

Facteurs bHLH et morphogenèse cardiaque

Les facteurs de transcription à domaine hélice-boucle-hélice (bHLH) jouent un rôle déterminant pour l'engagement et la différenciation terminale de certains types cellulaires. Chez les vertébrés, la famille des protéines myogéniques (MyoD, Myf5, myogénine, MRF4) est essentielle pour le développement du muscle squelettique [1, 2] alors que les produits du gène E2A (E12, E47) sont requis pour la différenciation des lymphocytes B [3] ; le facteur érythroïde SCL est nécessaire pour l'hématopoïèse [4] et chez la drosophile, le produit du gène *twist* (*Mtwist* chez la souris) est indispensable à la formation du mésoderme, précurseur du muscle cardiaque et squelettique [5]. Les membres de cette famille structurale contiennent un domaine homologue de 70 acides aminés qui comprend un segment basique liant l'ADN et une région impliquée dans la dimérisation, adoptant vraisemblablement une conformation hélice-boucle-hélice. En général, les facteurs bHLH à spécificité tissulaire forment préférentiellement des hétérodimères avec les protéines ubiquitaires afin de lier la séquence consensus CANNTG (boîte E) dans les promoteurs et *enhancers* des gènes cibles (*m/s* n° 1, vol. 7, p. 86). D'autres protéines de cette famille (facteurs Id) ne contiennent pas de domaine basique fonctionnel et inhibent la liaison à l'ADN des protéines avec lesquelles elles forment des hétérodimères.

Le muscle cardiaque contient les protéines E12 et Id et l'expression de certains gènes cardiaques est dépendante de sites CANNTG dans leurs régions régulatrices (revue [1]). En dépit de preuves indirectes de la présence de facteurs bHLH cardiaques,

aucun homologue des facteurs myogéniques n'a été isolé par criblage de banque d'ADNc ou par PCR. Ces résultats ont suggéré que les protéines bHLH du cœur, bien que pouvant former des dimères avec des partenaires ubiquitaires déjà connus, divergeaient largement de celles de la famille MyoD. Le groupe de E.N. Olson (TX USA), a utilisé le système double hybride chez la levure pour cribler une banque d'ADNc de souris en vue d'isoler les facteurs de transcription bHLH formant des hétérodimères avec la protéine E12 [6]. Plusieurs gènes exprimés dans le mésoderme de l'embryon ont ainsi été clonés dont *eHAND* (*HAND* pour *expressed in heart, autonomous nervous system, neural crest derivatives*) [7]. L'expression des gènes *eHAND* et *dHAND*, son analogue isolé par criblage dans des conditions d'hybridation douces avec la séquence codant pour le domaine bHLH de *eHAND*, débute dans la région précordiale de l'embryon et est ensuite restreinte aux régions de formation des valves cardiaques pour *eHAND* et dans tout le cœur primitif pour *dHAND*. Par ailleurs, leurs deux ARNm sont présents dans l'arche pharyngée I ainsi que dans la III et la IV pour *dHAND* uniquement. Ces deux dernières arches contiennent une forte proportion de cellules dérivées de la crête neurale cardiaque qui forment, entre autres, le septum situé entre l'aorte et l'artère pulmonaire.

Parce que c'est dans l'espèce aviaire que le développement cardiaque et le destin des cellules de la crête neurale sont les mieux connus, l'étude du rôle dans le développement des protéines *eHAND* et *dHAND* a été effectuée chez le poulet en utilisant des oligonucléotides antisens [8]. Si

l'inhibition de l'expression de *eHAND* ou *dHAND* séparément n'a aucun effet sur la formation du cœur, l'incubation des embryons avec des oligonucléotides antisens dirigés contre les deux ARNm simultanément arrête la progression de la morphogenèse du cœur alors que la différenciation des cardiomyocytes reste normale.

Compte tenu du nombre de protéines bHLH présentes dans le mésoderme pré musculaire, il est intéressant de se demander si certaines d'entre elles sont impliquées dans la différenciation des cardiomyocytes ou si ce phénomène implique une autre famille de facteurs de transcription tels les facteurs GATA [9, 10]. En tout état de cause, les travaux sur *eHAND* et *dHAND* ouvrent la voie à la compréhension des mécanismes moléculaires qui règlent la morphogenèse du cœur et l'identification de leurs gènes cibles constituerait des outils précieux à cette investigation. Enfin, les résultats de l'inhibition simple de *eHAND* et *dHAND* suggèrent qu'il existe un phénomène de redondance fonctionnelle entre les deux membres de cette famille comme entre les facteurs myogéniques Myf5 et MyoD. Par ailleurs, le rôle central des protéines bHLH lors de la différenciation cellulaire et le fait qu'elles fonctionnent en coordination avec un autre réseau de régulateurs (protéines MEF2 dans le muscle squelettique et GATA-1 dans les cellules érythroïdes) laissent supposer qu'un circuit de régulation et de rétrocontrôle analogue existe avec les mêmes familles de protéines (MEF2C, GATA-4, -5, -6) dans le tissu cardiaque.

C.G.
M.N.

1. 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.
2. Alonso S. Des facteurs de régulation spécifiques de la myogenèse. *médecine/sciences* 1990; 6: 635-44.
3. Kadesch T. Helix-loop-helix proteins in the regulation of immunoglobulin gene transcription. [Review]. *Immunol Today* 1992; 13: 31-6.
4. Aplan PD, Nakahara K, Orkin SH, Kirsch IR. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J* 1992; 11: 4073-81.
5. Wolf C, Thisse C, Stoetzel C, Thisse B, Gerlinger P, Perrin-Schmitt F. The M-twist gene of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus X-twi* and the *Drosophila twist* genes. *Dev Biol* 1991; 143: 363-73.
6. Staudinger J, Perry M, Elledge SJ, Olson EN. Interactions among vertebrate helix-loop-helix proteins in yeast using the two-hybrid system. *J Biol Chem* 1993; 268: 4608-11.
7. Cserjesi P, Brown D, Lyons GE, Olson EN. Expression of the novel basic helix-loop-helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development. *Dev Biol* 1995; 170: 664-78.
8. Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* 1995; 270: 1995-9.
9. Grépin C, Robitaille L, Antakly T, Nemer M. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks *in vitro* cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4095-102.
10. Grépin C, Durocher D, Nemer M. Le cœur: un programme unique de transcription et de différenciation musculaire. *médecine/sciences* 1995; 11: 395-405.

■■■ **La face cachée de la protéine nucléaire ATF-2, un facteur essentiel au développement du système nerveux central et de l'os.** ATF-2 (*activating transcription factor-2*) fait partie d'une famille de protéines nucléaires qui activent la transcription de gènes contrôlés par l'AMPc en se fixant, au niveau de l'ADN, sur les éléments de réponse à l'AMPc (CRE pour *cAMP response element*). De façon inattendue, l'inactivation sélective du gène codant pour ATF-2 chez la souris a pour conséquence une importante mortalité des animaux homozygotes *ATF-2^{-/-}*, la moitié ne survivant pas plus d'un mois [1]. Les animaux hétérozygotes *ATF-2^{+/-}* voient leur mortalité diminuée de moitié par rapport à celle des homozygotes, ce qui suggère un effet de dosage génique. Les survivants *ATF-2^{-/-}* ont une longévité normale mais un poids et une taille inférieurs à la normale (nanisme à prédominance rhizomélique) avec, dans certains cas, une infiltration lymphocytaire périoculaire. Des anomalies osseuses se manifestent essentiellement au niveau des cartilages de conjugaison, dont les chondrocytes sont désorganisés et se divisent plus lentement, entraînant ainsi un amincissement voire une absence de cartilage de conjugaison. Les anomalies observées sont tout à fait comparables à celles de l'hypochondroplasie humaine, affection essentiellement due, chez l'homme, à la mutation du gène codant pour le récepteur FGFR3 (*fibroblast growth factor receptor 3*) (*m/s n° 8-9, vol. 10, p. 936*). Chez les souris *ATF-2^{-/-}*, cependant, la synthèse d'ARNm de ce récepteur n'est pas altérée. Au niveau du cerveau, lieu de synthèse préférentiel de ATF-2, on observe, chez les souris mutées, une réduction de la taille, un élargissement des ventricules et un déficit neuronal sévère qui concerne plus particulièrement les cellules de Purkinje

du cervelet et les neurones sensitifs de l'oreille interne. Ces altérations se traduisent par un tremblement de tout le corps, une perte de coordination des membres, des secousses de la tête et une perte de l'audition. Les effets de l'absence d'ATF-2 sur le développement des souris mutées sont bien en relation avec l'effet transcriptionnel de ATF-2, comme le montre l'absence de l'expression du gène de la sélectine-E dont le site de liaison ATF-2 est bien établi. L'absence d'ATF-2 ne modifie pas l'expression de gènes de facteurs de transcription apparentés comme ceux codant pour CREB (*cAMP response element-binding protein*), ATF-1, c-Jun, c-Fos. En outre, un grand nombre de gènes dont le promoteur lie ATF-2 ne voient pas leur expression affectée par son absence (TCR α et β , CD3 δ , interféron- β). Ces résultats démontrent qu'en absence d'ATF-2, l'induction de certains gènes met en jeu d'autres facteurs transcriptionnels, probablement de la famille ATF/CREB. En ce qui concerne les lésions osseuses, elles ne sont pas sans rappeler celles observées après l'inactivation de *c-fos* [2]: mortalité précoce élevée, anomalies osseuses, débilité physique; d'ailleurs, ATF-2 et c-Fos sont toutes deux des protéines à glissière de leucines qui forment des hétérodimères avec c-Jun. En revanche, l'inactivation de *c-fos* n'a pas d'effets délétères sur le cervelet. Les conséquences de l'absence de ATF-2 sur le développement du système nerveux central et du cartilage osseux sont des illustrations évidentes de la fonction particulière et spécifique de cette protéine nucléaire dans le développement.

[1. Reimold AM, et al. *Nature* 1996; 379: 262-5.]

[2. Saint-Arnaud R. *médecine/sciences* 1993; 9: 1243-6.]