

La régionalisation de l'expression de gènes cardiaques : implications pour la morphogenèse du cœur

**Robert G. Kelly
Margaret
E. Buckingham**

Le cœur des vertébrés est formé à partir de compartiments morphologiquement distincts qui sont décelables chez l'embryon précoce et qui se remodelent ensuite au cours de la cardiogenèse. Des études de transgénèse chez la souris ont mis en évidence des différences transcriptionnelles inattendues entre différentes parties du cœur, y compris les régions droite et gauche. Une telle régionalisation est aussi décelée, souvent de manière transitoire, pour certains gènes endogènes. Les molécules de signalisation ainsi que les facteurs de transcription éventuellement impliqués dans ces phénomènes commencent à être identifiés et leur rôle mis en évidence par mutagenèse. La régionalisation du myocarde apparaît dès l'inflexion du tube cardiaque qui reçoit des informations de position selon l'axe antéro-postérieur puis des signaux de latéralisation responsables de l'asymétrie. Les souris transgéniques qui révèlent cette régionalisation permettent une analyse fine de la contribution des différentes régions du cœur embryonnaire à la constitution du cœur adulte. Chez certaines souris mutantes, qui se présentent comme des modèles de malformations cardiaques congénitales chez l'homme, le suivi du développement cardiaque permet de rattacher ces malformations à des interactions aberrantes entre les divers compartiments cardiaques.

ADRESSES

R.G. Kelly: *chercheur postdoctoral*. M.E. Buckingham: *directeur de recherche au Cnrs*. Cnrs URÀ 1947, Département de biologie moléculaire, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris, France.

Le cœur des vertébrés est composé d'une série de compartiments distincts, résultats de processus morphologiques compliqués qui se déroulent chez l'embryon. Des données récentes indiquent que ces compartiments correspondent à une série de régions qui possèdent des propriétés transcriptionnelles différentes, y compris les parties gauche et droite du cœur. Dans cette revue, sont résumés d'abord les événements principaux qui conduisent à la formation

du cœur et à la différenciation des compartiments ventriculaires et auriculaires et ensuite les données provenant de souris transgéniques qui ont mis en évidence une compartimentalisation plus importante dans le cœur, révélant ainsi l'organisation modulaire de la transcription cardiaque. Ces souris fournissent de nouvelles informations quant à la contribution aux régions du cœur adulte de régions différentes du cœur en formation pendant la cardiogenèse normale et anormale. Enfin, les nouvelles données embryologiques et moléculaires contribuant à la compréhension de cette sous-compartimentalisation cardiaque seront discutées.

Le développement du cœur

Les événements principaux de la morphogénèse cardiaque chez la souris sont résumés dans la première figure. Les premiers cardiocytes, dérivés du mésoderme antérieur latéral, se diffé-

rencient de part et d'autre de la ligne médiane de l'embryon au jour 7 de l'embryogenèse (E7). Pendant le repliement du corps embryonnaire, les deux régions précardiaques gauche et droite fusionnent sur le bord antérieur de l'aire cardiaque, formant ainsi un tube cardiaque organisé transitoirement suivant l'axe antéro-postérieur de l'embryon, avec le pôle artériel en position antérieure et le pôle veineux en position postérieure. A E8, le cœur se courbe vers la droite, avec le déplacement du pôle veineux dorsalement et antérieurement, pour engendrer un tube cardiaque embryonnaire en forme de «S», composé d'une voie afférente, d'une oreillette primitive, d'un canal auriculo-ventriculaire (AVC), d'un ventricule primitif et d'une voie efférente. Ensuite, la croissance et la septation des chambres cardiaques engendrent les compartiments gauche et droit du cœur; les septa convergent dans la région de l'AVC avec la formation de quatre compartiments dis-

tincts qui établissent les circulations pulmonaire et systémique [1].

La régionalisation de l'expression génique dans le cœur

La différenciation du cœur tubulaire suit un gradient antérieur-postérieur (A-P) et dès le début de l'inflexion cardiaque, on constate une première régionalisation de l'expression de quelques marqueurs du myocarde [2, 3]. Les oreillettes et les ventricules du cœur embryonnaire sont caractérisés par l'expression différentielle de gènes, expression corrélée aux phénotypes de ces compartiments, tels que les propriétés contractiles et électrophysiologiques. Ainsi, chez le poulet, une régionalisation précoce des transcrits d'une chaîne lourde de la myosine auriculaire est détectée dans la zone postérieure du tube cardiaque [4]. De même, chez la souris, l'expression de deux gènes ventriculaires, *MLC2V* (*myosin light chain 2*

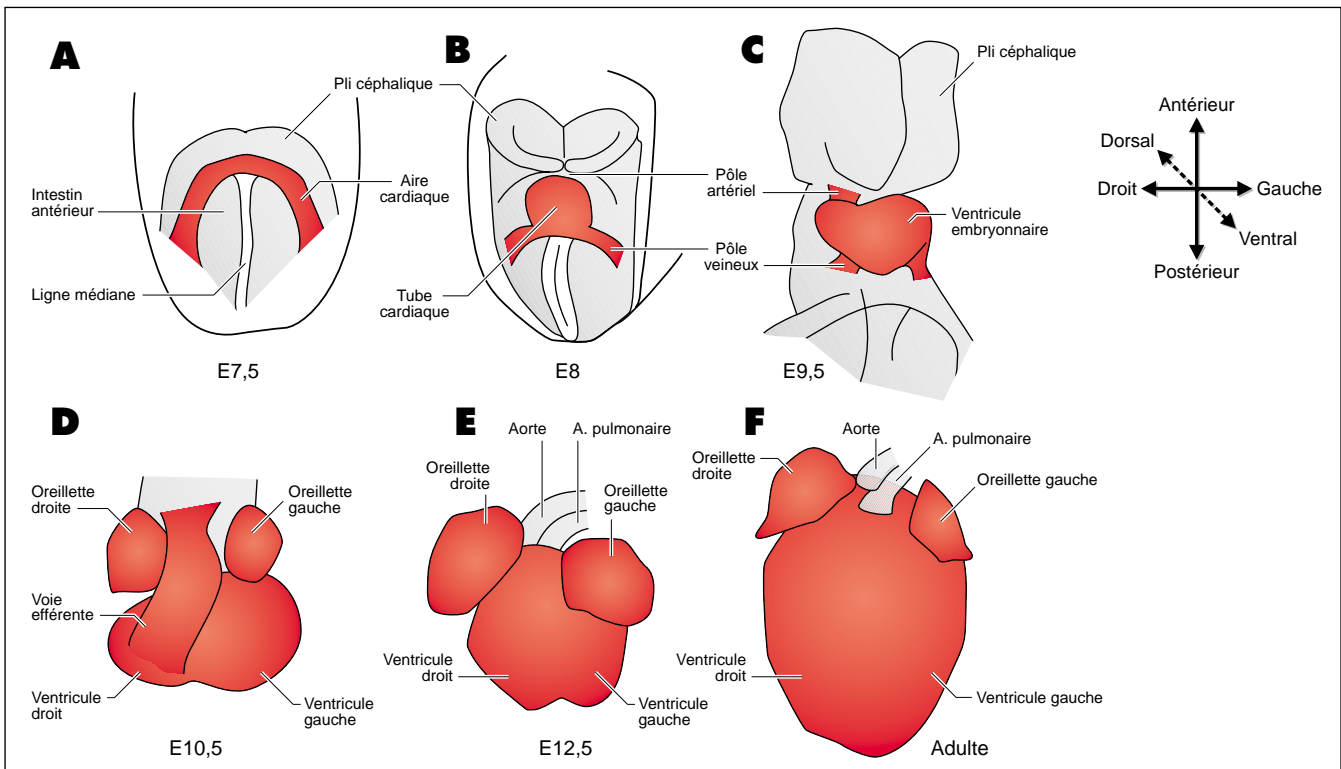


Figure 1. **Schéma du développement du cœur chez la souris.** A. Les premiers cardiocytes se différencient de part et d'autre de la ligne médiane au jour 7 de l'embryogenèse (E7). B. L'inflexion cardiaque se passe entre E8 et E8,5; le pôle artériel est en position antérieure, le pôle veineux, en position postérieure. C. À E9,5, le pôle veineux s'est déplacé dorsalement et antérieurement et le tube cardiaque forme un S. D, E. De E10,5 à E12,5, la septation des chambres cardiaques engendre les cavités droite et gauche à partir d'une oreillette primitive, d'un ventricule primitif et de la voie efférente. F. Cœur adulte. (D'après [15].)

Transgène	Voie efférente	Ventricules		Canal AV	Oreillettes		Voie afférente	Référence
		Droit	Gauche		Droite	Gauche		
<i>MLC3F-nlacZ-2E</i>	□	□	■	■	■	□	□	[7]
<i>MLC3F-nlacZ-9</i>	□	■	■	■	■	■	□	[14]
<i>α-cardiac actin--nlacZ</i>	□	□	■	■	■	□	□	[43]
<i>MLC2V-lacZ</i>	■	■	□	□	□	□	□	[8]
<i>Desmine-nlacZ</i>	■	■	□	□	□	□	□	[9]
<i>hdf-lacZ</i>	■	■	□	□	□	□	□	[30]
<i>Tnls-CAT</i>	□	■	■	■	■	■	□	[13]

Le niveau d'expression est dégradé : ■ > ■ > □ > □

Figure 2. **Transgènes dont l'expression est régionalisée dans le myocarde embryonnaire de la souris.** Les transgènes sont composés d'un gène rapporteur, *nlacZ* ou CAT, sous le contrôle transcriptionnel de promoteurs et séquences activatrices de gènes exprimés dans le cœur. MLC: myosin light chain, *hdf*: heart defect, *Tnls*: troponine I lente, canal AV: canal auriculo-ventriculaire.

ventricular) et β -MHC (*myosin heavy chain*), est restreinte dès E9,5 au compartiment ventriculaire du cœur [5, 6]. D'autres gènes ventriculaires restent exprimés dans le compartiment auriculaire jusqu'à E16. Les changements dans le profil d'expression des gènes cardiaques ne suivent donc pas un programme synchrone [6].

Depuis peu nous constatons que la régionalisation transcriptionnelle dans le cœur est beaucoup plus répandue que l'étude des gènes spécifiques des oreillettes et des ventricules ne l'aurait indiqué. Des différences transcriptionnelles ont été mises en évidence entre les compartiments gauche et droit du cœur

pendant l'embryogenèse et de telles différences peuvent persister dans le cœur adulte. Ces observations ont d'abord été effectuées sur des souris transgéniques, porteuses du gène rapporteur β -galactosidase sous le contrôle transcriptionnel de promoteurs et de séquences activatrices cardiaques diverses (figure 2). Par exemple, certaines séquences régulatrices (*MLC3F-nlacZ-2E*) du gène rapporteur *nlacZ* (qui code pour la β -galactosidase) dans le ventricule gauche et l'oreillette droite chez l'embryon et l'adulte [7] (figure 3A-C). Étant donné que les transcrits *nlacZ* sont aussi restreints au ventricule gauche, la régionalisation est un phénomène transcriptionnel et non post-transcriptionnel. Ce profil régionalisé a été observé dans plusieurs lignées de souris transgéniques, et correspond donc à une réelle régulation par les séquences portées par le transgène, plutôt qu'à un effet de position dû au site d'intégration. Cette régionalisation est mise en place très tôt pendant la cardiogenèse, dès le début de l'inflexion cardiaque. Avant cette étape, le transgène est exprimé à la fois dans les parties gauche et droite du tube cardiaque (figure 3B). Un profil complémentaire est obtenu avec d'autres transgènes contenant

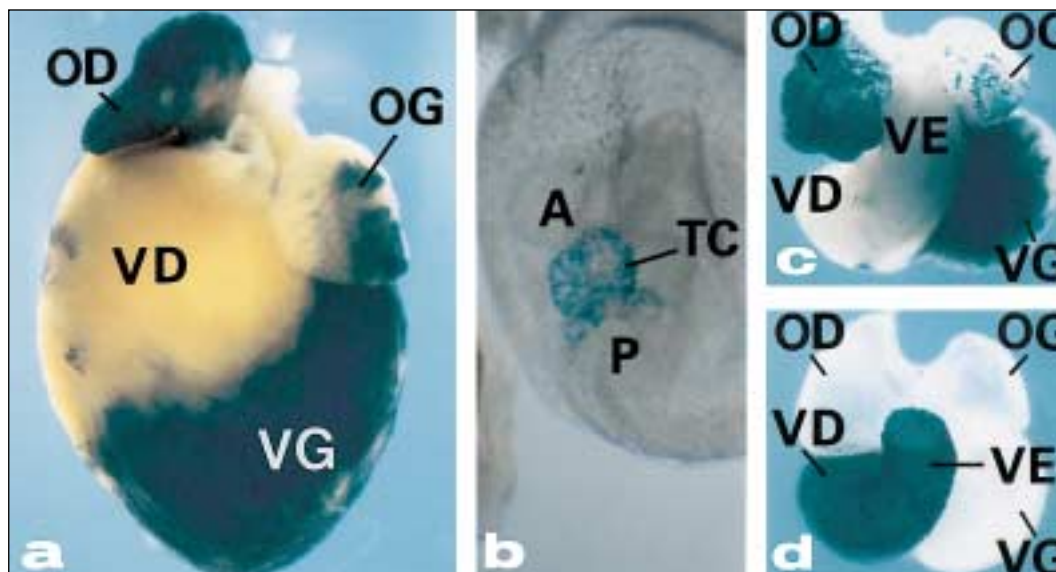


Figure 3. **Expression régionalisée de transgènes cardiaques.** A. L'expression d'un transgène MLC3F (construction MLC3F-nlacZ-2, dont l'activité β -galactosidase est révélée par coloration par le X-gal) est régionalisée au ventricule gauche (VG) et à l'oreillette droite (OD) du cœur adulte, avec une faible expression dans l'oreillette gauche (OG). B. Avant l'inflexion cardiaque (E8), l'expression de ce transgène est symétrique dans

le tube cardiaque (TC); A, antérieur; P, postérieur. C. A E10,5, le profil d'expression régionalisé du transgène est déjà établi [7, 14]. D. L'expression d'un transgène MLC1V est restreinte au ventricule embryonnaire droit (VD) et à la voie efférente (VE) à E10,5 et donc montre une régionalisation complémentaire de celle du transgène MLC3F.

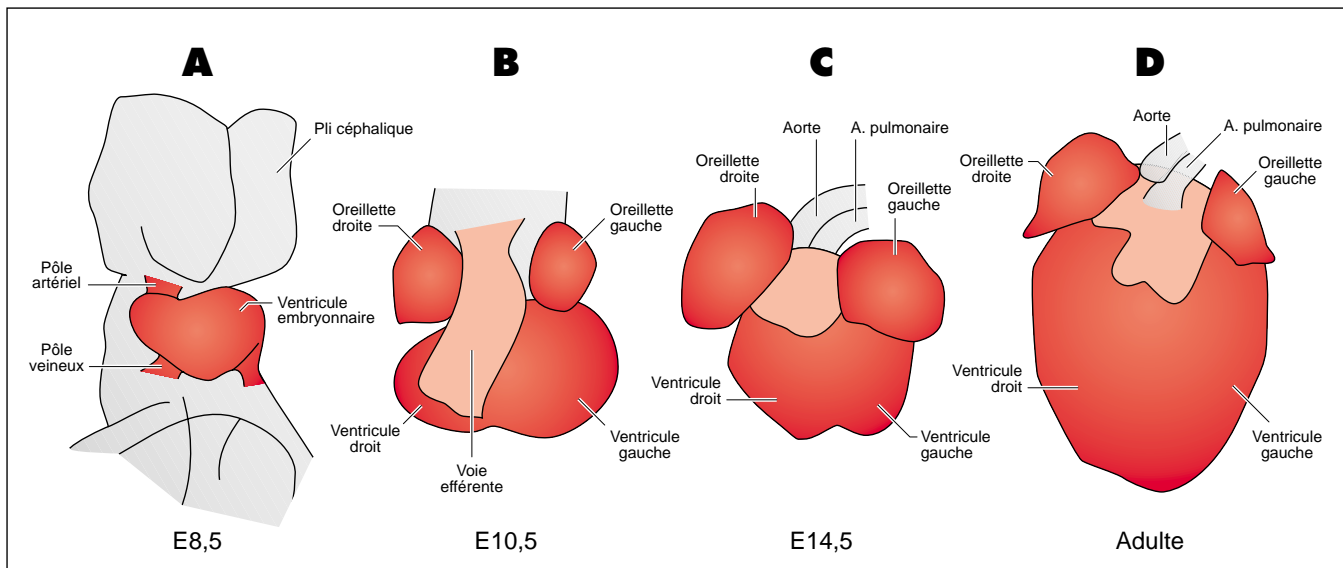


Figure 4. **La voie efférente du cœur embryonnaire est incorporée dans les ventricules au cours de l'embryogenèse.** Cela est illustré par le profil d'expression (en rouge) d'un transgène *MLC3F* (construction *MLC3F-nlacZ-9*) qui n'est pas exprimé dans ce compartiment transcriptionnel (voie efférente en rose) du cœur [14]. En rouge: myocarde exprimant le transgène; en rose: myocarde n'exprimant pas le transgène. (D'après [15].)

nlacZ sous le contrôle des séquences régulatrices des gènes *MLC2V* [8], *desmine* [9] et *MLC1V* (Kelly et Buckingham, non publié); ces derniers sont exprimés dans le ventricule droit et la voie efférente du cœur embryonnaire (figure 3D).

Ces données suggèrent que l'expression d'un gène cardiaque dans plusieurs compartiments du cœur est contrôlée par des éléments séparables agissant *in cis*, qui sont, soit inclus, soit absents des transgènes: le profil d'expression du gène endogène est donc le produit de modules transcriptionnels différents. Cela dit, il a été démontré récemment que plusieurs gènes endogènes cardiaques sont soumis au même phénomène de régionalisation que les transgènes. Ainsi, l'expression du facteur auriculaire natriurétique (ANF) est restreinte au ventricule gauche avant de devenir spécifique des oreillettes [10]; de même, les transcrits de la créatine phosphokinase (MCK) s'accumulent préférentiellement dans le ventricule droit, quand l'expression de ce gène débute vers E12,5 [11]. On peut citer également l'exemple de la connexine 40, dont l'expression est transitoirement restreinte au ventricule gauche à E10,5 [12]. D'après une analyse plus fine, il semble que

beaucoup de gènes dont l'expression devient restreinte aux oreillettes, y compris celui de la chaîne lourde de la myosine α -MHC, montrent, transitoirement, un profil régionalisé entre les compartiments gauche et droit ventriculaire pendant la cardiogenèse. D'ailleurs, des résultats en nombre croissant indiquent qu'il existe d'autres compartiments transcriptionnels cardiaques. La voie efférente, par exemple, n'exprime pas les transgènes *TnIs-CAT* (séquences du promoteur du gène de la tropomyosine I, gène rapporteur *CAT*) [13] ni *MLC3F-nlacZ-9* [14], qui sont exprimés dans les deux ventricules (voir plus loin), tandis que l'expression d'autres transgènes est restreinte à ce compartiment du cœur dès E13. Plusieurs marqueurs, à la fois transgènes et gènes endogènes, permettent ainsi d'identifier comme sous-compartiments cardiaques des domaines particuliers, tels que les ventricules et oreillettes gauches et droits, l'AVC ou la voie efférente, et nous amènent à suggérer que la formation du cœur fait appel à une organisation transcriptionnelle plus complexe que décrite auparavant [15]. La signification fonctionnelle d'une telle sous-compartmentalisation cardiaque reste à préciser.

Les marqueurs régionalisés et la morphogenèse du cœur

La définition de plusieurs compartiments transcriptionnels dans le cœur en formation étend notre compréhension de la morphogenèse cardiaque, nous permettant de « suivre » les destins de sous-populations de cellules cardiaques pendant la cardiogenèse. L'analyse de ces marqueurs régionalisés vient en complément d'autres approches morphologiques et génétiques. Les souris *MLC3F-nlacZ*, par exemple, ont été utilisées pour étudier la contribution de régions particulières du cœur embryonnaire au cœur adulte [14]. L'étude du profil d'expression du transgène *MLC3F-nlacZ-9* a ainsi contribué à résoudre la question du destin de la voie efférente du cœur (figure 4). En effet, ce transgène n'est pas exprimé dans la voie efférente, mais l'est dans les ventricules embryonnaires gauche et droit. Chez l'adulte, une région du ventricule droit sous l'artère pulmonaire n'exprime pas le transgène, non plus qu'une région sous-aortique du ventricule gauche. L'analyse du profil d'expression du transgène pendant les stades intermédiaires du dévelop-

pement fœtal a permis de conclure que le myocarde de la voie efférente est incorporé dans les ventricules pendant la morphogenèse du cœur, conclusion également suggérée par des études sur l'expression des transgènes montrant un profil d'expression complémentaire [14]. Les analyses de profils d'expression ne constituent évidemment pas une preuve de lignage *stricto sensu* mais fournissent plutôt des indications. Ces marqueurs régionalisés peuvent également contribuer à l'étude du développement anormal du cœur. Plusieurs malformations du cœur chez l'homme touchent un ou deux sous-compartiments cardiaques, soulignant l'importance médicale d'une connaissance précise de la morphogenèse des différentes régions cardiaques, et de leurs contributions à la formation des structures définitives. Plusieurs modèles de ces malformations existent chez la souris, souvent centrés sur le processus de septation. Ont ainsi été décrites des souris mutantes spontanées et des souris mutantes engendrées par l'inactivation ciblée d'un gène particulier [16]. Par exemple, les souris mutantes pour le récepteur de l'acide rétinoïque RXR α présentent plusieurs défauts ventriculaires [17]; un croisement avec des souris porteuses d'un transgène *MLC2V-lacZ* exprimé dans le ventricule droit a montré que l'expression régionalisée est néanmoins conservée, permettant ainsi une analyse plus fine des mutants [8]. L'isométrie* des oreillettes est une caractéristique des syndromes d'hétérotaxie** chez l'homme; elle est également observée avec une fréquence élevée chez les souris mutantes dont la détermination de l'axe gauche-droite est perturbée, telles que les souris *iv/iv* (*m/s n° 6-7, vol. 9, p. 816*) [18]. Le croisement entre ces souris et les souris *MLC3F-nlacZ-2E* qui présentent une régionalisation du transgène au ventricule gauche et à l'oreillette droite, permet l'identification d'embryons avec une isométrie des oreillettes avant leur identification morphologique. Les croisements entre les sou-

ris transgéniques et des mutants présentant des défauts de la voie efférente, telles que les souris *splotch*, devraient permettre de définir la contribution des cardiocytes ventriculaires gauche ou droit, ou de la voie efférente, aux structures malformées. Ces quelques exemples illustrent le potentiel de ces souris transgéniques comme source de marqueurs régionalisés permettant une analyse morphogénétique fine de la cardiogenèse, avec des implications dans le domaine de la pathologie. Nous avons appelé de telles souris, qui permettent une définition des sous-compartiments du cœur, des « souris *cardiosensor* » [15].

L'origine des sous-domaines transcriptionnels du cœur

Quelle est l'origine embryologique de ces sous-domaines transcriptionnels du cœur et quelle est la base moléculaire de cette compartimentalisation? Une structure en trois dimensions, telle que le cœur, est modelée suivant plusieurs axes; la régionalisation cardiaque semble être le résultat de deux types d'informations agissant en série, d'abord sur l'axe antéro-postérieur puis, précédant l'inflexion du tube cardiaque, sur l'axe gauche-droite de l'embryon (voir figure 1).

L'axe antéro-postérieur

Plusieurs observations suggèrent que le cœur est modelé suivant l'axe antéro-postérieur. D'abord, le tube cardiaque se forme selon une séquence définie avec agrandissement du myocarde postérieurement et antérieurement à la future région ventriculaire [19-21]. Ce modèle de la formation segmentée du cœur résulte d'expériences réalisées chez le poulet, de traçage cellulaire avec les particules FeO, l'encre de Chine et des marqueurs radioactifs, qui démontrent que la première région du cœur à se former est la région apicale du ventricule droit, suivie par la région apicale du ventricule gauche. Les ventricules droit et gauche seraient donc d'abord différenciés sur l'axe antéro-postérieur (A-P) de l'embryon. Ensuite, le cœur s'étend par ajout du myocarde qui contribue aux régions adjacentes, à la

voie efférente dans la région antérieure, à l'AVC et aux oreillettes dans la région postérieure. La position relative des cellules précardiaques sur l'axe A-P semble être conservée entre la gastrulation et la formation du tube cardiaque, ce qui suggère que les différentes régions du cœur sont préfigurées dans le mésoderme précardiaque, et peuvent être spécifiées au moment de la migration des cellules à travers la ligne primitive [22, 23].

La première manifestation des différences le long de l'axe A-P du myocarde est un gradient intrinsèque dans le rythme cardiaque: des explants prélevés à partir de la région postérieure battent plus vite que ceux de la région antérieure, et cette différence est déterminée par les signaux provenant des tissus adjacents, tels que l'endoderme [24]. D'autres expériences suggèrent que, même si elles sont spécifiées (état réversible) au moment de la gastrulation, ces cellules ne sont déterminées (état irréversible) qu'après la différenciation – cette dernière ayant également lieu dans une direction A-P [25]. L'importance de la position des cardiocytes sur l'axe A-P est aussi démontrée par des expériences avec l'acide rétinoïque, une molécule qui perturbe l'axe A-P de l'embryon. Des anomalies cardiaques sont observées chez l'embryon de rat qui manque d'acide rétinoïque, et le traitement des embryons de plusieurs espèces par l'acide rétinoïque provoque des malformations cardiaques, telles que la délétion de la partie antérieure du cœur et la *cardia bifida**** (voir [26]). Chez le poisson zèbre, un gradient de sensibilité à l'acide rétinoïque a été mis en évidence le long de l'axe A-P du cœur et, chez le poulet, il postriorise le tube cardiaque et augmente le domaine d'expression des gènes exprimés dans la partie postérieure du cœur [27, 28]. Cette extension du domaine postérieur semble être le résultat d'une conversion des myocytes d'un lignage (antérieur) en un autre (postérieur). Les malformations cardiaques des souris mutantes pour les récepteurs de l'acide rétinoïque sont en accord avec un rôle de cette molécule dans la cardiogenèse, et les

* Développement de deux oreillettes gauche ou droite.

** Perte d'information gauche/droite des organes qui se développent de manière asymétrique, tels que le cœur.

*** Non-fusion des régions péricardiaques gauche et droite résultant dans le développement de deux tubes cardiaques.

combinaisons de mutations dans les gènes *RAR* et *RXR* provoquent des défauts sélectifs dans des régions différentes du cœur, suggérant des fonctions régionalisées distinctes (*m/s n° 1, 1995, p. 132*) (voir [26]). Le rôle possible des gènes *Hox*, cibles de l'acide rétinoïque, dans la détermination du positionnement A-P dans le cœur, reste à préciser.

En résumé, les profils d'expression des transgènes régionalisés dans le cœur peuvent être corrélés à un modèle segmenté de la cardiogenèse. En outre, l'analyse des mutants de souris et de poisson zèbre présentant des défauts cardiaques conforte ce modèle. Les mutations spécifiques d'un compartiment du cœur du poisson zèbre ont été identifiées par mutagenèse à grande échelle (*m/s n° 1, vol. 13, p. 132*) et incluent des délétions de la région ventriculaire, telles que la mutation *pandora* [29]. Chez la souris, la mutation insertionnelle *hdf* (*heart defect*) est caractérisée par un défaut du segment antérieur du tube cardiaque [30]. Le cœur semble donc être engendré par l'addition progressive de segments, chacun sous un contrôle génétique spécifique, et l'analyse détaillée de ces modèles mutants devrait faciliter l'identification de molécules qui jouent un rôle important dans ce processus.

L'axe droite/gauche

La régionalisation transcriptionnelle, évidente dès le début de l'inflexion cardiaque, va donc être, au moins en partie, le résultat du positionnement sur l'axe A-P. Il existe néanmoins une deuxième contribution importante à la régionalisation cardiaque: la latéralité, c'est-à-dire l'interprétation par le cœur précoce de l'axe gauche-droite de l'embryon. Cette interprétation de la latéralité suivrait l'acquisition de l'information A-P par le cœur.

L'inflexion cardiaque à droite est précédée par un déplacement transitoire à gauche, résultat d'un développement asymétrique dans la région postérieure du cœur. L'origine de cette asymétrie reste inconnue mais semble être le produit de l'expression asymétrique de molécules de signalisation dans le mésoderme latéral. La régionalisation du côté droit

ou gauche de l'embryon de plusieurs molécules a été mise en évidence récemment chez plusieurs espèces et contribue à une cascade d'informations par laquelle les organes asymétriques du corps reçoivent leur détermination gauche/droite (*figure 5; voir [31]*). Cette cascade semble débiter dans le nœud (région organisatrice du mésoderme) et les structures axiales, et implique au moins deux molécules de la famille des TGF β , nodal et lefty (*m/s n° 1, vol. 13, p. 126; n° 2, vol. 14, p. 234*), dont le domaine d'expression dans le mésoderme latéral gauche s'étend jusqu'au niveau postérieur du cœur (*voir [31]*). Chez les souris mutantes *iv/iv*, l'expression de ces gènes et, par conséquent, la direction de l'inflexion cardiaque se font au hasard. Chez le poisson zèbre, BMP4 est asymétriquement distribué dans la région du cœur précoce; cette expression et la direction de l'inflexion sont perturbées lors de diverses mutations qui modifient les structures axiales [32]. Comment cette information est-elle traduite par le cœur? Chez le poulet, plusieurs molécules de la matrice extracellulaire sont localisées de manière asymétrique dans la région postérieure du tube cardiaque, telles que le produit du gène *flexine* à gauche, et il se peut que ces molécules jouent un rôle dans le démarrage de l'inflexion [33].

Au moment de l'inflexion, le myocarde est donc soumis à un code positionnel qui est le produit d'une régionalisation sur l'axe A-P et des signaux de latéralité. Ce code entraîne la régionalisation de plusieurs gènes exprimés dans le cœur embryonnaire. L'importance des deux types de signaux semble être différente dans des régions distinctes du cœur. Les ventricules gauche et droit sont d'abord établis suivant l'axe A-P du cœur et ne semblent pas être touchés par les mutations qui provoquent une perturbation de la détermination gauche-droite comme chez les souris *iv/iv*; au contraire, l'identité des oreillettes gauche et droite peut être perturbée chez ces mutants [18]. Ces différences entre les compartiments du cœur peuvent éventuellement être mises en rapport avec l'ordre temporel de l'incorporation dans le tube cardiaque des cellules qui vont contribuer à ces compartiments.

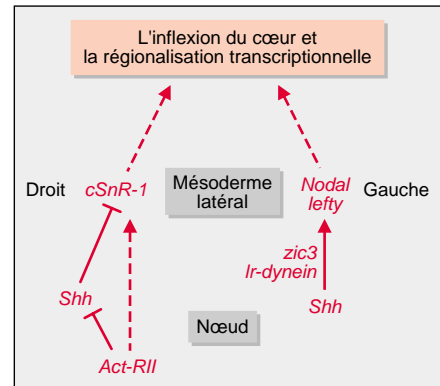


Figure 5. Les origines de l'asymétrie embryonnaire gauche/droite avant l'inflexion cardiaque. (D'après [31].) Résultat d'études menées sur plusieurs espèces, ce schéma montre la restriction de la molécule de transmission du signal Sonic hedgehog (*Shh*) dans la partie gauche du nœud par la voie de transmission du signal activine via le récepteur *Act-RIIA*, et l'expression résultante des facteurs de la famille TGF β , *nodal* et *lefty*, à gauche, et d'un gène à doigts de zinc, *snail-related 1* (*cSnR-1*), à droite dans le mésoderme latéral. Deux gènes récemment identifiés qui participeraient à la voie de latéralité sont *zic3*, un gène impliqué dans l'hétérotaxie chez l'homme, et *left/right-dynein* (*Ir-dynein*), à l'origine du phénotype mutant des souris *iv/iv* (voir [44]).

La régionalisation et les facteurs de transcription

Comme nous l'avons vu, la régionalisation dans le myocarde est le résultat d'une régionalisation du potentiel transcriptionnel. Quels facteurs de transcription sont donc à la base d'une telle régionalisation? Au moins quatre familles de facteurs de transcription semblent être impliquées dans la régulation des gènes cardiaques: les protéines à boîte homéo de la famille *Nkx*, deux facteurs à motif bHLH, *eHAND* (*Hand1*) et *dHAND* (*Hand2*) (*m/s n° 6-7, vol. 14, p. 802*), les protéines qui renferment une boîte MADS dont *SRF* et les membres de la famille *MEF2*, et les protéines à doigt de zinc, *GATA-4*, 5 et 6 (*figure 6A; voir [34]*). Deux approches donnent un début de réponse à la question ci-dessus: la définition des éléments agissant en cis dans les transgènes régionalisés, et

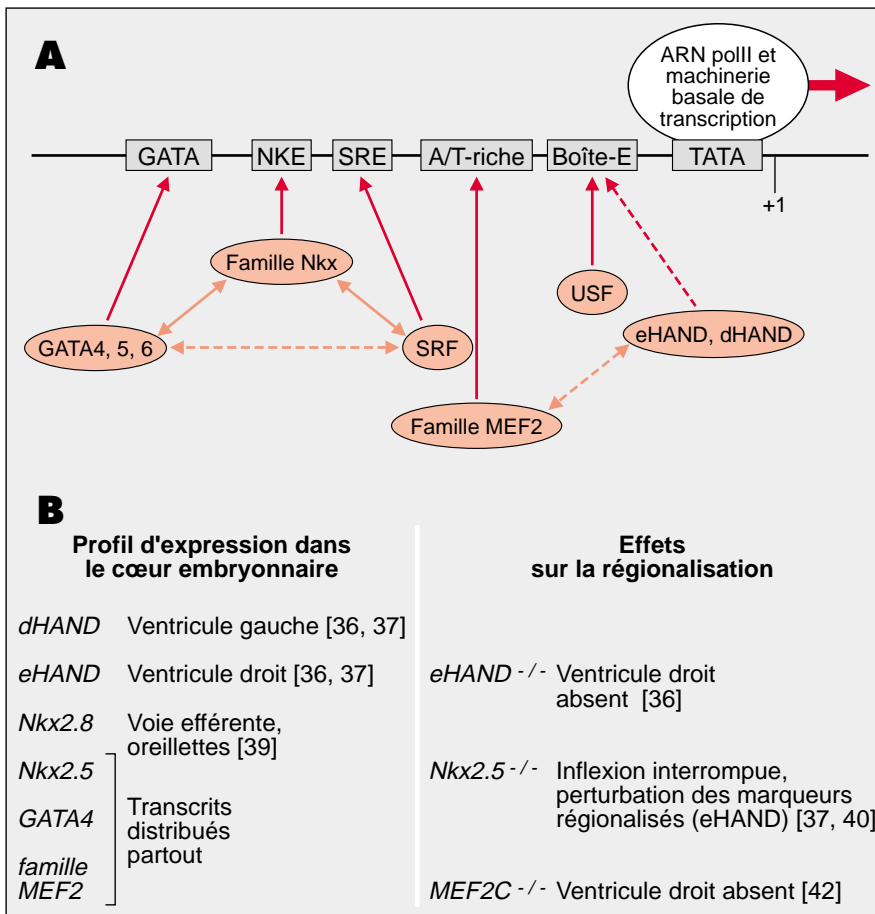


Figure 6. **Facteurs de transcription agissant sur le cœur.** **A.** Plusieurs familles de facteurs de transcription jouent un rôle dans l'expression des gènes du myocarde. Ces facteurs interagissent entre eux (flèches roses) et avec des motifs contenus dans les promoteurs ou séquences activatrices myocardiques (flèches rouges). Les interactions potentielles sont indiquées par des flèches pointillées (voir [34] et m/s n° 3, vol. 11, p. 395). **B.** Régionalisation des facteurs de transcription dans le cœur embryonnaire et effets sur la régionalisation du cœur de souris porteuses de mutations dans ces facteurs.

l'analyse des profils d'expression et des fonctions des facteurs qui régulent la transcription cardiaque.

Une analyse des motifs impliqués dans la régionalisation de transgènes dans le myocarde a été effectuée dans trois cas. Une région de 28 pb, contenant les motifs *Hf-1a* et *Hf-1b/MEF2* est suffisante pour l'expression restreinte au ventricule droit d'un gène rapporteur *lacZ* sous contrôle d'un promoteur minimal du gène *MLC2V* [8]. Ni les gènes de la famille *MEF2*, ni *YB-1* dont le produit se fixe au site *HF-1a*, ni son co-facteur CARP ne sont régionalisés dans le cœur embryonnaire. *MEF2* est également impliqué dans l'expression d'un transgène *desmine-lacZ* dans le ventricule droit [9].

Une autre protéine à boîte MADS, SRF, est essentielle à l'expression d'un transgène *SM22 α -lacZ* dans le ventricule droit [35]. Dans ces deux derniers cas, il n'est pas possible de distinguer entre un rôle des éléments impliqués dans la régionalisation *per se* et un rôle plus général dans l'expression spécifique du myocarde: les éléments importants pour la régionalisation peuvent donc être ailleurs dans ces transgènes.

Parmi les facteurs de transcription cardiaques analysés par hybridation *in situ*, à ce jour, trois montrent un profil d'expression régionalisé dans le myocarde: *eHAND* et *dHAND* dans le cœur de la souris, et *Nkx2.8* chez le poulet (figure 6B). Quoique leur rôle

comme facteurs de transcription reste à démontrer, *eHAND* et *dHAND* contiennent un motif de liaison à l'ADN et pourraient interagir avec des séquences CANNTG présentes dans les régions régulatrices de plusieurs gènes cardiaques [34]. Les deux gènes sont exprimés d'une manière dynamique dans le myocarde: *eHAND* est exprimé dans la partie gauche des ventricules embryonnaires dès le début de l'inflexion, profil qui est inversé dans les cas de *situs inversus* (où le cœur tourne vers la gauche). La protéine *eHAND* est donc une molécule candidate pour le contrôle du processus d'inflexion et de la régulation des gènes dont le profil d'expression est restreint au ventricule gauche [36, 37]. Le gène *dHAND* est exprimé de manière complémentaire dans le ventricule droit du cœur embryonnaire. Les deux gènes sont également exprimés dans la voie efférente. Contrairement à ce que l'on observe chez la souris, l'expression de ces deux gènes est symétrique dans le cœur du poulet [38]. Les transcrits du gène *Nkx2.8* sont aussi exprimés d'une manière dynamique: d'abord dans le cœur entier, ensuite dans les oreillettes et la voie efférente et, finalement, dans les régions extracardiaques des arcs branchiaux [39]. Pour la plupart des facteurs de transcription exprimés dans le cœur, une éventuelle régionalisation reste à démontrer, soit au niveau des transcrits ou de la protéine, soit au niveau du fonctionnement, à la suite d'interaction avec d'autres facteurs dont l'expression est restreinte à des compartiments particuliers. Il faut dire qu'une régionalisation stricte des facteurs de transcription n'est pas forcément nécessaire; des différences de niveau d'expression de plusieurs facteurs couplées à des différences de seuil d'activation de leur gènes cibles peuvent également aboutir au même phénomène.

Les effets d'une perte de facteur de transcription sur la morphogénèse du cœur

L'analyse fonctionnelle des facteurs de transcription cardiaque par mutagenèse dirigée donne quelques indications sur le rôle de ces facteurs

dans la régionalisation du myocarde (figure 6B). Les souris avec deux allèles nuls de *dHAND* meurent à E10,5 et le ventricule droit est absent, suggérant que *dHAND* est essentiel au développement de ce compartiment [36]. Chez le poulet, les expériences d'antisens ont montré que la perte des deux transcrits *eHAND* et *dHAND* bloque le développement du cœur au début de l'inflexion (*m/s n° 6-7, vol. 14, p. 802*) [38].

L'inactivation du gène *Nkx2.5* bloque l'inflexion du cœur [40]. Bien que *Nkx2.5* soit exprimé normalement partout dans le cœur, l'expression de quelques marqueurs est perturbée de manière régionalisée. Par exemple, *CARP*, normalement exprimé le long du tube cardiaque, n'est exprimé que dans la région postérieure du cœur mutant, suggérant que la transcription dans les différentes régions du cœur est plus ou moins dépendante du facteur *Nkx2.5* [41]. L'expression de quelques marqueurs exprimés de manière régionalisée, tels que ANF ou *eHAND*, est abolie dans les cœurs mutants [37]. La protéine *Nkx2.5* est donc essentielle pour l'activation (et peut-être aussi la régionalisation) de ces gènes.

Le gène *MEF2C* est exprimé lui aussi le long du cœur embryonnaire mais son inactivation donne un phénotype régionalisé dans le cœur, semblable, mais en plus sévère, à celui des embryons mutants pour *dHAND*, avec perte du ventricule droit [42]. Ce phénotype régionalisé pourrait suggérer que *MEF2C* interagit avec d'autres facteurs régionalisés dans le cœur, tels que *dHAND* lui-même. Dans le cas des mutations de *dHAND* et *MEF2C*, il reste à déterminer si la mutation bloque la prolifération des cardiocytes déjà destinés à contribuer au ventricule droit ou si la mutation provoque la délétion de cette population de précurseurs.

Des expériences, déjà en cours dans plusieurs laboratoires, devraient permettre d'éclaircir les interactions éventuelles entre ces différents facteurs de transcription et leurs rôles dans la régionalisation du myocarde. Une question-clé est évidemment de savoir comment de tels facteurs interagissent et intègrent l'information A-P et gauche-droite qui préfigure la régionalisation de marqueurs de différenciation. Quels sont les méca-

nismes à la base de la régionalisation de ces facteurs de transcription eux-mêmes, et comment agit de manière régionalisée un facteur, lui-même non régionalisé ? La réponse à l'ensemble de ces questions devrait mener à une compréhension de la base génétique de la cardiogenèse sur un plan modulaire, avec des implications importantes pour la compréhension des maladies morphogénétiques du cœur ■

Remerciements

Nous remercions nos collègues Diego Franco et Antoon Moorman pour leurs discussions, et Juliette Hadchouel pour son aide dans la rédaction du manuscrit. Le laboratoire de M.B. bénéficie du support financier de l'Institut Pasteur, du Cnrs, de l'AFM et de la CE (Programmes Biomed et Biotechnologie). R.K. remercie la CE (PL 950228) pour son soutien financier.

RÉFÉRENCES

- Larsen WJ. *Human embryology*. New York: Churchill Livingstone, 1993, chapitre 7: 131-65.
- Icardo JM. Developmental biology of the vertebrate heart. *J Exp Zool* 1996; 275: 144-61.
- Moorman AFM, Lamers WH. Molecular anatomy of the developing heart. *Trends Cardiovasc Med* 1994; 4: 257-64.
- Yutzey KE, Rhee JT, Bader D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of antero-posterior polarity in the developing chicken heart. *Development* 1994; 120: 871-83.
- O'Brien TX, Lee KJ, Chien KR. Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5157-61.
- Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol* 1990; 111: 2427-36.
- Kelly R, Alonso S, Tajbakhsh S, Cossu G, Buckingham M. Myosin light chain 3F regulatory sequences confer regionalized cardiac and skeletal muscle expression in transgenic mice. *J Cell Biol* 1995; 129: 383-96.
- Ross RS, Navankasattusas S, Harvey RP, Chien KR. An HF-1a/HF-1b/MEF-2 combinatorial element confers cardiac ventricular specificity and establishes an anterior-posterior gradient of expression. *Development* 1996; 122: 1799-809.
- Kuisk IR, Li H, Tran D, Capetanaki Y. A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 1996; 174: 1-13.
- Zeller R, Bloch KD, Williams BS, Arceci RJ, Seidman CE. Localized expression of the atrial natriuretic factor gene during cardiac embryogenesis. *Genes Dev* 1987; 1: 693-8.
- Lyons GE. *In situ* analysis of the cardiac muscle gene program during embryogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 1994; 4: 70-7.
- Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Briand JP, Willecke K, Gros D, Théveniauc-Ruissy M. Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circ Res* 1997; 81: 423-37.
- Zhu L, Lyons GE, Juhasz O, Joya JE, Hardeman EC, Wade R. Developmental regulation of troponin I isoform genes in striated muscles of transgenic mice. *Dev Biol* 1995; 169: 487-503.
- Franco D, Kelly R, Lamers W, Buckingham M, Moorman AFM. Regionalised transcriptional domains of myosin light chain 3F transgenes in the embryonic mouse heart: morphogenetic implications. *Dev Biol* 1997; 188: 17-33.
- Kelly R, Franco D, Moorman AFM, Buckingham M. Chamber-specific myofibrillar gene expression: implications for A/P patterning. In: Rosenthal N, Harvey R, eds. *Heart Development*. New York: Academic Press, 1998 (sous-presses).
- Rossant J. Mouse mutants and cardiac development: new molecular insights into cardiogenesis. *Circ Res* 1996; 78: 349-53.
- Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 1994; 8: 1007-18.
- Seo JW, Brown NA, Ho SY, Anderson RH. Abnormal laterality and congenital cardiac anomalies. Relations of visceral and cardiac morphologies in the *iv/iv* mouse. *Circulation* 1992; 86: 642-50.
- Rosenquist GC, DeHaan RL. Migration of precardiac cells in the chick embryo: a radioautographic study. *Carnegie Inst Wash Contrib Embryol* 1966; 38: 111-21.
- Argüello C, De la Cruz MV, Gomez CS. Experimental study of the formation of the heart tube in the chick embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1975; 33: 1-11.
- De la Cruz MV, Sanchez-Gomez C, Palomino MA. The primitive cardiac regions in the straight tube heart (stage 9) and their anatomical expression in the mature heart: an experimental study in the chick embryo. *J Anat* 1989; 165: 121-31.
- Stalsberg H, De Haan RL. The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol* 1969; 19: 128-59.
- Garcia-Martinez V, Schoenwolf GC. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol* 1993; 159: 706-19.

RÉFÉRENCES

24. Satin J, Fujii S, De Haan RL. Development of cardiac beat rate in early chick embryos is regulated by regional cues. *Dev Biol* 1988; 129: 103-13.
25. Inagaki T, Garcia-Martinez V, Schoenwolf GC. Regulative ability of the prospective cardiogenic and vasculogenic areas of the primitive streak during avian gastrulation. *Dev Dyn* 1993; 197: 57-68.
26. Smith, SM, Dickman, ED. New insights into retinoid signalling in cardiac development and physiology. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7: 324-9.
27. Stainier DY, Fishman MC. Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity. *Dev Biol* 1992; 153: 91-101.
28. Yutzey KE, Gannon M, Bader D. Diversification of cardiomyogenic cell lineages *in vitro*. *Dev Biol* 1995; 170: 531-41.
29. Stainier DYR, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE, Mohideen MAPK, Neuhaus SCF, Solnica-Krezel L, Schier AF, Zwartkruis F, Stemple DL, Malicki J, Driever W, Fishman MC. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* 1996; 123: 285-92.
30. Yamamura H, Zhang M, Markwald RR, Mjaatvedt CH. A heart segmental defect in the anterior-posterior axis of a transgenic mutant mouse. *Dev Biol* 1997; 186: 58-72.
31. King T, Brown NA. Embryonic asymmetry: left TGF β at the right time? *Curr Biol* 1997; 7: R212-5.
32. Chen JN, Van Eeden FJM, Warren K, Chin A, Nusslein-Volhard C, Haffter P, Fishman MC. Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development* 1997; 124: 4373-82.
33. Tsuda T, Philp N, Zile MH, Linask, KK. Left-right asymmetric localization of flectin in the extracellular matrix during heart looping. *Dev Biol* 1996; 173: 39-50.
34. Olson EN, Srivastava D. Molecular pathways controlling heart development. *Science* 1996; 272: 671-6.
35. Kim S, Ip HS, Lu MM, Clendenin C, Parmacek MS. A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle sublineages. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 2266-78.
36. Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor dHAND. *Nat Genet* 1997; 16: 154-60.
37. Biben C, Harvey RP. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene *eHand* during murine heart development. *Genes Dev* 1997; 11: 1357-69.
38. Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* 1995; 270: 1995-9.
39. Reecy JM, Yamada M, Cummings K, Sosic D, Chen CY, Eichele G, Olson EN, Schwartz RJ. Chicken *Nkx2-8*: a novel homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and branchial cleft -2 and -3 endoderm. *Dev Biol* 1997; 188: 295-311.
40. Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeobox gene *Nkx2.5*. *Genes Dev* 1995; 9: 1654-66.
41. Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo H-C, Harvey RP, Chien K. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the *Nkx2-5* homeobox gene pathway. *Development* 1997; 124: 793-804.
42. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 1997; 276: 1404-7.
43. Biben C, Hadchouel J, Tajbakhsh S, Buckingham M. Developmental and tissue-specific regulation of the murine cardiac actin gene *in vivo* depends on distinct skeletal and cardiac muscle-specific enhancer elements in addition to the proximal promoter. *Dev Biol* 1996; 173: 200-12.
44. Srivastava D. Left, right... which way to turn? *Nat Genet* 1997; 17: 252-4.

TIRÉS À PART

M.E. Buckingham.

Summary

Regionalisation of myocardial gene expression: implications for heart morphogenesis

The vertebrate heart is composed of a series of distinct morphological compartments which are established in the early embryo and remodelled during subsequent cardiogenesis. Transgenic mouse studies have shown that these compartments, including right and left cardiac chambers, correspond to a series of independent transcriptional units. These results, supported by the transiently compartmentalised expression profiles of a subset of endogenous cardiac genes, reveal a modular basis to transcription in the myocardium. Regionalised expression domains provide informative markers with which the contribution of different regions of the embryonic heart to particular structures of the adult heart can be followed during normal cardiogenesis, and, using mouse models of cardiac malformations, during abnormal heart development. Congenital heart disease in man is frequently the result of aberrant interactions between different cardiac compartments. Regionalisation within the myocardium becomes evident at the time of cardiac looping, and is the product of two patterning inputs: firstly position along the anterior-posterior axis of the early heart tube, and secondly embryonic laterality signals which dictate cardiac asymmetry. Recent experiments have begun to elucidate the role of different cardiac transcription factors in directing regionalised expression domains in the embryonic heart.