

Le cœur : un programme unique de transcription et de différenciation musculaire

Les maladies cardiovasculaires demeurent la principale cause de mortalité en Europe et en Amérique du Nord, et la défaillance cardiaque est généralement la cause directe du décès. Élucider les mécanismes moléculaires qui contrôlent la fonction cardiaque est indispensable pour développer des traitements préventifs ou visant à corriger le dysfonctionnement cardiaque. Les facteurs de transcription contrôlant le programme génétique cardiaque, qui jouent probablement un rôle important dans la cardiogenèse, représentent des cibles potentielles d'intervention thérapeutique. Des mécanismes du contrôle de l'expression génétique distincts ont été mis à jour pour les gènes codant pour les peptides natriurétiques cardiaques de type A (ANP) et de type B (BNP), dans les différents compartiments cardiaques, et à des stades différents du développement du cœur. On a isolé de nouveaux facteurs de transcription propres au muscle cardiaque, dont la protéine GATA-4 qui appartient à la famille des facteurs de transcription GATA qui jouent un rôle clé dans l'hématopoïèse. L'implication de ces facteurs de transcription dans l'activation du programme génétique du muscle cardiaque ainsi que dans la différenciation cellulaire et la morphogenèse du cœur est l'objet de nombreuses études.

**Claudine Grépin
Daniel Durocher
Mona Nemer**

ADRESSE

C. Grépin : étudiante en doctorat. D. Durocher : étudiant en doctorat. M. Nemer : directrice de recherche. Laboratoire de développement et différenciation cardiaques, Institut de recherches cliniques de Montréal, 110, avenue des Pins-Ouest, Montréal QC Canada H2W 1R7.

Les malformations cardiaques congénitales représentent 25 % des anomalies congénitales et la défaillance cardiaque est l'une des plus importantes causes de mortalité dans les pays industrialisés. Malheureusement, la base moléculaire, incluant les gènes et les effecteurs intracellu-

laires impliqués dans le développement normal ou pathologique du cœur, demeure incertaine. Cette incertitude contraste avec les développements spectaculaires dans le domaine d'étude du muscle squelettique où l'analyse de la transcription propre à ce muscle a permis d'identifier toute une classe de fac-

RÉFÉRENCES

- Rosenquist GC. A radioautographic study of labeled grafts in the chick blastoderm. Development from primitive-streak stages to stage 12. *Carnegie Inst Wash Contrib Embryol* 1966 ; 38 : 71-110.
- DeHaan RL. Morphogenesis of the vertebrate heart. In : DeHaan RL, Ursprung H, eds. *Organogenesis*. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1965 : 377-420.
- Bodmer R. The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* 1993 ; 118 : 719-29.
- Satin J, Kyle JW, Fan Z, Rogart R, Fozzard HA, Makielski JC. Post-repolarization block of cloned sodium channels by saxitoxin: the contribution of pore-region amino acids. *Biophys J* 1994 ; 66 : 1353-63.
- Stainier DY, Fishman MC. Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of antero-posterior polarity. *Dev Biol* 1992 ; 153 : 91-101.
- Lyons GE. *In situ* analysis of the cardiac muscle gene program during embryogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 1994 ; 4 : 70-7.
- Johnson JE, Wold BJ, Haushchka SD. Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1989 ; 9 : 3393-9.
- Olson EN, Klein WH. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev* 1994 ; 8 : 1-8.
- Nemer M, Chamberland M, Sirois D, Argentin S, Drouin J, Dixon RA, Zivin RA, Condra JH. Gene structure of human cardiac hormone precursor, pro-natriodilatant. *Nature* 1984 ; 312 : 654-6.
- Grépin C, Dagnino L, Robitaille L, Haberstroh L, Antakly T, Nemer M. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994 ; 14 : 3115-29.
- Argentin S, Ardati A, Tremblay S, Lihrmann I, Robitaille L, Drouin J, Nemer M. Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 1994 ; 14 : 777-90.

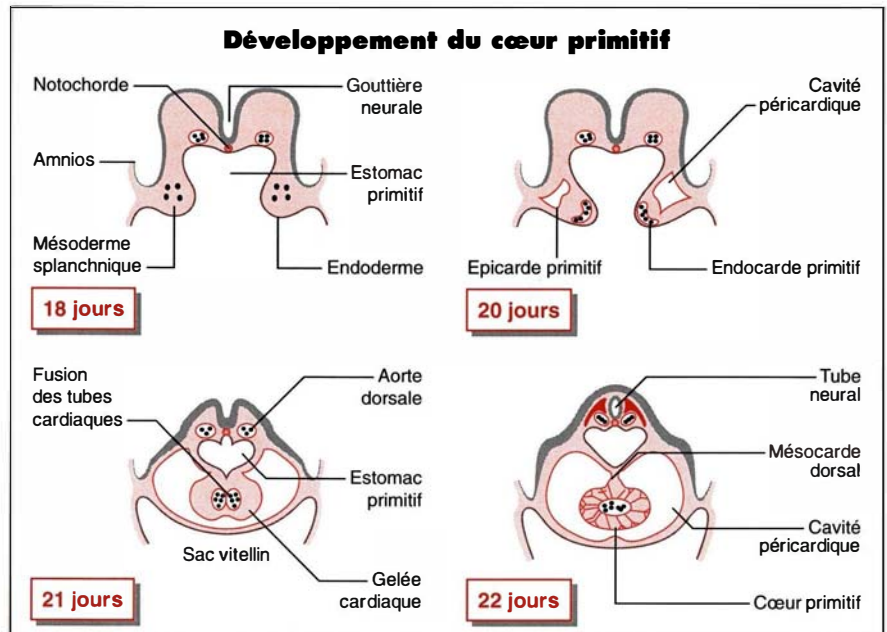


Figure 1. **Schéma du développement précoce du cœur humain.** La séquence d'événements est la même chez les rongeurs et le poulet.

teurs de transcription qui sont également des facteurs de différenciation capables d'enclencher le programme génétique musculaire et d'effectuer une conversion phénotypique musculaire. Cette découverte a fait avancer très rapidement nos connaissances, non seulement de l'expression génétique mais également du développement et de la différenciation du muscle squelettique.

Le muscle cardiaque est un muscle strié au même titre que le muscle squelettique et tous deux se développent à partir du mésoderme de l'embryon. Cependant, alors que le muscle squelettique dérive des somites (issues du mésoderme dorsal à partir du jour embryonnaire 8,5 chez la souris), les cellules du cœur proviennent du mésoderme latéral et sont engagées dans la voie cardiaque dès l'implantation de l'embryon (jour embryonnaire 5 chez la souris). Ainsi, les origines spatiales et temporelles bien différentes de ces deux muscles striés suggèrent l'existence de voies de différenciation distinctes pour chacun. La découverte des facteurs myogéniques (*MyoD*, myogénine, *Myf5*) et l'élucidation des mécanismes de différenciation du muscle

squelettique ont depuis confirmé cette hypothèse laissant toutefois les voies de différenciation du muscle cardiaque inexploitées.

Le cœur est le premier organe fonctionnel chez l'embryon et le développement cardiaque commence dès le début de l'embryogenèse (avant la fin de la gastrulation) lorsque les cellules mésodermes s'engagent dans la voie de différenciation cardiaque pour donner naissance aux cellules myocardiales ou cardiomyocytes ; ces derniers vont proliférer pour former le tube cardiaque (ou cœur primitif) vers la fin de la troisième semaine de gestation chez l'humain (figure 1) et au jour embryonnaire 7-7,5 chez la souris. Une seconde phase, dite de morphogenèse, aboutira à la formation du cœur définitif à quatre cavités (figure 2) et des anomalies du développement à ce stade produisent des malformations cardiaques (défaut de septation, désorganisation du système de conduction et autres).

Bien que la structure, la physiologie et la pathologie du cœur des vertébrés soient maintenant bien connues, les mécanismes de différenciation des cellules qui formeront le myocarde demeurent vagues. Ce

manque d'informations est attribué à l'absence de marqueurs moléculaires et de modèles *in vitro* permettant d'étudier le processus d'engagement et de différenciation ainsi que les événements précoces de la cardiogénèse.

Origine et différenciation des cellules cardiaques. Formation du cœur primitif

Le développement du cœur embryonnaire débute bien avant que le tissu cardiaque puisse être identifié morphologiquement. La présence de cellules engagées dans la voie cardiaque avant l'implantation a été mise en évidence grâce à diverses approches expérimentales chez les amphibiens et chez l'embryon de poulet. Ces études ont démontré l'existence de deux régions précardiennes, localisées de façon symétrique de part et d'autre du nœud de

Hensen dans le mésoderme latéral; elles sont capables de se différencier en myocarde lorsqu'elles sont transplantées [1] ou sont incorporées dans le cœur en voie de développement [2]. Ces cellules « engagées » ou cellules précardiennes migrent et se regroupent dans la région médiane du mésoderme latéral (*figure 1*) pour former le mésoderme précardien. Ces deux régions cardiogéniques se rapprochent progressivement, vraisemblablement grâce aux mouvements dus à la formation de l'intestin primitif, puis fusionnent pour former une structure unique appelée tube cardiaque au jour embryonnaire 7 chez la souris. Les études sur l'origine et l'engagement des cellules dans la voie cardiogénique montrent que les cellules précardiennes sont en fait différenciées : elles expriment des protéines spécifiques du cœur telles les protéines contractiles myosine et desmine ainsi que la titine et l' α -actine. La différen-

ciation cardiaque est donc établie avant la formation du cœur primitif et bien avant la formation des somites qui conduiront au muscle squelettique.

Une étape cruciale pour la spécification du mésoderme cardiaque est, bien sûr, la segmentation du mésoderme. Chez la drosophile, un gène homéotique *tinman* est requis pour la spécification du mésoderme cardiaque et viscéral [3]. Mis à part *tinman* et le rôle inducteur de l'endoderme antérieur, les facteurs – diffusibles ou non – ainsi que les mécanismes de signalisation impliqués dans la cardiogénèse restent obscurs.

Morphogénèse cardiaque : formation du cœur à quatre cavités

Le tube cardiaque subit des changements de forme spectaculaires avant d'aboutir au cœur définitif comprenant quatre cavités : oreillettes et ventricules droits et gauches. La surface ventrale du cœur se plie et le tube entier tourne du côté droit de l'embryon pour devenir une structure en forme de S (*figure 2*). Les changements externes (formation des oreillettes et des ventricules, organisation du système de conduction) et les changements internes (trabéculatation, formation des septums) sont le résultat de déformations et de remaniements topologiques complexes. Ces phénomènes, associés à une constante prolifération, termineront le développement du cœur avant la naissance. Bien que des processus de prolifération différentielle, de migration cellulaire, voire de mort cellulaire, aient été proposés, les mécanismes impliqués dans la morphogénèse cardiaque sont encore inconnus. A cet égard, le développement de souris déficientes en certains facteurs par invalidation génétique (*knockout*) a permis d'identifier des gènes impliqués dans la croissance et la morphogénèse du cœur (*Tableau 1*). Cependant, il est important de souligner que, dans tous les cas, la différenciation précoce et la formation du tube cardiaque n'étaient point affectées, confirmant que la différenciation des cardiomyocytes précède et est indépendante de la morphogénèse cardiaque.

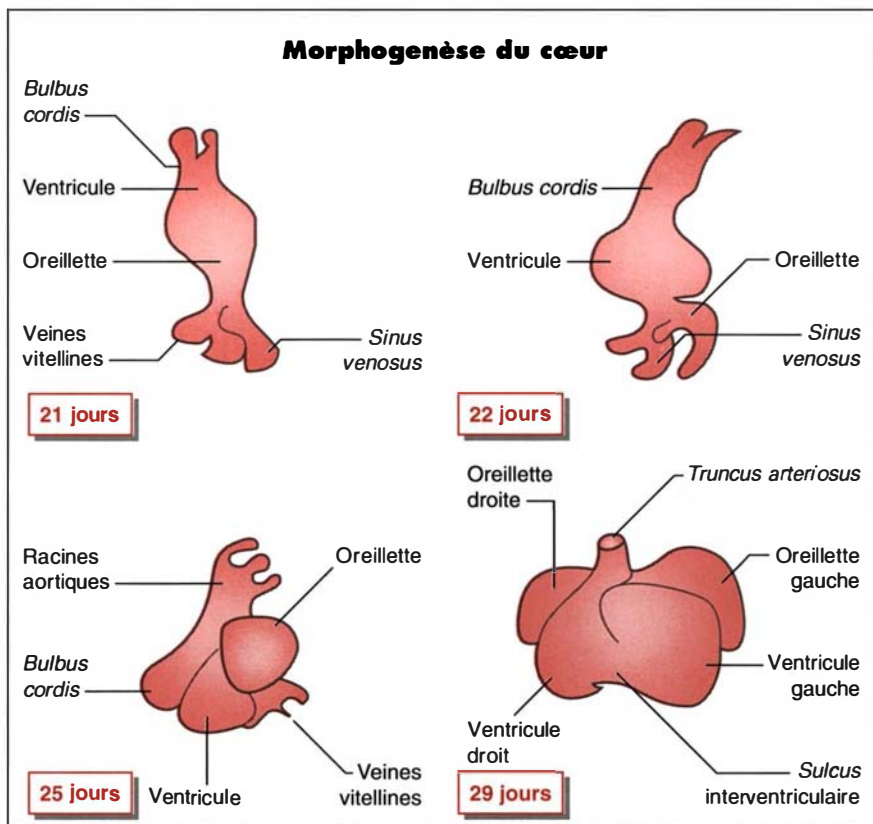


Figure 2. Développement du cœur primitif pour donner le cœur à quatre cavités. Les jours indiqués correspondent au développement de l'embryon humain.

RÉFÉRENCES

12. Seidman CE, Schmidt EV, Seidman JG. cis-dominance or rat atrial natriuretic factor gene regulatory sequences in transgenic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69: 1486-92.

13. Thompson WR, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. A MyoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the b-myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 22678-88.

14. Martin JF, Schwarz JJ, Olson EN. Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5282-6.

15. Chambers AE, Logan M, Kotecha S, Towers N, Sparrow D, Mohun TJ. The RSRF/MEF2 protein SL1 regulates cardiac muscle-specific transcription of a myosin light-chain gene in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* 1994; 8: 1324-34.

16. Cserjesi P, Lilly B, Bryson L, Wang Y, Sassoon DA, Olson EN. MBox: a mesodermally restricted homeodomain protein that binds an essential site in the muscle creatine kinase enhancer. *Development* 1992; 115: 1087-101.

17. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RF. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 1993; 119: 419-31.

18. Ip HS, Wilson DB, Heikinheimo M, Tang Z, Ting CN, Simon MC, Leiden JM, Parmacek MS. The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in non-muscle cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7517-26.

19. Molkenin JD, Kalvakolanu DV, Marikam BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the α -myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4947-57.

20. Grépin C, Robitaille L, Nemer M. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks cardiac muscle differentiation. *Nature* 1995 (sous presse).

21. Yang Z, Gu L, Romeo PH, Bories D, Motohashi H, Yamamoto M, Engel JD. Human GATA-3 trans-activation, DNA-binding, and nuclear localization activities are organized into distinct structural domains. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2201-12.

22. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994; 371: 221-6.

Spécificité spatio-temporelle du programme génétique cardiaque

Chaque étape du développement du cœur après la formation du tube cardiaque est caractérisée par un programme génétique unique (*Tableau*

II). En outre, certains gènes sont spécifiques de l'oreillette ou du ventricule établissant ainsi, à l'intérieur du muscle cardiaque, une spécificité spatiale. Cependant, la période exacte de la spécification oreillette/ventricule ainsi que les mécanismes impliqués dans cette différenciation demeurent indéfinis. Entre autres, on

Tableau I INACTIVATION DE GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT NORMAL DU CŒUR		
Gène inactivé	Symptomatologie	Référence
<i>RXRα</i>	létalité embryonnaire (e 13,5-16,5) hypoplasie des myocytes amincissement des parois ventriculaires septation anormale des cavités	[25]
<i>RARα</i> <i>+ RARγ</i>	létalité embryonnaire (e 13,5-18,5) hypoplasie des myocytes et amincissement du myocarde absence du septum ventriculaire	[26]
<i>c-myc</i>	létalité embryonnaire (e 10,5) hypertrophie cardiaque dilatation du péricarde	[27]
<i>N-myc</i>	létalité embryonnaire (e 11,5) hypoplasie du myocarde absence des cavités oreillettes/ventricules	[28]
<i>TGFβ1</i>	létalité périnatale (j 1) désorganisation du muscle cardiaque malformations valvulaires malformation de la lumière ventriculaire	[29]
<i>PDGFβ</i>	létalité périnatale dilatation du myocarde hypertrabéculatation du ventricule droit	[30]
<i>WT-1</i>	létalité embryonnaire (e 13-15) dilatation du ventricule gauche hypoplasie de la paroi ventriculaire	[31]
<i>NF-1</i>	létalité embryonnaire (e 13,5) cœur globulaire et hypoplasique malformations du septum ventriculaire	[32]
<i>TEF-1</i>	létalité embryonnaire (e 11-12) paroi ventriculaire anormalement mince	[33]
<i>Hox 1,5</i>	létalité périnatale (j0-20) hypertrophie et malformation des cavités du cœur	[34]

e: jour de vie embryonnaire chez la souris.
j: jour de vie post-natale chez la souris.

ignore si une population commune de myocytes bipotents se différencie en lignée auriculaire ou ventriculaire, ou si chaque lignée est établie très tôt à partir de myocytes non différenciés, bien que déjà engagés dans le programme cardiaque. Des travaux récents effectués chez le poulet et le poisson zèbre suggèrent l'existence d'une polarité à un stade précoce de la différenciation du mésoderme cardiaque avec les cellules les plus postérieures donnant naissance aux cellules auriculaires alors que les cellules ventriculaires proviendraient de la partie la plus antérieure du tissu; par ailleurs, le destin des cellules précardiaques peut être modifié par traitement à l'acide rétinoïque. Ces résultats, ainsi que ceux obtenus à partir d'expériences de transplantation, suggèrent que des inducteurs et/ou des interactions locales influencent les voies de différenciation auriculaire et ventriculaire [4, 5]. La mise au point de marqueurs moléculaires précoces du développement faciliterait grandement l'étude des mécanismes de spécification spatiale des

cellules cardiaques. Étant donné que les facteurs de transcription à spécificité tissulaire contrôlent l'expression des gènes de différenciation, participant ainsi aux décisions précoces qui accompagnent la spécification des cellules, les facteurs de transcription spécifiques des oreillettes et/ou des ventricules pourraient représenter des marqueurs idéaux pour retracer les origines spatio-temporelles des myocytes auriculaires et ventriculaires.

Outre sa variation lors de la spécification des cavités oreillettes/ventricules, le profil d'expression des gènes dans le cœur varie également au cours du développement. Un changement majeur ou *switching* se produit durant la première semaine de vie postnatale alors que l'expression de nombreux gènes embryonnaires est éteinte et que celle de certains autres augmente (revue par Lyons *et al.* [6]); cela inclut les gènes codant pour des protéines de l'appareil contractile, des canaux ioniques et des hormones cardiaques (*Tableau II*). Ainsi, de nombreuses caractéristiques fonctionnelles du cœur embryonnaire et adulte dépendent du contrôle temporel précis du programme génétique cardiaque.

Mécanismes de transcription spécifique au muscle cardiaque

Mis à part les gènes codant pour les peptides natriurétiques, la grande majorité des gènes cardiaques étudiés jusqu'à présent sont coexprimés dans le muscle squelettique adulte ou embryonnaire. Cette observation a mené à l'hypothèse de l'existence de mécanismes communs de contrôle de la transcription – et potentiellement de la différenciation – dans les muscles cardiaques et squelettiques. L'étude de la transcription dans le muscle squelettique était grandement facilitée par la disponibilité de plusieurs lignées cellulaires de myoblastes squelettiques capables de se différencier en myotubes alors que l'étude de la transcription cardiaque se heurtait à l'absence de modèles *in*

Tableau II
PROFIL D'EXPRESSION DE CERTAINS GÈNES CARDIAQUES
AU COURS DU DÉVELOPPEMENT

Gènes	Stade de développement				
	Embryon	Nouveau-né		Adulte	
		Oreillette	Ventricule	Oreillette	Ventricule
<i>MHCα</i> <i>MHCβ</i>	+	+	+/-	+	+
	+	-	+	-	-
<i>MLC1-A</i> <i>MLC1-V</i> <i>MLC-2V</i>	+	+	-	+	-
	+	-	+	-	+
Gène codant pour l'actine cardiaque	+	+	+	+	+
<i>MCK</i>	-	-	+	+	+
<i>ANP</i> <i>BNP</i>	+	+	+/-	+	-
	+	+	+	+	+

MHC: chaînes lourdes des myosines.
MLC A et V: chaîne légère des myosines de l'oreillette (A) et du ventricule (V).
ANP: peptide natriurétique de type A.
BNP: peptide natriurétique de type B.
MCK: créatine kinase musculaire.

RÉFÉRENCES

23. Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F. Erythroid differentiation in chimeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991 ; 349 : 257-60.
24. Kelley C, Blumberg H, Zon LI, Evans T. GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development* 1993 ; 118 : 817-27.
25. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXRa mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 1994 ; 8 : 1007-18.
26. Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, Luffkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Fonction of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 1994 ; 120 : 2749-71.
27. Davis AC, Wims M, Spotts GD, Hann SR, Bradley A. A null *c-myc* mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 1993 ; 7 : 671-82.
28. Stanton BR, Perkins AS, Tessarollo L, Sassoon DA, Parada LF. Loss of *N-myc* function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev* 1992 ; 6 : 2235-47.
29. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Prøtzsel G, Calvin D, Anunziata N, Døetschman T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992 ; 359 : 693-9.
30. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF β -receptor mutant mice. *Genes Dev* 1994 ; 8 : 1888-96.
31. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993 ; 74 : 679-91.
32. Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, Buchberg AM, Jenkins NA, Parada LF, Copeland NG. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev* 1994 ; 8 : 1019-29.
33. George KM, Leonard MW, Roth ME, Lieuw KH, Kioussis D, Grosveld F, Engel JD. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* 1994 ; 120 : 2673-86.

in vitro de cardiogenèse. Ainsi, des études *in vitro* sur les promoteurs de gènes codant pour la créatine kinase musculaire (MCK), les actines, myosines et troponines, ont permis d'identifier des éléments régulateurs spécifiques des myotubes. Cependant, les premiers tests *in vivo* sur des souris transgéniques ont révélé que des éléments régulateurs différents étaient requis pour la transcription dans les muscles cardiaques et squelettiques d'un même gène [7], un résultat contraire à la notion de mécanismes communs pour l'expression génétique dans les deux muscles striés.

Les études portant sur la transcription dans le muscle squelettique ont abouti à l'isolement et à la caractérisation fonctionnelle des facteurs de transcription myogéniques de la famille MyoD (revue par Olson et Klein [8]). L'expression forcée de ces facteurs dans des cultures cellulaires induit l'expression du programme génétique du muscle squelettique mais non cardiaque. De plus, l'inactivation de ces gènes par recombinaison homologue chez la souris affecte le développement des muscles squelettiques sans aucun effet sur le développement du muscle cardiaque (*m/s n° 4, vol. 10, p. 481*). Ainsi, il est à présent clair que les mécanismes d'activation de la transcription sont différents dans les muscles cardiaque et squelettique.

Promoteurs et éléments régulateurs cardiaques

Depuis quelques années, le développement de cultures primaires de myocytes dérivés de cœurs d'embryons ou de nouveau-nés ainsi que l'utilisation de souris transgéniques ont permis d'identifier quelques éléments régulateurs cardiaques, quoique les protéines nucléaires qui interagissent avec ces sites et qui dictent la spécificité cardiaque commencent à peine à être identifiées (*Tableau III*).

Les études de la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les peptides natriurétiques cardiaques ont amélioré de façon significative les connaissances des mécanismes de transcription spécifique du muscle cardiaque. Deux peptides natriurétiques sont synthétisés dans les car-

diomyocytes, le peptide natriurétique de type A (ANP) et le peptide natriurétique de type B (BNP). Ces peptides sont sécrétés et agissent *via* des récepteurs spécifiques sur plusieurs tissus cibles pour augmenter la natriurèse, la diurèse, la vasodilatation et possèdent ainsi des effets hypotenseurs importants. Cette famille d'hormones cardiaques a été découverte au début des années 1980 et le premier gène, celui codant pour l'ANP, a été cloné il y a à peine dix ans [9]. Des études récentes ont démontré que les gènes *ANP* et *BNP* sont localisés à l'intérieur d'un fragment de moins de 50 kpb sur le chromosome 1 humain, mettant ainsi en évidence l'existence d'un *locus* de peptides natriurétiques cardiaques. Contrairement aux gènes cardiaques connus jusque là, l'expression des gènes *ANP* et *BNP* est restreinte aux cardiomyocytes et n'est pas détectable dans le muscle squelettique embryonnaire ou adulte. Ces gènes représentent donc des marqueurs intéressants pour identifier des mécanismes régulateurs propres au muscle cardiaque. Le gène *BNP* est exprimé de façon constitutive dans les oreillettes et dans les ventricules. Le clonage et l'étude fonctionnelle de la région régulatrice du gène *BNP* ont révélé de façon inattendue une organisation structurale très similaire à celle des promoteurs et *enhancers* des gènes érythroïdes (*m/s n° 3, vol. 8, p. 255*) puisque des motifs GATA, un site NF-E2 et une boîte CACCC sont présents dans les premières 115 pb du promoteur cardiaque (*figure 3*). Cette organisation est entièrement conservée à travers plusieurs espèces incluant les gènes *BNP* humains, de souris et de chiens. Les expériences de mutagenèse ont mis en évidence un rôle crucial pour les séquences GATA dans la transcription cardiaque [10]. Des sites GATA ont, depuis, été impliqués dans l'activité cardiaque de trois autres promoteurs, soit le promoteur de l'*ANP*, de la troponine C et de l' α -MHC (*myosin heavy chain*).

Si l'étude du promoteur *BNP* a été des plus utiles pour élaborer un mécanisme d'expression basal ou constitutif des gènes cardiaques, l'étude du promoteur *ANP* a contribué à l'élucidation de mécanismes impliqués, au cours du développement, dans le

contrôle spatial de l'expression génétique dans le cœur. Le gène de l'ANP est exprimé de façon constitutive dans les cardiomyocytes auriculaires alors qu'il est contrôlé de façon liée au développement dans le ventricule ; en particulier, son expression diminue considérablement à partir de la première semaine de vie postnatale et durant le stade adulte de façon que l'expression d'ANP dans le cœur adulte soit quasiment spécifique des oreillettes [11]. Des expériences de transgénèse ont montré que les premières 500 pb du promoteur humain de l'ANP étaient suffisantes pour reconstituer la spécificité spatio-temporelle [12]. L'utilisation de cultures

primaires de cardiomyocytes auriculaires ou ventriculaires provenant de rats embryonnaires ou âgés de 1 à 5 jours a permis d'identifier des éléments régulateurs spécifiques des différents stades du développement cardiaque. Ainsi, un élément contenant une boîte CArG (Tableau III) parfaitement conservée entre les promoteurs humains et de rats est nécessaire pour la transcription du promoteur ANP dans des ventricules de type adulte, alors que l'élément est inactif dans des ventricules embryonnaires ou provenant de rats nouveau-nés [11]. D'autres études ont également démontré que des éléments contenant des motifs CArG contribuent à

l'activité cardiaque des promoteurs MCK [37] et MHC [13]. Cependant, la ou les protéines nucléaires qui interagissent avec l'élément CArG et qui confèrent la spécificité cardiaque sont inconnues.

Dans les oreillettes et les ventricules embryonnaires, l'activité du promoteur ANP dépend largement de l'élément CARE (*cardiac regulatory element*). Cet élément, parfaitement conservé entre les promoteurs humains et de rats, est capable de conférer une activation transcriptionnelle de 10 à 50 fois lorsqu'il est présent en une à trois copies devant un promoteur hétérologue. Le site CARE est présent également dans les promoteurs des gènes MHC, MLC (*myosin light chain*) et codant pour la troponine C (Tableau III). L'élément CARE est actif dans les myocytes embryonnaires mais son activité diminue dramatiquement dans des ventricules de nouveau-nés, en accord avec le profil d'expression du gène ANP au cours du développement. Ainsi, l'identification d'éléments régulateurs spécifiques des différents stades de développement cardiaque suggère que les mécanismes d'initiation et du maintien du phénotype cardiaque sont différents.

Outre les éléments GATA, CArG et CARE, les analyses de plusieurs promoteurs cardiaques ont révélé l'importance de trois autres éléments régulateurs pour la transcription dans les cardiomyocytes, soit une séquence riche en A et T appelée MEF2, la séquence CATTCT appelée M-CAT et une séquence CCACC (Tableau III).

Facteurs de transcription spécifiques des cardiomyocytes

Contrairement au muscle squelettique, où les protéines de la famille MyoD jouent un rôle clé dans l'activation du programme de transcription et de différenciation musculaire, les facteurs et les mécanismes moléculaires impliqués dans la transcription et la différenciation cardiaque demeurent obscurs. Plusieurs groupes ont cherché à isoler l'homologue cardiaque de MyoD mais ces efforts ont tous été vains. Néanmoins, durant les dernières années, plusieurs facteurs de transcription dont l'expression est, soit restreinte au muscle

Élément	Séquence	Promoteur	Protéine cardiaque
GATA	A/T GATA A/G	BNP [10] ANP [10] MHC [19] cTpC [18]	GATA-4 [10] GATA-5 [47] GATA-6 ?
CArG	CC (A/T) ₆ GG	ANP [11] MHC [35] c-actine [36] MCK [37]	?
MCAT	CATTCT	cTpT [38] MHC [39] MHC [35]	TEF-1 [33] ?
MEF2	C _T T(A) ₅ TAAC	MKC [7] MLC-2 [40] MHC [39] ANP [11] myoglobine [41]	MEF2A, C, D [14, 48]
CARE	GCTGGG	ANP [42] MHC [35] MLC1-V [43] cTpC [44]	CATF ?
CACCC	CCACCC	Myoglobine [45] c-actine [46] MHC [13] cTpC [44] BNP [10]	MNF ? [45]

Voir abréviations du Tableau I.
cTpT: troponine T cardiaque.
cTpC: troponine C cardiaque/slow.

RÉFFÉRENCES

34. Mukhopadhyay AD, Schumacher M, Leidenberger FA. Steroidogenic effect of atrial natriuretic factor in isolated mouse Leydig cells is mediated by cyclic GMP. *Biochem J* 1986 ; 239 : 463-7.
35. Rindt H, Gulick J, Knotts S, Neumann J, Robbins J. *In vivo* analysis of the murine beta-myosin heavy chain gene promoter. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 5332-8.
36. Miwa T, Kedes L. Duplicated CArG box domains have positive and mutually dependent regulatory roles in expression of the human alpha-cardiac actin genes. *Mol Cell Biol* 1987 ; 7 : 2803-13.
37. Vincent CK, Gualberto A, Patel CV, Walsh K. Different regulatory sequences control creatine kinase-M gene expression in directly injected skeletal and cardiac muscle. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 1264-72.
38. Stewart AFR, Larkin SB, Farrance IKG, Mar JH, Hall DE, Ordahl CP. Muscle-enriched TEF-1 isoforms bind M-CAT elements from muscle-specific promoters and differentially activate transcription. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 3147-50.
39. Molkenin JD, Markham BE. An M-CAT binding factor and an RSRF-related A-rich binding factor positively regulate expression of the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene *in vivo*. *Mol Cell Biol* 1994 ; 14 : 5056-65.
40. Zhu H, Nguyen VT, Brown AB, Pourosheni A, Garcia AV, van Bilsen M, Chien KR. A novel, tissue-restricted zinc finger protein (HF-1b) binds to the cardiac regulatory element (HF-1b/MEF-2) in the rat myosin light-chain 2 gene. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 4432-44.
41. Bassel-Duby R, Grohe CM, Jessen ME, Parsons WJ, Richardson JA, Chao R, Grayson J, Ring WS, Williams RS. Sequence elements required for transcriptional activity of the human myoglobin promoter in intact myocardium. *Circ Res* 1993 ; 73 : 360-6.
42. McBride K, Robitaille L, Tremblay S, Argentin S, Nemer M. Fos/jun repression of cardiac-specific transcription in quiescent and growth stimulated myocytes is targeted at a tissue-specific cis-element. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 600-12.
43. Kurabayashi M, Komuro I, Shibasaki Y, Tsuchimochi H, Takaku F, Yazaki Y. Functional identification of the transcriptional regulatory elements within the promoter region of the human ventricular myosin alkali light chain gene. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 19271-8.
44. Parmacek MS, Vora AJ, Shen T, Barr E, Jung F, Leiden JM. Identification and characterization of a cardiac-specific transcriptional regulatory element in the slow/cardiac troponin C gene. *Mol Cell Biol* 1992 ; 12 : 1967-76.

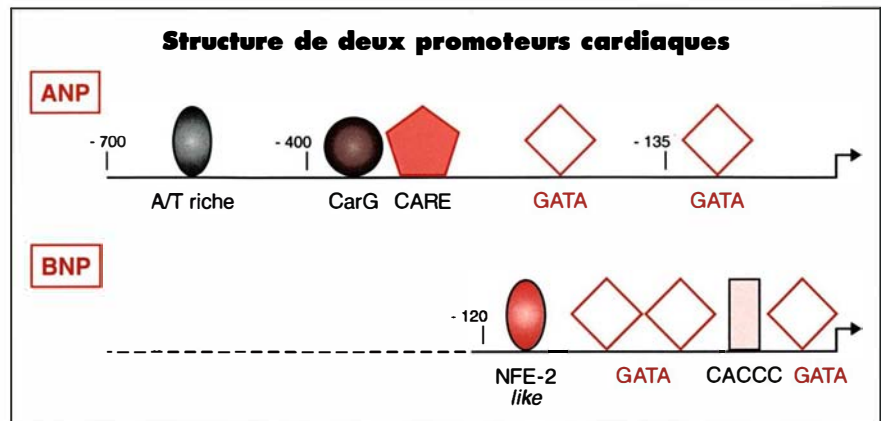


Figure 3. Représentation schématique de la structure des promoteurs cardiaques des gènes codant pour les facteurs natriurétiques de type A (ANP) et B (BNP). Les éléments régulateurs indiqués ont été déterminés par des analyses *in vitro* dans des cultures primaires de cardiomyocytes de rat.

cardiaque, soit enrichie dans les cardiomyocytes, ont été identifiés (Tableau IV). Cependant, mis à part les facteurs GATA-4, MEF2D et CATF pour lesquels des gènes cibles ont été identifiés, le rôle exact de ces facteurs dans l'activation des gènes cardiaques est loin d'être élucidé. Par exemple, bien que l'inactivation du gène *TEF-1* chez la souris conduise à des malformations cardiaques (Tableau I), l'expression des gènes cardiaques et, en particulier, des gènes codant pour les troponines T, C et MHC, n'est point affectée chez ces animaux, ce qui soulève des questions quant au rôle de ce facteur dans le cœur et à l'identité du facteur cardiaque qui agit *via* le site MCAT. Par ailleurs, une majorité de ces facteurs sont coexprimés dans les muscles cardiaque et squelettique et correspondraient donc difficilement à des activateurs spécifiques du programme génétique cardiaque. CATF (*cardiac ATPase containing transcription factor*) a été isolé par sa capacité de lier l'élément CARE du gène ANP. La structure primaire de CATF révèle la présence d'un domaine de liaison à l'ATP et de motifs hélicases qui rappellent les transactivateurs de levures de la famille *SWI*. Ces derniers sont, non seulement impliqués dans l'activation de la transcription, mais également capables d'interagir avec la chromatine. La caractérisation préliminaire de CATF indique que ce facteur est capable de *transac-*

tiver le promoteur ANP de façon spécifique et que, dans le cœur adulte, CATF est exprimé de façon prédominante dans les cardiomyocytes auriculaires (Durocher *et al.*, en préparation)

Les protéines MEF2/RSRF appartiennent à la famille des facteurs de transcription MADS (*MCM1*, *agamous*, *deficiens*, *serum response factor*). Le domaine MADS est un motif de 56 acides aminés qui permet la liaison à l'ADN et la dimérisation. Les produits des gènes *MEF2* sont très similaires dans leur domaine MADS et dans la région adjacente alors qu'ils divergent dans leur région carboxyterminale. Les gènes *MEF2A*, *MEF2B* et *MEF2D* sont exprimés dans une large gamme de tissus adultes, incluant le cœur et le muscle squelettique (bien que *MEF2B* soit particulièrement abondant dans les cellules B du système lymphoïde) alors que l'expression de *MEF2C* est restreinte au cœur, au muscle squelettique, au cerveau et à la rate. Des expériences d'hybridation *in situ* ont permis d'établir le profil d'expression des gènes *MEF2* chez la souris au cours du développement. Ainsi, les transcrits *MEF2C* apparaissent dans la région cardiogénique de l'embryon au jour 7,5 - 8 alors qu'ils ne deviennent détectables dans le muscle squelettique qu'à partir du jour 8,5 - 9, ce qui suggère un rôle potentiel de la protéine dans la transcription musculaire aussi bien cardiaque que sque-

lettique. Cependant, bien que l'expression des gènes *MEF2A*, *C*, *D* soit importante dans les cellules musculaires au cours du développement, les messagers sont également détectés dans une grande quantité de tissus embryonnaires (intestin, muscle lisse, cerveau embryonnaire) [14]. Par ailleurs, un seul travail pour le moment indique l'implication d'un membre de la famille *MEF2* dans la transcription cardiaque; il s'agit de celui de Chambers *et al.* [15] qui ont démontré que l'injection de *SL1*, l'homologue amphibien de *MEF2D*,

induit l'expression du gène cardiaque *MLC2* mais non l'expression d'autres gènes cardiaques incluant ceux de l' α -MHC, dans les explants d'embryons de xénope. Ces résultats suggèrent que *SL1* n'est pas capable d'induire une conversion cardiogénique et que *MLC2* serait une cible directe de *SL1*. Par analogie avec les autres facteurs de la famille MADS, il est probable que les protéines MEF2 interagissent avec d'autres facteurs nucléaires. Cserjesi *et al.* [16] ont récemment isolé l'ADN (ADNc) codant pour une protéine, MHox, qui

contient un domaine homéotique. La protéine MHox, exprimée dans les muscles squelettique, cardiaque et lisse, lie un site riche en A/T retrouvé à côté du site *MEF2* du promoteur *MCK* et elle pourrait probablement interagir avec les protéines MEF2. Un autre facteur nucléaire qui pourrait interagir avec les protéines MEF2 dans le cœur est la protéine Csx/NK2.5; elle appartient à la famille des protéines homéotiques qui sont généralement importantes pour la segmentation et qui jouent un rôle important lors de la spécification et le développement de plusieurs organes. L'expression du gène *Csx/NK2.5* est plutôt restreinte aux cardiomyocytes et les transcrits *Csx/NK2.5* apparaissent très tôt au cours du développement embryonnaire de la souris dans la région précardiaque, ce qui suggérerait un rôle précoce dans la formation du cœur [17].

L'implication de séquences contenant un motif GATA dans la transcription cardiaque était surprenante puisque ces séquences avaient été associées jusque-là à la transcription de gènes spécifiques des cellules érythroïdes et à certains gènes des lymphocytes T, mais non à la transcription musculaire. Les motifs GATA, présents sur les promoteurs érythroïdes, sont reconnus par une famille de facteurs de transcription dont le domaine de liaison à l'ADN est de type doigt de zinc. Les trois membres identifiés de cette famille avaient des distributions tissulaires plutôt restreintes aux cellules hématopoïétiques et absentes du muscle cardiaque, suggérant que l'activité GATA dans les cardiomyocytes était due à un nouveau membre de la famille des protéines GATA. C'est ainsi que l'ADNc codant pour la protéine nucléaire cardiaque qui interagit avec le site GATA a été cloné [10]. Cette protéine, GATA-4, lie spécifiquement le site GATA et *trans*-active le promoteur *BNP* dans les cellules non cardiaques jusqu'à atteindre le même niveau d'activité que dans les cardiomyocytes. GATA-4 lie également les sites GATA présents dans les promoteurs des gènes *ANP*, *MHC* et codant pour la troponine C cardiaque et *trans*-active spécifiquement ces promoteurs par cotransfection transitoire de l'ADNc *GATA-4* avec des gènes rapporteurs [10, 18, 19].

Facteurs de transcription	Muscle cardiaque	Muscle squelettique	Site de liaison	Gènes cibles dans le cœur
GATA-4 [10]	+	-	A _T GATAA/G	<i>BNP</i> , <i>ANP</i> [10] <i>cTpc</i> [18] <i>MHC</i> [19] <i>MLC1-A</i> [20]
GATA-5 [47]	+	-	A _T GATAA/G **	?
GATA-6 [47]	+	-	A _T GATAA/G **	?
MEF2A [49] MEF2C [14] MEF2D [50]	+	+	C _T T(A) ₅ TAAC	<i>MCK</i> ? <i>MLC2</i> [15]
MHOX [16]	+	+	TAATTATAACC	?
Csx/Nk2,5 [17]	+	+/-	?	?
TEF-1 [51]	+	+	CATTCCT	?
MITF (microphthalmie) [52]	+	-	?	?
MLP (<i>muscle LIM protein</i>) [53]	+	+	?	?
Hox8 [54]	+	-	?	?
Hox1,11 [55]	+*	-	?	?
CATF	+	-	GCTGGG	<i>ANP</i>

* système de conduction.

** probable mais non démontré.

RÉFÉRENCES

45. Bassel-Duby R, Hernandez MD, Yang Q, Rochelle JM, Seldin MF, Williams RS. Myocyte nuclear factor, a novel winged-helix transcription factor under both developmental and neural regulation in striated myocytes. *Mol Cell Biol* 1994 ; 14 : 4596-605.
46. Sartorelli V, Webster KA, Kedes L. Muscle-specific expression of the cardiac alpha-actin gene requires MyoD1, CArG-box binding factor, and Sp1. *Genes Dev* 1990 ; 4 : 1811-22.
47. Laverriere AC, Mac Neill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 23177-84.
48. Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olson EN. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* 1989 ; 9 : 5022-33.
49. Pollock R, Treisman R. Human SRF-related proteins : DNA-binding properties and potential regulatory targets. *Genes Dev* 1991 ; 5 : 2327-41.
50. Yu YT, Breitbart RE, Smoot LB, Lee Y, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* 1992 ; 6 : 1783-98.
51. Xiao JH, Davidson I, Matthes H, Garnier JM, Chambon P. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 1991 ; 65 : 551-63.
52. Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 1993 ; 74 : 395-404.
53. Arber S, Halder G, Caroni P. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 1994 ; 79 : 221-31.
54. Chan-Thomas PS, Thompson RP, Robert B, Yacoub MH, Barton PJ. Expression of homeobox genes *Msx-1 (Hox-7)* and *Msx-2 (Hox-8)* during cardiac development in the chick. *Dev Dynamics* 1993 ; 197 : 203-16.
55. Patel CV, Gorski DH, LePage DF, Lincum J, Walsh K. Molecular cloning of a homeobox transcription factor from adult aortic smooth muscle. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 26085-90.

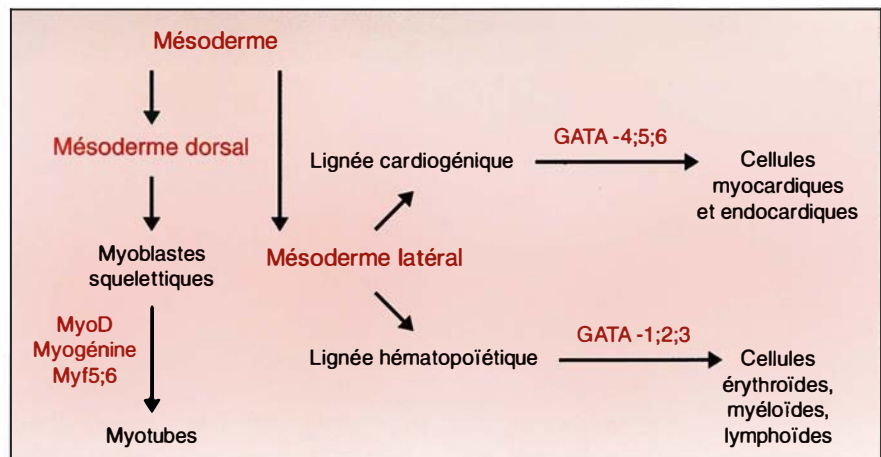


Figure 4. **Origine et voies de différenciation distinctes pour les muscles squelettique et cardiaque.** Noter la ressemblance entre les lignées cardiogéniques et hématopoïétiques quant à l'origine spatiale et temporelle et à l'implication de facteurs GATA dans la transcription (et probablement la différenciation) cardiaque et érythrocytaire.

Ainsi, l'étude du promoteur *BNP* a permis la mise en évidence dans le muscle cardiaque, tout comme dans la lignée hématopoïétique, d'un mécanisme de transcription dépendant des protéines GATA. Cependant, la protéine GATA-4 est exprimée à un niveau équivalent dans les oreillettes et ventricules, et de façon constitutive à partir du jour embryonnaire 14 et durant le développement postnatal. L'activité GATA ne peut donc expliquer à elle seule l'expression génétique différentielle dans les oreillettes et les ventricules ou durant le développement. Des études d'hybridation *in situ* ont montré que le gène *GATA-4* était déjà exprimé au jour 7 du développement embryonnaire chez la souris avant la formation du tube cardiaque. Ainsi, l'ontogenèse de *GATA-4* et sa capacité d'activer plusieurs promoteurs cardiaques suggèrent un rôle clé dans l'activation du programme cardiaque et dans la différenciation de cardiomyocytes. En effet, *GATA-4* est capable de transactiver plusieurs gènes cardiaques (*Tableau IV*) et, pour le moment, c'est le seul facteur de transcription spécifique des cardiomyocytes dont des gènes cibles sont clairement identifiés. Par ailleurs, des expériences *in vitro* dans les cellules pluripotentes P19 suggèrent que *GATA-4* est nécessaire à la

différenciation de ces cellules en cardiomyocytes, ce qui soulève la possibilité que *GATA-4* soit requis pour la différenciation précoce de la lignée cardiogénique (Grépin *et al.*, soumis) [20]. Il est utile à cet égard de souligner les rôles importants des facteurs *GATA-1*, *-2* et *-3* dans le développement embryonnaire de la souris et, en particulier, les rôles de *GATA-1* et *-2* dans la différenciation hématopoïétique. En effet, l'inactivation du gène codant pour *GATA-3* cause une mortalité embryonnaire précoce [21] ; l'inactivation du gène *GATA-2* est également létale au stade embryonnaire par déficience de cellules hématopoïétiques souches (*m/s n° 11*, vol. 10, p. 1174) [22]. Enfin, les expériences *in vitro* et *in vivo* indiquent que *GATA-1* est nécessaire à la différenciation érythrocytaire [23]. Outre *GATA-4*, deux autres membres de la famille *GATA* semblent être présents dans le cœur, *GATA-5* et *GATA-6*. Chez le poulet, *GATA-6* est exprimé dans le cœur embryonnaire et diminue de façon très significative au cours du développement ; de fait, chez l'adulte, le site majeur d'expression de *GATA-6* est le système digestif, le foie et le poumon. L'expression de *GATA-5* est restreinte au cœur et au système digestif. *GATA-5* et *-6* sont présents chez le rat, le poulet et le xénope. Cependant, la distribution

cellulaire de GATA-5 et -6 dans le cœur n'est pas très claire quoique, chez le xénope, GATA-5 semble être spécifique des cellules de l'endocarde et non du myocarde [24]. Même si le rôle de GATA-5 et -6 dans le développement et la transcription reste à établir, il est tentant de faire l'hypothèse que les facteurs GATA-4/5/6 agissent durant la cardiogenèse, de façon analogue aux facteurs GATA-1/2/3 lors de l'établissement et de la différenciation de la voie hématopoïétique (figure 4).

Evidemment, l'élucidation du rôle exact des différents facteurs GATA dans le développement cardiaque devra attendre la production de souris transgéniques dans lesquelles chacun de ces gènes aura été inactivé. Néanmoins, la découverte des facteurs GATA a remis en question l'implication de facteurs de la famille MyoD dans la différenciation cardiaque et la similitude des voies de développement des muscles cardiaque et squelettique. Même avec les connaissances limitées dont on dispose pour le moment, il semblerait que les voies de différenciation du muscle cardiaque ressemblent plutôt à celles des cellules hématopoïétiques. Cela ne serait pas tout à fait surprenant, considérant que les cellules cardiaques et hématopoïétiques dérivent très tôt d'une même origine spatiale (le mésoderme latéral, figure 4) pour donner naissance au système circulatoire primitif qui est essentiel au développement embryonnaire. Ainsi, les facteurs impliqués dans le contrôle précoce de l'expression génétique et de la différenciation cardiaque représentent des cibles d'intervention pour modifier ou corriger l'expression de certains gènes dont la structure et/ou la fonction sont associées à des maladies cardiaques ■

TIRÉS À PART

M. Nemer.

m/s n° 3, vol. 11, mars 95

Summary

The heart: a unique muscle program for transcription and differentiation

Death from cardiovascular diseases remains the number one killer in Europe and North America and cardiac failure is, in most cases, the direct cause of death. Understanding the molecular mechanisms that underlie cardiac function is a prerequisite to developing therapeutic interventions to prevent or correct cardiac dysfunction. Since tissue-specific gene expression is a key component of cellular differentiation and organ function, transcription factors that direct cardiac-specific transcription may also be regulators of cardiogenesis and thus represent potential therapeutic targets. Analyses of the regulatory mechanisms underlying transcription of the two cardiac natriuretic peptide genes (ANP and BNP) have led, so far, to identification of chamber and temporal-specific transcription pathways and the isolation of novel transcription factors one of which, GATA-4, belongs to the expanding GATA family of transcription factors that play crucial roles in hematopoiesis. Implications of this and other cardiac transcription factors in expression of the cardiac muscle gene program and in differentiation of cardiac muscle cells are discussed.

Remerciements

Nous remercions tous les membres passés et présents de notre laboratoire pour leurs contributions scientifiques et humaines au cours des années. Nos recherches ont bénéficié du support financier du Conseil de recherche médicale du Canada et de la Fondation canadienne des maladies du cœur. CG était boursière de la Fondation Mérierux/France et reçoit actuellement une bourse de la FCMC. DD détient une bourse Canada 1967 du Conseil de recherche en sciences et en génie (CRSNG) du Canada et MN est scientifique du CRM.