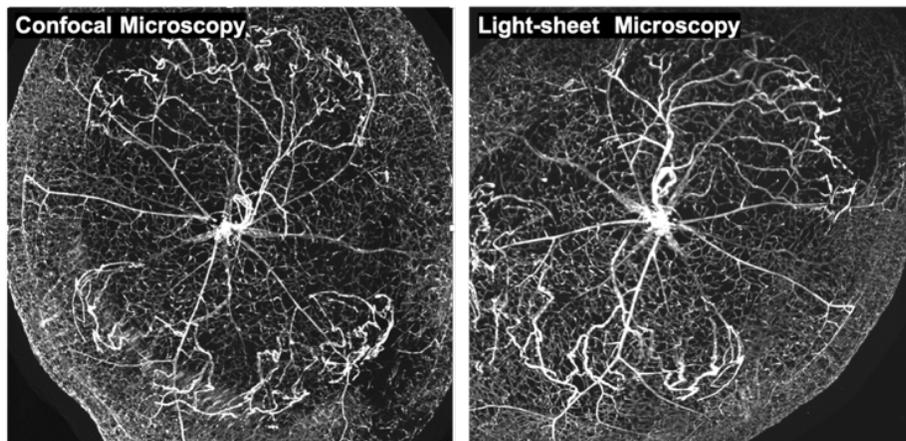
**Résultats:** La comparaison 2D des deux techniques de microscopie appliqué à notre protocole montre une résolution acceptable dans les deux cas (*Figure 2*)

- 6) Analyse d'image et 3D reconstruction : Utilisez le logiciel ZEN, Allez dans « processing », Convertir les images en TIF au format IMARIS grace a « IMARIS files converter ». (Ouvrir Imaris files converter> « Add files »> « Change settings »> V= vue > « Start all »). Cette étape peut prendre quelques heures. Ouvrir « Imaris Sticher » et générer la reconstruction 3D en alignant les plans, faire une vidéo.

**Résultats:** Les reconstruction en 3D proposées par le logiciel Leica et le logiciel IMARIS nous montre que le logiciel Imaris fourni image d'une résolution nettement supérieure (*Figure 3*)

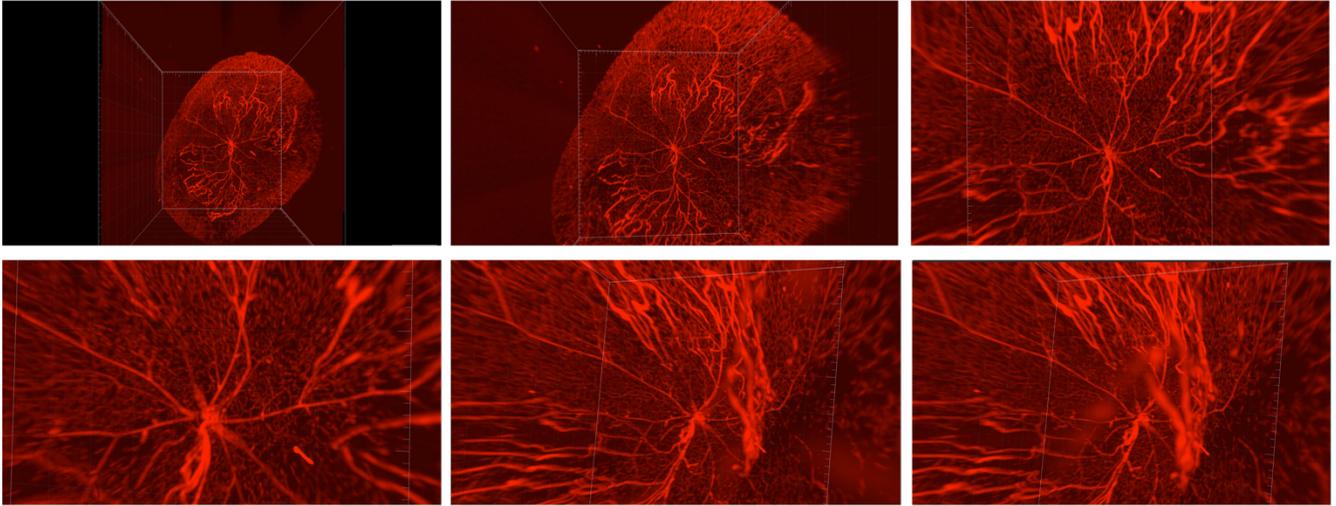


**Figure 18** Retine clarifier avec CUBIC et imagé au microscope confocol. IB4 ne semble pas avoir bien fonctionné.

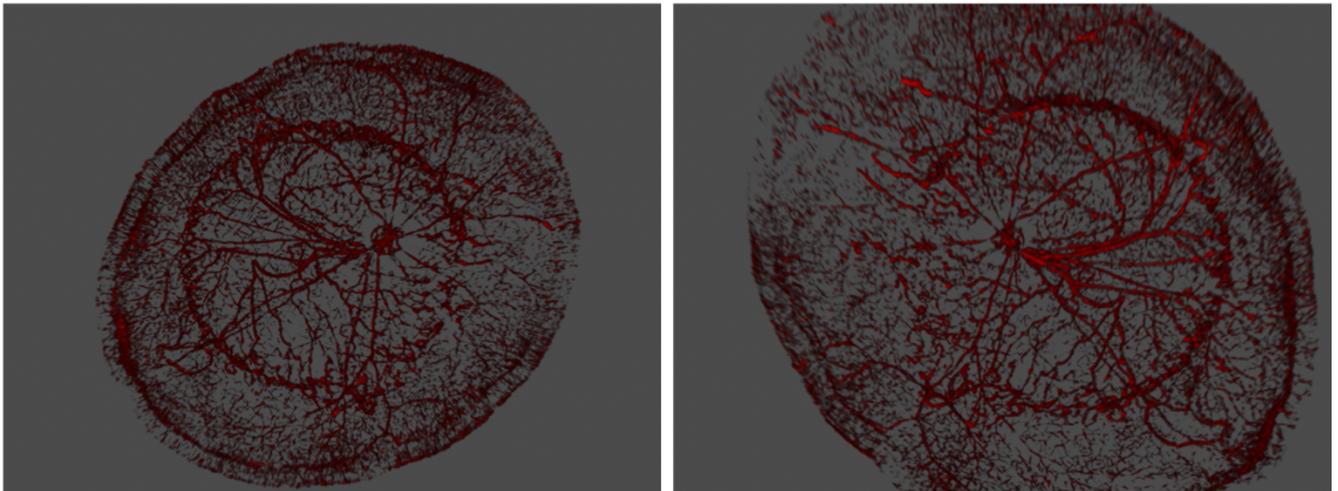


**Figure 19** Comparaison en 2D de l'imagerie par microscopy confocal et light-sheet (Grossissement 5X). Le temps d'aquisition pour la mircroscopie confoczl est de 23 minutes et le temps dacquisition pour le light-sheet est de 4 minutes. Le niveau de détail en profondeur semble plus optimal avec le lighsheet.

### IMARIS software reconstruction



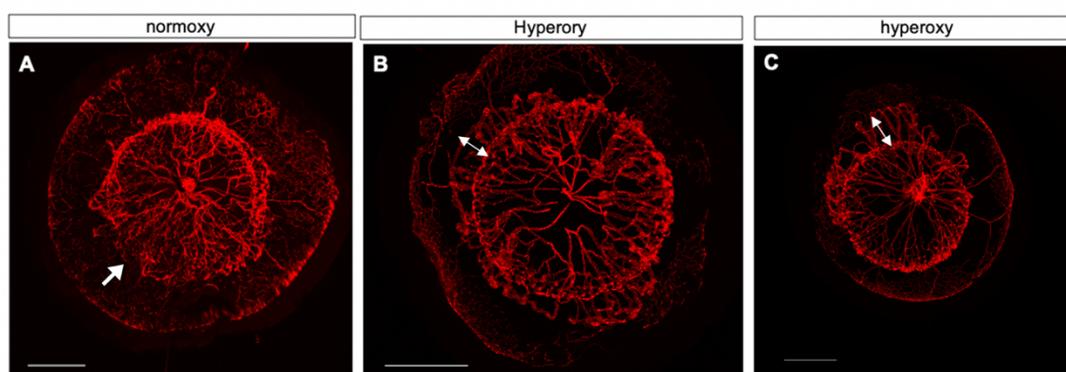
### Leica software reconstruction



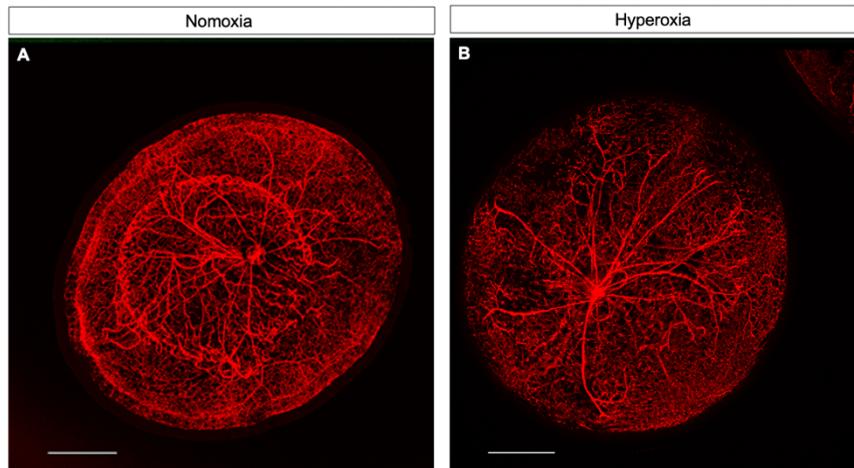
**Figure 20** Comparaison en 3D de la reconstruction a partir du logiciel Imaris et du logiciel Leica. Imaris nous permet de voir la rétine dans son intégralité avec un niveau de détails extrêmement précis. Le logiciel leica montre une reconstruction partielle du réseau vasculaire et la rétine n'est pas dans son intégralité.

### 6.2.2.2 Comparaison du développement vasculaire de l'œil chez des souris en hyperoxie vs normoxie

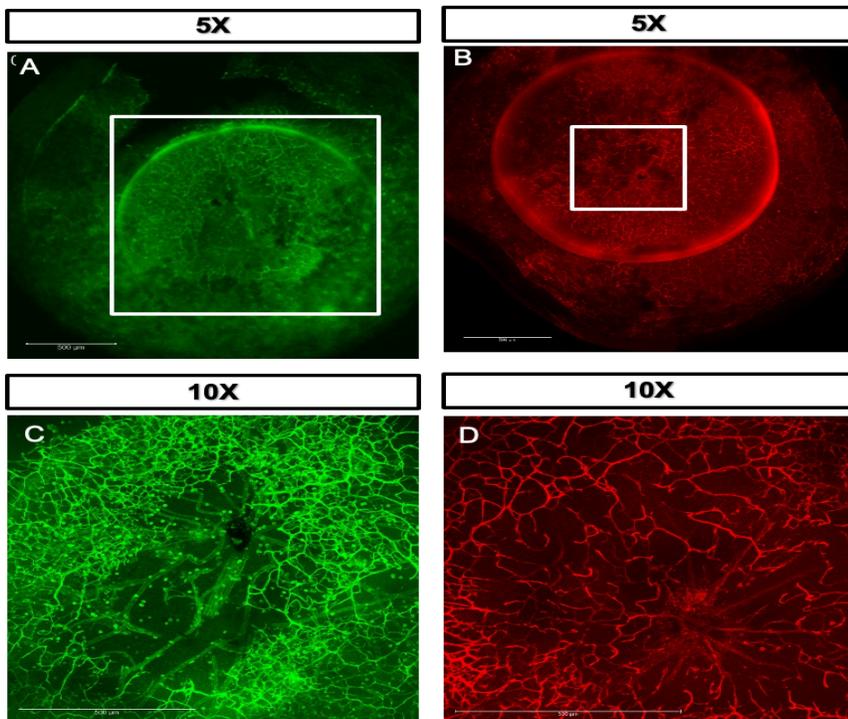
Les rétines ont été prélevées a P6 et P11 proviennent de deux groupes de souris. Les souris qui sont en normoxy c'est-à-dire laissez dans la concentration d'oxygène atmosphérique de 21% et les souris placées en hyperoxy de P1 a P6, elles sont dans un caisson a 75% d'oxygène. Chez les P6, un phénotype est clairement visible chez les hyperoxy ou il n'y a pas de dégradation des hyaloïdes et où ils envahissent la rétine (**Figure 4**). Chez les P11, le phénotype est moins distinct mais le réseaux hyaloïdes et rétinien semble avoir fusionné (**Figure 5**). Les anticorps IB4-488 et IB4-657 ont été testé sur les souris hyperoxyP11, cette fois ci nous avons réduit le temps de clarification a 30 min dans le but de moins endommagé les protéines. Les marquages fonctionnent et nous pouvons apercevoir les macrophages de la rétine.



**Figure 21** Comparison between P6 Cdh5-cre-tdtomato normoxia Vs hyperoxia. Prise par Microscopie confocale – Maximum intensity (A) Le réseau rétinien s'est formé homogènement et les artères hyaloïdes commence a se dégader (B ,C) Le reseau rétien est moins développé chez les hypéroxies et les hyaloïdes ne sont pas dégrader. Il s'entende même en dehors de son emplacement normale et envahis l'a rétine (flèche)



**Figure 22** Comparison between 11 Cdh5-cre-tdtomato normoxia Vs hyperoxia. Prise par Microscopie confocal – Maximum intensity (B) le réseau hyaloïde semble avoir fusionné avec le réseau rétinien si l'on compare au A il n'y a plus de distinction.



**Figure 23** Zoom sur la rétine marqué avec IB4- 488 (A, C) et IB4 – 647 (B, D). Lorsque le temps de clearing est réduit les anticrop fonctionne.

### **6.3. Discussion\conclusion**

Notre protocole permet de reconstituer l'ensemble de la rétine en 3D de la souris Cdh5-tdt. En effet, le Protocol de clarification permet au tissu de devenir complètement transparent en profondeur et la microscopie - permet de l'imager avec une haute résolution. Bien que IB4 semble fonctionné et donne des marquages bien visible en microscopie confocale, il faut tester une reconstruction avec IMARIS. De plus, d'anticorps vasculaire devrait être testés.

## Bibliographies

- “19.5 Development of the Heart – Anatomy and Physiology.” n.d. Accessed March 4, 2020. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/19-5-development-of-the-heart/>.
- “000664 - C57BL/6J.” n.d. Accessed March 6, 2020. <https://www.jax.org/strain/000664>.
- “006137 - B6.FVB-Tg(Cdh5-Cre)7Mlia/J.” n.d. Accessed May 22, 2020. <https://www.jax.org/strain/006137>.
- “007914 - B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<tm14(CAG-TdTomato)Hze>/J.” n.d. Accessed February 28, 2020. <https://www.jax.org/strain/007914>.
- “013731 - STOCK Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle>/J.” n.d. Accessed January 31, 2020. <https://www.jax.org/strain/013731>.
- “A Transgenic TdTomato Rat for Cell Migration and Tissue Engineering Applications.” n.d. Accessed January 31, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946766/>.
- Acharya, Asha, Seung Tae Baek, Serena Banfi, Banu Eskiocak, and Michelle D. Tallquist. 2011. “Efficient Inducible Cre-Mediated Recombination in Tcf21 Cell Lineages in the Heart and Kidney.” *Genesis (New York, N.y. : 2000)* 49 (11): 870–77. <https://doi.org/10.1002/dvg.20750>.
- Aikawa, Elena, Peter Whittaker, Mark Farber, Karen Mendelson, Robert F. Padera, Masanori Aikawa, and Frederick J. Schoen. 2006. “Human Semilunar Cardiac Valve Remodeling by Activated Cells from Fetus to Adult: Implications for Postnatal Adaptation, Pathology, and Tissue Engineering.” *Circulation* 113 (10): 1344–52. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.591768>.
- Azhar, Mohamad, Kristen Brown, Connie Gard, Hwudaurw Chen, Sudarsan Rajan, David A. Elliott, Mark V. Stevens, Todd D. Camenisch, Simon J. Conway, and Thomas Doetschman. 2011. “Transforming Growth Factor Beta2 Is Required for Valve Remodeling during Heart Development.” *Developmental Dynamics* 240 (9): 2127–41. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22702>.
- Babinet, C., and M. Cohen-Tannoudji. 2000. “Vingt ans d’interventions délibérées sur le génome de la souris : une révolution dans l’approche génétique de la biologie des mammifères.” *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974], 2000, Vol. 16, N° 1; p.31-42*. <https://doi.org/10.4267/10608/1499>.
- Binder, Marley J., Scott McCoombe, Elizabeth D. Williams, Daniel R. McCulloch, and Alister C. Ward. 2017. “The Extracellular Matrix in Cancer Progression: Role of Hyaluronan Proteoglycans and ADAMTS Enzymes.” *Cancer Letters* 385: 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.001>.
- Braga, Vania. 2016. “Spatial Integration of E-Cadherin Adhesion, Signalling and the Epithelial Cytoskeleton.” *Current Opinion in Cell Biology* 42: 138–45. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.07.006>.
- Brocker, Chad N, Vasilis Vasiliou, and Daniel W Nebert. 2009. “Evolutionary Divergence and Functions of the ADAM and ADAMTS Gene Families.” *Human Genomics* 4 (1): 43–55. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-1-43>.
- Butcher Jonathan T., Tressel Sarah, Johnson Tiffany, Turner Debi, Sorescu George, Jo Hanjoong, and Nerem Robert M. 2006. “Transcriptional Profiles of Valvular and Vascular Endothelial Cells Reveal Phenotypic Differences.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (1): 69–77. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000196624.70507.0d>.

Camenisch, Todd D., Raymond B. Runyan, and Roger R. Markwald. 2010. "Chapter 6.1 - Molecular Regulation of Cushion Morphogenesis." In *Heart Development and Regeneration*, edited by Nadia Rosenthal and Richard P. Harvey, 363–87. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381332-9.00018-9>.

Carmona, R., M. González-Iriarte, D. Macías, J. M. Pérez-Pomares, L. García-Garrido, and R. Muñoz-Chápuli. 2000. "Immunolocalization of the Transcription Factor Slug in the Developing Avian Heart." *Anatomy and Embryology* 201 (2): 103–9. <https://doi.org/10.1007/pl00008230>.

Carradori, Dario, Kristell Barreau, and Joël Eyer. 2016. "The Carbocyanine Dye DiD Labels in Vitro and in Vivo Neural Stem Cells of the Subventricular Zone as Well as Myelinated Structures Following in Vivo Injection in the Lateral Ventricle." *Journal of Neuroscience Research* 94 (2): 139–48. <https://doi.org/10.1002/jnr.23694>.

Chatterjee, Krishnendu, Feby Wijaya Pratiwi, Frances Camille M. Wu, Peilin Chen, and Bi-Chang Chen. 2018. "Recent Progress in Light Sheet Microscopy for Biological Applications." *Applied Spectroscopy* 72 (8): 1137–69. <https://doi.org/10.1177/0003702818778851>.

Conway, Simon J., Thomas Doetschman, and Mohamad Azhar. 2011. "The Inter-Relationship of Periostin, TGF Beta, and BMP in Heart Valve Development and Valvular Heart Diseases." *TheScientificWorldJournal* 11 (July): 1509–24. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.132>.

Cousin, Hélène. 2019. "Spemann-Mangold Grafts." *Cold Spring Harbor Protocols* 2019 (2). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot097345>.

Crabtree, Gerald R., and Eric N. Olson. 2002. "NFAT Signaling: Choreographing the Social Lives of Cells." *Cell* 109 Suppl (April): S67-79. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00699-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00699-2).

Das, Atze T., Liliane Tenenbaum, and Ben Berkhout. 2016. "Tet-On Systems For Doxycycline-Inducible Gene Expression." *Current Gene Therapy* 16 (3): 156–67. <https://doi.org/10.2174/1566523216666160524144041>.

Davis, Jennifer, Marjorie Maillet, Joseph M. Miano, and Jeffery D. Molkentin. 2012. "Lost in Transgenesis: A User's Guide for Genetically Manipulating the Mouse in Cardiac Research." *Circulation Research* 111 (6): 761–77. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.262717>.

de Lange Frederik J., Moorman Antoon F.M., Anderson Robert H., Männer Jörg, Soufan Alexandre T., Vries Corrie de Gier-de, Schneider Michael D., Webb Sandra, van den Hoff Maurice J.B., and Christoffels Vincent M. 2004. "Lineage and Morphogenetic Analysis of the Cardiac Valves." *Circulation Research* 95 (6): 645–54. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000141429.13560.cb>.

"Difference Between Transfection and Transduction." n.d. Compare the Difference Between Similar Terms. Accessed December 9, 2019. <https://www.differencebetween.com/difference-between-transfection-and-vs-transduction/>.

Dor, Y., T. D. Camenisch, A. Itin, G. I. Fishman, J. A. McDonald, P. Carmeliet, and E. Keshet. 2001. "A Novel Role for VEGF in Endocardial Cushion Formation and Its Potential Contribution to Congenital Heart Defects." *Development (Cambridge, England)* 128 (9): 1531–38.

Dubail, Johanne, and Suneel S. Apte. 2015. "Insights on ADAMTS Proteases and ADAMTS-like Proteins from Mammalian Genetics." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 44–46 (July): 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.001>.

"Endothelial-Specific Cre Mouse Models | Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology." n.d. Accessed January 20, 2020.

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.118.309669>.

Fava, Marika, Javier Barallobre-Barreiro, Ursula Mayr, Ruifang Lu, Athanasios Didangelos, Ferheen Baig, Marc Lynch, et al. 2018. "Role of ADAMTS-5 in Aortic Dilatation and Extracellular Matrix Remodeling." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 (7): 1537–48. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310562>.

Feil, R., J. Wagner, D. Metzger, and P. Chambon. 1997. "Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237 (3): 752–57. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7124>.

Ferrara, Napoleone, Hans-Peter Gerber, and Jennifer LeCouter. 2003. "The Biology of VEGF and Its Receptors." *Nature Medicine* 9 (6): 669–76. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>.

Gao, Xue, and Pumin Zhang. 2007. "Transgenic RNA Interference in Mice." *Physiology (Bethesda, Md.)* 22 (June): 161–66. <https://doi.org/10.1152/physiol.00002.2007>.

Garside, Victoria C., Alex C. Chang, Aly Karsan, and Pamela A. Hoodless. 2013. "Co-Ordinating Notch, BMP, and TGF $\beta$  Signalling During Heart Valve Development." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 70 (16): 2899–2917. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1197-9>.

"Gfp Green Fluorescent Protein [Neisseria Gonorrhoeae] - Gene - NCBI." n.d. Accessed January 30, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7011691>.

"Guide des souris les plus utilisées au laboratoire." n.d. Recherche animale. Accessed October 9, 2019. <https://www.recherche-animale.org/guide-des-souris-les-plus-utilisees-au-laboratoire>.

Harvey, Richard P. 2002. "Patterning the Vertebrate Heart." *Nature Reviews. Genetics* 3 (7): 544–56. <https://doi.org/10.1038/nrg843>.

"Heart Anatomy | Anatomy and Physiology." n.d. Accessed March 5, 2020. <https://courses.lumenlearning.com/nemcc-ap/chapter/heart-anatomy/>.

Hickman-Davis, Judy M., and Ian C. Davis. 2006. "Transgenic Mice." *Paediatric Respiratory Reviews* 7 (1): 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2005.09.005>.

Hinton, Robert B., Joy Lincoln, Gail H. Deutsch, Hanna Osinska, Peter B. Manning, D. Woodrow Benson, and Katherine E. Yutzey. 2006. "Extracellular Matrix Remodeling and Organization in Developing and Diseased Aortic Valves." *Circulation Research* 98 (11): 1431–38. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000224114.65109.4e>.

Hinton, Robert B., and Katherine E. Yutzey. 2011. "Heart Valve Structure and Function in Development and Disease." *Annual Review of Physiology* 73: 29–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142145>.

Hurle, J. M., E. Colveé, and A. M. Blanco. 1980. "Development of Mouse Semilunar Valves." *Anatomy and Embryology* 160 (1): 83–91. <https://doi.org/10.1007/bf00315651>.

Huxley-Jones, Julie, Suneel S. Apte, David L. Robertson, and Raymond P. Boot-Handford. 2005. "The Characterisation of Six ADAMTS Proteases in the Basal Chordate *Ciona Intestinalis* Provides New Insights into the Vertebrate ADAMTS Family." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (9): 1838–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.03.009>.

Huxley-Jones, Julie, Toni-Kim Clarke, Christine Beck, George Toubaris, David L. Robertson, and Raymond P. Boot-Handford. 2007. "The Evolution of the Vertebrate Metzincins; Insights from *Ciona Intestinalis* and *Danio Rerio*." *BMC Evolutionary Biology* 7 (April): 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-63>.

Inui, Masafumi, Mami Miyado, Maki Igarashi, Moe Tamano, Atsushi Kubo, Satoshi

Yamashita, Hiroshi Asahara, Maki Fukami, and Shuji Takada. 2014. “Rapid Generation of Mouse Models with Defined Point Mutations by the CRISPR/Cas9 System.” *Scientific Reports* 4 (June). <https://doi.org/10.1038/srep05396>.

Ittner, Lars M., and Jürgen Götz. 2007. “Pronuclear Injection for the Production of Transgenic Mice.” *Nature Protocols* 2 (5): 1206–15. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.145>.

Kelwick, Richard, Ines Desanlis, Grant N. Wheeler, and Dylan R. Edwards. 2015. “The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) Family.” *Genome Biology* 16 (May): 113. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0676-3>.

Kennedy, Alan, Dewar D. Finlay, Daniel Guldenring, Raymond Bond, Kieran Moran, and James McLaughlin. 2016. “The Cardiac Conduction System: Generation and Conduction of the Cardiac Impulse.” *Critical Care Nursing Clinics of North America* 28 (3): 269–79. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2016.04.001>.

Koo, Bon-Hun, Carine Le Goff, Katherine A. Jungers, Amit Vasanthi, John O’Flaherty, Crystal M. Weyman, and Suneel S. Apte. 2007. “ADAMTS-like 2 (ADAMTSL2) Is a Secreted Glycoprotein That Is Widely Expressed during Mouse Embryogenesis and Is Regulated during Skeletal Myogenesis.” *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 26 (6): 431–41. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.03.003>.

Kovacic, Jason C., Stefanie Dimmeler, Richard P. Harvey, Toren Finkel, Elena Aikawa, Guido Krenning, and Andrew H. Baker. 2019. “Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review.” *Journal of the American College of Cardiology* 73 (2): 190–209. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.09.089>.

Lee, Nathan V., Makoto Sato, Douglas S. Annis, Joseph A. Loo, Lily Wu, Deane F. Mosher, and M. Luisa Iruela-Arispe. 2006. “ADAMTS1 Mediates the Release of Antiangiogenic Polypeptides from TSP1 and 2.” *The EMBO Journal* 25 (22): 5270–83. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601400>.

Lin, Chien-Jung, Chieh-Yu Lin, Chen-Hao Chen, Bin Zhou, and Ching-Pin Chang. 2012. “Partitioning the Heart: Mechanisms of Cardiac Septation and Valve Development.” *Development (Cambridge, England)* 139 (18): 3277–99. <https://doi.org/10.1242/dev.063495>.

Lindsley, Andrew, Paige Snider, Hongming Zhou, Rhonda Rogers, Jian Wang, Michael Olaopa, Agnieszka Kruzynska-Frejtag, et al. 2007. “Identification and Characterization of a Novel Schwann and Outflow Tract Endocardial Cushion Lineage-Restricted Periostin Enhancer.” *Developmental Biology* 307 (2): 340–55. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.04.041>.

Liu, Y.-J., Y. Xu, and Q. Yu. 2006. “Full-Length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 Fragments Display pro- and Antimetastatic Activity, Respectively.” *Oncogene* 25 (17): 2452–67. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209287>.

Lu, Hengyun, Francesca Giordano, and Zemin Ning. 2016. “Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly.” *Genomics, Proteomics & Bioinformatics, SI: Big Data and Precision Medicine*, 14 (5): 265–79. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>.

Luque, Alfonso, Darren R. Carpizo, and M. Luisa Iruela-Arispe. 2003. “ADAMTS1/METH1 Inhibits Endothelial Cell Proliferation by Direct Binding and Sequestration of VEGF165.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23656–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212964200>.

Luxán, Guillermo, Gaetano D’Amato, and José Luis de la Pompa. 2016. “Intercellular Signaling in Cardiac Development and Disease: The NOTCH Pathway.” In *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease: From Gene Function and Cellular Interaction to*

*Morphology*, edited by Toshio Nakanishi, Roger R. Markwald, H. Scott Baldwin, Bradley B. Keller, Deepak Srivastava, and Hiroyuki Yamagishi. Tokyo: Springer.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500293/>.

Lyons, K. M., R. W. Pelton, and B. L. Hogan. 1990. "Organogenesis and Pattern Formation in the Mouse: RNA Distribution Patterns Suggest a Role for Bone Morphogenetic Protein-2A (BMP-2A)." *Development (Cambridge, England)* 109 (4): 833–44.

MacDonald, Bryan T., Keiko Tamai, and Xi He. 2009. "Wnt/Beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases." *Developmental Cell* 17 (1): 9–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>.

Mahaut Smith, Martyn P., Richard J. Evans, and Catherine Vial. 2019. "Development of a P2X1-EYFP Receptor Knock-in Mouse to Track Receptors in Real Time." *Purinergic Signalling* 15 (3): 397–402. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09666-1>.

Marvin, M. J., G. Di Rocco, A. Gardiner, S. M. Bush, and A. B. Lassar. 2001. "Inhibition of Wnt Activity Induces Heart Formation from Posterior Mesoderm." *Genes & Development* 15 (3): 316–27. <https://doi.org/10.1101/gad.855501>.

McDonald, John A., and Todd D. Camenisch. 2002. "Hyaluronan: Genetic Insights into the Complex Biology of a Simple Polysaccharide." *Glycoconjugate Journal* 19 (4–5): 331–39. <https://doi.org/10.1023/A:1025369004783>.

Menon, Vinal, John F. Eberth, Richard L. Goodwin, and Jay D. Potts. 2015. "Altered Hemodynamics in the Embryonic Heart Affects Outflow Valve Development." *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 2 (2): 108–24.  
<https://doi.org/10.3390/jcdd2020108>.

Nakada, Mitsutoshi, Hisashi Miyamori, Daisuke Kita, Tomoya Takahashi, Junkoh Yamashita, Hiroshi Sato, Ryu Miura, Yu Yamaguchi, and Yasunori Okada. 2005. "Human Glioblastomas Overexpress ADAMTS-5 That Degrades Brevican." *Acta Neuropathologica* 110 (3): 239–46. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-1032-6>.

"Nanopore Community." n.d. Oxford Nanopore Technologies. Accessed May 21, 2020. <http://nanoporetech.com/community>.

"Nfatc1 Directs the Endocardial Progenitor Cells to Make Heart Valve Primordium." n.d. Accessed January 21, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3766465/#R37>.

"Nucleolin Modulates Compartmentalization and Dynamics of Histone 2B-ECFP in the Nucleolus." n.d. Accessed January 31, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6165600/>.

"Oxidative Stress in Cardiac Valve Development | SpringerLink." n.d. Accessed March 6, 2020. [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4899-7693-2\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4899-7693-2_1).

Patten, B. M., T. C. Kramer, and A. Barry. 1948. "Valvular Action in the Embryonic Chick Heart by Localized Apposition of Endocardial Masses." *The Anatomical Record* 102 (3): 299–311. <https://doi.org/10.1002/ar.1091020305>.

"Pronucleus." n.d. Vulgaris Médical. Accessed November 10, 2019. <https://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/pronucleus>.

Ran, F. Ann, Patrick D. Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A. Scott, and Feng Zhang. 2013. "Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System." *Nature Protocols* 8 (11): 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.

Ranger, A. M., M. J. Grusby, M. R. Hodge, E. M. Gravallesse, F. C. de la Brousse, T. Hoey, C. Mickanin, H. S. Baldwin, and L. H. Glimcher. 1998. "The Transcription Factor NF-ATc Is Essential for Cardiac Valve Formation." *Nature* 392 (6672): 186–90.

<https://doi.org/10.1038/32426>.

Ravikanth, Manyam, P Soujanya, K Manjunath, TR Saraswathi, and CR Ramachandran. 2011. "Heterogeneity of Fibroblasts." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP* 15 (2): 247–50. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.84516>.

Renninger, Sabine L., Helia B. Schonhaler, Stephan C. F. Neuhauss, and Ralf Dahm. 2011. "Investigating the Genetics of Visual Processing, Function and Behaviour in Zebrafish." *Neurogenetics* 12 (2): 97–116. <https://doi.org/10.1007/s10048-011-0273-x>.

Rosenquist, T. H., M. L. Kirby, and L. H. van Mierop. 1989. "Solitary Aortic Arch Artery. A Result of Surgical Ablation of Cardiac Neural Crest and Nodose Placode in the Avian Embryo." *Circulation* 80 (5): 1469–75. <https://doi.org/10.1161/01.cir.80.5.1469>.

Russell, Darryl L., Hannah M. Brown, and Kylie R. Dunning. 2015. "ADAMTS Proteases in Fertility." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 44–46 (July): 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.007>.

Schoen, Frederick J. 2008. "Evolving Concepts of Cardiac Valve Dynamics: The Continuum of Development, Functional Structure, Pathobiology, and Tissue Engineering." *Circulation* 118 (18): 1864–80. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805911>.

Schroeder, Joyce A., Leslie F. Jackson, David C. Lee, and Todd D. Camenisch. 2003. "Form and Function of Developing Heart Valves: Coordination by Extracellular Matrix and Growth Factor Signaling." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 81 (7): 392–403. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0456-5>.

Snarr, Brian S., Christine B. Kern, and Andy Wessels. 2008. "Origin and Fate of Cardiac Mesenchyme." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237 (10): 2804–19. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21725>.

Stankunas, Kryn, Gene K. Ma, Frank J. Kuhnert, Calvin J. Kuo, and Ching-Pin Chang. 2010. "VEGF Signaling Has Distinct Spatiotemporal Roles During Heart Valve Development." *Developmental Biology* 347 (2): 325–36. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.08.030>.

Susaki, Etsuo A., Kazuki Tainaka, Dimitri Perrin, Hiroko Yukinaga, Akihiro Kuno, and Hiroki R. Ueda. 2015. "Advanced CUBIC Protocols for Whole-Brain and Whole-Body Clearing and Imaging." *Nature Protocols* 10 (11): 1709–27. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.085>.

Swonger, Jessica M., Jocelyn S. Liu, Malina J. Ivey, and Michelle D. Tallquist. 2016a. "Genetic Tools for Identifying and Manipulating Fibroblasts in the Mouse." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 92 (3): 66–83. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.05.009>.

———. 2016b. "Genetic Tools for Identifying and Manipulating Fibroblasts in the Mouse." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 92 (3): 66–83. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.05.009>.

Takase, M., T. Imamura, T. K. Sampath, K. Takeda, H. Ichijo, K. Miyazono, and M. Kawabata. 1998. "Induction of Smad6 mRNA by Bone Morphogenetic Proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244 (1): 26–29. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8200>.

Tao, Ge, James D. Kotick, and Joy Lincoln. 2012. "Chapter Seven - Heart Valve Development, Maintenance, and Disease: The Role of Endothelial Cells." In *Current Topics in Developmental Biology*, edited by Benoit G. Bruneau, 100:203–32. Heart Development. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387786-4.00006-3>.

Tarkowski, A. K. 1998. "Mouse Chimaeras Revisited: Recollections and Reflections." *The International Journal of Developmental Biology* 42 (7): 903–8.

“The Heart Wall - TeachMeAnatomy.” n.d. Accessed March 5, 2020. <https://teachmeanatomy.info/thorax/organs/heart/heart-wall/>.

Timmerman, Luika A., Joaquín Grego-Bessa, Angel Raya, Esther Bertrán, José María Pérez-Pomares, Juan Díez, Sergi Aranda, et al. 2004. “Notch Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition during Cardiac Development and Oncogenic Transformation.” *Genes & Development* 18 (1): 99–115. <https://doi.org/10.1101/gad.276304>.

“Transcription Factors of the NFAT Family: Regulation and Function. - PubMed - NCBI.” n.d. Accessed January 21, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143705>.

Vega, Rick B., John Yang, Beverly A. Rothermel, Rhonda Bassel-Duby, and R. Sanders Williams. 2002. “Multiple Domains of MCIP1 Contribute to Inhibition of Calcineurin Activity.” *The Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 30401–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200123200>.

Wang, Zhongxiao, Chi-Hsiu Liu, Shuo Huang, and Jing Chen. 2019. “Assessment and Characterization of Hyaloid Vessels in Mice.” *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 147 (15). <https://doi.org/10.3791/59222>.

Weissman, Tamily A., and Y. Albert Pan. 2015. “Brainbow: New Resources and Emerging Biological Applications for Multicolor Genetic Labeling and Analysis.” *Genetics* 199 (2): 293–306. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.172510>.

Wessels, Andy, Maurice J. B. van den Hoff, Richard F. Adamo, Aimee L. Phelps, Marie M. Lockhart, Kimberly Sauls, Laura E. Briggs, et al. 2012. “Epicardially Derived Fibroblasts Preferentially Contribute to the Parietal Leaflets of the Atrioventricular Valves in the Murine Heart.” *Developmental Biology* 366 (2): 111–24. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.04.020>.

Westin, J., and M. Lardelli. 1997. “Three Novel Notch Genes in Zebrafish: Implications for Vertebrate Notch Gene Evolution and Function.” *Development Genes and Evolution* 207 (1): 51–63. <https://doi.org/10.1007/s004270050091>.

Whitman, C. O. 1886. “Memoirs: The Leeches of Japan.” *Journal of Cell Science* s2-26 (103): 317–416.

———. 1887. “A Contribution to the History of the Germ-Layers in Clepsine.” *Journal of Morphology* 1 (1): 105–82. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050010107>.

“Why Use the Mouse in Research?” n.d. Yourgenome. Accessed October 10, 2019. [/facts/why-use-the-mouse-in-research](https://facts/why-use-the-mouse-in-research).

Wünnemann, Florian, Asaf Ta-Shma, Christoph Preuss, Severine Leclerc, Patrick Piet van Vliet, Andrea Oneglia, Maryse Thibeault, et al. 2020. “Loss of ADAMTS19 Causes Progressive Non-Syndromic Heart Valve Disease.” *Nature Genetics* 52 (1): 40–47. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0536-2>.

Yanai, Hirotsugu, Toshihiro Tanaka, and Hiroo Ueno. 2013. “Multicolor Lineage Tracing Methods and Intestinal Tumors.” *Journal of Gastroenterology* 48 (4): 423–33. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0736-3>.

Zhao, Shuang, Enze Jiang, Shuangshuang Chen, Yuan Gu, Anna Junjie Shangguan, Tangfeng Lv, Ligu Luo, and Zhenghong Yu. 2016. “PiggyBac Transposon Vectors: The Tools of the Human Gene Encoding.” *Translational Lung Cancer Research* 5 (1): 120–25. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.05>.

Zhong, Sheng, and Raouf A. Khalil. 2019. “A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with Thrombospondin Motifs (ADAMTS) Family in Vascular Biology and Disease.” *Biochemical Pharmacology* 164 (June): 188–204. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.03.033>.

Zhou, Bin, Alexander von Gise, Qing Ma, Yong Wu Hu, and William T. Pu. 2010. “Genetic

Fate Mapping Demonstrates Contribution of Epicardium-Derived Cells to the Annulus Fibrosis of the Mammalian Heart.” *Developmental Biology* 338 (2): 251. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.007>.

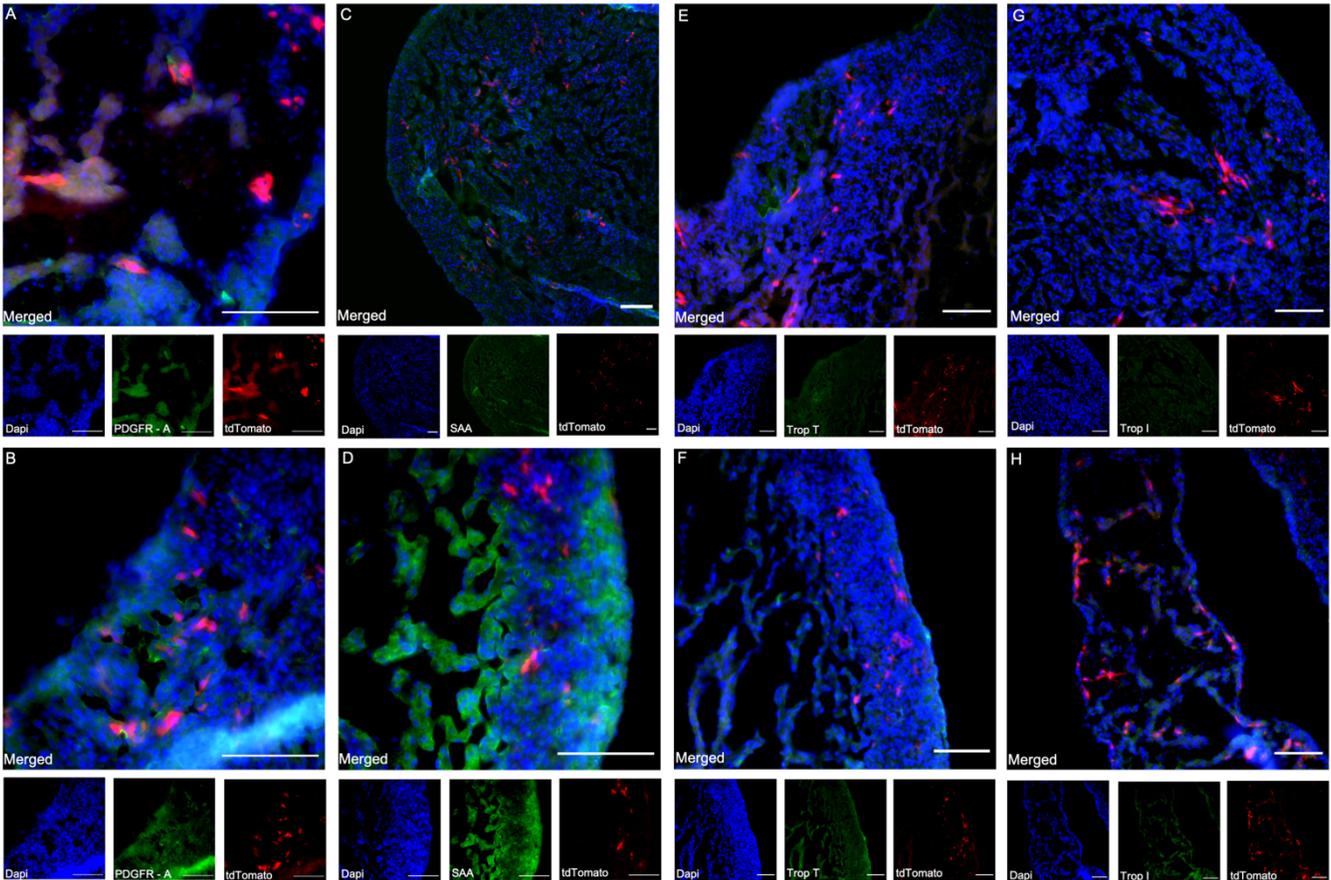
Zhou, Pingzhu, and William T. Pu. 2016. “Recounting Cardiac Cellular Composition.” *Circulation Research* 118 (3): 368–70. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308139>.

# Chapitre VII Données Supplémentaires

Croisement d'expérience lignée 3344

|                        |                 |             |                    | Total = 22 expériences  |                      |              |
|------------------------|-----------------|-------------|--------------------|-------------------------|----------------------|--------------|
| Generation             | Souris ADAMTS19 | Stade       | Dose               | Patron d'expression     | Embryon positif      |              |
| F0                     | 3344            | E13,5-E16,5 |                    |                         | non gestante         |              |
|                        |                 | E13,5-E16,5 | 3,6X               |                         | 0/2                  |              |
|                        |                 | E13,5-P1    | 4X                 | Ventricule + oreillette | 6/10                 |              |
|                        |                 | E13,5-P1    | 4X                 |                         | nouveaux nés décédés |              |
| F1                     | 4841            | E13,5-E16,5 |                    |                         | non gestante         |              |
|                        |                 | E13,5-E16,5 | 3X                 | Ventricule + oreillette | 5/8                  |              |
|                        |                 | E13,5-E16,5 |                    |                         | non gestante         |              |
|                        |                 | E13,5-E16,5 | 3X                 | Ventricule + oreillette | 7/8                  |              |
|                        |                 | E13,5-E16,5 | 3X                 | Ventricule + oreillette | 3/9                  |              |
|                        |                 | E11,5-E16,5 | 3X                 | Ventricule + oreillette | 1/10                 |              |
|                        |                 | E11,5-E16,5 | 3X                 |                         | non gestante         |              |
|                        |                 | E11,5-E16,5 | 3X                 | Ventricule + oreillette | 4/9                  |              |
|                        |                 | E11,5-E16,5 | 3X                 | Ventricule + oreillette | 3/9                  |              |
|                        |                 | 4361        | E13,5-E16,5        | 3X                      |                      | 0/4          |
|                        |                 |             | E13,5-E16,5        | 3X                      |                      | 0/9          |
| E13,5-E16,5            | 3X              |             |                    | abortion                |                      |              |
| F2                     | 7342            | E13,5-E16,5 | 3X                 | Ventricule + oreillette | 4/10                 |              |
|                        |                 | E13,5-E16,5 | 3X                 |                         | 4/10                 |              |
|                        |                 | E11,5-E16,5 |                    |                         | non gestante         |              |
|                        |                 | E9,5-16,5   | 3X                 |                         | non gestante         |              |
|                        |                 | 7246        | E9,5-16,5          | 3X                      |                      | non gestante |
| E9,5-16,5              | 3X              |             |                    | abortion                |                      |              |
| <b>Ratio Mendélien</b> |                 |             |                    |                         |                      |              |
| Statut experience      | Porportion      | pourcentage | Embryons resultats | Pourcentage %           | Moyenne              |              |
| non gestante           | 7/22            | 31,82       | 6/10               | 60,00                   | Moyenne positif %    |              |
| abortion/ décédé       | 3/22            | 13,64       | 5/8                | 62,50                   | 47,30                |              |
| Embryon positif        | 9/22            | 40,91       | 7/8                | 87,50                   | Moyenne negatif %    |              |
| Embryon negatif        | 3/22            | 13,64       | 3/9                | 33,33                   | 0,00                 |              |
|                        |                 |             | 1/10               | 10,00                   | Moyenne Total %      |              |
|                        |                 |             | 4/9                | 44,44                   | 33,11                |              |
|                        |                 |             | 3/9                | 33,33                   | Moyenne attendu %    |              |
|                        |                 |             | 0/4                | 0,00                    | 50,00                |              |
|                        |                 |             | 0/9                | 0,00                    |                      |              |
|                        |                 |             | 0/2                | 0,00                    |                      |              |

*Figure supplémentaire 1* État de la lignée 1 : Reproduction et ratio mendélien. Chaque expérience représente un accouplement, un gavage durant le développement valvulaire, le sacrifice de la mère, l'extraction des embryons, l'extraction des cœurs des embryons, l'analyse des cœurs entier suivit de la coupe gelée, et d'analyse histologique quelques jours plus tard.



**Figure supplémentaire 2.** Test des anticorps visant à déterminer si les cellules illuminées sont des cardiomyocytes ou des fibroblastes. PDGFR-A s (A, B) est utilisé pour le marquage des fibroblastes et Troponine T (E,F), Troponine I (G,H) et SAA – Alpha Actin Sarcomeric (C,D) servent à marquer les cardiomyocytes.

| Croisement d'expérience lignée 3339 |                 |             |      | Total = 4 expériences |                 |
|-------------------------------------|-----------------|-------------|------|-----------------------|-----------------|
| Generation                          | Souris ADAMTS19 | Stade       | Dose | Patron d'expression   | Embryon positif |
| F0                                  | 3339            | E13,5-E16,5 | 4X   | Valve                 | 1/9             |
|                                     |                 | E13,5-E16,5 | 4X   | Valve                 | 2/9             |
|                                     |                 | E13,5-E16,5 | 4X   | X                     | non gestante    |

*Figure supplémentaire 2* État de la lignée 2 : Reproduction

Croisement d'expérience lignée 3341

|                        |                 |               |                    | Total = 23 expériences    |                   |
|------------------------|-----------------|---------------|--------------------|---------------------------|-------------------|
| Generation             | Souris ADAMTS19 | Stade         | Dose               | Patron d'expression       | Embryon positif   |
| F1                     | 3339            | E13,5-P1      |                    |                           | non gestante      |
|                        |                 | E12,5-15,5    | 2,5X               | Valve + Artère pulmonaire | 1/9               |
|                        |                 | E13,5 - E16,5 | 4X                 | Valve + Artère pulmonaire | 4/9               |
| F2                     | 4310            | E13,5-E16,5   |                    |                           | non gestante      |
|                        |                 | E13,5-E16,5   | 4X                 |                           | 0/9               |
|                        |                 | E13,5-E16,5   | 4X                 | Artère pulmonaire         | 1/6               |
|                        |                 | E13,5-E16,5   | 4X                 | Artère pulmonaire         | 4/6               |
|                        |                 | E11,5-E16,5   | 4X                 |                           | abortion          |
|                        |                 | E11,5-E16,5   | 4X                 |                           | 4/9               |
|                        |                 | E9,5-E16,5    | 4X                 |                           | non gestante      |
|                        |                 | E9,5-E16,5    | 4X                 |                           | non gestante      |
|                        |                 | E13,5-E16,5   | 4X                 |                           | non gestante      |
|                        |                 | E13,5-E16,5   | 4X                 | Artère pulmonaire         | 4/8               |
|                        |                 | E11,5-E16,5   | 4X                 |                           | 2/4               |
|                        |                 | E9,5-E16,5    | 4X                 |                           | abortion          |
| F2                     | 4309            | E9,5-E16,5    | 4X                 |                           | abortion          |
|                        |                 | E13,5-E16,5   | 4X                 |                           | non gestante      |
|                        |                 | E13,5-E16,5   | 4X                 | Artère pulmonaire         | 4/8               |
|                        |                 | E11,5-E16,5   | 4X                 |                           | 2/4               |
|                        |                 | E9,5-E16,5    | 4X                 |                           | abortion          |
|                        |                 | E9,5-E16,5    | 4X                 |                           | abortion          |
| F2                     | 4307            | E13,5-E16,5   | 3X                 |                           | non gestante      |
|                        |                 | E13,5-E16,5   | 3X                 | Artère pulmonaire         | 4/9               |
|                        |                 | E13,5-E16,5   | 3X                 |                           | non gestante      |
| F3                     | 7291            | E9,5-E16,5    | 3X                 |                           | non gestante      |
|                        |                 | E9,5-E16,5    | 3X                 |                           | 0/7               |
|                        |                 | E9,5-E16,5    | 3X                 |                           | 4/12              |
|                        |                 | E11,5-E16,5   | 3X                 |                           | 1/3               |
|                        |                 | E11,5-E16,5   | 3X                 |                           | 3/7               |
| <b>Ratio Mendélien</b> |                 |               |                    |                           |                   |
| Statut experience      | Porportion      | pourcentage   | Embryons resultats | Pourcentage %             | Moyenne           |
| non gestante           | 7/23            | 30,43         | 1/9                | 11,11                     | Moyenne positif % |
| abortion/ décédé       | 3/23            | 13,04         | 4/9                | 44,44                     | 39,75             |
| Embryon positif        | 11/23           | 47,83         | 1/6                | 16,67                     | Moyenne negatif % |
| Embryon negatif        | 2/23            | 8,70          | 4/6                | 66,67                     | 0,00              |
|                        |                 |               | 4/9                | 44,44                     | Moyenne Total %   |
|                        |                 |               | 4/8                | 50,00                     | 33,64             |
|                        |                 |               | 2/4                | 50,00                     | Moyenne attendu % |
|                        |                 |               | 4/9                | 44,44                     | 50,00             |
|                        |                 |               | 4/12               | 33,33                     |                   |
|                        |                 |               | 1/3                | 33,33                     |                   |
|                        |                 |               | 3/7                | 42,86                     |                   |
|                        |                 |               | 0/7                | 0,00                      |                   |
|                        |                 |               | 0/9                | 0,00                      |                   |

Figure supplémentaire 3 État de la lignée 3 : Reproduction et ratio mendélien

Croisement d'expérience lignée 3877

|                   |                        |             |                    | Total = 53 expériences |                   |                      |              |
|-------------------|------------------------|-------------|--------------------|------------------------|-------------------|----------------------|--------------|
| Generation        | Souris ADAMTS19        | Stade       | Dose               | Patron d'expression    | Embryon positif   |                      |              |
| F0                | 3877                   | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | 0/8               |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | 0/3               |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 |                        | 0/8               |                      |              |
|                   |                        | E13,5-E16,5 | 3X                 | Valve                  | 2/9               |                      |              |
|                   |                        |             |                    | P1-P6                  | 3X                | nouveaux nés décédés |              |
|                   |                        | F1          | 6881               | E13,5-E16,5            |                   |                      | non gestante |
|                   |                        |             |                    | E13,5-E16,5            |                   |                      | non gestante |
| E13,5-E16,5       |                        |             |                    |                        | non gestante      |                      |              |
| E13,5-E16,5       | 2X                     |             |                    |                        | non gestante      |                      |              |
| E13,5-E16,5       | 2,5X                   |             |                    |                        | non gestante      |                      |              |
| E13,5-E16,5       | 2X                     |             |                    |                        | 0/9               |                      |              |
| E13,5-E16,5       | 3X                     |             |                    |                        | 0/8               |                      |              |
| E13,5-E16,5       | 4X                     |             |                    |                        | 0/4               |                      |              |
| 6882              | E13,5-E16,5            |             |                    | 4X                     |                   | 0/4                  |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             |                    | 3X                     |                   | non gestante         |              |
|                   | 6883                   |             |                    | E13,5-E16,5            | 3X                |                      | abortion     |
|                   |                        |             |                    | E13,5-E16,5            | 3X                |                      | non gestante |
| 6884              | E13,5-E16,5            |             |                    | 3X                     |                   | 0/1                  |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             |                    | 3X                     |                   | non gestante         |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             |                    | 3X                     |                   | non gestante         |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             |                    | 3X                     |                   | non gestante         |              |
| 6884              | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | abortion          |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
| 6865              | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   | 14,5-16,5              |             | 3X                 |                        | 1/7               |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 2X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
| 6598              | E13,5-E16,5            |             | 2X                 |                        | 0/8               |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 2X                 |                        | 0/9               |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | non gestante      |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 2,5X               |                        | non gestante      |                      |              |
| 7149              | E13,5-E16,5            |             |                    |                        | non gestante      |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | 0/8               |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | 0/6               |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            |             | 3X                 |                        | 0/6               |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          |                    | 0/8                    |                   |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          |                    | 0/9                    |                   |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          |                    | 0/7                    |                   |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          |                    | non gestante           |                   |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          |                    | non gestante           |                   |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          |                    | non gestante           |                   |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          |                    | non gestante           |                   |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          |                    | non gestante           |                   |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          |                    | non gestante           |                   |                      |              |
|                   | E13,5-E16,5            | 3X          | valve              | 2/8                    |                   |                      |              |
|                   | <b>Ratio Mendélien</b> |             |                    |                        |                   |                      |              |
| Statut expérience | Porportion             | pourcentage | Embryons resultats | Pourcentage %          | Moyenne           |                      |              |
| non gestante      | 31/53                  | 58,49       | 2/8                | 25,00                  | Moyenne positif % |                      |              |
| abortion/ décédé  | 3/53                   | 5,66        | 1/7                | 14,29                  | 8,79              |                      |              |
| Embryon positif   | 3/53                   | 5,66        | 2/9                | 22,22                  | Moyenne négatif % |                      |              |
| Embryon négatif   | 16/53                  | 30,19       | 0/8                | 0,00                   | 0,00              |                      |              |
|                   |                        |             | 0/3                | 0,00                   | Moyenne Total %   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/8                | 0,00                   | 6,15              |                      |              |
|                   |                        |             | 0/9                | 0,00                   | Moyenne attendu % |                      |              |
|                   |                        |             | 0/8                | 0,00                   | 50,00             |                      |              |
|                   |                        |             | 0/4                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/4                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/1                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/8                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/9                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/8                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/6                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/6                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/8                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/9                | 0,00                   |                   |                      |              |
|                   |                        |             | 0/7                | 0,00                   |                   |                      |              |

Figure supplémentaire 4 État de la lignée 4 : Reproduction et ratio mendélien

