

Interactions entre les facteurs MEF2 et GATA dans la différenciation cellulaire

Les facteurs de transcription à boîte MADS (MCM1, *Agamous*, *Deficiens* et *Serum response factor* – SRF) constituent une famille de protéines incluant les facteurs de transcription métazoaires SRF et MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) qui jouent un rôle clé dans le contrôle de divers processus biologiques. Chez les vertébrés, le facteur de transcription SRF contrôle l'expression des gènes précoces et de gènes exprimés spécifiquement dans les muscles. Pour leur part, les facteurs MEF2 ont été impliqués dans la régulation de l'expression des gènes musculaires, la différenciation des cellules du muscle squelettique, l'induction de l'apoptose dans les lymphocytes T et la survie des neurones.

La boîte MADS est un motif structurellement très conservé de 56 acides aminés présent dans le domaine de liaison à l'ADN des membres de cette famille [1], qui possèdent également des spécificités de liaison à l'ADN très similaires. La capacité de ces protéines de former des dimères corrèle avec la symétrie en dyade de leurs sites de liaison à l'ADN.

Les facteurs de transcription de la famille MEF2

Les membres de la famille de facteurs de transcription MEF2 ont été initialement identifiés par leur activité de liaison aux sites d'ADN spécifiques des muscles, activité qui est observée majoritairement dans les cellules musculaires différenciées (*pour revue voir [2]*). Ces facteurs MEF2 jouent un rôle important dans l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes des muscles cardiaque et squelettiques. Chez les vertébrés, il existe quatre gènes *mef2* : *mef2a*, *mef2b*, *mef2c*

et *mef2d*. L'organisation des introns et des exons des gènes *mef2* des vertébrés et de l'unique gène *mef2* de la drosophile (*D-mef2*) est identique dans les régions conservées de ces gènes (boîte MADS et domaine MEF2 ; *figure 1*), suggérant qu'ils proviennent d'un gène *mef2* ancestral commun. En revanche, leur domaine carboxy-terminal est non seulement très divergent, mais il subit aussi un épissage alternatif. Il est fort probable que les mécanismes qu'utilisent ces facteurs pour activer la transcription soient eux aussi divergents car c'est ce domaine carboxy-terminal qui est responsable de la transactivation.

Les protéines MEF2 peuvent former entre elles des homo- et des hétérodimères, mais elles ne peuvent pas former d'hétérodimères avec d'autres facteurs à boîte MADS ; cette capacité de dimérisation des protéines MEF2 requiert un domaine de 29 acides aminés situé directement en carboxy-terminal de la boîte MADS et appelé le domaine MEF2 (*figure 1*). Il contribue également à assurer une affinité de liaison maximale à l'ADN. Ensemble, la boîte MADS et le domaine MEF2 sont nécessaires et suffisants pour permettre une liaison de haute affinité à la séquence consensus (T/C)TA(A/T)₄TA(G/A). Des sites de liaison pour les protéines MEF2 ont été identifiés dans les promoteurs de plusieurs gènes des muscles cardiaque et squelettiques (*pour revue voir [2]*).

Expression des facteurs MEF2 au cours du développement

Durant l'embryogenèse des vertébrés, les transcrits *mef2* sont abondamment exprimés dans les cellules musculaires cardiaques, squelettiques

et lisses ainsi que dans d'autres types cellulaires, incluant les neurones et les lymphocytes. Chez la souris, les gènes *mef2b* et *mef2c* sont les premiers membres de la famille exprimés, leurs transcrits apparaissant dès le jour embryonnaire 7,5 (E7,5) au niveau des précurseurs mésodermiques qui formeront le cœur [2]. Peu après, au jour E8,0, les transcrits des gènes *mef2a* et *mef2d* sont exprimés dans l'ébauche du myocarde. Puis l'expression des quatre gènes *mef2* est aussi détectée dans les cellules musculaires squelettiques et lisses de façon concomitante à l'activation de leur programme de différenciation. Plus spécifiquement, l'expression des gènes *mef2* débute dans le mésoderme somitique pour ensuite gagner le myotome.

Les membres de la famille MEF2 sont également exprimés dans les lymphocytes B [3] et dans le système nerveux central en développement [4]. Temporellement, l'expression des protéines MEF2 dans les neurones est corrélée avec l'activation de la différenciation de ces cellules.

Chez l'adulte, en dépit de l'expression ubiquitaire des ARNm de *mef2*, les protéines MEF2 et leur activité de liaison à l'ADN sont très enrichies dans les muscles, les lymphocytes et le cerveau. Cette disparité entre l'expression des transcrits et des protéines suggère l'existence de mécanismes post-transcriptionnels impliqués dans la régulation de l'expression de ces facteurs.

Analyses génétiques du rôle des facteurs MEF2

Plusieurs évidences génétiques suggèrent que les protéines MEF2 contribuent à l'expression des gènes mus-

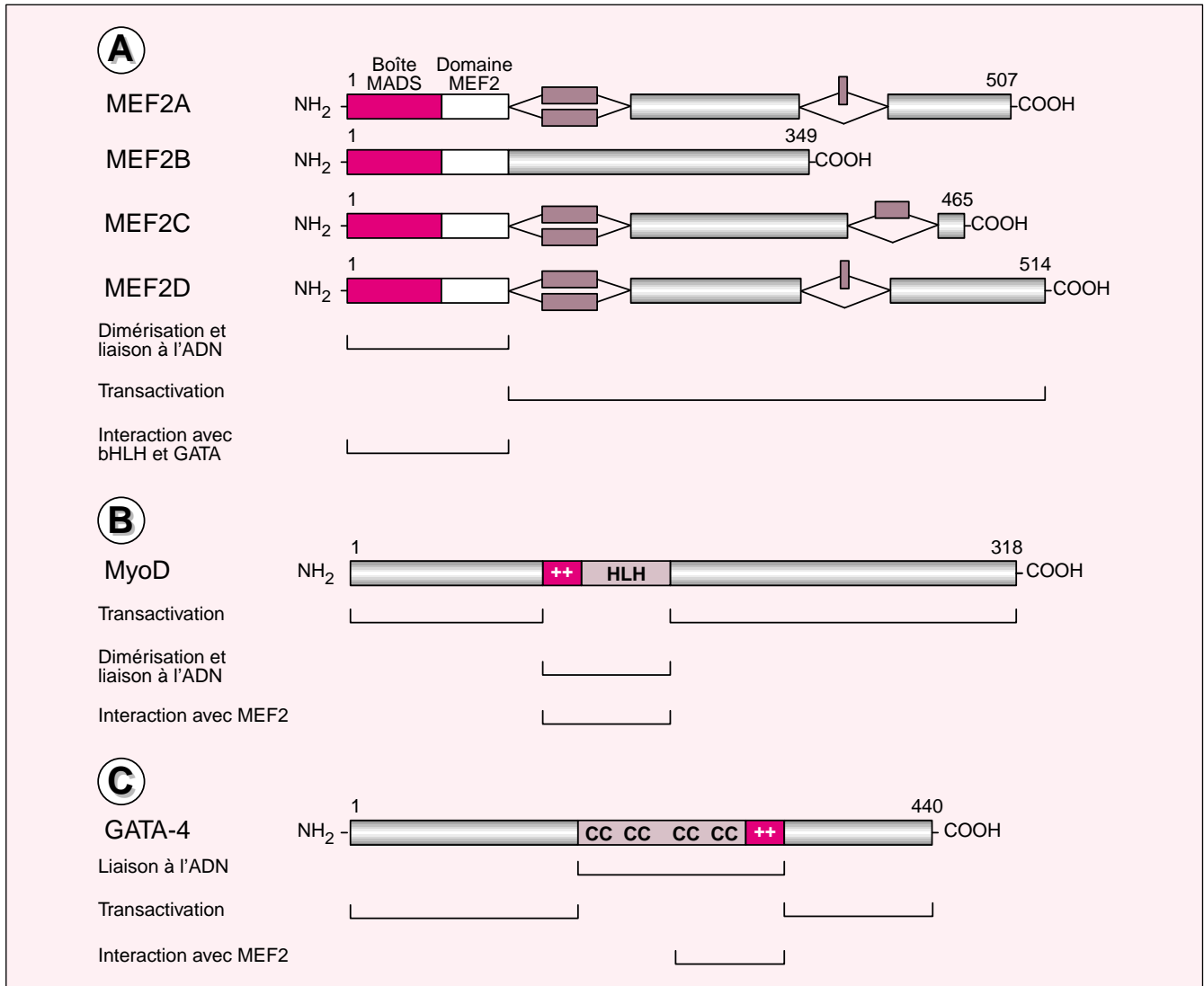


Figure 1. **Représentation schématique des membres de la famille MEF2, MyoD et GATA.** **A.** Les quatre membres de la famille MEF2: MEF2A, MEF2B, MEF2C et MEF2D sont représentés avec, pour chacun, les épissages alternatifs possibles. Le domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN comprend la boîte MADS et le domaine MEF2. La longueur des protéines ainsi que les domaines d'activation de la transcription et d'interaction avec les facteurs bHLH myogéniques et GATA sont également indiqués. **B.** Représentation schématique de MyoD. Le domaine HLH et la région basique (++) qui permettent la liaison à l'ADN, sont indiqués. **C.** Représentation de GATA-4. Les doigts de zinc (CC CC) et la région basique (++) sont requis pour la liaison à l'ADN. La structure des autres facteurs GATA est similaire à celle de GATA-4.

culaires et à la myogenèse. Chez la drosophile, la mutation de *D-mef2* inhibe la différenciation terminale des cellules musculaires squelettiques, cardiaques et viscérales [2]. Cependant, les précurseurs myogéniques de chacune de ces lignées semblent spécifiés normalement. Ces résultats suggèrent un rôle relativement tardif de *D-mef2* dans la différenciation de tous les types musculaires chez la drosophile.

Chez les vertébrés, la fonction des gènes *mef2* commence seulement à être élucidée, notamment grâce aux études d'inactivation de gène chez la souris. Le premier gène *mef2* à avoir été inactivé est *mef2c* (*mef2c*^{-/-}) [5]. Les embryons *mef2c*^{-/-} paraissent normaux jusqu'au jour E9,0, où l'on observe un ralentissement généralisé de leur développement ainsi qu'un épanchement péricardique, témoin d'une insuffisance cardiaque. Le tube car-

diaque reste droit sans subir la courbure permettant la morphogenèse cardiaque et le futur ventricule droit ne se forme pas. Dans ces embryons mutants, plusieurs transcrits cardiaques, comme ceux de l'ANF (*atrial natriuretic factor*), l' α MHC (*α -myosin heavy chain*) et l' α -actine cardiaque, ne sont pas exprimés, tandis que d'autres, comme MLC2V (*myosin light chain*) et MLC2A, sont exprimés normalement [5]. Ces résultats confir-

ment donc le rôle essentiel de MEF2 dans la différenciation terminale des cardiomyocytes.

Outre ces défauts de développement du muscle cardiaque, les souris *mef2c*^{-/-} présentent également des défauts vasculaires [6, 7] : les cellules musculaires lisses ne se différencient pas et l'organisation des cellules endothéliales est anormale, suggérant un rôle crucial de MEF2C dans le développement vasculaire.

Interactions entre les facteurs MEF2 et les protéines de la famille bHLH

Les membres de la famille MEF2, comme les autres protéines à boîte MADS, coopèrent avec d'autres facteurs de transcription pour contrôler le programme d'expression génique propre à un tissu. Dans le muscle squelettique, il s'agit des membres de la famille des facteurs myogéniques de type hélice-boucle-hélice (bHLH), MyoD, myogénine, Myf5 et MRF4, qui contrôlent la spécification et la différenciation des cellules musculaires squelettiques ([8] et *m/s 1997, n°10, p.1182*). Ces facteurs myogéniques forment des hétérodimères avec les facteurs de transcription bHLH ubiquitaires, les protéines E, et lient une séquence spécifique appelée boîte E (CANNTG) sur l'ADN de plusieurs promoteurs de gènes spécifiques des muscles. Chacun de ces facteurs myogéniques peut activer le programme de différenciation musculaire lorsqu'il est exprimé de façon ectopique dans des cellules non musculaires. Contrairement aux facteurs myogéniques, les protéines de la famille MEF2 sont incapables d'activer le programme de différenciation musculaire. Cependant, elles peuvent coopérer avec les facteurs myogéniques pour activer de façon synergique les promoteurs des gènes musculaires squelettiques et pour induire la myogenèse [9, 10]. Plusieurs études ont démontré que cette coopération est due à une interaction physique directe entre la boîte MADS des protéines MEF2 et le domaine de liaison à l'ADN bHLH des facteurs myogéniques (figure 1). De plus, le site de liaison à l'ADN d'un seul des deux facteurs est requis. Ces résultats sug-

gèrent que les facteurs MEF2 peuvent moduler la transcription des gènes musculaires selon deux mécanismes différents : par leur liaison directe à leur site sur le promoteur, ou encore en étant recrutés par un membre de la famille myogénique lié à une boîte E sur le promoteur.

Les protéines MEF2 peuvent également interagir avec MASH1 (*mouse achaete scute homolog 1*), une protéine bHLH de la famille *achaete scute* exprimée dans les neurones [11, 12]. Comme dans le muscle squelettique, la boîte MADS des protéines MEF2 interagit directement avec le domaine bHLH de MASH1 et cette interaction résulte en une activation synergique de la transcription. Bien qu'aucun gène neuronal n'ait été identifié comme cible de l'interaction MEF2/MASH1, ces résultats suggèrent un rôle possible des protéines MEF2 comme co-facteurs des protéines bHLH neurogéniques.

Interactions entre les facteurs MEF2 et les protéines de la famille GATA

• Mécanismes d'action des facteurs MEF2 dans le muscle cardiaque

L'inactivation du gène *mef2c* étant responsable d'un arrêt du développement cardiaque et d'une diminution (voire une abolition) de l'expression de nombreux gènes cardiaques comme ceux codant pour l'ANF,

α MHC et α CA, on pouvait supposer que les facteurs MEF2 soient impliqués dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes cibles. Cependant, la plupart des promoteurs de ces gènes ne contiennent pas de site de liaison, ou seulement des sites de liaison de faible affinité, pour les protéines MEF2. En outre, lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules hétérologues, les facteurs MEF2 ne peuvent activer de façon significative ces promoteurs [13]. Ces résultats suggèrent que l'action des facteurs MEF2 dans le muscle cardiaque nécessite la présence d'un co-facteur spécifique de ce tissu.

En accord avec cette hypothèse, nous avons démontré que les facteurs MEF2 sont recrutés au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles par le facteur de transcription spécifique du cœur GATA-4 dont ils potentialisent l'activité transcriptionnelle [13]. GATA-4 est, chez les vertébrés, un des six membres (GATA-1 à -6) connus de la famille des facteurs de transcription GATA (*pour revue voir [14]*). Ils possèdent tous un domaine de liaison à l'ADN très conservé de type doigt de zinc qui lie spécifiquement la séquence (A/T)GATA (A/G), et peuvent être divisés en deux groupes selon leur patron d'expression et leur homologie de séquence : l'un comprend GATA-1, GATA-2 et GATA-3, qui sont princi-

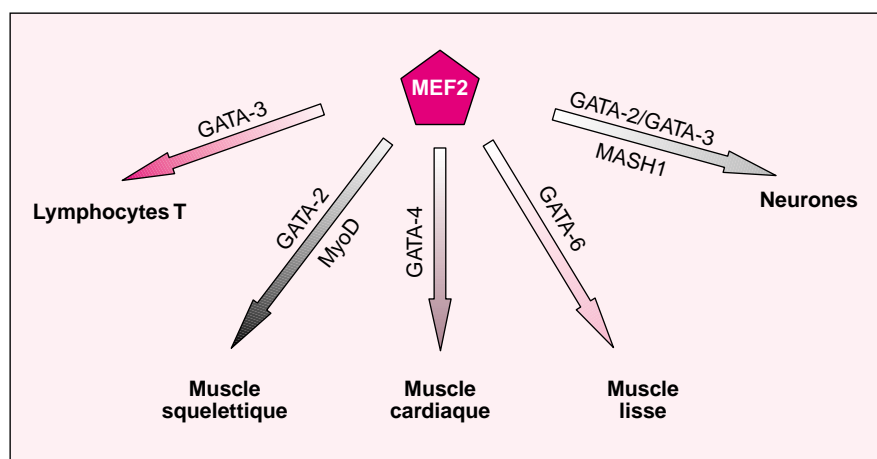


Figure 2. **Interactions combinatoires entre les facteurs MEF2, bHLH et GATA.** Ces interactions, dont le rôle fonctionnel est démontré dans le muscle squelettique et cardiaque, représentent probablement un mécanisme général de contrôle spécifique de la transcription dans certains tissus comme le muscle lisse, les lymphocytes et les neurones.

palement exprimés dans le système hématopoïétique et le système nerveux, et l'autre comprend GATA-4, GATA-5 et GATA-6, qui le sont principalement dans le système cardiovasculaire. Plus précisément, GATA-4 et GATA-6 sont tous deux exprimés dans les cardiomyocytes [15, 16] dans lesquels ils sont essentiels au maintien du phénotype cardiaque [16], GATA-4 étant en outre requis pour la différenciation et la survie des cardiomyocytes [17, 18].

En coopérant avec GATA-4 et GATA-6, les facteurs MEF2 contribuent ainsi à l'activation de nombreux promoteurs de gènes cardiaques [13]. Cette activation synergique entre les facteurs MEF2 et GATA-4 requiert à la fois une interaction physique entre le domaine de liaison à l'ADN de MEF2 et le doigt de zinc carboxy-terminal de GATA-4, et la présence des domaines d'activation de la transcription de chacun des deux facteurs (*figure 1*). Si la liaison de GATA sur sa séquence consensus d'ADN est indispensable à cette synergie, celle des facteurs MEF2 ne l'est pas. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation combinatoire impliquant le recrutement des facteurs MEF2 par les protéines GATA liées à leur site sur le promoteur. Ce mécanisme n'est pas sans rappeler le recrutement des facteurs MEF2 par les facteurs myogéniques et suggère un rôle fondamental des facteurs MEF2 en tant que co-facteurs transcriptionnels essentiels à la myogenèse et à la régulation de l'expression des gènes musculaires cardiaques et squelettiques.

• *Un paradigme pour la régulation spécifique de la transcription dans de nombreux tissus ?*

Les mécanismes moléculaires contrôlant l'expression des gènes spécifiques au muscle lisse demeurent inconnus. Cela est principalement dû au fait que peu de facteurs de transcription spécifiques de ce tissu ont été identifiés à ce jour. De façon intéressante, outre le myocarde, GATA-6 est également exprimé dans le muscle lisse et est capable d'interagir physiquement et fonctionnellement avec les protéines MEF2 [13]. Il est donc possible que le recrutement des

facteurs MEF2 par GATA-6 contribue aussi à l'expression des gènes du muscle lisse (*figure 2*).

L'interaction des facteurs GATA et MEF2 pourrait aussi jouer un rôle dans le muscle squelettique. En effet, des protéines GATA, telle GATA-2, y sont exprimées et contribuent, de concert avec les facteurs NFAT (*nuclear factors of activated T cells*), à la réponse des cellules aux facteurs de croissance [19]. On peut envisager que les facteurs GATA participent aussi à l'action de MEF2 dans la régulation du programme d'expression génique et la différenciation du muscle squelettique.

Enfin, la co-expression des facteurs GATA et des protéines MEF2 n'est pas limitée au muscle, mais est également observée dans les lymphocytes T (MEF2/GATA-3; [3, 20, 21]) et les neurones (MEF2/GATA-2 et GATA-3; [22, 23]). Puisque les facteurs GATA contrôlent l'expression de nombreux gènes lymphoïdes et neuronaux, une implication éventuelle des facteurs MEF2 dans ces régulations est proposée.

Les facteurs MEF2 : points de convergence pour de multiples voies de signalisation

L'activité transcriptionnelle des facteurs MEF2 est modulée par trois voies de signalisation : la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) p38 et ERK5/BMK1, la voie de la calcineurine et la voie des CaMK (*calcium/calmodulin-dependent protein kinases*). Les MAPK p38, en phosphorylant directement les facteurs MEF2 dans leur domaine d'activation de la transcription, augmentent leur activité transcriptionnelle [24]. Inversement, la calcineurine, une phosphatase qui est activée par une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium, peut déphosphoryler les facteurs MEF2 dans leur domaine de liaison à l'ADN, augmentant ainsi leur capacité de liaison à l'ADN et, indirectement leur activité transcriptionnelle [25]. L'élévation des niveaux de calcium intracellulaire active également les CaMK, qui sont elles-mêmes

capables de stimuler l'activité transcriptionnelle des facteurs MEF2 [26]. Les mécanismes par lesquels ces voies de signalisation modulent l'activité des facteurs MEF2 demeurent largement inconnus. La phosphorylation des facteurs MEF2 par les MAPK p38 et la CaMK se situe au niveau du domaine de transactivation et n'affecte pas leur activité de liaison à l'ADN. Ces résultats suggèrent qu'un gain de charge négative et/ou une modification de la conformation de la protéine module sa capacité à interagir avec la machinerie transcriptionnelle de base ou avec un co-facteur. Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer si ces voies de signalisation peuvent influencer la capacité des facteurs MEF2 à interagir avec les facteurs myogéniques ou les facteurs de la famille GATA et ainsi contribuer à régler de façon fine les mécanismes combinatoires des facteurs MEF2.

Conclusions

L'ensemble de ces données montrent que les interactions combinatoires des facteurs MEF2 avec les différents facteurs GATA et à motif bHLH pourraient représenter un mécanisme général permettant de contrôler la transcription de nombreux gènes de façon spécifique dans certains tissus. Elles pourraient plus généralement être impliquées dans les processus de différenciation, d'apoptose et de survie cellulaire ■

RÉFÉRENCES

1. Huang K, Louis JM, Donaldson L, Lim FL, Sharrocks AD, Clore GM. Solution structure of the MEF2A-DNA complex: structural basis for the modulation of DNA bending and specificity by MADS-box transcription factors. *EMBO J* 2000; 19: 2615-28.
2. Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 167-96.
3. Swanson BJ, Jack HM, Lyons GE. Characterization of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) expression in B and T cells: MEF2C is a B cell-restricted transcription factor in lymphocytes. *Mol Immunol* 1998; 35: 445-58.

