

2M11.3543.5

Université de Montréal

***Participation de l'endocarde dans les malformations  
cardiaques du syndrome Holt-Oram***

Par

Mathieu Nadeau

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M. Sc)  
en biologie moléculaire

Mai 2007

© Mathieu Nadeau 2007



QH

506

V54

2007

V019

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Rôle de l'endocarde dans les malformations cardiaques du syndrome  
Holt-Oram**

Présenté par :  
Mathieu Nadeau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Frédéric Charron, Président-rapporteur  
Dr Mona Nemer, Directeur de recherche  
Dr Céline Fiset, Membre du jury

## Résumé

Les malformations congénitales cardiaques (MCCs) sont retrouvées chez 1 à 3% des nouveau-nés. Les plus fréquentes sont les défauts de septation des valves. Le syndrome Holt-Oram (SHO), caractérisé par un large spectre de malformations cardiaques, incluant des malformations septales et des défauts du système de conduction, est causé par une haploinsuffisance du facteur de transcription *Tbx5*. La fonction de *Tbx5* dans plusieurs types cellulaires cardiaques et la présence de gènes modulateurs est présentement l'hypothèse retenue pour expliquer l'expressivité variable du SHO. Afin d'évaluer la participation des cellules endocardiques dans le développement des malformations cardiaques observées dans le SHO, une délétion de *Tbx5* spécifiquement au sein de ces cellules fut générée en croisant la souris *Tie2-Cre* avec la souris *Tbx5-Flox*. La présente étude démontre que la perte de fonction endocardique de *Tbx5* induit, dans 100% des cas, et de façon dose-dépendante, une communication inter-auriculaire (CIA) de type *secundum*, une dilatation de l'oreillette droite et un dérèglement du flot sanguin au niveau de la valve mitrale. Le mécanisme responsable de l'apparition de la CIA implique l'apoptose excessive du *septum primum*. Des expériences *in vitro* suggèrent que *eNOS* et *Bcl-xL* sont des cibles et médiateurs potentiels de *Tbx5*. De plus, l'épistasie avec des gènes associés à la présence de CIA, tels *eNOS* et *GATA-4*, fut observée et supporte d'autant plus l'hypothèse de l'étiologie multigénique de la CIA. Il est intéressant de noter que bien que les souris *eTbx5<sup>+/-</sup>* ne montrent aucun signe de dysfonction cardiaque, ils présentent une faible tolérance à l'effort. Ils possèdent aussi un foramen oval persistant (FOP), un subtil défaut de septation auriculaire associé à des risques élevés d'accident vasculaire cérébral ischémique retrouvé dans 30% de la population. Les résultats indiquent que *Tbx5* endocardique est essentiel à la survie et à la différenciation des cellules endocardiques et que l'altération de sa fonction au sein de ces cellules compromet la morphogénèse cardiaque. Par ailleurs, la souris *eTbx5<sup>+/-</sup>* représente un nouveau modèle animal d'une malformation cardiaque courante et pourrait être utile pour l'analyse du mécanisme reliant le FOP aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) et pour tester l'efficacité de nouveaux traitements pharmacologiques.

**Mots-clés :** *Tbx5*, malformations congénitales cardiaques, endocarde, développement cardiaque, communication inter-auriculaire.

**Abstract**

Congenital heart defects (CHDs) are found in 1 to 3% of newborns. Septal and valvular defects are the most frequent of them. Mutations in transcription factor *Tbx5* are associated with Holt-Oram syndrome (HOS). This syndrome is characterized by defects in forelimb development and a large spectrum of heart abnormalities. We hypothesized that *Tbx5* function in multiple cardiac cell types and the presence of genetic modifiers may account for the variable expressivity of HOS. In order to establish the role of endocardial cells in the cardiac malformations found in HOS, an endocardial specific deletion of *Tbx5* was engineered in mice by breeding *Tie2-Cre* mice with *Tbx5-Flox* mice. This study shows that loss of endocardial *Tbx5* produces, in 100% of the cases and in a dose dependent manner, a *secundum* type atrial septal defect (ASD), a severe right atrium dilatation and a mitral valve blood flow dysregulation. The mechanism responsible for the ASD involves excessive apoptosis of the *septum primum*. *In vitro* experiments show that both *eNOS* and *Bcl-xL* are potential target genes implicated in this phenomenon. Moreover, epistasis with other ASD associated genes, such as *eNOS* and GATA-4 was found, therefore supporting the hypothesis of a multigenic etiology of ASD. Interestingly, while *eTbx5*<sup>+/-</sup> mice do not show any sign of cardiac dysfunction they have a reduced tolerance to exercise. In addition, they present with a persistent foramen oval (FOP), a subtle and common cardiac malformation found in 30% of the population and associated with higher risks of ischemic stroke. Together, the results indicate that endocardial *Tbx5* is essential for endocardial cell survival and differentiation and that alteration of *Tbx5* function in these cells disrupts proper heart morphogenesis. On the other hand, heterozygote mice with a FOP represent a novel animal model of a common human cardiac malformation, which will be useful to analyze the link between FOP and stroke and to test the effectiveness of different pharmacologic interventions.

**Keywords:** *Tbx5*, congenital heart disease, endocardium, heart development, atrial septal defect.

<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>A) Malformations cardiaques</b> .....	<b>1</b>
<b>B) Développement cardiaque</b> .....	<b>2</b>
1) <i>La gastrulation et la détection des premiers progéniteurs cardiaques</i> .....	2
2) <i>Le croissant cardiaque</i> .....	4
3) <i>Le premier organe fonctionnel : le tube cardiaque</i> .....	4
4) <i>Le « looping »</i> .....	5
a) <i>Formation du cœur en « C »</i> .....	5
b) <i>Formation du cœur en « S »</i> .....	5
c) <i>Étapes finales du « looping »</i> .....	6
5) <i>La septation</i> .....	6
a) <i>Septation auriculaire</i> .....	6
b) <i>Septation ventriculaire</i> .....	8
<b>C) Origine des cellules cardiogéniques</b> .....	<b>8</b>
1) <i>Origine des cellules endocardiques et myocardiques : commune ou distincte?</i> .....	8
2) <i>Origine des cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires</i> .....	9
3) <i>Origine des autres types cellulaires présents dans le cœur</i> .....	11
a) <i>Cellules du système de conduction (fibre de Purkinje)</i> .....	11
b) <i>Système vasculaire coronaire (cellules musculaires lisses coronaires, vasculaires endothéliales et fibroblastes)</i> .....	11
c) <i>Cellules musculaires lisses aortiques</i> .....	12
<b>D) Régulation transcriptionnelle du développement cardiaque</b> .....	<b>12</b>
1) <i>De la gastrulation au tube cardiaque</i> .....	12
a) <i>Tinman et ses orthologues Nkx2-5/csx</i> .....	13
b) <i>Les facteurs de transcription à domaine MADS</i> .....	15
c) <i>Les facteurs de transcription de la famille GATA</i> .....	20
2) <i>Segmentation du tube cardiaque</i> .....	24
a) <i>Les facteurs de transcription de la famille bHLH</i> .....	25
<b>E) Les facteurs de transcription à boîte T (T-box(Tbx))</b> .....	<b>27</b>
1) <i>Importance biologique des facteurs Tbx</i> .....	27
2) <i>Les facteurs Tbx dans le développement extra cardiaque</i> .....	31
3) <i>Les facteurs Tbx dans le développement cardiaque</i> .....	36
<b>F) Rôle de l'endocarde dans le développement cardiaque</b> .....	<b>42</b>

1) Rôle des cellules endocardiques dans la croissance du myocarde .....	42
a) La voie de signalisation VEGF.....	43
b) La voie de signalisation Neureguline-1.....	44
c) La voie de signalisation de l'angiopoïétine-1 .....	44
d) La voie de signalisation de l'endothéline-1 .....	45
e) Voie de signalisation de l'oxyde nitrique (ON).....	46
f) La voie de signalisation de FGF .....	46
g) La voie de signalisation de l'Erythropoïétine (EPO) .....	47
G) Analyse de la fonction cardiaque dans le modèle murin .....	47
1) Évaluation de la contractilité .....	48
2) Évaluation du débit cardiaque et de la fonction valvaire.....	49
3) Évaluation de l'activité électrique .....	50
4) Évaluation de la tolérance à l'effort.....	51
H) Objectif du travail .....	53
<b>Chapitre 2: Résultats .....</b>	<b>55</b>
<b>Atrial septal defects caused by endocardial specific deficiency of transcription</b>	
<b>factor <i>Tbx5</i>.....</b>	<b>55</b>
Abstract .....	56
Introduction.....	57
Methods.....	57
Results.....	60
Discussion .....	64
Acknowledgements .....	66
<b>Chapitre 3 : Discussion .....</b>	<b>82</b>
A) Modèle expérimental de foramen oval persistant (FOP). .....	82
1) Importance biologique du Foramen oval.....	82
2) FOP et CIA secundum : un seul et même continuum de malformations.....	83
3) Options de traitement des patients souffrant de FOP.....	84
4) Utilité du modèle de FOP.....	84
a) Développement pharmacologique .....	84
b) Étude des relations causales entre le FOP et les AVC, les migraines et autres	
malaises associés.....	85
c) Étude de l'impact de la combinaison de plusieurs facteurs de risques d'AVC....	85
d) Analyse des interactions des cascades transcriptionnelles impliquées dans le	
développement du <i>septum</i> auriculaire .....	85

e) Analyse des interactions des cascades transcriptionnelles impliquées dans le développement endocardique .....	87
<b>B) Nouveau modèle animal de communication inter-auriculaire de type secundum</b> .....	89
<b>C) Comparaison des modèles animaux <math>eTbx5^{-/-}</math> et <math>Tbx5^{+/-}</math></b> .....	90
<b>D) Redondance fonctionnelle de <math>Tbx5</math> avec <math>Tbx20</math> et <math>Tbx18</math></b> .....	92
1) $Tbx5$ et $Tbx20$ .....	93
2) $Tbx5$ et $Tbx18$ .....	94
<b>E) <math>Tbx5</math> dans le contrôle transcriptionnel du développement endocardique</b> .....	94
1) Convergence des cascades fonctionnelles de $Tbx5$ et de eNOS .....	96
2) Convergence des cascades fonctionnelles de $Tbx5$ et de VEGF .....	97
3) Convergence des cascades fonctionnelles de $Tbx5$ et de GATA-4 .....	98
<b>Chapitre 4 : Perspectives et études futures</b> .....	99
<b>Bibliographie</b> .....	100

## Liste des figures

### Introduction

<b>Figure 1,1.</b> Malformations congénitales cardiaques .....	1
<b>Figure 1,2.</b> Le développement cardiaque et les types cellulaires y participant.....	3
<b>Figure 1,3.</b> Développement du septum auriculaire .....	7
<b>Figure 1,4 :</b> Structure de <i>Tbx5</i> , sa relation phylogénique avec les autres membres de sa famille et les conséquences phénotypiques de sa mutation chez l'humain.....	28
<b>Figure 1,5.</b> Patron d'expression des facteurs de transcription <i>Tbx</i> à l'intérieur du cœur et des membres .....	32
<b>Figure 1,6.</b> Multiplicité phénotypique et génétique des malformations congénitales cardiaques chez l'humain .....	40

### Article

<b>Figure 1.</b> Generation of the e <i>Tbx5</i> conditionnal knock out .....	74
<b>Figure 2.</b> Anatomical analysis of e <i>Tbx5</i> <sup>+/-</sup> and e <i>Tbx5</i> <sup>-/-</sup> mice .....	75
<b>Figure 3.</b> MRI and cardiac chamber mass of e <i>Tbx5</i> mice .....	76
<b>Figure 4.</b> Conduction system defect in aging e <i>Tbx5</i> <sup>-/-</sup> mice .....	77
<b>Figure 5.</b> Cardiac function of e <i>Tbx5</i> mice.....	78
<b>Figure 6.</b> Exercise tolerance is reduced in e <i>Tbx5</i> <sup>-/-</sup> mice .....	79
<b>Figure 7.</b> Epistasis between eNOS, GATA-4 and <i>Tbx5</i> .....	80
<b>Figure 8.</b> Excessive apoptosis of the <i>septum primum</i> in e <i>Tbx5</i> <sup>-/-</sup> mice .....	81

## Liste des tableaux

### Introduction

<b>Tableau 1,1.</b> Facteurs de transcription impliqués dans le développement cardiaque .....	14
<b>Tableau 1,2:</b> Membres de la famille des facteurs de transcription Tbx impliqués dans le développement cardiaque .....	29
<b>Tableau 1,3.</b> Voies de signalisation impliquées dans la communication entre l'endocarde et le myocarde.....	42

### Article

<b>Table 1.</b> <i>eTbx5</i> mutant pups are present in a Mendelian ratio .....	72
<b>Table 2.</b> <i>eTbx5<sup>+/-</sup>/eNOS<sup>+/-</sup></i> mice have either a <i>primum</i> or a <i>secundum</i> type ASD .	73

## Liste des abréviations

$\alpha$ -CA: actine cardiaque alpha

$\alpha$ -MHC:  $\alpha$ -myosin heavy chain

AA : anomalie aortique

AAP : anomalie artérielle pulmonaire

AVC : accident vasculaire cérébral

ADI : domaine d'activation 1

ADII : domaine d'activation 2

ADN: acide désoxyribonucléique

*AMHC1* : chaîne lourde de la myosine auriculaire 1 (atrial myosin heavy chain 1)

ANF: facteur natriurétique de type A (atrial natriuretic factor)

AR : acide rétinoïque

ARNm : acide ribonucléique messenger

AT : anormalité trabéculaire

ATRVP : anomalie totale du retour veineux pulmonaire

AV : atrioventriculaire

AVC : coussin atrio-ventriculaire

AVT : atrésie de la valve tricuspide

*bHLH* : facteur basique hélice-loupe-hélice

BMP : protéine morphogénique osseuse (bone morphogenic protein)

*BNP* : peptide natriurétique de type B

*BRCA-1* : gène de tumeur mammaire 1 (breast cancer gene 1)

*BRCA-2* : gène de tumeur mammaire 2 (breast cancer gene 2)

Ca : caudal

CAE: crête apicale ectodermique

*c-fos* : un facteur de réponse sérique

CIA : communication inter-auriculaire

CIV : communication inter-ventriculaire

CO : cardiac output

*cTnC* : Troponine cardiaque C

*cTnI* : Troponine cardiaque I

Cx : connexine

DAP : doctus arteriosus persistant

DC : débit cardiaque

DCE : défaut du coussin endocardique

*dHAND/eHAND*: deciduum/extraembryonic membrane, heart, autonomic nervous system, neural crest-derived cell types

*Dmef2*: drosophila myocyte enhancer binding factor 2

*dpp* : dentin phosphoprotein

DSC : dysfonction du système de conduction

*ECE* : endothelin-1 conversion enzyme

ECM : endothéliale capillaire myocardique

EE : endothéliale endocardique

*Elk-1*: membre de la famille d'oncogène Ets

*eNOS/NOS3* : endothelial nitric oxyde synthase

*Eomes/Tbr2* : eomesodermin

*EPO* : erythropoietin

*ErbB<sub>2</sub>*: récepteur tyrosine kinase de la famille des facteurs de croissance épidermique

*ET-1*: endothelin-1

*ET<sub>A</sub>*: récepteur de l'endothelin-1 couplé à une protéine G A

*ET<sub>B</sub>*: récepteur de l'endothelin-1 couplé à une protéine G B

ETs: E twenty six

*FE*: fraction d'éjection

*FGF* : fibroblast growth factor

*FGFR* : fibroblast growth factor receptor

*Flk-1/VEGFR-2* : VEGF receptor 2

*FOG*: Friend of GATA

FOP : foramen oval persistant

*FoxC1*: forkhead box C1

FP: fente primitive (primitive streak)

FS: fractional shortening

FR: fraction de raccourcissement

GTP: guanosine triphosphate

*HEY2* : hairy/enhancer of split-related with YRPW motif

HVG : hypoplasie ventriculaire gauche

IRES : internal ribosome entry site

*Irx4*: Iroquois 4

*Isl1* : Islet 1

*IVDs*: diamètre intra-ventriculaire en systole

*IVDd* : diamètre intra-ventriculaire en dyastole

KLF : facteur Krüppel-like

MADS: MCM1, agamous, deficiens and SRF

MCC : malformation congénitale cardiaque

MDM2 : gène mouse double minute 2

*MEF2*: myocyte enhancer binding factor 2

*Mlc2v*: chaîne légère de la myosine ventriculaire 2

*Mlc1A* : chaîne légère de la myosine auriculaire 1

*MRF4* : facteur de modulation de la reconnaissance 4

MVM : malformation de la valve mitrale

*MyoD/Myf3* : facteur de différenciation myogénique 3

*Myf5* : facteur de différenciation myogénique 5

MPS : mésoderme présomitique

*Net* : membre de la famille d'oncogène Ets

*NFATc* : facteur nucléaire de cellules T activées (nuclear factor of activated T cells)

NKE : site de liaison des facteurs de transcription NK (NK element)

*NF- $\kappa$ B* : facteur nucléaire kappa B

*NK2SD* : domaine spécifique NK2

*NO* : nitric oxyde

*Nppa* : précurseur de peptide natriuretic A (natriuretic peptid precursor A)

*Nppb* : précurseur de peptide natriuretic B (natriuretic peptid precursor B)

O : oreillette

OD : oreillette droite

OG : oreillette gauche

ON : oxyde nitrique

*P53* : protéine tumorale 53

*PDGFR $\beta$*  : Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes  $\beta$

*PFO* : patent foramen oval

*Pitx/Tbx19* : facteur hypophysaire (pituitary factor)

*POMC* : proopiomelanocortin

*ppET-1* : pre pro endothelin-1

QCE-6 : lignée cellulaire immortalisée mésodermique cardiaque

QTL : trait de loci quantitatif

RAR : récepteur d'acide rétinoïque

*RBTN2* : rhombotin 2

Ro : rostral

*rv* : facteur rib-vertebrae

RXR : récepteur rétinoïque X

*Sap-1* : saposin A

SDVD : sortie double ventriculaire droite

*Shh* : sonic hedgehog

SHO : syndrome Holt-Oram

siRNA : small interfering ribonucleotide acid

*SM22- $\alpha$*  : transgelin

Sox-9 : SRY-related HMG-box gene 9

*SRE* : élément de réponse sérique (Serum response element)

*SRF* : facteur de réponse au sérum (serum response factor)

TBE : site de liaison de facteur *Tbx* (T box binding element)

*Tbx* : facteur de transcription à boîte T (T box factor)

*TCF* : facteur de complexe tertiaire (ternary complex factor)

TDF : tétralogie de Fallot

TE : trophoctoderme

TEM : transformation endothéliale-mésenchymateuse

*T<sub>h</sub>1* : cellule T auxiliaire 1 (T helper 1)

*T<sub>h</sub>2* : cellule T auxiliaire 2 (T helper 2)

*Tie-2* : récepteur tyrosine kinase spécifique aux cellules endothéliales 2

*Tin* : Tinman

TRA : troncus arteriosus

TUNEL : Terminal transferase dUTP nick end labeling

V : ventricule

VCSGP : veine cave supérieure gauche persistante

VD : ventricule droit

*VEGF* : Vascular endothelial growth factor

VG : ventricule gauche

*5-HT<sub>2B</sub>* : récepteur de la sérotonine

*À mes parents*

## **Remerciements**

Tout d'abord, je crois essentiel de remercier la personne qui a rendu cette expérience possible, ma directrice de recherche, Dre Mona Nemer. Je souhaite la remercier pour son support financier, technique et moral tout au long de cette longue et belle expérience que fût ma maîtrise. Je crois sincèrement que sans elle, ma maîtrise se serait terminée bien autrement qu'en une fantastique réussite et une expérience inoubliable. Elle fût présente pour moi aux moments clés, tant sur le plan humain que scientifique, et m'a forcé à repousser mes limites, à performer davantage et à atteindre mes buts. Tout au long du parcours, Mona a fait preuve d'une patience, d'une persévérance et d'une détermination envers moi qui rendrait jaloux bien des enfants. Ses coups de fouets m'ont fait progresser vers des réussites que je croyais inatteignables. Et c'est pour toutes ces raisons que je lui dis merci. Pour avoir cru en moi.

Évidemment, ce projet de recherche n'aurait pu être mené à bien sans l'équipe du laboratoire du Dre Nemer. Elle m'a appris toutes les techniques, utiles et indispensables, en biologie moléculaire et en physiologie animale, qui m'ont servi tout au long de mon séjour. Je tiens particulièrement à remercier Chantal Lefebvres, qui a génotypé de main de maître toutes les souris et embryons qui ont été nécessaires à ces recherches. Elle a aussi eu la patience de me côtoyer, tout au long de ces années, et d'endurer mes blagues parfois douteuses et mon caractère pas toujours positif. Aussi, besoin est de saluer la contribution du Dr Pierre Paradis, qui m'a permis de découvrir l'univers stimulant de la physiologie animale.

J'aimerais aussi remercier le futur docteur Romain Georges. Nos longues discussions, tant scientifiques que politiques, m'ont beaucoup appris. Ses idées et sa critique m'ont énormément servi et ont certainement rehaussé la valeur et l'impact de mes recherches.

Mon parcours fût aussi parsemé de co-directeurs officieux répondant aux noms de Dr Marko Horb et Dr Gregor Andelfinger. J'aimerais donc les remercier pour m'avoir suivi au cours des premières étapes de ma maîtrise. Leurs exigences

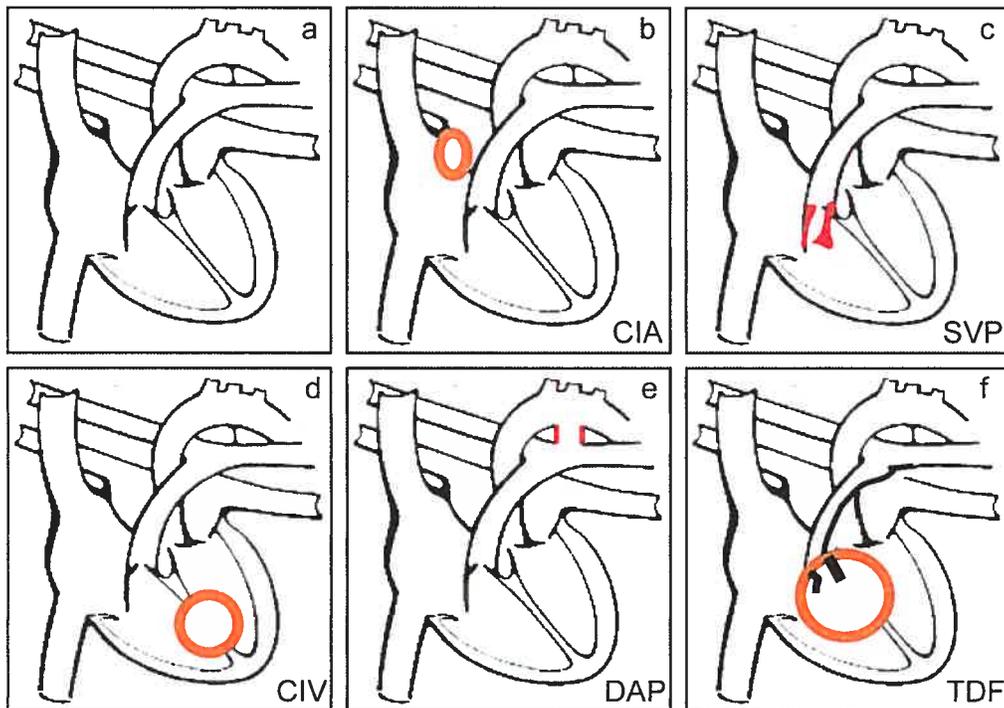
élevées m'ont amené à me dépasser, à travailler plus fort et ont certainement fait de moi un chercheur plus efficace. Leurs judicieux conseils ont aussi beaucoup apporté à l'étude présentée dans ce mémoire.

Enfin, je terminerai en remerciant tous mes proches, parents et amis, qui m'ont supporté moralement tout au long de cette épreuve. En particulier ma mère, qui n'a cessé de m'encourager et de me botter le derrière, littéralement, afin que je termine ce projet en beauté. Et je crois que c'est le cas. Ainsi donc, à vous tous, merci infiniment.

## Chapitre 1 : Introduction

### A) Malformations cardiaques

Les malformations congénitales cardiaques (MCCs) se retrouvent chez 1 à 3 % des nouveau-nés et représentent jusqu'à 25 % des malformations congénitales <sup>6</sup>. Bien que le spectre des malformations cardiaques observé soit considérable, les plus fréquentes sont les défauts du système de conduction et les défauts de septation auriculaire et ventriculaire (Fig 1,1 b,c) <sup>6</sup>. Le nombre important de patients ainsi que les coûts associés font de ces maladies un véritable fardeau pour le système de santé. Évidemment, la découverte de traitements préventifs et d'outils diagnostiques précoces améliorerait grandement la qualité de vie des patients et réduirait la charge financière supportée par le système de santé. Pour y arriver, il est nécessaire d'approfondir nos connaissances sur l'étiologie de ces malformations. Par ailleurs, une compréhension précise et complète des mécanismes menant à de tels défauts passe nécessairement par l'étude et l'analyse du développement de l'organe en question.



**Figure 1,1 Malformations congénitales cardiaques.** a) Cœur mature normal. b) Communication inter-auriculaire. c) Sténose de la valve pulmonaire. d) Communication inter-ventriculaire. e) *Doctus arteriosus* persistant. f) Tétralogie de Fallot

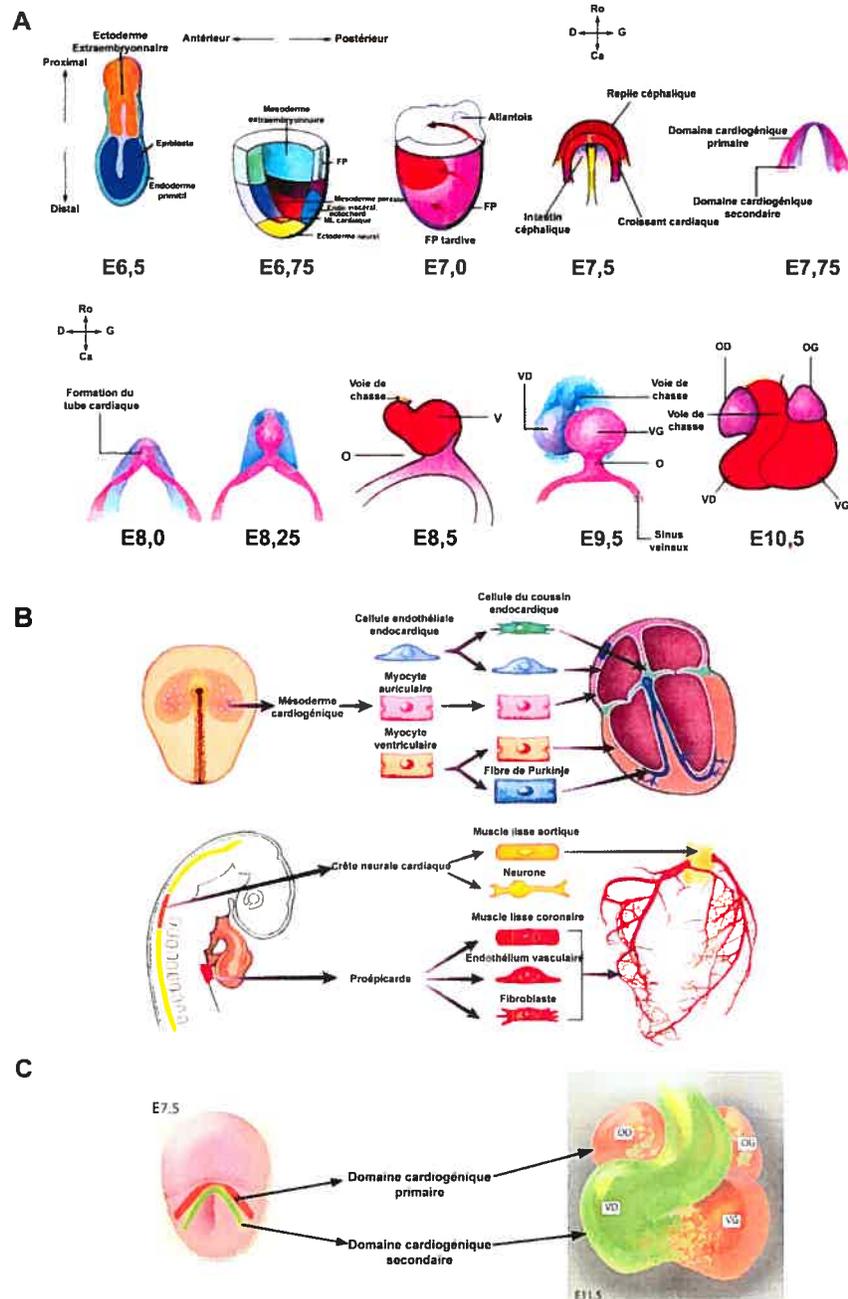
## **B) Développement cardiaque**

Le cœur est le premier organe fonctionnel à se développer<sup>7</sup>. Chez l'humain, les premiers battements sont observés dès le 23<sup>ème</sup> jour de gestation. Chez la souris, ceci correspond au jour embryonnaire 8,5 (E8,5). Malgré qu'il soit maintenant fonctionnel, son développement est loin d'être achevé. En effet, à ce moment, le cœur n'est en fait qu'un tube linéaire qui pompe le sang à l'aide de contractions péristaltiques (Fig 1,2a). À cette étape, il a la même configuration et le même fonctionnement que le vaisseau dorsal de la mouche (cœur de *Drosophila melanogaster*). Évidemment, entre le tube et le cœur adulte, une multitude d'étapes morphologiques se produisent et l'élucidation de la base moléculaire des malformations congénitales cardiaques passe nécessairement par leur compréhension. Voici donc une description détaillée du développement cardiaque, de la gastrulation au cœur adulte.

### *1) La gastrulation et la détection des premiers progéniteurs cardiaques*

La première étape permettant de comprendre le développement cardiaque est de localiser les cellules précurseuses cardiaques dans l'épiblaste (Fig 1,2a). Ces dernières sont détectées dans le mésoderme embryonnaire, postérieur aux précurseurs de la plaque neurale, près du site qui deviendra plus tard la partie rostrale de la fissure primitive (FP) (primitive streak)<sup>8,9</sup>. Déjà, les précurseurs expriment les marqueurs cardiaques *Nkx2-5*, *Tbx5* et *GATA-4*<sup>10-12</sup>. Il a été prouvé que cette zone renferme les précurseurs des cellules myocardiques et endocardiques. Suite à la formation de la fissure primitive, les progéniteurs cardiaques entrent dans la FP, migrent et forment le mésoderme cardiaque situé dans la partie antéro-proximale de l'épiblaste, juste sous la plaque céphalique<sup>10,12</sup>. Lors de la migration, l'endoderme et le mésoderme cardiaque se déplacent parallèlement, antérieurement, en suivant les côtés latéraux de la plaque neurale<sup>13</sup>.

Il est intéressant de noter que « l'ingestion » des précurseurs cardiaques dans la FP semble restreindre leur potentiel lignéaire<sup>14</sup>. En effet, il est possible de faire des greffes cellulaires avant la formation de la FP sans affecter le développement embryonnaire. Cependant, si la greffe est réalisée après, les cellules se sont déjà commises dans un type cellulaire et ne peuvent faire marche arrière<sup>15</sup>. La perte de plasticité des cellules du mésoderme cardiaque peut être expliquée par la présence d'interactions inductives provenant de l'endoderme. Aussi, les membres des familles



Modifiées de Harvey et Rosental 1999 et de Stennard *et al.* 2005

**Figure 1.2. Le développement cardiaque et les types cellulaires y participant. A)**

Étapes du développement cardiaque chez les vertébrés. FP : fissure primitive, ML : mesoderme latéral, Ro : rostral, Ca : caudal, D : droite, G : gauche, O : oreillette, V : ventricule, VD : ventricule droit, VG : ventricule gauche, OD : oreillette droite, OG : oreillette gauche. B) Origine cellulaire des différentes structures cardiaques. C) Structures dérivées des domaines cardiogéniques primaire et secondaire

BMP et FGF sont produits par l'endoderme et leur action en tant que signaux d'induction n'est plus à défendre <sup>16,17</sup>.

### 2) *Le croissant cardiaque*

Précédent la formation du tube cardiaque, les progéniteurs cardiaques sont disposés aux marges latérales et rostrales du mésoderme cardiaque <sup>9</sup>. Ils sont donc étalés en forme de croissants. Les deux croissants, latéral gauche et droit, fusionnent chez l'humain à leur partie rostrale vers le 22<sup>ième</sup> jour de gestation (E8 chez la souris). Cette fusion se termine environ un jour plus tard (12 heures chez la souris) avec la formation du tube cardiaque (Fig 1,2a). Le mésoderme cardiaque étant constitué de cellules endocardiques et myocardiques, c'est par une migration différentielle de ces types cellulaires que le tube cardiaque se forme <sup>18</sup>. L'origine de ces deux types cellulaires sera élaborée ultérieurement.

### 3) *Le premier organe fonctionnel : le tube cardiaque.*

Le cœur devient un organe fonctionnel lorsqu'il atteint la forme d'un tube linéaire qui bat. Le tube cardiaque est fonctionnel puisqu'il se contracte directionnellement, débutant ainsi la circulation sanguine. Il est constitué d'une monocouche externe de cardiomyocytes et d'une autre interne de cellules endocardiques <sup>19</sup>. Déjà à cette étape, l'expression différentielle de différents marqueurs indique que les quatre chambres cardiaques sont délimitées le long du tube <sup>20-24</sup>. La partie rostrale formera ultérieurement la voie de chasse (outflow tract), la partie médiane formera quant à elle le ventricule droit et finalement, la partie caudale constituera le ventricule gauche et les oreillettes. Aussi, la diversité cellulaire du cœur à cette étape est faible, ne comprenant que trois types cellulaires : endocardiques, cardiomyocytes ventriculaires et cardiomyocytes auriculaires.

Étant donné l'absence du système de conduction à cette étape, comment expliquer les contractions rythmiques observées? C'est en fait cette contractilité spontanée qui différencie les cellules musculaires cardiaques des cellules musculaires squelettiques et lisses <sup>19,25</sup>. Le rythme auquel les cardiomyocytes se contractent augmente selon un gradient rostro-caudale (lent-rapide) <sup>19</sup>. Puisque les cardiomyocytes sont couplés à l'aide de jonction « gap », on croit que les cellules situées dans le nœud

sinusal se contractant à un rythme plus rapide possèdent une fonction de « pacemaker »<sup>19</sup>.

#### 4) *Le « looping »*

Peu de temps après ses premières contractions péristaltiques, le tube cardiaque se plie, positionnant ainsi le futur ventricule gauche en juxtaposition au ventricule droit (Fig 1,2a)<sup>26</sup>. Le « looping » cardiaque définit donc la séquence des changements positionnels et morphologiques par lesquels le tube linéaire cardiaque se transforme en cœur asymétrique. Ces changements font du cœur le premier organe à développer une asymétrie gauche-droite. De la Cruz (1998)<sup>27</sup> propose un modèle de looping cardiaque en trois étapes : 1) formation du cœur en C, 2) formation du cœur en S, et 3) étapes finales du looping. Ces dernières regroupent le positionnement final des chambres et du *conus* par rapport aux oreillettes.

##### a) *Formation du cœur en « C »*

La première étape du « looping » consiste en un repliement ventral de la section ventriculaire du tube cardiaque. Par la suite, la zone ventriculaire se tord vers la droite, produisant ainsi un cœur en forme de « C ». La torsion du cœur fait en sorte que les cardiomyocytes qui se trouvaient initialement dans la partie ventrale du tube linéaire se retrouvent maintenant du côté droit, à l'intérieur du « C ». Cette rotation de 90° est aussi infligée à tous les autres cardiomyocytes ventriculaires. Finalement, cette étape se termine par un léger déplacement vers la droite du *conus*.

##### b) *Formation du cœur en « S »*

La transition du cœur en « C » vers un cœur en « S » comporte deux événements morphologiques distincts : 1) le raccourcissement de la distance entre le mur caudal du *conus* primitif et le mur rostral de l'oreillette primitive et 2) le déplacement de la zone ventriculaire de sa position rostrale à une position caudale à l'oreillette primitive.

Le raccourcissement et le déplacement décrits précédemment sont tous deux fortement influencés par la rotation vers la droite du corps autour de l'axe rostro-caudal et par la flexion crânienne et cervicale de l'embryon. Ce processus débute par la tête et se propage caudalement.

### c) Étapes finales du « looping »

Les changements morphologiques terminant le « looping » sont, en premier lieu, l'apparition morphologique de l'ébauche tubulaire (tubular anlage) des futures grandes artères (truncus arteriosus) au pôle artériel du cœur et, en second lieu, le déplacement du deux tiers proximal du *conus* primitif vers la droite, gagnant ainsi sa position finale par rapport aux oreillettes. Ces changements sont accompagnés par une croissance générale du cœur et une expansion considérable de la zone ventriculaire et de l'oreillette primitive.

### 5) La septation

Suite au « looping », seule la cloison entre l'oreillette et le ventricule, appelée coussin auriculo-ventriculaire, s'est développée<sup>28</sup>. Chez le cœur adulte, les *septums* auriculaires et ventriculaires sont aussi présents. Voici donc une description de leur développement.

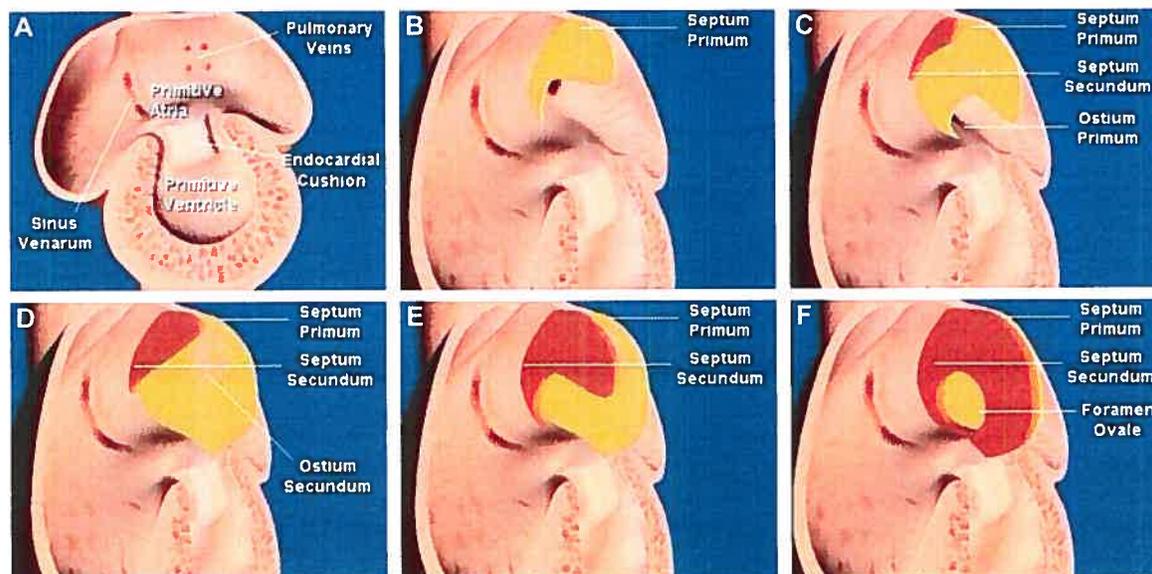
#### a) Septation auriculaire

La septation auriculaire se déroule chez la souris aux jours E11 à E14. La formation adéquate de ce *septum* implique plusieurs caractéristiques. Tout d'abord, le *septum* doit permettre, chez l'embryon, la circulation sanguine directionnelle entre les deux oreillettes et chez l'adulte, un cloisonnement hermétique de ces dernières<sup>28</sup>. En effet, la circulation fœtale implique que le sang oxygéné, provenant du placenta et arrivant par la veine cave à l'oreillette droite, soit redirigé vers la circulation périphérique en passant directement à l'oreillette gauche. Ceci évite au sang oxygéné de passer d'abord par les poumons remplis d'eau avant de passer à la circulation périphérique. Voici donc une description des étapes du développement normal du *septum* auriculaire.

Le début de la septation auriculaire consiste en la migration du *Septum Primum* de la partie rostro-dorsale de l'oreillette commune vers le coussin endocardique (Fig 1,3a,b,c)<sup>29</sup>. Cette étape se déroule chez la souris aux jours E11 à E12. Le *septum primum* est surtout composé de cardiomyocytes. Jusqu'à sa fusion avec le coussin endocardique, le sang passe sans difficulté de l'oreillette droite à l'oreillette gauche par l'*ostium primum* (Fig 1,3d,e,f)). De E12,5 à E13,5, une zone de la partie rostrale du *septum primum* subit de l'apoptose créant ainsi un second orifice, le *septum secundum*. Au même moment, le *septum secundum* se développe d'une invagination de la partie

dorsale de l'oreillette commune, du côté droit du *septum primum*, et migre lui aussi vers le coussin endocardique. Ce dernier laisse cependant un orifice ouvert, en face de l'*ostium primum*, appelé *fossa ovalis* ou fosse ovale (Fig 1,3f). La pression étant plus élevée, chez l'embryon, dans l'oreillette droite que dans la gauche, le sang oxygéné passe par le labyrinthe créé par la fosse ovale et l'*ostium secundum* pour se rendre dans l'oreillette gauche.

Après la naissance, la pression dans l'oreillette droite diminue tandis que celle de l'oreillette gauche augmente. Ceci a pour conséquence de forcer le *septum primum* à se coller sur le *septum secundum*, moins flexible. Ce faisant, l'*ostium secundum* et la *fossa ovalis* se trouvent obstruées. Chez plus de 70% de la population, il s'en suit la fusion du *septum primum* avec le *septum secundum*. L'absence de cette fusion occasionne une malformation appelée foramen ovale persistant (FOP)<sup>30</sup>. Cette malformation est associée, entre autres, à des migraines à aura et triple les risques d'accidents vasculaires cérébraux à répétition<sup>31</sup>.



**Figure 1,3 : Étapes du développement du septum auriculaire.** En A, l'oreillette commune est observable. La première étape de la septation est la migration du *septum primum* (A) et la formation de l'*ostium primum* (B). Ensuite, il y a apoptose partielle du *septum primum* (D) et migration du *septum secundum* (D, E). Finalement la fusion des septums rend la cloison étanche (F)

### *b) Septation ventriculaire*

La septation ventriculaire débute quelques heures après la fusion du *septum primum* avec le coussin endocardique<sup>32</sup>. Le *septum* se développe à partir de l'apex ventriculaire. Une population de cardiomyocytes envahit le ventricule commun et migre vers le coussin endocardique. Il semblerait, à l'observation des coupes histologiques, que ce dernier migre légèrement vers le *septum* ventriculaire. La septation se termine avec la fusion du mur myocardique avec le coussin endocardique.

### **C) Origine des cellules cardiogéniques**

#### *1) Origine des cellules endocardiques et myocardiques : commune ou distincte?*

Maintenant que le développement anatomique du cœur a été décrit, les événements cellulaires et moléculaires qui y sont associés seront abordés. Le cœur étant formé de plusieurs types cellulaires, l'origine de celles-ci doit être abordée. Bien que plusieurs études dans divers modèles expérimentaux se contredisent sur certains points, toutes semblent s'entendre pour affirmer que le mésoderme cardiaque comprend à la fois les progéniteurs myocardiques et endocardiques<sup>7,33,34</sup>. Le débat porte plutôt sur le moment où les types cellulaires se commettent dans l'une ou l'autre des voies de différenciation. Voici un résumé des connaissances à ce jour.

Avant la formation du tube linéaire, les précurseurs sont regroupés dans le mésoderme cardiaque. Cette partie du mésoderme se trouve dans la région rostro-ventrale de l'épiblaste. Les cellules présentes au sein de ce mésoderme expriment toutes N-Cadherin et sont disposées en une monocouche d'épithélium<sup>35</sup>. Cet épithélium se sépare ensuite en deux populations cellulaires. D'une part, la majeure partie des cellules continue d'exprimer N-Cadherin et demeure au sein de l'épithélium. Ce groupe de cellules formera plus tard le myocarde. D'autre part, une faible partie de ces cellules cessent d'exprimer N-Cadherin et se détachent de l'épithélium pour former la population de cellules précurseurs endocardiques<sup>36,37</sup>.

Une question demeure toutefois, jusqu'à présent sans réponse : les cellules myocardiques et endocardiques sont-elles d'origine commune ou distincte? D'un côté, en se basant sur l'hétérogénéité morphologique cellulaire retrouvée à l'intérieur du mésoderme cardiaque, il est possible d'affirmer que, déjà à ce moment, les cardiomyocytes et les cellules endocardiques sont ségréguées<sup>7,33,34</sup>. Cependant, le

patron d'expression de gènes myocardiques et endocardiques à l'intérieur du mésoderme et celui retrouvé dans la lignée cellulaire QCE-6, une lignée cellulaire immortalisée provenant du mésoderme cardiaque, laisse croire que les cellules du mésoderme peuvent produire les deux types cellulaires<sup>38</sup>. En effet, les cellules QCE-6 ont la capacité de se différencier en cellules musculaires ou endothéliales.

Ce n'est qu'avec l'utilisation de rétrovirus que le mystère a finalement pu être résolu<sup>39</sup>. Brièvement, une cellule nouvellement entrée dans la FP, en migration vers le mésoderme cardiaque, était infectée avec un rétrovirus exprimant le gène rapporteur *LacZ*. Par la suite, le cœur des embryons était coloré et observé. Les résultats de ces analyses démontrent que le mésoderme est constitué des deux types cellulaires. Effectivement, tous les clones étudiés ont généré des populations homogènes de cellules, qu'elles soient endocardiques (dans 5% des cas) ou myocardiques (dans 95% des cas)<sup>39</sup>. Aucun clone dérivé de cellule du mésoderme cardiaque n'a produit des cellules filles appartenant aux deux types cellulaires. Ces résultats démontrent donc que la ségrégation des cardiomyocytes et des cellules endocardiques se produit avant la formation du mésoderme cardiaque.

## 2) *Origine des cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires*

Avant que le tube linéaire cardiaque ne commence ses contractions, les cardiomyocytes ventriculaires et auriculaires sont déjà ségrégés. En effet, les caractéristiques électrophysiologiques et le patron d'expression des protéines contractiles permettent d'affirmer que les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires se retrouvent respectivement dans les parties centrale et rostrale du tube linéaire<sup>40</sup>. De plus, des études de cartographie cellulaire (fate mapping) permettent d'observer que les cellules de la partie rostrale de la FP se retrouvent dans la partie rostrale du tube et que les cellules situées dans la partie caudale de la FP en forment la partie caudale<sup>9,18</sup>. Ceci suggère donc que les cardiomyocytes ventriculaires et auriculaires se spécifient pendant ou avant la gastrulation.

Par ailleurs, l'utilisation de greffes hétérotopiques isochroniques le long de la FP contredit ces conclusions et démontre plutôt que les cellules de la FP ne sont pas compromises à un type cellulaire en particulier et que la localisation à l'intérieur du cœur dépend du site d'ingression à la FP. Ces résultats suggèrent donc que les précurseurs

myogéniques conservent une bipotentialité à l'intérieur du mésoderme cardiaque et que la différenciation terminale se produit à l'intérieur du mésoderme ou lors des étapes suivantes du développement cardiaque.

Un mécanisme jouant un rôle clé dans l'établissement de l'axe rostro-caudal et l'identité auriculaire ou ventriculaire des cardiomyocytes à cette étape du développement implique l'acide rétinoïque (AR). Plusieurs faits supportent cette hypothèse. Tout d'abord, le traitement d'embryon de poulet à l'AR déplace l'expression de la chaîne lourde de myosine auriculaire-1 (AMHC1) vers la partie rostrale du tube cardiaque<sup>22</sup>. De plus, chez la souris mutante RXR, un récepteur d'AR, l'expression ventriculaire d'AMHC1 indique aussi qu'une partie du segment ventriculaire est en fait d'identité auriculaire<sup>41</sup>. Ces observations suggèrent donc que le gradient d'AR joue un rôle important dans l'établissement de l'identité des cardiomyocytes et dans la segmentation du tube cardiaque. Par ailleurs, il est intéressant de constater que chez le poulet, l'exposition à l'AR des cardiomyocytes du tube cardiaque n'influence plus leur identité auriculaire ou ventriculaire<sup>24</sup>. Ceci démontre donc que l'effet inductif de l'AR sur l'identité des cardiomyocytes survient avant la formation du tube cardiaque.

Tel que mentionné précédemment, les cellules cardiaques forment, au jour E7.5, le croissant cardiaque. Plus récemment, la cartographie cellulaire rétrospective a permis d'établir que toutes les cellules cardiaques proviennent d'un progéniteur commun mais qu'une restriction lignéaire s'établit tôt dans le développement, créant deux groupes distincts de cellules<sup>42</sup>. Ces deux groupes peuvent être suivis et la distribution de leurs cellules filles au sein du cœur est maintenant établie. Le premier groupe, le domaine cardiogénique primaire, est rostral au second et occupe la zone considérée classiquement comme le domaine du croissant cardiaque<sup>42</sup>. Il subit une différenciation hâtive à en juger par les patrons d'expression de marqueurs myofilamentaires au stade du croissant cardiaque. Il regroupe les précurseurs du ventricule gauche, des oreillettes, du canal auriculo-ventriculaire et de la voie d'entrée cardiaque. Le deuxième groupe, le domaine cardiogénique secondaire, est constitué des précurseurs du ventricule droit et de la voie de chasse cardiaque mais quelques cellules filles de ce domaine sont aussi retrouvées dans les oreillettes<sup>43</sup>. L'expression de différents marqueurs, notamment *Isl1* et *Tbx1*, par les cellules du domaine cardiogénique secondaire ainsi que différentes méthodes de traçage permettent d'affirmer que sa différenciation et son déploiement se font plus tardivement que ceux du domaine

cardiogénique primaire<sup>44-46</sup>. L'expression de ces marqueurs soutient aussi l'hypothèse proposant qu'une restriction lignéaire s'établie avant la formation du croissant cardiaque<sup>47</sup>.

### 3) *Origine des autres types cellulaires présents dans le cœur*

Le cœur est évidemment formé d'autres types cellulaires (Fig 1,2b). Des études de cartographie cellulaire (fate mapping) réalisées chez le poulet ont permis de déterminer que les cellules constituant le cœur proviennent exclusivement de trois origines; a) du mésoderme cardiaque, b) de la crête neurale ou c) du proépicaarde<sup>39</sup>. Voici donc les autres types cellulaires retrouvés dans le cœur et leur origine.

#### a) *Cellules du système de conduction (fibre de Purkinje)*

Les premières fibres de Purkinje, détectées par le haut niveau d'expression de Connexine 42 (Cx42), sont observées le long des artères coronaires en croissance à E10<sup>48</sup>. Des études de marquage génétique à l'aide de rétrovirus ont démontré que les cellules des fibres de Purkinje se différencient à partir de cardiomyocytes ventriculaires contractiles. Cependant, aucun clone n'a produit une population mixte comportant des fibres de Purkinje et des cellules du nodule auriculo-ventriculaire, du « bundle » ou du compartiment sinoatrial<sup>48</sup>. Le potentiel de différenciation des cardiomyocytes en divers types de cellules du système de conduction doit donc être réduit plus tôt dans le développement ou influencé par des signaux inductifs locaux.

#### b) *Système vasculaire coronaire (cellules musculaires lisses coronaires, vasculaires endothéliales et fibroblastes)*

Les mécanismes impliqués dans le développement du système vasculaire coronaire et le patron de distribution de ses vaisseaux restent encore aujourd'hui largement inconnus. Ceci s'explique entre autres par le fait que l'ontogénie et le lignage cellulaire des vaisseaux coronaires sont demeurés controversés jusqu'à tout récemment<sup>49,50</sup>. D'autre part, deux processus distincts menant à la formation de vaisseaux sanguins pourraient expliquer la formation de la vasculature coronaire : l'angiogénèse et la vasculogénèse<sup>51</sup>. Le premier décrit la formation d'un vaisseau par sa croissance à partir d'un autre déjà existant alors que le second l'explique par la fusion de vésicules endothéliales formées localement. Ici encore, l'utilisation de rétrovirus apporte des réponses à ces questions. Tout d'abord, les résultats démontrent que les cellules musculaires lisses et vasculaires endothéliales proviennent du proépicaarde<sup>52</sup>.

Cette zone se situe sur le corps de l'embryon, à peu près à la hauteur du sixième somite. Finalement, les clones provenant de cette zone produisent, dans tous les cas, une population cellulaire homogène soit : musculaire lisse, endothéliale vasculaire ou fibroblastique. Ceci démontre donc que déjà dans le proépicarde, les progéniteurs de ces trois types cellulaires se sont déjà différenciés vers une lignée bien précise.

#### *c) Cellules musculaires lisses aortiques*

L'utilisation de chimères poulet/caille permet d'affirmer que les cellules musculaires lisses formant les artères proximales (sac aortique, aorte et arc aortique) proviennent de la crête neurale<sup>53</sup>. La participation de cette dernière à la vascularisation coronaire n'a cependant pu être analysée à l'aide de ce modèle puisque la structure de la chromatine des cellules de caille change à l'intérieur du cœur, rendant impossible le discernement de ces dernières par rapport à celle du poulet. Par ailleurs, l'utilisation de rétrovirus démontre que l'apport des cellules de la crête neurale se restreint à ce site<sup>54</sup>.

### **D) Régulation transcriptionnelle du développement cardiaque**

Maintenant que le développement cardiaque du point de vue morphologique et cellulaire a été décrit, une analyse des événements moléculaires et transcriptionnels s'impose.

#### *1) De la gastrulation au tube cardiaque*

Le vaisseau dorsal de *Drosophila Melanogaster* est comparable, du point de vue développemental, au tube linéaire cardiaque des vertébrés. L'étude des interactions moléculaires et génétiques menant à la formation du vaisseau dorsal permet d'analyser les gènes et les éléments régulateurs essentiels à son développement.

Tel que mentionné précédemment, les premiers stades du développement cardiaque sont observés lors ou peu avant la formation du mésoderme. Il semble que trois facteurs de transcriptions soient essentiels au développement de ce dernier. Tout d'abord, le morphogène NK-kB-related Dorsal, d'origine maternelle, est exprimé principalement le long de la ligne ventrale du blastoderme<sup>55</sup>. La présence de ce morphogène est essentielle à l'expression des gènes zygotiques *twist*, un facteur de transcription hélice-loupe-hélice de base (bHLH), et *snail*, un facteur de transcription à

doigt de zinc. Dans les deux cas, une perte de fonction inhibe complètement la formation et la différenciation du mésoderme<sup>56</sup>. Il est cependant important de mentionner que ces deux facteurs de transcription jouent des rôles forts différents. *Snail* agit en réprimant l'expression de gènes non mésodermaux alors que *twist* active l'expression de gènes impliqués dans l'invagination et la différenciation du mésoderme<sup>57</sup>. Les principaux gènes cibles de *twist* sont : *folded gastrulation*, un gène encodant une molécule sécrétée, *heartless*, qui encode un récepteur FGF, *tinman*, un facteur de transcription à homéodomaine, représenté chez les vertébrés par *Nkx2-5*, *myocyte enhancer binding factor-2 (mef2)*, un facteur de transcription à domaine MADS et *zfh-1*, un facteur de transcription à doigt de zinc et à homéodomaine, requis pour la différenciation d'un groupe de cellules cardiaques<sup>57,58</sup>. Les facteurs de transcription les plus étudiés chez les vertébrés seront ici discutés (Tableau 1,1).

#### a) *Tinman* et ses orthologues *Nkx2-5/csx*

Le facteur de transcription *tinman* (NK4 et msh-2) joue un rôle crucial dans la spécification du mésoderme en mésoderme viscéral et somatique. Il est exprimé sous le contrôle du gène *twist* et encode un facteur de transcription à homéodomaine de classe NK-2. Cette famille se distingue principalement par la présence d'une tyrosine à la position 54 de l'homéodomaine, contribuant probablement à la spécificité de liaison à l'ADN de cette classe<sup>59</sup>. Son expression est d'abord observée dans les cellules du blastoderme mésogénique. Elle persiste dans ces mêmes cellules après la gastrulation. L'expression se restreint ensuite à la partie dorsale du mésoderme grâce à un signal inductif provenant de l'ectoderme et médiée par *dpp*, un orthologue de la protéine morphogène osseuse (BMP).

Présentement, trois rôles sont possiblement joués par *tinman*. Tout d'abord, chez le mutant *tin*, les cellules précurseuses dorsales ne sont pas spécifiées. En effet, les cellules musculaires cardiaques, viscérales et du mur dorsal sont absentes<sup>60,61</sup>. *Tin* a donc un rôle primordial à jouer dans la segmentation du mésoderme. Par ailleurs, *tin* permet l'expression cardiaque de *Dmef2*, un facteur de transcription à boîte MADS, essentiel à la différenciation terminale de cellules musculaires<sup>62</sup>. Finalement, un troisième rôle dans la spécification de cellules gliales et musculaires ventrales a aussi été observé<sup>60</sup>.

**Tableau 1.1. Facteurs de transcription impliqués dans le développement cardiaque**

Gène	Gènes cible	Phénotype associé à sa perte de fonction
<i>Nkx2-5</i>	<i>Dmef2, Nppa, <math>\alpha</math>-CA, MLC2V, SM-22, CARP, eHAND/Hand1</i>	Absence de spécification des cellules précurseurs dorsales. Absence de spécification des cellules gliales et musculaires ventrales <sup>63</sup>
<i>Mef2</i>	<i>Desmin, MLC2V, <math>\alpha</math>MHC, myogenin, dHAND, eHAND, Nppa, <math>\alpha</math>-CA, MLC1A</i>	<i>Mef2c</i> : retard de croissance à E9, absence de « looping », hypoplasie ventriculaire, absence du ventricule droit, dilatation auriculaire <sup>64</sup> . <i>Mef2a</i> : mort subite pendant la première semaine de vie, dilatation ventriculaire droite, fragmentation myofibrillaire, désorganisation mitochondriale <sup>65</sup> .
<i>SRF</i>	<i><math>\alpha</math>-CA, myogenine, c-fos</i>	Hypoplasie ventriculaire, hypotrabéculatation et amincissement du septum inter-ventriculaire <sup>66</sup> . Le cœur des souris mutantes cesse de battre au jour E10,5.
GATA-4	<i>cTnC, <math>\alpha</math> et <math>\beta</math>MHC, Nppa, Nppb, Troponin I et Tcardiaque,</i>	Bloque la réponse des P19 à l'acide rétinoïque <sup>10</sup> . Spécification normale des pro-cardiomyocytes mais migration compromise <sup>67</sup> . Formation d'un ou deux tubes cardiaques dans la partie dorsale de l'embryon.
GATA-5	À déterminer	Malformation du tractus génital chez la femelle <sup>68</sup> .
GATA-6		Absence de phénotype cardiaque en absence de GATA-6 <sup>69</sup> . Les souris double hétérozygotes GATA-4/GATA-6 démontrent cependant un phénotype cardiaque comprenant communication inter-ventriculaire et aorto-pulmonaire, un développement anormal des muscles lisses et une hypoplasie myocardique <sup>70</sup> . La prolifération des cardiomyocytes est aussi réduite chez ces embryons.
<i>dHAND</i>	GATA-4	Absence de ventricule droit. Les étapes précoces du looping sont normales <sup>71</sup> . Malformation du sac aortique.
<i>eHAND</i>		Hypoplasie ventriculaire gauche <sup>72</sup> .
COUP-TFII	<i>Angiopoietin-1</i>	Arrêt du développement auriculaire et du sinus veineux au stade du tube linéaire cardiaque. Essentiel au développement des vaisseaux veineux. Son absence induit l'apparition de marqueurs artériels dans les veines <sup>73</sup> .

Chez les vertébrés, le premier gène de la classe NK-2 exprimé dans le cœur à être identifié est *Nkx2-5/Csx*<sup>74,75</sup>. Il est aussi le marqueur le plus précoce des cellules cardiogéniques. Jusqu'à présent, il est aussi le seul membre de la famille à être exprimé dans le cœur de tous les vertébrés étudiés. D'autres, tel *Nkx-2.3a*, *Nkx-2.8* et *Nkx2.7* sont aussi retrouvés dans le cœur du *Xenopus*, du poulet et du poisson zèbre respectivement.

L'expression cardiaque de *Nkx2-5* chez la souris est détectée aussi tôt que E7.5<sup>75</sup>. Elle se situe dans le mésoderme cardiaque et persiste lors de la formation du croissant

avant de se restreindre à la couche de cardiomyocytes. Elle demeure détectable chez l'adulte exclusivement dans les cardiomyocytes.

L'identification de la séquence de liaison à l'ADN (T-C/T-A-A-G-T-G) couplée à des recherches *in silico* et *in vitro* ont permis de découvrir des gènes cibles de *Nkx2-5*. C'est le cas du gène *Nppa* qui encode le facteur natriurétique auriculaire (Atrial Natriurétic Factor (ANF)), et de l'*actine cardiaque alpha* ( $\alpha$ -CA). Dans le cas de *Nppa*, *Nkx2-5* interagit physiquement et synergise avec GATA-4 pour permettre son expression. La présence des deux partenaires est en effet essentielle à l'activation du promoteur *in vitro*<sup>76</sup> et *in vivo*<sup>16</sup>. Quant à elle, l'expression maximale de l' $\alpha$ -CA dépend de l'action synergique de plusieurs éléments de réponse sérique (serum response element (SRE)) et de *Nkx2-5*. Il est aussi intéressant de constater que la boucle de rétroaction positive qui permet à *tin* de réguler sa propre expression, est présente tant chez la mouche que chez la souris<sup>77,78</sup>. Il faut cependant mentionner que ces deux gènes ne sont pas fonctionnellement équivalents. En effet, la perte de fonction de *tin* ne peut être sauvée totalement par l'expression de *Nkx2-5*. Bien que le phénotype viscéral puisse être compensé par le gain de fonction de *Nkx2-5*, le phénotype cardiaque, lui, demeure inchangé<sup>61</sup>. De plus, le domaine cardiogénique de *tin*, présent en N-terminal, n'est pas retrouvé chez *Nkx2-5*. Ces observations démontrent donc une divergence fonctionnelle de ces orthologues ainsi qu'une divergence des mécanismes moléculaires utilisés par les membres de la famille NK-2 dans la cardiogénèse.

D'autres gènes régulés par *Nkx2-5* ont été découverts à l'aide de la perte de fonction de *Nkx2-5*. Parmi ceux-ci se trouvent la chaîne légère de myosine 2V (MLC2V), *Nppa* et les facteurs de transcription *CARP* et *eHand/Hand1*<sup>79-81</sup>. Ce dernier sera discuté ultérieurement.

#### b) Les facteurs de transcription à domaine MADS

Le facteur de transcription *MEF2* appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine MADS, nommé ainsi suite à la découverte des quatre facteurs de transcriptions fondateurs soit : MCM1, contrôlant le « mating » chez la levure, *Agamous* et *Deficiens*, impliqués dans le développement du pétale et du verticille chez la plante et finalement, le facteur de réponse sérique (SRF), essentiel à l'activation de gènes musculaires. Ce dernier sera discuté plus loin. Cette famille de facteur de

transcription possède un domaine de liaison à l'ADN MADS au sein des 57 premiers acides aminés N-terminal. Quant à la sous famille MEF2, elle possède en plus un domaine de liaison à l'ADN MEF2 en C-terminal du domaine MADS. La drosophile ne possède qu'un seul gène *mef2* alors que les vertébrés en possèdent quatre (*mef2a* à *d*). Ces cinq gènes *mef2* démontrent un haut degré d'identité de séquence au niveau de leurs domaines MADS et MEF2 mais divergent fortement en ce qui a trait à leur domaines de transactivation situé en C-terminal. Les membres de la sous-famille MEF2 lient l'ADN via la séquence consensus C/T-T-A-(A/T<sub>4</sub>)-T-A-G/A retrouvée dans le promoteur de plusieurs gènes cardiaques et musculaires. C'est entre autre le cas du promoteur du gène *desmin*, pour lequel la séquence de liaison MEF2 est essentielle à son expression cardiaque<sup>82</sup>. Le site de liaison MEF2 est aussi retrouvé dans les promoteurs des gènes de la chaîne légère de myosine ((MLC)-2V) et de la chaîne lourde d'alpha myosine ( $\alpha$ -MHC)<sup>83</sup>. De plus, celui retrouvé dans le promoteur du gène *myogenin* est essentiel à son expression *in vivo*<sup>84</sup>. Il est cependant nécessaire de mentionner que l'activation de ce promoteur ne requiert pas la liaison de MEF2 et qu'elle peut se faire via le recrutement de MEF2 par GATA-4<sup>85</sup>.

Il est aussi important de mentionner que chaque gène *mef2* produit plusieurs isoformes et que ces derniers ont des rôles à jouer dans le développement extracardiaque<sup>86-91</sup>. Cette multitude de protéines MEF2 peut s'hétérodimériser rendant ainsi possible la reconnaissance d'une multitude de sites de liaison à l'ADN. Ces rôles ne seront cependant pas discutés ici.

L'expression des gènes de la sous-famille MEF2 débute, chez la souris, au jour E7.75. À ce stade, les transcrits de *mef2b* et *c* sont détectés dans le mésoderme précardiogénique. À E8, peu après la formation du tube linéaire cardiaque, débute l'expression des deux autres membres de la famille, *mef2a* et *d*. Les quatre transcrits sont ensuite présents tout au long du développement cardiaque. Ils sont aussi observables dans d'autres types cellulaires, particulièrement, les cellules musculaires squelettiques et lisses, les cellules endothéliales vasculaires du sac vitellin et certaines du cerveau. Chez l'adulte, le patron d'expression des transcrits *mef2* est pratiquement ubiquitaire. Il est cependant intéressant de constater que malgré ce large patron d'expression, les protéines et leur activité de liaison sont fortement enrichies dans les muscles, le cœur et le cerveau<sup>92</sup>. Cette observation s'explique par la découverte d'un

mécanisme de régulation post-transcriptionnel impliquant une séquence conservée de 428 nucléotides dans la région 3' non traduite<sup>93</sup>. La régulation post-traductionnelle des membres de cette famille a aussi son importance dans leur spécificité d'action<sup>94</sup>.

Étant donné la multitude de gènes *mef2* chez la souris et la redondance possible entre ceux-ci, l'interprétation d'une perte de fonction complète de *mef2* est encore aujourd'hui difficile. Chez la drosophile cependant, l'existence d'un seul gène *D-mef2* la facilite grandement. Incidemment, les embryons de drosophiles n'exprimant pas *D-mef2* possèdent des myoblastes cardiaques, somatiques et viscéraux spécifiés et correctement localisés. Toutefois, la différenciation terminale de ces derniers est compromise<sup>95</sup>. Ce phénotype suggère donc un rôle important joué par *D-mef2* dans le programme de différenciation musculaire chez la drosophile.

L'analyse de la fonction des gènes *mef2* chez les vertébrés a débuté avec l'inactivation du gène *mef2c*. Les embryons n'exprimant aucune allèle *mef2c* semblent normaux jusqu'au jour E9 mais présentent ensuite un retard de croissance et une effusion péricardique typique d'une insuffisance cardiaque<sup>64</sup>. De plus, le cœur de ces embryons n'initie pas le « looping » dextral et forme plutôt un organe comportant un seul ventricule hypoplasique fusionné directement à une oreillette élargie. La région du ventricule droit semble également absente. Par ailleurs, les cardiomyocytes et les cellules endocardiques sont présents bien que fortement désorganisées<sup>64</sup>. Toutes ces observations démontrent donc le rôle primordial joué par *mef2c* dans la segmentation des différentes chambres le long du tube linéaire cardiaque. Cette hypothèse est, de plus, appuyée par le fait que les patrons d'expression de *dHAND* et *eHAND*, deux facteurs de transcriptions discutés plus loin et importants pour la ségrégation des différentes chambres, sont fortement modifiés dans les embryons *mef2c*<sup>-/-</sup>.

Conformément à sa fonction chez la Drosophile, *mef2c* est aussi important pour la différenciation des cardiomyocytes chez la souris<sup>64</sup>. En effet, les niveaux d'expression de plusieurs protéines contractiles cardiaques sont diminués chez les embryons *mef2c*<sup>-/-</sup>. C'est le cas notamment de l'ANF, de l'*actine cardiaque*  $\alpha$ , de l' $\alpha$ -MHC et de la chaîne légère de myosin T 1A ((MLC) 1A). Étrangement, le niveau d'expression de MLC2V, contenant un site MEF2 essentiel à son expression *in vitro* est resté inchangé. Ceci et le fait que d'autres gènes cardiaques ayant des sites MEF2 au sein de leur promoteur

soient exprimés à des niveaux inchangés chez les embryons *mef2c*<sup>-/-</sup> suggèrent que d'autres membres de la famille *mef2* peuvent compenser pour la perte de fonction de *mef2c*. Cette redondance est fort probable, d'autant plus que *mef2b* est coexprimé avec *mef2c* tout au long des étapes précoces du développement cardiaque. Par ailleurs la perte de fonction de *MEF2C* à l'aide de dominant négatif abolit l'apparition de structure cardiaque et inhibe la différenciation des cardiomyocytes *in vitro*<sup>96</sup>. Ceci démontre donc que *MEF2c* joue un rôle important lors du développement cardiaque. Bien que les embryons *mef2b* ne démontrent aucune malformation évidente, la double perte de fonction reste à accomplir.

Besoin est de mentionner que la famille des facteurs de transcription *mef2* est aussi associée à la présence de cardiomyopathies chez la souris<sup>97</sup>. En effet, la surexpression de *mef2a* et de *mef2c* induit une incidence élevée de cardiomyopathies dilatées ainsi qu'un allongement des cardiomyocytes<sup>97</sup>. Aussi, il est intéressant de noter que le phénotype associé de leur surexpression est particulièrement sévère chez les souches de souris prédisposées aux cardiomyopathies dilatées ainsi que lorsque combinée à d'autres facteurs de risque comme l'hypertension<sup>97</sup>.

L'étude de la souris *mef2a*<sup>-/-</sup> apporte aussi son lot de réponses quant au rôle des facteurs *mef2* dans le développement cardiaque. Ces souris souffrent du syndrome de mort subite pendant leur première semaine de vie. La dilatation du ventricule droit, la fragmentation myobrillaire, la désorganisation mitochondriale et la réactivation de la transcription de gènes fœtaux caractérisent le phénotype. De plus, l'activité transcriptionnelle de la famille *mef2*, évaluée par le niveau d'expression de gènes cibles, est augmentée suite à la perte de fonction de *mef2a*, possiblement due à une activité compensatoire de *mef2D*. Ces observations démontrent donc que *mef2a* est essentiel au maintien de l'architecture du cytosquelette et de la quantité de mitochondrie dans les cardiomyocytes.

Le facteur de transcription SRF fait aussi partie de la famille des facteurs de transcription à boîte MADS. Afin d'acquiescer son activité transcriptionnelle, il s'homodimérise ou s'hétérodimérise, puis se lie au site consensus C-C-(A/T)<sub>6</sub>-G-G. Ce site, appelé boîte CArG ou SRE (SRF Response Element)<sup>98</sup>, est présent dans le promoteur de plusieurs gènes musculaires, notamment, celui de l'*actine α*. Son patron

d'expression chez les vertébrés est comparable à celui de *mef2*. Son expression est enrichie dans les myocytes squelettiques, cardiaques et lisses. L'analyse plus précise des niveaux d'expression de SRF au cours du développement des cardiomyocytes indique qu'ils sont minimaux lors de la réplication et quarante fois supérieurs pendant et après la différenciation terminale. De plus, la perte de fonction, que se soit à l'aide d'anticorps<sup>99</sup>, d'antisens<sup>100</sup> ou de dominant négatif<sup>99</sup>, inhibe la fusion et la différenciation terminale des myoblastes. Dans tous les cas, l'absence de SRF est aussi corrélée avec des niveaux d'expression fortement réduits de *myogenin* et *d'actine  $\alpha$* . Ceci suggère donc que SRF joue un rôle important dans la différenciation terminale des myoblastes.

La perte de fonction classique de SRF chez la souris inhibe la gastrulation et la formation du mésoderme et mène au décès *in utero*<sup>66</sup>. Les cellules souches extraites des embryons *SRF*<sup>-/-</sup> ne peuvent exprimer l' *$\alpha$ -actine* myogénique, *SM22- $\alpha$*  ni *myocardin*. Elles sont aussi incapables de former des cardiomyocytes qui battent malgré les niveaux d'expression normaux de *Nkx2-5* et *GATA-4*. Par ailleurs, sa perte de fonction cardiaque spécifique, est aussi létale *in utero*, et est accompagnée de niveau d'expression réduits d'ANF et d' *$\alpha$ -actine* myogénique<sup>66</sup>. Au niveau physiologique, les souris mutantes démontrent un œdème cardiaque à partir du jour E10,25. À cette étape, leur cœur bat toujours. Plus tard, au jour E10,5, il cesse de battre et une effusion péricardique sévère apparaît. L'histologie permet de déterminer que les souris mutantes possèdent des murs ventriculaires hypoplasiques, une réduction de la trabéculatation et un amincissement du *septum* inter-ventriculaire. Ensemble, ces observations démontrent que SRF joue un rôle important dans l'activation de la transcription de gènes codant des protéines contractiles et donc, dans l'activation de programmes menant à la formation de cellules contractiles matures.

L'activité et la spécificité transcriptionnelle du facteur de transcription SRE sont acquises via son interaction avec d'autres co-facteurs, plusieurs desquels sont exprimés de façon tissu-spécifique, tel que *GATA-4* et *Nkx2-5*, ou fonctionnent en réponse à un signal. Au moins deux voies de signalisation influencent l'activité de SRF. La première inclue la phosphorylation des facteurs de complexe tertiaire (TCFs), faisant partie de la famille de facteurs de transcription à domaine E vingt-six (E twenty six (Ets)) *Elk-1*, *Net* et *Sap-1*. La seconde, elle, est contrôlée par des petites GTPases de la famille Rho et

la synthèse d'actine. L'association de TCFs à SRF facilite sa liaison aux promoteurs contenant un site de liaison TCF adjacent à un SRE. Par ailleurs, la formation du complexe tertiaire peut stimuler ou réduire l'activité transcriptionnelle de SRF.

L'interaction de SRF à certain cofacteurs influence aussi sont activité transcriptionnelle. GATA-4 et *Nkx2-5* en sont de bons exemples. Il est intéressant de noter que ces deux facteurs de transcription activent, de façon synergique, le promoteur de l' $\alpha$ -CA et que l'utilisation d'autre co-facteurs synergisant avec SRF sur le promoteur de *c-fos*, notamment Phox-1, inhibe cette coopération<sup>101,102</sup>. Ces résultats proposent donc que l'activité transcriptionnelle de SRF est fortement influencée par ses partenaires.

### c) Les facteurs de transcription de la famille GATA

La famille des facteurs de transcriptions GATA comprend, jusqu'à présent, six membres. Ces facteurs contiennent deux domaines de liaison à l'ADN à doigt de zinc de type IV et reconnaissent la séquence consensus A/T-G-A-T-A-A/G. Il est cependant intéressant de constater que seul le doigt de zinc situé en C-terminal, ainsi que le domaine basique adjacent, sont essentiels à la liaison spécifique à l'ADN. Celui situé en N-terminal ne contribue que faiblement à cette spécificité. D'autre part, les deux doigts de zinc ont aussi la fonction de permettre l'homodimérisation et l'hétérodimérisation avec d'autres facteurs de transcription, notamment avec certains membres de la famille Sp1, KLF et RBTN2<sup>103-105</sup>. Deux domaines d'activations indépendants ont été découverts au sein de la partie N-terminale de GATA-4. Le premier, ADI, consiste en un motif neutre, riche en proline alors que le second, ADII, possède un pI de 6.20 et contient trois prolines, cinq serines et quatre tyrosines. Ces deux domaines sont conservés du *Xenopus leavis* à l'humain et peuvent aussi être identifiés dans les parties N-terminales de GATA-5 et -6 grâce à un haut degré d'identité. La présence de tyrosine et de sérine autant dans ADI que dans ADII suggère que les modifications post-traductionnelles peuvent avoir un rôle important à jouer dans la régulation de leur activité.

Les six membres de la famille des facteurs de transcription GATA se divisent en deux groupes. Le premier contient les facteurs de transcription GATA-1, -2 et -3 et le second renferme les facteurs GATA-4, -5 et -6. Les membres du premier groupe ont un

patron d'expression principalement hématopoïétique. Leur importance dans le développement et la différenciation de ces cellules n'est plus à défendre et leurs rôles en tant qu'activateurs de gènes hématopoïétiques, de facteurs pro-différenciatifs ainsi que de modulateurs apoptotiques sont largement décrits <sup>106,107</sup>. Les membres de ce premier groupe possèdent un haut degré d'identité de séquence en N-terminal qui n'est pas observé dans le second groupe.

Les membres du second groupe sont exprimés de façon prédominante au niveau du cœur et des viscères. Leurs patrons d'expression spatiale et temporelle diffèrent mais se chevauchent partiellement. Le transcrite de GATA-6 est tout d'abord détecté au niveau de l'endoderme viscéral au jour E6,5. Au jour E7,5, GATA-4 et -6 sont tous deux présents au sein du mésoderme de la FP et de l'endoderme viscéral et pariétal <sup>108</sup>. L'expression de GATA-5, quant à elle, ne débute qu'au jour E7 dans le mésoderme précardiaque, au niveau de la plaque cardiogénique <sup>10,109</sup>. Peu après, au jour E9,5, ces trois facteurs sont retrouvés autant dans l'endocarde que dans le myocarde de l'oreillette, du ventricule et de la voie de chasse cardiaque (outflow tract). L'expression de GATA-5 se restreint ensuite aux cellules endocardiques de l'oreillette et du coussin endocardique au jour E12,5 alors que celles de GATA-4 et -5 persistent dans l'ensemble du cœur embryonnaire. Au jour E16,5, GATA-5 est absent du cœur alors que GATA-4 et -6 s'y retrouve toujours <sup>108</sup>. L'expression de ces derniers est aussi détectée chez l'adulte.

L'importance des facteurs de transcription GATA-4, -5 et -6 dans le développement cardiaque est appuyée par plusieurs faits. Tout d'abord, une séquences consensus GATA se retrouve dans le promoteur de plusieurs gènes cardiaques, notamment dans celui de *cTnC*, de la *chaîne lourde d'actine cardiaque  $\alpha$  et  $\beta$* , de *Nppa* et du *Nppb* <sup>110</sup>. D'autres sites GATA, dont la fonction reste à déterminer, sont aussi retrouvés dans le promoteur d'autres gènes cardiaques dont ceux de la *troponin I cardiaque* murine, de la *troponine T cardiaque aviaire* et du *phospholamban* du rat <sup>110</sup>. De plus, la surexpression de GATA-4, -5 et -6 dans des cellules musculaires non-cardiaques induit l'expression de *cTnC* <sup>109</sup>. Ceci suggère donc, en premier lieu, que GATA-4, -5 et -6 contrôlent l'expression de gènes cardiaques et, en second lieu, qu'il existe une redondance fonctionnelle de ces facteurs de transcription *in vitro*.

Le rôle de GATA-4 dans l'activation de gènes cardiaques est aussi mis en évidence grâce à sa perte et son gain de fonction dans la lignée cellulaire P19, une lignée pluripotente embryonnaire ayant la capacité de se différencier en cardiomyocytes. En effet, l'expression d'un antisens GATA-4 abolit la réponse des P19 à l'acide rétinoïque, bloquant ainsi l'expression de gènes encodant les protéines contractiles cardiaques <sup>111</sup>. À l'opposé, sa surexpression accélère la cardiogénèse et augmente le nombre de cardiomyocytes produits lors de la différenciation *in vitro*. La fonction de GATA-4 comme gène clé pro-différenciatif est aussi observé chez le *Xenopus* où sa surexpression, via injection d'ARNm, induit l'expression prématurée d' $\alpha$ -CA et d' $\alpha$ -MHC <sup>112</sup>. Ces résultats démontrent donc l'importance de GATA-4 dans la régulation tissu-spécifique de l'expression génique pendant le développement cardiaque.

D'autres expériences de pertes de fonction de GATA-4 effectuées dans des cultures primaires de cardiomyocytes complètent ces dernières observations et appuient l'importance de GATA-4 dans la conservation de l'identité cardiomyocytaire <sup>113</sup>. En effet, sa perte de fonction, induite suite à l'utilisation d'adénovirus anti-sens GATA-4, conduit à une diminution des niveaux d'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'établissement de l'identité cardiomyocytaire tels que : *nppa*, *nppb*,  $\alpha$ -MHC, *cTnl*, *PDGFRb*,  $\alpha$ - et  $\beta$ -MHC <sup>113</sup>. Il est par ailleurs intéressant de noter que l'expression de ces gènes est aussi modulable par GATA-6 étant donné que sa perte de fonction induit, tout comme celle de GATA-4, une modulation de leur expression <sup>113</sup>. De plus, il semblerait qu'une certaine coopération existe entre ces deux facteurs de la famille GATA puisqu'une synergie à l'activation des promoteurs *nppa* et *nppb* est observable dans les cardiomyocytes <sup>113</sup>. Ces observations démontrent donc un rôle important de GATA-4 et -6 non seulement lors de la prolifération et de la différenciation des cardiomyocytes, mais aussi dans la régulation de gènes importants à l'identité cardiomyocytaire <sup>113</sup>.

Afin d'analyser plus précisément la fonction des facteurs de transcriptions GATA-4, -5 et -6 *in vivo*, les souris GATA-4<sup>-/-</sup>, GATA-5<sup>-/-</sup> et GATA-6<sup>-/-</sup> furent créées. Voici donc une brève description des phénotypes observés.

Tout d'abord, les embryons GATA-4<sup>-/-</sup> meurent entre les jours E8,5 et E10,5 <sup>67,114</sup>. Ils présentent aussi des malformations sévères au niveau des repliements rostro-caudal

et latéral-ventral, reflétant une désorganisation de la zone ventrale de l'embryon<sup>67</sup>. Au niveau cardiaque, la spécification des procardiomyocytes à partir du mésoderme est normale, indiquant que les étapes précoces du développement cardiaque ne sont pas influencées par l'absence de GATA-4. En effet, le patron d'expression du mésoderme dorsal cardiogénique des embryons GATA-4<sup>-/-</sup> est comparable à celui des GATA-4<sup>+/+</sup><sup>67</sup>. Ainsi, les niveaux d'expression de *MHC*, (*MLC*)-2A et 2V, de *cTnC* et de *Nppa* demeurent inchangés. Les étapes subséquentes du développement cardiaque des embryons GATA-4<sup>-/-</sup> sont cependant dramatiquement compromises. En effet, bien que les procardiomyocytes soient spécifiés, leur migration vers le mésoderme ventrale est abolie. Les embryons qui réussissent à survivre au-delà du jour E8,5 le font grâce à la formation d'un ou deux tubes cardiaques dans la partie dorsale de l'embryon. Bien que ces structures expriment les gènes codant pour les protéines contractiles cardiaques, l'absence de formation d'un système circulatoire cause le décès de ces embryons. Globalement, il semble donc que GATA-4 soit essentiel à la migration des procardiomyocytes et non à leur différenciation. La possible redondance fonctionnelle avec d'autres facteurs GATA est par ailleurs une hypothèse probable pouvant expliquer la présence de cardiomyocytes différenciés chez les souris GATA-4<sup>-/-</sup>. Elle sera discutée plus loin.

Afin de préciser davantage le rôle de GATA-4 dans les étapes précoces et tardives du développement, des souris exprimant la cre recombinase sous le contrôle du promoteur de *Nkx2-5* ou de  $\alpha$ -*MHC* furent utilisées<sup>115</sup>. La perte de fonction précoce de GATA-4 mène à un amincissement myocardique, à l'absence de cellules mésenchymateuses au sein du coussin endocardique et à une hypoplasie ventriculaire gauche associée à une diminution du niveau d'expression de dHAND. Le taux de prolifération des cardiomyocytes sont aussi réduits, quoi que davantage dans le ventricule droit que dans le gauche. Quant à elle, la perte de fonction tardive de GATA-4 n'a pas affecté la formation du coussin endocardique ni le développement du ventricule droit. Par contre, elle induit aussi un amincissement myocardique et une réduction de la prolifération des cardiomyocytes. Aussi, elle s'accompagne d'une double sortie du ventricule droit. Ces résultats proposent donc un rôle général joué par GATA-4 dans la régulation de la prolifération des cardiomyocytes et, conséquemment, dans la morphogénèse cardiaque.

La souris GATA-5<sup>-/-</sup>, quant à elle, ne démontre aucun phénotype cardiovasculaire apparent<sup>68</sup>. L'analyse de la stratégie de recombinaison utilisée démontre toutefois la présence d'une faille importante. En effet, dans cette première version, seul l'exon 1 est délété, permettant ainsi la production d'une protéine tronquée à partir d'un second codon « start », situé dans l'exon 2. Comme cette protéine contient donc deux doigts de zinc, un domaine de localisation nucléaire et un domaine de transactivation en C-terminal, elle peut lier l'ADN et activer la transcription de gènes cibles. Le phénotype d'une souris n'exprimant aucun GATA-5 demeure donc inconnu à ce jour.

Finalement, il fut difficile de déterminer le rôle joué par GATA-6 dans le développement cardiaque étant donné que les embryons GATA-6<sup>-/-</sup> meurent avant le jour E7.5, pendant la gastrulation<sup>116</sup>. Cependant, l'utilisation de la complémentation embryonnaire tétraploïde, fournissant un endoderme extra embryonnaire sauvage, permet aux embryons GATA-6<sup>-/-</sup> de survivre jusqu'au jour E10,5<sup>69</sup>. Chez ces embryons, le développement hépatique est fortement affecté mais ceux du cœur, du *septum* transverse mésenchymateux et du système vasculaire sont intacts. La redondance avec GATA-4 est évidemment une hypothèse plausible, pouvant expliquer l'absence de phénotype cardiaque apparent. Elle est par ailleurs confirmée avec l'utilisation de souris hétérozygotes pour les gènes GATA-4 et GATA-6<sup>70</sup>. Bien que les souris hétérozygotes GATA-4 ou GATA-6 ne présentent pas de phénotype cardiaque, les souris double hétérozygotes, elles, meurent au jour E13,5 d'insuffisance cardiaque. Elles présentent un large spectre de malformations incluant une communication inter-ventriculaire et aorto-pulmonaire, un développement anormal des muscles lisses et une hypoplasie myocardique. Cette dernière est associée à une diminution de la prolifération des cardiomyocytes, des niveaux d'expression de *mef2c* et de *β-MHC*. Ces observations suggèrent donc que le dosage adéquat de GATA-4 et GATA-6 est nécessaire au développement du système cardiovasculaire. Il est aussi possible de croire que des mutations récessives de ces deux gènes sont impliquées dans le développement de malformations congénitales cardiaques.

## 2) *Segmentation du tube cardiaque*

À sa formation, le tube linéaire cardiaque est déjà segmenté le long de son axe rostro-caudal<sup>19</sup>. En effet, les patrons d'expression de plusieurs gènes, notamment ceux de *dHAND* et *eHAND* ainsi que la découverte d'éléments *cis*-régulateurs produisant une

expression chambre spécifique soutiennent cette affirmation <sup>117,118</sup>. À ce stade, des facteurs de transcription d'au moins cinq familles sont exprimés dans le cœur: *MEF2*, *NK*, *GATA*, *bHLH* et *Tbx*. La présente section a donc pour but de faire connaître les facteurs de transcription exprimés lors de cette étape du développement cardiaque. Puisque trois des cinq familles ont déjà été présentées, l'accent sera maintenant placé sur la famille des facteurs de transcription *bHLH* et *Tbx*.

#### a) Les facteurs de transcription de la famille *bHLH*

Les membres de la famille de facteurs de transcription *bHLH* sont caractérisés par la présence de quatre domaines conservés, un basique, une hélice, une boucle (loop) et une hélice au centre de la protéine. Les domaines *HLH* permettent la dimérisation avec d'autres membres de la famille, ce qui a pour effet de rapprocher les domaines basiques des deux facteurs qui, ensemble, reconnaissent la séquence consensus C-A-N-N-T-G, connu sous le nom de boîte E (E box). Certains membres de la famille sont exprimés de façon ubiquitaire. Ces derniers sont désignés comme étant des *bHLH* de classe A, aussi appelés protéines E <sup>119-121</sup>. Ils dimérisent de façon préférentielle avec les *bHLH* de classe B qui eux, possèdent un patron d'expression plus restreint <sup>122</sup>. Le rôle de cette famille de facteurs de transcription a tout d'abord été étudié dans le muscle squelettique. En effet, quatre membres de la famille des *bHLH*, *MyoD*, *myogenin*, *myf5* et *MRF4*, sont exprimés de façon prédominante dans les muscles squelettiques. Ils possèdent la capacité d'induire la myogenèse lorsque surexprimés dans les fibroblastes <sup>123</sup>. En outre, leurs pertes de fonction *in vivo* démontrent leurs importances primordiales dans la détermination et la différenciation des myoblastes <sup>62,65</sup>.

Par ailleurs, deux membres de cette famille sont exprimés au cours du développement cardiaque. En effet, les transcrits de *dHAND* et de *eHAND* (**d**eciduum/**e**xtraembryonic membrane, **h**earth, **a**utonomic nervous system, **n**eural crest-derived cell types) sont d'abord détectés au niveau du mésoderme précardiaque. Plus tard, à l'étape du tube linéaire, l'expression de *dHAND* est présente dans l'ensemble du cœur alors que celle de *eHAND* est restreinte aux parties rostrale et caudale mais indétectables de la partie centrale qui formera plus tard le ventricule droit. Par ailleurs, lors du « looping », l'expression de *dHAND* se restreint au segment du tube qui formera le ventricule droit, alors que *eHAND* occupe le reste du cœur <sup>124</sup>. Cette expression complémentaire soulève donc un questionnement quant à la nature du rôle joué par ces

deux facteurs de transcription. Effectivement, suite à cette observation, il est possible de spéculer autant sur un rôle dans la spécification des chambres que dans la détermination de l'orientation du « looping ».

La perte de fonction chez la souris répond cependant à ces questions. En effet, chez la souris mutante homozygote *dHAND*, qui meurt au jour E10.5, le tube cardiaque se replie mais le ventricule droit ne se développe pas <sup>71</sup>. Chez ces embryons, la position des oreillettes et du ventricule gauche est normale, indiquant que les étapes initiales du looping ne sont pas affectées par l'absence d'expression de *dHAND*. Par ailleurs, le ventricule gauche, où *dHAND* est habituellement légèrement exprimé à cette étape, se développe mais l'absence de trabéculatation est notable. Les embryons *eHAND*<sup>-/-</sup>, quant à eux, démontrent un phénotype moins sévère. Le ventricule gauche est visiblement sous développé mais tout de même présent <sup>72</sup>. Étant donné que *dHAND* est faiblement exprimé dans cette région du cœur et qu'il partage un haut niveau d'identité avec *eHAND*, la redondance fonctionnelle pourrait empêcher l'apparition d'un phénotype plus sévère. Cette redondance est par ailleurs observée chez le poulet, où les deux facteurs de transcription sont co-exprimés le long du tube cardiaque <sup>124</sup>.

Les facteurs de transcription *dHAND* et *eHAND* sont aussi exprimés dans certaines cellules de la crête neurale. Ces cellules, comme mentionné plus tôt, contribuent à la formation du sac aortique et, plus tard, à celle de l'arche aortique. L'angiogénèse d'artère à partir de l'arc aortique étant visible au jour E9.5, il est intéressant de noter qu'à cette étape, les embryons *dHAND*<sup>-/-</sup> possèdent un sac aortique dilaté duquel aucune artère ne débute <sup>125</sup>. De plus, leur implication dans le développement d'autres structures dérivées de cellules de la crête neurale, notamment l'arc pharyngale, fut observée lors de l'analyse des souris *ET-1*<sup>-/-</sup> (*endothelin 1*) <sup>126</sup>. Ces observations suggèrent donc que *dHAND* est important pour le développement des structures dérivées des cellules de la crête neurale.

Tous ces résultats ne permettent cependant pas de déterminer si la fonction des facteurs de transcription *dHAND* et *eHAND* consiste en la détermination cellulaire ou si elle se situe davantage au niveau de la régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose. Il est cependant possible d'affirmer qu'ils jouent un rôle clef dans le

développement cardiaque, autant au niveau des cellules d'origine mésodermique que de celles de la crête neurale.

### ***E) Les facteurs de transcription à boîte T (T-box(Tbx))***

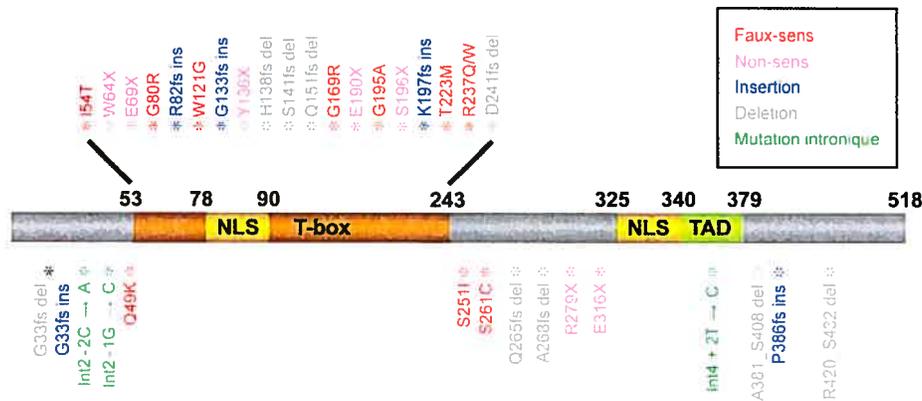
La famille des facteurs de transcription à boîte T comprend plus de vingt membres, dont dix-huit chez les mammifères, possédant tous un domaine de liaison à l'ADN conservé (Fig 1,4a). Leur haut degré d'identité est cependant restreint à ce domaine et la forte divergence du reste de la protéine permet de tracer un arbre phylogénique et de regrouper en sous-famille les membres les plus similaires (Fig 1,4b). La famille doit son nom à celui de son membre fondateur, *Brachyury*, aussi appelé *T*, du fait que les souris mutantes *Brachyury* ont la queue tronquée (short Tail)<sup>127</sup>. Les facteurs de transcription à boîte T se retrouvent dans nombres d'organismes, des métazoaires (oursin de mer) aux vertébrés supérieurs en passant par les protostomiens (*C. elegans*)<sup>128</sup>. Cette observation suggère que les *Tbx* présents chez les vertébrés proviennent de la duplication d'un ancêtre commun retrouvé chez les métazoaires.

Par ailleurs, ces facteurs de transcription lient l'élément de liaison à boîte T (T-box binding element (TBE)) sous forme de monomère reconnaissant le demi-site A-G-G-T-G-T-G-A-A-A-T-T<sup>129</sup>. Par contre, certains d'entre eux, comme *Tbx2*, *Tbx3* et *Tbx5*, démontrent une plus forte affinité pour différentes combinaisons, orientations, nombres et espacements des demi-sites TBE<sup>130-132</sup>. En plus de lier l'ADN, les facteurs de transcription à boîte T possèdent aussi la capacité d'activer et de réprimer la transcription de gènes cibles. En effet, des domaines d'activation et de répression ont été découverts dans la partie C-terminale de plusieurs membres de la famille<sup>133,134</sup>. Leur interaction avec d'autres facteurs de transcription des familles GATA, à homéodomaine et LIM ainsi que l'existence de nombreux syndromes causés par leurs mutations (Tableau 1,2) démontrent bien l'importance des *Tbx* dans le développement des vertébrés. Voici donc une revue des faits concernant cette famille de facteurs de transcription.

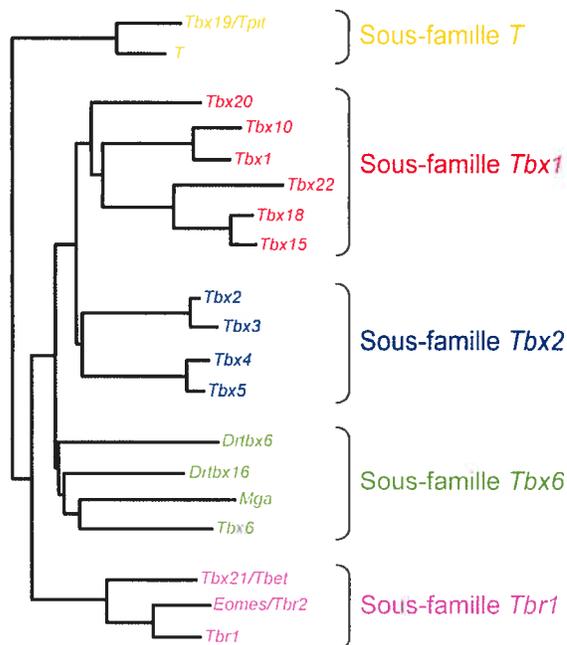
#### *1) Importance biologique des facteurs Tbx*

Plusieurs faits soutiennent l'importance biologique des facteurs de transcription *Tbx*. Tout d'abord, plusieurs syndromes et malformations congénitales sont associés à des mutations dans les *Tbx* (Tableau 1,2)<sup>135</sup>. Ces dernières impliquent plusieurs

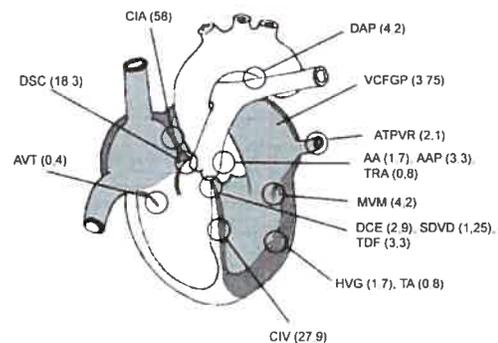
A



B



C



**Figure 1,4 : Structure de *Tbx5*, sa relation phylogénique avec les autres membres de sa famille et les conséquences phénotypiques de sa mutation chez l'humain.** A) Mutations retrouvées chez les patients souffrant du SHO. Tiré de la banque de données des mutations de *Tbx5* : [www.unileipzig.de/~genetik/TBX5/TBX5.htm](http://www.unileipzig.de/~genetik/TBX5/TBX5.htm). B) Arbre phylogénique des différents facteurs de transcription *Tbx* présent chez les vertébrés. C) Patron d'expression de *Tbx5* (gris) et incidence, en pourcentage, des malformations cardiaques observées chez 240 patients souffrant du SHO. CIA : communication inter-auriculaire, DSC : dysfonction du système de conduction, AVT : atrésie de la valve tricuspide, DAP : doctus arteriosus persistant, VCSGP : veine cave supérieure gauche persistante, ATPVR : anomalie totale du retour veineux pulmonaire, AA : anomalie aortique, AAP : anomalie artérielle pulmonaire, TRA : troncus arteriosus, MVM : malformation de la valve mitrale, DCE : défaut du coussin endocardique, SDVD : sortie double ventriculaire droite, TDF : tétralogie de Fallot, HVG : hypoplasie ventriculaire gauche, AT : anomalie trabéculaire, CIV : communication inter-ventriculaire

organes et systèmes. De plus, leur rôle dans le développement semble débiter lors des étapes précoces du développement.

Le patron d'expression des *Tbx* s'étend tout au long du développement, de l'ovocyte à l'adulte, et plusieurs *Tbx* sont impliqués dans le développement normal à plusieurs étapes clés, de la gastrulation à la formation du cordon ombilical. Le rôle le plus précoce connu des *Tbx* est tenu par *Eomesodermin* (*Eomes/Tbr2*), un membre de la sous-famille *Tbr1*. Chez la souris, certaines cellules de la *morula* doivent se

**Tableau 1,2: Membres de la famille des facteurs de transcription *Tbx* impliqués dans le développement cardiaque**

Gène	Site d'expression	Phénotype de la souris homozygote	Phénotype de la souris hétérozygote	Syndrome associé chez l'humain
<i>Tbx1</i>	E8 : Endoderme pharyngien et mésoderme du premier arc pharyngien E9,5 à E12,5 : endoderme tapissant la poche pharyngéale, mésoderme de la tête et de la zone cardiogénique secondaire. <sup>44, 136-138</sup>	Létal périnatalement. Malformations sévères des artères de l'arc pharyngien. Croissance et septation de la voie de chasse anormale. Communication inter-ventriculaire. Hypoplasie du thymus et des glandes parathyroïdes. Malformations craniofaciales musculaires, osseuses et fente palatine. <sup>139</sup>	Viable et fertile. Développement aberrant de la quatrième artère de l'arc aortique gauche, de l'aorte et de l'artère pulmonaire. <sup>140</sup>	Syndrome de la délétion 22q11 Syndrome de DiGeorge
<i>Tbx2</i>	E8,5 : Allantois. E8,75 à E9,5 : myocarde du canal AV. E9,5 : vésicules optique et otique, mésenchyme naso-facial, membres, poumons, organes génitaux. <sup>136, 141, 142</sup>	Létal <i>in utero</i> avant le jour E14,5. Canal AV anormal et défaut de septation de la voie de chasse. Dismorphisme facial, hypoplasie des arc pharyngienne et malformations oculaires. <sup>143</sup>	Rien à signaler. <sup>143</sup>	Aucun identifié
<i>Tbx3</i>	E8,5 : myocarde du canal AV situé dans la partie sino-auriculaire, anneau inter-ventriculaire. Délimite ensuite le système de conduction central cardiaque. <sup>144</sup>	Létal <i>in utero</i> avant le jour E16,5. Malformation des membres antérieurs, postérieurs et du sac vitellin. Absence de glandes mammaires et petit foie. <sup>145</sup>	Viable et fertile. Différence morphologique mineur des organes génitaux externes. <sup>146</sup>	Syndrome Ulna-mammaire. <sup>146</sup>
<i>Tbx4</i>	Membres postérieurs, proctodeum, mésenchyme mandibulaire et pulmonaire, oreillettes et mur corporel. <sup>136</sup>	létal <i>in utero</i> avant le jour E10,5. Absence de fusion du chorioallantoïque et malformations des membres postérieurs. <sup>147-149</sup>	Rien à signaler. <sup>147</sup>	Syndrome de la petite rotule. <sup>150</sup>
<i>Tbx5</i>	Croissant et tube cardiaque selon un gradient décroissant caudal-rostral. Sinus veineux, oreillette commune, ventricule gauche, trabéculations du ventricule droit, membres antérieurs et yeux. <sup>151</sup>	Létal <i>in utero</i> avant le jour E10,5. Looping cardiaque défaillant, hypoplasie sino-auriculaire et ventriculaire gauche. Malformations des membres antérieurs. <sup>152</sup>	Létalité périnatale de 40%. Malformation des membres antérieurs. Défauts du système de conduction. Communication inter-auriculaire et ventriculaire. <sup>152</sup>	Syndrome Holt Oram. <sup>153</sup>
<i>Tbx18</i>	Mesoderme splanchnique, septum transversum, proépicarde, épicaarde. <sup>154</sup>	Létalité périnatale causé par un insuffisance respiratoire. Malformations sévères du squelette. Malformation de la colonne vertébrale et de la cavité thoracique. <sup>154</sup>	Rien à signaler. <sup>154</sup>	Aucun identifié
<i>Tbx20</i>	Allantois, mésoderme de la plaque latérale, croissant et tube cardiaque selon un gradient, de façon prédominante dans la région caudale et la voie de chasse. Coussin endocardique, cerveau postérieur, œil. <sup>155</sup>	Létal <i>in utero</i> avant le jour E11,5. Vascularisation anormale du sac vitellin. Absence de looping cardiaque. Cœur hypoplasique. Absence de différenciation des chambres. <sup>47, 155-157</sup>	Viable et fertile. Légère dilatation cardiomyopathique ventriculaire gauche. <sup>155</sup>	Aucun identifié

commettre pour se différencier en trophoctoderm (TE), afin de former les structures placentaires. Chez les embryons *Eomes*<sup>-/-</sup>, les cellules du TE ne prolifèrent pas et ne peuvent participer à l'implantation utérine<sup>158</sup>, conduisant au décès de l'embryon. D'autres *Tbx*, dont *Brachyury*, *Tbx4* et *Tbx3* jouent aussi un rôle important dans le développement de structures extra-embryonnaires<sup>145,159</sup>.

Les *Tbx* jouent aussi un rôle important dans l'établissement du mésoderme et, conséquemment, dans le développement de la gastrula. En effet, chez la souris, les facteurs *T* et *Eomes* y sont essentiels ainsi qu'à la régulation de l'expression de gènes clés à cette étape, tel le *facteur de croissance fibroblastique (fibroblast growth factor (FGF))*<sup>160</sup>. Cependant, le chevauchement des patrons d'expression et la redondance fonctionnelle rendent difficile l'analyse de la fonction de chaque membre présent<sup>135</sup>. L'observation des pertes de fonction d'autres *Tbx* a par ailleurs apporté des réponses quant à leur rôle dans le développement du mésoderme. Ainsi, *Tbx6*, qui est exprimé dans le mésoderme présomitique (MPS) peu après son ingestion dans la FP, est essentiel à la formation des somites. En effet, chez les souris *Tbx6*<sup>-/-</sup>, les somites sont présents mais morphologiquement aberrants et remplacés par des tubes neuraux paraxiaux ectopiques<sup>161</sup>. De plus, le bourgeon de queue, source de nouveau mésoderme, est anormalement élargi. Ces souris décèdent à mi-gestation. Un autre rôle de *Tbx6* émerge avec l'utilisation de souris exprimant une version mutée de *Tbx6*. Cette mutation, appelé *rib-vertebrae (rv)*, utilisée sous forme de transgène dans les souris *Tbx6*<sup>-/-</sup> réintroduit une expression minimale de *Tbx6* et permet aux embryons de survivre plus longtemps, rendant possible l'observation de malformations plus tardives. Ces dernières comprennent des malformations aux côtes ainsi qu'à la colonne vertébrale précédées de niveaux d'expression réduits de plusieurs marqueurs du compartiment antérieur et d'un élargissement de la zone d'expression de marqueurs du compartiment postérieur. De plus la sévérité du phénotype augmente avec la réduction des niveaux de *Tbx6*, démontrant ainsi l'importance de son dosage dans le développement des somites<sup>162</sup>.

Dans un même ordre d'idée, *Tbx18* est, lui aussi, requis pour la compartimentation des somites. Il est exprimé dans la région antérieure des somites et les souris *Tbx18*<sup>-/-</sup> meurent périnatalement, présentant un large spectre de malformations des côtes et de la colonne vertébrale<sup>154</sup>. Par ailleurs, l'analyse moléculaire de ces embryons permet

d'affirmer que la spécification des compartiments antérieur et postérieur des somites au sein du MPS est normale mais qu'elle n'est pas maintenue lors de la formation des somites <sup>154</sup>. De plus, son gain de fonction à l'aide de vecteur d'expression dans le MPS induit la formation de frontière somitique, appuyant son rôle dans leur segmentation.

Finalement, le dernier facteur *Tbx* reconnu comme étant impliqué dans le développement des somites est *Tbx24* chez le poisson zèbre. Ce dernier est si différent des autres qu'il ne peut être inclus dans aucune des sous-familles et aucun orthologue mammifère n'a été identifié. Son expression est d'abord détectée dans le mésoderme paraxial et est par la suite restreinte au MPs antérieur et intermédiaire. Sa perte de fonction à l'aide de Morpholino cause une segmentation somitique défailante, autant moléculairement que morphologiquement <sup>163</sup>. De plus, l'absence de phénotype lors de la formation précoce du mésoderme propose que *Tbx24* joue un rôle accessoire à cette étape.

L'importance biologique des facteurs de transcription à boîte T est manifeste lors des étapes plus tardives du développement embryonnaire, soit l'organogénèse. En effet l'expression de différents *Tbx* est essentielle à la formation normale de plusieurs organes et systèmes, notamment les membres inférieurs, antérieurs (Fig 1,5), certaines structures cranio-faciales, l'hypophyse, le système immunitaire et le cœur. Leurs rôles dans le développement cardiaque et extra-cardiaque seront abordés.

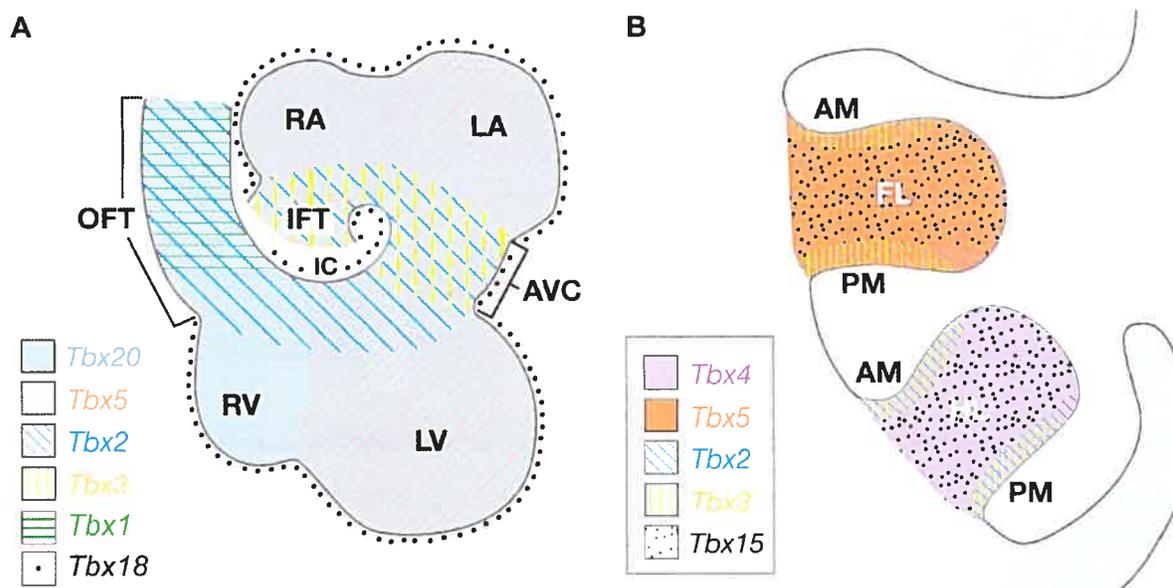
## 2) Les facteurs *Tbx* dans le développement extra cardiaque

Tel que mentionné précédemment, les *Tbx* sont impliqués dans plusieurs syndromes. Un de ceux-ci, le syndrome de DiGeorge, fait partie du syndrome del22q11.2 et implique une délétion de *Tbx1* chez l'humain <sup>164</sup>. Il est caractérisé par des malformations cranio-faciales et cardiovasculaires. Ces dernières seront discutées plus loin. Bien que la délétion observée chez les humains implique plusieurs autres gènes, la souris mutante *Tbx1*<sup>+/-</sup> reproduit et la fente palatine et les défauts du système auditif, de la mandibule et des muscles branchiomériques, caractéristiques des malformations cranio-faciales du syndrome de DiGeorge <sup>139</sup>. En outre, le phénotype obtenu suite à la mutation de *Tbx1* chez le poisson zèbre supporte aussi l'hypothèse de son implication dans le syndrome de DiGeorge et suggère de plus que sa fonction est conservée tout au long de l'évolution <sup>165</sup>. Il est par ailleurs intéressant de noter que son patron

d'expression n'inclut pas les cellules de la crête neurale, ce qui est surprenant considérant les malformations observés suite à sa perte de fonction <sup>44</sup>.

Par ailleurs, le gain de fonction de *Tbx1* à l'aide de la transgénèse induit aussi le phénotype cranio-facial du syndrome. Cependant, la compensation de ce gain de fonction avec l'utilisation d'un fond *Tbx1*<sup>-/-</sup> démontre que la majorité des défauts, notamment la fente palatine, l'hypoplasie du thymus, l'hypoplasie des muscles maxillaires et les défauts cardiovasculaires, sont dus au dosage inadéquat de *Tbx1* <sup>166</sup>. Ces observations démontrent donc que le dosage adéquat de ce facteur est primordial.

Dans un même ordre d'idée, *Tbx22* est aussi essentiel à la fermeture de la fente palatine chez l'humain. Il serait aussi responsable de l'ankyloglossie, une malformation bénigne réduisant la mobilité de la langue <sup>167,168</sup>. Puisque aucune souris mutante pour *Tbx22* n'est encore connue, il est difficile de s'avancer sur l'interaction épistatique



**Figure 1,5. Patron d'expression des facteurs de transcription *Tbx* à l'intérieur du cœur et des membres.** A) Patron d'expression cardiaque de *Tbx20*, *Tbx5*, *Tbx2* et *Tbx3* au jour E9,5. RA : oreillette droite, LA : oreillette gauche, RV : ventricule droit, LV : ventricule gauche, AVC : coussin atrio-ventriculaire, OFT : voie de chasse, IC : courbure interne. B) Patron d'expression dans les membres des facteurs *Tbx* qui y sont exprimé aux jours E10,5 à E12,5. AM : Marge antérieure, PM : marge postérieure, FL : Membre antérieur, HL : membre postérieur.

possible avec *Tbx1* au niveau de la fente palatine.

Un autre facteur *Tbx* impliqué dans le développement extra cardiaque est *Tbx19/TPIT*. Ce dernier est détectable dans les deux lignées cellulaires exprimant la Pro-opiomélanocortine (POMC) de la glande hypophysaire, dans les cellules corticotrophiques du lobe antérieur, produisant l'hormone adrénocorticotrophique (ACTH) ainsi que dans les cellules mélanotrophiques du lobe intermédiaire<sup>169,170</sup>. Sa perte de fonction chez l'humain est associée à la déficience isolée en ACTH. Par ailleurs, les mutations dans *Tbx19* sont récessives puisque seuls les humains et souris homozygotes démontrent ce phénotype. L'analyse des souris *Tbx19*<sup>-/-</sup> démontre qu'il est essentiel à la différenciation terminale des cellules corticotrophiques et mélanotrophiques ainsi qu'à l'expression de POMC. De plus, *Tbx19* inhibe la différenciation des cellules gonadotrophiques, suggérant un rôle clé dans l'établissement des lignées cellulaires hypophysaires<sup>171</sup>.

L'influence de plusieurs *Tbx* est aussi importante dans le développement des membres antérieurs et postérieurs<sup>172</sup>. En effet, les quatre membres de la sous-famille *Tbx2* y sont exprimés durant leur développement et le rôle de chacun de ces derniers a été établi.

*Tbx4* et *Tbx5* ont un patron d'expression similaire au niveau des membres postérieurs et antérieurs respectivement (Fig 1,5)<sup>148,149</sup>. Leur expression débute au site de formation du membre, avant l'apparition morphologique du bourgeon, et est maintenue jusqu'aux étapes tardives du développement. De plus, la surexpression ectopique de chacun d'eux à l'aide d'électroporation dans les membres antérieurs et postérieurs du poulet produisent tous des malformations des membres<sup>148,149</sup>. Ces observations suggèrent donc un rôle de ces *Tbx* dans la détermination de l'identité des membres. Il est cependant important de mentionner que la surexpression de ces facteurs dans leurs membres respectifs mène aussi aux diverses malformations. Incidemment, il est difficile d'établir avec certitude la fonction de *Tbx4* et *Tbx5* dans le développement des membres à l'aide de ces seules expériences. Leurs pertes de fonction apportent d'avantage de réponses. Leur mutation chez les humains est associée à des syndromes dominants impliquant des malformations des membres. En effet, la souris *Tbx5*<sup>+/-</sup> reproduit le syndrome Holt-Oram (SHO), regroupant des

malformations modérées à sévères des membres antérieurs. Ces souris reproduisent aussi les malformations cardiaques du syndrome et ces dernières seront discutées ultérieurement. Il est aussi intéressant de noter que chez les souris *Tbx5*<sup>-/-</sup>, l'initiation du bourgeon antérieur est normale et que les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont définis correctement<sup>173</sup>. L'expression de *FGF10*, essentiel à la formation et à la croissance du bourgeon, est cependant abolie au niveau du mésenchyme compromettant ainsi sa formation. Ces observations soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle *Tbx5* est nécessaire à la croissance du bourgeon mais non à son initiation.

Bien que quelque peu similaire, le rôle de *Tbx4* n'est pas identique à celui de *Tbx5*. En effet, les souris *Tbx4*<sup>+/-</sup> souffrent du syndrome de la petite rotule, caractérisé par des malformations mineures des hanches, des genoux et des pieds<sup>150</sup>. Chez les souris *Tbx4*<sup>-/-</sup>, l'initiation du bourgeon est normale et la formation de la structure morphologique est évidente<sup>147</sup>. Cependant, peu après cette étape, l'expression de *FGF10* dans l'ectoderme disparaît et le membre ne se développe guère passé cette étape.

L'utilisation de souris exprimant la recombinaise *Cre* seulement dans les membres antérieurs ou postérieurs permet de préciser encore davantage le rôle des facteurs de transcription *Tbx4* et *Tbx5*. Elle démontre, hors de tout doute, que ces derniers ne sont pas responsables de l'identité des membres. En effet, l'expression de *Tbx4* dans les membres antérieurs de souris *Tbx5*<sup>-/-</sup> permet la formation partielle de membres antérieurs. De plus, ces membres ne présentent aucun marqueur de membres postérieurs. Ceci suggère donc non seulement que *Tbx4* est fonctionnellement équivalent à *Tbx5* mais aussi qu'il n'induit pas une identité postérieure. On croit maintenant que l'identité des membres est conférée par *Pitx1*, un partenaire de *Tbx4*, puisque son expression ectopique dans les membres antérieurs, en présence de *Tbx4* ou de *Tbx5*, conduit à la formation de structures similaires aux membres postérieurs<sup>129</sup>.

Les deux autres membres de la sous-famille *Tbx2*, *Tbx2* et *Tbx3*, sont aussi exprimés dans les membres en développement, aux limites antérieures et postérieures du mésenchyme (Fig 1,3b)<sup>142,172</sup>. Chez le poulet, *Tbx2* est retrouvé légèrement postérieurement à *Tbx3*, à la limite postérieure du bourgeon. Il est aussi exprimé au niveau de la crête apicale ectodermique (CAE), à la limite distale du membre. L'utilisation de dominants négatifs et de gain de fonction démontre que *Tbx2* et *Tbx3*

induisent tous deux l'identité postérieure des doigts, via les voies de signalisation Shh et BMP, bien que *Tbx2* possède une plus forte capacité inductive<sup>174</sup>. Il est cependant intéressant de constater que leur patron d'expression ainsi que leur rôle sont inversés chez la souris et l'humain. En effet, *Tbx3* est exprimé au niveau de la limite postérieure du bourgeon et de la CAE alors que *Tbx2*, possède le même patron d'expression que *Tbx3* chez le poulet<sup>172</sup>. Aussi, leur perte de fonction chez la souris indique que *Tbx3* est essentiel au développement de la partie postérieure des membres<sup>145</sup> alors que *Tbx2* ne démontre qu'un effet mineur à ce niveau<sup>143</sup>. Leur rôle chez la souris semble d'ailleurs conservé chez l'humain puisque les mutations de *Tbx3* sont associées au syndrome ulnaire-mammaire, caractérisé par des malformations des membres antérieurs, des glandes apocrines, des dents et des organes génitaux<sup>146</sup>, alors qu'aucune mutation de *Tbx2* n'a jusqu'à maintenant été identifiée chez les patients présentant des malformations aux membres.

Un dernier membre de la famille des facteurs de transcription *Tbx* est détectable lors de développement des membres. Il s'agit de *Tbx15*, un membre de la sous-famille *Tbx1*. Son patron d'expression est complémentaire à ceux de *Tbx2* et *Tbx3* au niveau du mésenchyme (Fig 1,3b)<sup>175</sup>. Sa perte de fonction chez la souris occasionne des défauts squelettiques mineurs des membres caractérisés par des os courts et fins ainsi que de faibles articulations<sup>156</sup>. L'apparition de ce phénotype est expliquée par une prolifération cellulaire diminuée au niveau du mésenchyme, résultant en une plus faible condensation pré-cartilagineuse mésenchymateuse, source des os. Il est cependant intéressant de noter que cette diminution de prolifération n'est pas observée aux limites des membres, suggérant une redondance fonctionnelle de *Tbx15* avec *Tbx2* et *Tbx3*<sup>156</sup>.

Le système immunitaire est aussi influencé par l'expression de certains *Tbx*. En effet, les membres de la sous-famille *Tbr1* sont importants pour la différenciation des lymphocytes T et B<sup>176,177</sup>. Comme mentionné plus tôt, les souris *Eomes*<sup>-/-</sup> meurent au début de la gestation. Cependant, les souris *Eomes*<sup>+/-</sup> survivent et démontrent un dysfonctionnement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, les souris *Tbx21*<sup>+/-</sup> ne produisent aucun lymphocyte T « helper » de la sous-catégorie 1 (Th1) et présente un dysfonctionnement des lymphocytes B et des cellules tueuses naturelles (Natural Killer)<sup>176,177</sup>. Sa fonction dans le développement des cellules Th1 se situe au niveau de la maturation des lymphocytes naïfs, en induisant la différenciation terminale et en bloquant

la cascade différenciative alternative menant à une identité Th2. De plus, les souris *Tbx21*<sup>-/-</sup> démontrent des signes d'inflammation des voies respiratoires, caractéristiques de l'asthme. Ses niveaux d'expression réduits sont aussi présents chez les patients asthmatiques humains<sup>178</sup>. L'importance de *Tbx21* dans le développement du système immunitaire humain est aussi appuyée par le fait que des niveaux d'expression altérés sont observés dans plusieurs maladies impliquant ce système, notamment le lupus<sup>179</sup>, la colite reliée aux cellules T, la maladie de Crohn<sup>180</sup> et dans la transformation métastatique du cancer de la prostate<sup>179</sup>.

Finalement, un nombre croissant d'indices portent à croire que certains facteurs *Tbx* auraient un rôle à jouer dans le développement tumoral, principalement au niveau du sein. Un de ceux-ci, *Tbx2* est situé dans le segment chromosomique humain 17q22-24. Celui-ci est fréquemment amplifié dans les tumeurs pancréatiques et mammaires<sup>181-183</sup>. Plusieurs oncogènes possibles, fréquemment surexprimés dans certaines tumeurs mammaires primaires et lignées cellulaires cancéreuses, ont été identifiés à l'intérieur de ce segment et *Tbx2* est un de ceux-là. Cependant, contrairement à la majorité de ces oncogènes, *Tbx2* est aussi surexprimé dans plusieurs tumeurs mammaires impliquant *BRCA-1* et *BRCA-2*<sup>184</sup>. De plus, *Tbx2* et *Tbx3* sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire via la voie de signalisation *ARF-MDM2-p53* et possèdent la capacité de prévenir la sénescence prématurée des fibroblastes embryonnaires murins<sup>182,185</sup>. En outre, la prolifération cellulaire aberrante des glandes mammaires présente chez les souris *Tbx3*<sup>+/-</sup> et l'aggravation de ce phénotype chez les souris *Tbx2*<sup>+/-</sup>/*Tbx3*<sup>+/-</sup> suggèrent une contribution importante de ces gènes dans le maintien du développement mammaire normal<sup>186</sup>. L'élucidation du mécanisme reliant la dérégulation de *Tbx3* et de *Tbx2* à la tumorigénèse apportera des informations potentiellement pertinentes à la prévention ou au traitement de ces tumeurs.

### 3) Les facteurs *Tbx* dans le développement cardiaque

Plusieurs protéines de la famille *Tbx*, notamment *Tbx1*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5*, *Tbx18* et *Tbx20*, sont exprimées pendant le développement cardiaque (Fig 1,5 et Tableau 1,2). Cette section est donc une vue d'ensemble des facteurs de transcription à boîte T impliqués dans le développement cardiaque.

Tel que mentionné précédemment, la mutation de *Tbx1* est associée à l'apparition du syndrome de DiGeorge, caractérisé par des malformations cranio-faciales et cardiovasculaires <sup>139</sup>. Ce sont ces dernières qui seront maintenant abordées. Typiquement, les malformations cardiaques retrouvées chez les patients atteints de ce syndrome sont d'origine conotruncale. Les plus fréquentes sont la tétralogie de Fallot, causée par l'absence de septation de la voie de chasse, la malformation de la quatrième artère gauche de l'arche aortique et la persistance du troncus arteriosus <sup>187</sup>. Aussi, il est intéressant de noter que ces malformations sont fort similaires à celles observées suite à l'ablation des cellules de la crête neurale craniale (CNC) <sup>125</sup>. De plus, la souris mutante hétérozygote *Tbx1* reproduit partiellement le phénotype du syndrome, ne montrant qu'une malformation de la quatrième artère de l'arc aortique alors que la souris homozygote en reproduit l'ensemble, quoi qu'à son extrême sévérité, causant la mort périnatalement <sup>137,139</sup>.

Le transcrite de *Tbx1* est détectable à partir du jour E7,5 au niveau du mésoderme cranial et pharyngien <sup>136,188</sup>, plus précisément à l'intérieur de la zone cardiogénique secondaire <sup>44</sup>. Il est aussi détecté à l'intérieur de l'endoderme et son expression est maintenue grâce au morphogène de signalisation *Sonic Hedgehog* (*Shh*) sécrété par l'ectoderme pharyngien <sup>45,188</sup>. La présence de *Shh* induit l'expression des facteurs de transcription *Foxc1* et *Foxc2* dans le mésoderme et celle de *Foxa2* dans l'endoderme qui eux, activent directement la transcription de *Tbx1* <sup>45</sup>. Un des rôles de *Tbx1* consiste en l'activation de la transcription des protéines effectrices *FGF8/10* <sup>138</sup>. Aussi, les niveaux d'expression de ces deux effecteurs sont fortement diminués chez la souris *Tbx1*<sup>-/-</sup> <sup>45</sup>. Cette voie de signalisation est importante pour le maintien de la prolifération et la différenciation cellulaire mésenchymateuse au niveau de la région pharyngienne, pour le développement de l'endoderme ainsi que pour la survie, la différenciation et la migration des cellules de la crête neurale <sup>45,189-191</sup>.

Les malformations cardiaques présentes dans le syndrome de DiGeorge découlent du fait que la prolifération cellulaire au niveau de la zone cardiogénique secondaire, contribuant à la formation de ces structures, est réduite chez les souris *Tbx1*<sup>-/-</sup> <sup>44,192</sup>. Aussi, une surexpression ectopique de *Tbx1* dans le tube cardiaque conduit à l'élongation de la voie de chasse <sup>45</sup>. Toutes ces observations suggèrent l'importance de *Tbx1* dans le contrôle de la prolifération des cellules cardiogéniques. Un autre facteur

*Tbx* ayant une importance capitale lors du développement cardiaque est *Tbx2*. Son expression est détectée au niveau du coussin auriculo-ventriculaire. Il a la capacité de réprimer efficacement l'expression de plusieurs marqueurs myocardiques, notamment *Nppa* et *Cx40*<sup>144,193</sup> et de lier d'autres corépresseurs tels *Hdac1*<sup>194</sup>. Il forme aussi un complexe tertiaire répresseur avec *Nkx2-5* sur le promoteur de *Nppa*<sup>193</sup>. Par ailleurs, la mutation des sites de liaisons TBE et NKE *in vivo* induit l'expression ectopique de *Nppa* au niveau du coussin AV et ce même phénomène est aussi retrouvé chez les souris *Tbx2*<sup>-/-</sup><sup>143,193</sup>. Inversement, l'expression de *Tbx2* tout le long du tube cardiaque inhibe l'expression des marqueurs *Nppa* et *Cx40* et bloque complètement la formation des chambres<sup>141,144,144</sup>. Les résultats provenant du gain et de la perte de fonction de *Tbx3* étant comparables à ceux obtenus avec *Tbx2*, il est possible de conclure qu'ils sont tous deux essentiels à la répression de la différenciation des chambres au niveau du coussin AV<sup>193</sup>. *Tbx2* est aussi important lors du développement de la voie de chasse puisqu'il est possible d'observer des défauts de septation de ce dernier chez les souris *Tbx2*<sup>-/-</sup><sup>143</sup>.

Il est aussi important de mentionner le lien existant entre *Tbx2* et *Tbx20*. En effet, les souris *Tbx20*<sup>-/-</sup> meurent à mi-gestation à cause d'une insuffisance cardiaque<sup>47,155,156</sup>. Cette insuffisance est secondaire au sous-développement des chambres, observable autant au niveau physiologique que moléculaire, et à l'absence de « looping » cardiaque. L'augmentation des niveaux d'expression de *Tbx2* est notable chez les souris *Tbx20*<sup>-/-</sup> et elle est corrélée aux niveaux d'expression réduits de *Nppa*<sup>47,156,187</sup>. L'utilisation d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) permet d'affirmer que *Tbx20* lie le promoteur de *Tbx2* et que son activité répressive est dépendante de la présence des TBE à environ 680 paires de base<sup>47</sup>. Ces résultats suggèrent donc que *Tbx20* est nécessaire au développement des chambres cardiaques via l'inhibition directe de la transcription de *Tbx2*<sup>187</sup>. Par ailleurs, le chevauchement des patrons d'expression de *Tbx20* et *Tbx2* au niveau du coussin AV contredit quelque peu cette hypothèse. Il est présentement proposé que l'action inhibitrice de *Tbx20* soit elle-même inhibée, à ce niveau, par un facteur dont l'identité reste à établir<sup>187</sup>. Cependant, BMP-2 et BMP-4, exprimés au niveau du coussin AV et impliqués dans l'induction de l'expression de *Tbx2* *in vitro*, sont de bons candidats<sup>195</sup>.

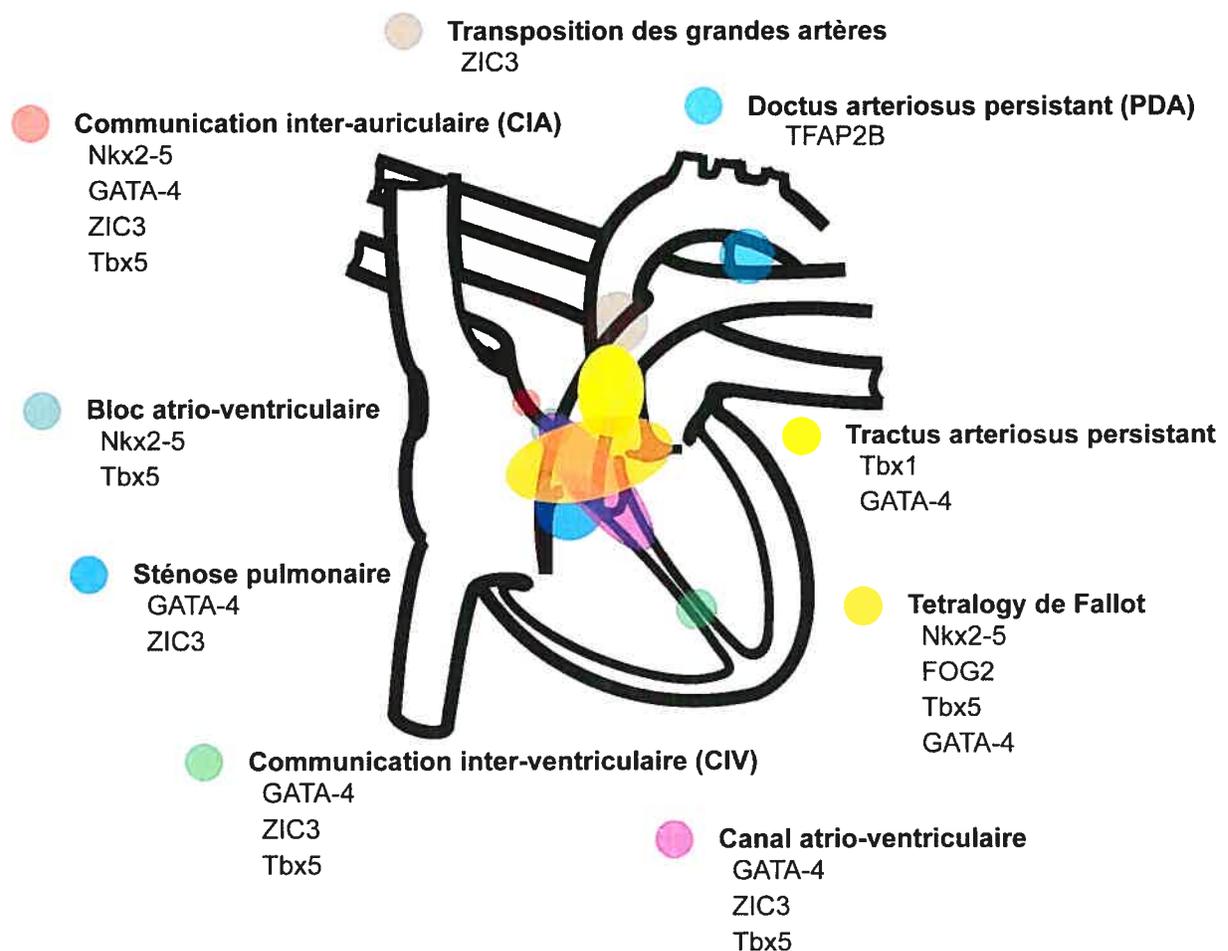
Le dernier membre de la famille à être exprimé lors du développement cardiaque est *Tbx5*. Il est détecté au niveau du croissant cardiaque à partir du jour E7,5. Plus

tard, il est exprimé selon un gradient le long du tube cardiaque <sup>151</sup>. Ses niveaux d'expression les plus élevés sont détectés dans la région caudale. Ce patron d'expression est induit par la voie de signalisation de l'acide rétinoïque (AR) aussi essentiel à la formation du sinus auriculaire <sup>151,196</sup>. Pendant et suite au « looping » l'expression de *Tbx5* se restreint encore davantage à la partie sino-auriculaire du tube. Elle demeure toutefois faiblement présente au niveau du ventricule gauche, de la partie gauche du *septum* inter-ventriculaire et des trabécules du ventricule droit <sup>151</sup>. Plusieurs expériences suggèrent que ce gradient détermine l'identité moléculaire et morphologique des chambres cardiaques. En effet, la surexpression de *Tbx5* tout au long du tube linéaire, que ce soit chez la souris ou le poulet, mène à une « caudalisation » autant moléculaire que morphologique de sa région rostrale <sup>196</sup>. Concrètement, ce gain de fonction induit l'expression de marqueurs ventriculaires gauches à l'intérieur du ventricule droit, l'absence de *septum* inter-ventriculaire, de trabéculation et une diminution des niveaux d'expression de marqueur ventriculaire gauche au profit de marqueurs auriculaires <sup>196-198</sup>. À l'inverse, chez les souris mutantes homozygotes, la partie sino-auriculaire du tube linéaire est sévèrement hypoplasique <sup>152</sup>.

Comme mentionné précédemment, *Tbx5* est impliqué chez l'humain dans le syndrome Holt Oram (SHO) dont l'incidence est de 1/100 000. Les patients qui en sont atteints démontrent invariablement des malformations des membres antérieurs. Plus de 85% d'entre eux souffrent aussi de malformations cardiaques (Fig 1,6) <sup>152</sup>. Le spectre de ces dernières, tout comme celles des membres antérieurs, est vaste et s'étend de l'arythmie aux malformations complexes de la tétralogie de Fallot, en passant par les communications inter-auriculaires (CIA) et inter-ventriculaires (CIV) et le syndrome du ventricule gauche hypoplasique <sup>151,199,200</sup>. Il est intéressant de noter que ce large spectre est aussi retrouvé dans les familles où les individus portent la même mutation, suggérant ainsi l'intervention de gènes modulateurs dans l'expressivité du syndrome.

Il est possible de tirer plusieurs conclusions fort intéressantes de l'analyse des souris mutantes *Tbx5*. Tout d'abord, d'un point de vue morphologique, bien qu'exprimé très tôt dans le développement, un peu avant la formation du croissant cardiaque, *Tbx5* n'est pas essentiel à la formation du croissant cardiaque et à sa fusion, menant au tube linéaire cardiaque puisque ces structures sont présentes chez les souris *Tbx5*<sup>-/-</sup>. Il semble cependant nécessaire au développement de la partie caudale du tube linéaire

puisque chez la souris *Tbx5*<sup>-/-</sup>, la croissance de cette section, qui donne naissance aux oreillettes, est inhibée. Ces observations suggèrent donc que l'absence de *Tbx5* induit un défaut dans le patron de différenciation du tube cardiaque. Par ailleurs le développement normal de la partie rostrale du tube chez ces souris indique qu'il se fait indépendamment de *Tbx5*. Le développement cardiaque semble cependant s'arrêter au jour E9,5 en absence de *Tbx5*. Quant à la souris *Tbx5*<sup>+/-</sup>, elle survit jusqu'à l'âge adulte. La souche dans laquelle l'allèle muté est présente influence cependant grandement le phénotype de ces souris. Ce phénomène est compatible avec l'hypothèse que des gènes modulateurs influencent l'expressivité du phénotype<sup>152</sup>. Ces souris reproduisent la majorité des malformations cardiaques retrouvées dans le SHO. Elles sont



**Figure 1,6. Multiplicité phénotypique et génétique des malformations congénitales cardiaques chez l'humain.** Représentation schématique des malformations congénitales cardiaques associées à des mutations génétiques. Il est à noter qu'une malformation peut être causée par plus d'une mutation et qu'à l'inverse, une mutation peut aussi causer plusieurs malformations

caractérisées par une haute incidence de pathologies électrophysiologiques, de communications inter-auriculaires et ventriculaires. De plus, une sévère dilatation des deux oreillettes et une apparence arrondie des ventricules est aussi observable.

L'analyse moléculaire des souris mutantes suggère que la fonction de *Tbx5* dans la partie sino-auriculaire passe par la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes impliqués dans le développement cardiaque. En effet, chez les souris *Tbx5*<sup>-/-</sup>, les patrons d'expression de *Nppa*, *Cx40*, *Irx4*, *Mlc2v*, *GATA-4*, *Nkx2-5* et de *Hey2* sont altérés. Par contre, ceux d'autres marqueurs, notamment *cMybp-C*, *αMCH*, *eHand* et de *Hey1* restent inchangés, indiquant que l'altération des patrons d'expression est spécifique à la perte de fonction de *Tbx5*<sup>152</sup>. Ces observations proposent aussi que la différenciation cellulaire au niveau de la région sino-auriculaire soit altérée. Chez l'hétérozygote, les niveaux d'expression de la majorité des marqueurs étudiés ne varient pas, à l'exception de ceux de *Nppa* et de *Cx40* qui sont réduits respectivement de 90% et de 50%. *Cx40* étant impliqué dans le fonctionnement du système de conduction, sa perte de fonction pourrait contribuer à expliquer le haut degré d'incidence d'arythmie retrouvé chez les souris *Tbx5*<sup>+/-</sup>. Par ailleurs, l'expression du canal calcique de type *α1D-L* et de *Cx43*, aussi nécessaire au système de conduction, n'est pas influencée par les niveaux réduits de *Tbx5*. Des expériences *in vivo* indiquent que le mécanisme de régulation de l'expression de *Nppa* et *Cx40* implique la coopération du cofacteur *Nkx2-5*.

Ainsi, les résultats démontrent donc que les facteurs de transcriptions de la famille *Tbx* jouent un rôle essentiel dans le développement cardiaque. La famille est impliquée à plusieurs étapes, de la formation du tube linéaire, à la formation des compartiments. Ils sont aussi impliqués dans le développement et la différenciation des différents types cellulaires cardiaques. Leurs caractéristiques transcriptionnelles sont aussi variées, certains jouant un rôle répresseurs, tel *Tbx2*, et d'autres un rôle activateurs. L'importance de la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes cardiaques est maintenant bien établie

Il est par ailleurs important de noter que des mutations dans certains de ces derniers sont associées, chez l'humain, à des malformations congénitales cardiaques. Étant donné leur grande importance dans la cardiogénèse, démontré par les différents modèles murins, il ne sera pas surprenant que des mutations dans d'autres membres de

la famille soient découvertes chez d'autres patients souffrant de malformations cardiaques.

### ***F) Rôle de l'endocarde dans le développement cardiaque***

On distingue deux types de cellules endocardiques : les cellules endothéliales endocardiques (EE) et les cellules endothéliales capillaires myocardiques (ECM). Contrairement aux cellules endothéliales vasculaires, ces dernières sont en contact étroit avec les cardiomyocytes <sup>4</sup> et sont en mesure d'influencer directement leur croissance, leur performance et leur fréquence contractiles (Tableau1,3) <sup>4</sup>. Cette section a donc pour but de décrire le rôle des cellules endothéliales cardiaques dans ces divers événements.

#### *1) Rôle des cellules endocardiques dans la croissance du myocarde*

L'importance des cellules endothéliales vasculaires pour la croissance vasculaire est largement reconnue <sup>201,202</sup>. De plus le rôle crucial, lors du développement vasculaire, de plusieurs facteurs sécrétés par les cellules endothéliales, notamment VEGF et FGF, est maintenant établi <sup>203-205</sup>. Ces observations démontrent donc que les signaux d'induction provenant des cellules endothéliales vasculaires sont nécessaires à la vasculogénèse et à l'angiogénèse via la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires <sup>203,206</sup>. Beaucoup moins de travail a cependant été fait sur la fonction des cellules endothéliales cardiaques lors du développement myocardique. Leur rôle dans la trabéculatation et l'épaississement des murs myocardiques est maintenant confirmée et plusieurs voies de signalisations sont retrouvées dans ces processus. Voici donc un résumé des voies de signalisation entre l'endocarde et le myocarde impliquées dans le développement cardiaque découvertes jusqu'à maintenant.

**Tableau 1.3. Voies de signalisation impliquées dans la communication entre l'endocarde et le myocarde.**

<b>Voie de signalisation</b>	<b>Site d'expression endocardique et myocardique</b>	<b>Rôle</b>
Endotheline-1	ET-1 est sécrétée par les cellules endocardiques et lie les récepteurs ET <sub>A</sub> et ET <sub>B</sub> exprimés par les cardiomyocytes <sup>1</sup> .	En absence de cette voie de signalisation, les souris développent des défauts de septation ventriculaire. Elle est aussi importante à la compaction du mur ventriculaire. Un des plus puissant inotrope positif connu. Cependant, <i>in vivo</i> , son effet passerait davantage par la stimulation autocrine des cellules endocardiques, induisant la relâche de NO.
FGF	FGF-9, -16 et -20 sont sécrétés par l'endocarde et le myocarde et lie les récepteurs FGFR-1 et -2. FGF-4 est sécrété par les cellules endocardiques mésenchymateuses et agit de façon autocrine via les récepteurs FGFR-1 à -3 <sup>2</sup> .	Important pour la prolifération et la différenciation des cardiomyocytes <sup>3</sup> . Active la voie de signalisation Ras et PLC- $\gamma$ et la prolifération au niveau des coussins endocardique <sup>4</sup> .
eNOS	L'oxyde nitrique est sécrété en majeure partie par les cellules endocardiques et lie la guanylyl cyclase sensible à NO <sub>2</sub> , présente sur les cardiomyocytes <sup>5</sup> .	Rôle anti-apoptotique et pro-différenciatif pour les cardiomyocytes. Chez l'adulte, cette voie de signalisation joue davantage un rôle anti-prolifératif. Inotrope positif au niveau basal. Inotrope négatif lors de sa sécrétion suite à un stress. Anti-arythmique et chronotrope positif <sup>6</sup> .
Neureguline	NRG-1 est sécrétée par les cellules endocardiques et stimule l'hétéro-dimérisation des récepteurs ErbB <sub>2</sub> et ErbB <sub>4</sub> situés sur les cardiomyocytes. Il agit de même sur les récepteurs ErbB <sub>1</sub> et ErbB <sub>2</sub> au niveau des cellules endocardiques mésenchymateuses <sup>7</sup> .	Chez les cardiomyocytes, joue un rôle dans la formation des trabéculations, dans la différenciation du système de conduction et dans la prolifération cellulaire <sup>8</sup> .

Un des premiers faits supportant l'importance de l'endocarde dans le développement cardiaque est représenté par le phénotype du poisson zèbre mutant *cloche* <sup>342,343</sup>. La mutation de ce gène induit l'absence de cellules endocardiques. Malgré ceci, le tube cardiaque se développe partiellement. Il est petit, dysmorphique, et ne présente aucune trabéculation. Sa partie sino-auriculaire est fortement dilatée et la partie ventriculaire est collapsée. Sa fonction est aussi affectée puisque les contractions cardiaques sont d'une très faible intensité. Ces observations suggèrent donc qu'en absence de cellules endocardiques, l'organisation, le développement et la croissance du myocarde sont compromis.

#### a) La voie de signalisation VEGF

Une des voies de signalisation endocardique-myocardique essentielle au développement cardiaque est celle de VEGF. Son récepteur *Flk-1* (*VEGFR-2*) est exprimé dans les cellules endocardiques au jour E7 et est nécessaire à l'intégration du signal VEGF provenant principalement des cardiomyocytes trabéculaires<sup>209,210</sup>. Sa perte de fonction chez la souris conduit, comme chez le poisson zèbre cloche, à l'absence de cellules endocardiques et de maturation cardiaque<sup>207,211</sup>. Par ailleurs, la perte de fonction d'un autre récepteur VEGF, *Flt-1* (*VEGFR-1*), au niveau des cellules endothéliales, induit le détachement de ces dernières de la couche de cardiomyocytes du tube cardiaque<sup>212</sup>. Les cellules endocardiques se différencient normalement mais envahissent la cavité ventriculaire, menant au décès de l'embryon. Bien que cette voie de signalisation ne constitue pas un signal inductif provenant des cellules endocardiques, elle illustre néanmoins que la communication entre les cellules endocardique et myocardique est essentielle au développement cardiaque.

#### b) La voie de signalisation Neureguline-1

Des signaux provenant de l'endocarde ont aussi été découverts. En effet, la *neuregulin-1* (*NRG1*), exprimée par les cellules endocardiques, peu après *cloche* et *Flk-1*, est excrétée par ces dernières et lie les récepteurs tyrosine kinase *ErbB<sub>2</sub>* et *ErbB<sub>4</sub>* retrouvés à la surface des cardiomyocytes adjacents<sup>213-218</sup>. La mutation de l'un ou l'autre de ces récepteurs conduit à l'absence de trabéculatation et à la mort *in utero*. L'importance de cette voie de signalisation est aussi renforcée par le fait que les souris mutantes pour le récepteur de la *sérotonine* (*5-HT<sub>2B</sub>*) expriment *ErbB<sub>2</sub>* à des niveaux réduits et démontrent, dans les cas les plus sévères, une hypotrabéculatation comme celle obtenue chez les souris *ErbB<sub>2</sub><sup>-/-</sup>*<sup>219</sup>. Par ailleurs, les souris *5-HT<sub>2B</sub><sup>-/-</sup>* qui présentent un phénotype moins sévère et qui survivent jusqu'à l'âge adulte, souffrent de cardiomyopathies sévères incluant une faible masse ventriculaire gauche causée par une réduction du nombre et du volume des cardiomyocytes<sup>220</sup>. Ces observations démontrent donc que ces voies de signalisations paracrines sont essentielles à la croissance et à la prolifération des cardiomyocytes.

#### c) La voie de signalisation de l'angiopoiétine-1

La découverte de la nouvelle famille de récepteur tyrosine kinase TIE, exprimée spécifiquement dans les cellules endothéliales vasculaires, a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation endocardique-myocardique essentielle au

développement cardiaque. Son ligand, *angiopoietin-1*, est fortement exprimé par les cellules myocardiques entourant les cellules endocardiques TIE-2 positives. La mutation de l'un ou l'autre de ces gènes produit, au niveau du tube cardiaque, une couche endocardique désorganisée, collapsée et détachée du myocarde<sup>221-223</sup>. De plus, la trabéculatation est absente. La perte de fonction d'*angiopoietin-1* semble donc influencer le développement endocardique qui, à son tour, ne peut produire les signaux inductifs nécessaires au développement myocardique. La surexpression dans l'endocarde de l'*angiopoietin-2*, un antagoniste de l'*angiopoietin-1* retrouvé dans les cellules endothéliales vasculaires, confirme par ailleurs cette théorie. En effet, ce gain de fonction bloque la voie de signalisation et reproduit le phénotype obtenu chez les souris mutantes TIE2 et *angiopoietin-1*<sup>224</sup>.

#### d) La voie de signalisation de l'endothéline-1

*ET-1* est une hormone peptidique sécrétée principalement par les cellules endocardique qui se lie aux récepteurs couplés à une protéine G  $ET_A$  et  $ET_B$ <sup>225</sup>. Il est produit sous la forme de pre-pro-*ET-1* et doit être clivé par ses enzymes de conversion ECE-1 et ECE-2. L'expression de *ppET-1*, d'ECE-1 et d'ECE-2 est détectée dans les cellules endothéliales du coussin endocardique et dans celles de la lumière ventriculaire<sup>226</sup>. Celle des récepteurs, eux, sont retrouvés dans les cellules de la crête neurale en migration, en post-migration ainsi que dans les cardiomyocytes<sup>1</sup>. La perte de fonction de l'un ou l'autre des éléments de cette voie de signalisation produit une hypoplasie ventriculaire gauche et une communication inter-ventriculaire.

*ET-1* joue aussi un rôle important dans la modulation de la performance contractile. Dans le cœur adulte normal, les cellules endocardiques ne sécrètent pas d'*ET-1*. Elles expriment par contre ses récepteurs, tout comme les cardiomyocytes, les cellules du système de conduction et les cellules endothéliales vasculaires<sup>227-229</sup>. Le stress, comme un étirement myocardique ou l'augmentation de la concentration sanguine d'*angiotensine II* ou de *norepinephrine*, induit par ailleurs sa réexpression<sup>230</sup>. Il est intéressant de noter qu'en culture primaire, *ET-1* est un des plus puissants agents inotropes positifs et un facteur de croissance induisant l'hypertrophie des cardiomyocytes<sup>231-233</sup>. Cependant, puisqu'il démontre aussi un fort potentiel vasoconstricteur, il est présentement proposé que son action se fasse de manière autocrine, en liant son récepteur et en induisant le relâchement d'oxyde nitrique<sup>234,235</sup>.

e) Voie de signalisation de l'oxyde nitrique (ON)

La contribution de l'ON dans le développement cardiaque peut être évalué en observant le phénotype obtenu des souris mutantes pour l'enzyme ON synthase endothéliale (*eNOS/NOS3*)<sup>236</sup>. Cette enzyme est exprimée dans les cellules endocardiques et, transitoirement, dans certains cardiomyocytes. Les souris mutantes homozygotes montrent une incidence élevée de CIA et de CIV et meurent peu après leur naissance<sup>237</sup>. De plus, les niveaux d'apoptose des cardiomyocytes y sont plus élevés, démontrant ainsi un rôle de l'ON dans leur survie.

Par ailleurs, l'ON a un effet inotrope positif *in vivo* chez les humains. En effet, des niveaux ventriculaires élevés de *eNOS* sont corrélés à une augmentation du volume d'éjection, de la fraction d'éjection et à une diminution de la rigidité du ventricule gauche<sup>238</sup>.

f) La voie de signalisation de FGF

Différents FGF et récepteurs FGF sont exprimés par les cellules endocardiques et myocardiques au cours du développement cardiaque. Les cellules endocardiques sécrètent FGF-4, FGF-9, FGF-16 et FGF-20<sup>2</sup>. Bien que FGF-4 ait une action principalement autocrine, les autres facteurs FGF produits par l'endocarde ont comme cible les récepteurs FGFR-1 et FGFR-2 exprimés par les cardiomyocytes. La perte de fonction des différents segments de cette voie de signalisation suggère son implication dans la régulation du développement cardiaque. En effet, les souris FGF-9<sup>-/-</sup> présente une hypoplasie ventriculaire bilatérale associée à une prolifération cellulaire réduite des cardiomyocytes. Par ailleurs, la perte de fonction des récepteurs FGFR-1 et FGFR-2 au niveau des cardiomyocytes propose aussi l'importance de cette voie de signalisation dans le développement cardiaque. Les souris n'exprimant aucun de ses récepteurs au niveau des cardiomyocytes souffrent d'hypoplasie ventriculaire sévère, un mur myocardique aminci et une dilatation auriculaire. Comme chez les souris mutantes FGF-9, une diminution du taux de prolifération des cardiomyocytes est observée. Finalement, l'effet de FGF-9, FGF-16 et FGF-20 *in vitro* sur des sections de cœur démontrent qu'ils augmentent de façon significative, la prolifération cellulaire des

cardiomyocytes. Ces résultats démontrent donc que la voie de signalisation FGF joue un rôle important dans l'induction de la prolifération myocytaire.

*g) La voie de signalisation de l'Erythropoïétine (EPO)*

Il est aussi important de mentionner que les signaux inductifs influençant la fonction et le développement de l'endocarde peuvent aussi avoir une conséquence sur le développement et la fonction du myocarde. Cette affirmation est appuyée par l'analyse de la perte de fonction de la voie de signalisation de l'EPO. Les souris mutantes EPO<sup>-/-</sup> ou récepteur EPO<sup>-/-</sup> souffrent d'hypoplasie ventriculaire et de communication inter-ventriculaire causée par une réduction de la prolifération des cardiomyocytes au niveau du mur compact et du *septum*<sup>239</sup>. Le récepteur de l'EPO est exprimé par les cellules endocardiques mais pas par les cardiomyocytes. Cette voie de signalisation induit la prolifération cellulaire des cellules endocardiques *in vitro*<sup>240</sup>. La molécule effectrice paracrine responsable de la prolifération des cardiomyocytes dans cette voie de signalisation reste toutefois inconnue. ET-1 demeure cependant le meilleur candidat. Par ailleurs, l'absence de capillaires au niveau du myocarde indique que les cellules ECM jouent un rôle important dans l'apparition du phénotype<sup>239</sup>.

Force est de constater que la présence et la fonction adéquate de l'endocarde sont nécessaire au développement et au fonctionnement normal du myocarde. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la communication entre ces deux types cellulaires et leur perte de fonction est associée à une diminution de la prolifération et de la performance des cardiomyocytes.

**G) Analyse de la fonction cardiaque dans le modèle murin**

Bien que la puissance et la précision des protocoles expérimentaux en biologie moléculaire et en pharmacologie ne cesse d'augmenter, les hypothèses élaborées dans un projet doivent être testées *in vivo* afin de valider leur importance. Plusieurs modifications de la fonction cardiaque sont observables *ex vivo* ou *post mortem*, soit par des microdissections ou par des analyses histologiques. Cependant, un large spectre de ces modifications ne peuvent être confirmées qu'en mesurant la fonction cardiaque *in vivo*. Les techniques d'évaluation de la fonction cardiaque *in vivo* bénéficie de plusieurs avantages. Tout d'abord, ces techniques mènent rarement au décès de l'animal. Il est

donc possible d'utiliser l'animal à d'autres fins, ou de mesurer la fonction cardiaque sur un même animal avant et après un traitement, ou tout au long de sa vie. Ces avantages réduisent la quantité d'animaux nécessaires à une étude et permettent de mesurer avec plus de précision l'effet d'un traitement ou du vieillissement sur la fonction cardiaque des animaux étudiés.

Mesurer la fonction cardiaque chez la souris comporte son lot de difficultés. Tout d'abord, la taille des chambres cardiaques est très réduite. À titre d'exemple, le diamètre intra-ventriculaire gauche en diastole mesure environ 3 mm et l'épaisseur de sa paroi est inférieure à 1 mm. De plus, la fréquence cardiaque est d'environ 600 battements/minute. Ces caractéristiques rendent donc nécessaire l'utilisation de systèmes d'imagerie ayant une résolution spatiale et temporelle supérieures à celles nécessaires au diagnostic chez l'humain. Ces systèmes permettent donc de mesurer avec précision différentes caractéristiques de la fonction cardiaque. Ces systèmes, ainsi que les paramètres importants de la fonction cardiaque seront ici abordés.

Plusieurs aspects de la fonction cardiaque peuvent être mesurés chez la souris. Tout d'abord, la fonction ventriculaire gauche comprend plusieurs paramètres standards utilisés dans nombre d'étude, qui permettent de comparer, entre autres, la capacité du cœur à pomper le sang dans la circulation périphérique.

Un autre aspect important de la fonction cardiaque est l'hémodynamie au niveau des valves cardiaques. Évidemment, les valves doivent être étanches. Mais en plus de cette caractéristique clef, la mesure du flux sanguin au niveau de ces dernières peut en dire long sur la fonction des différents compartiments cardiaques.

### 1) *Évaluation de la contractilité*

L'échocardiographie est une technique simple, peu coûteuse et reproductible permettant de mesurer la contractilité ventriculaire *in vivo* de souris sous sédation. En utilisant un système d'imagerie munit d'une sonde à ultrason d'une fréquence de 12 à 15 MHz, il est possible d'obtenir des images para-sternales en deux dimensions du cœur en systole et en diastole. Ces dernières peuvent montrer une vue apicale des quatre chambres ou encore une vue transverse, appelé axe long, permettant de mesurer le diamètre et l'épaisseur du ventricule gauche. De ces images sont tirées plusieurs

paramètres incluant le diamètre intra-ventriculaire gauche en systole (IVDs), le diamètre intra-ventriculaire gauche en diastole (IVDd) ainsi que différentes mesures d'épaisseur du septum ventriculaire et de la paroi extérieure du ventricule gauche. L'IVDs et l'IVDd sont ensuite utilisés afin de calculer un indice de contractilité ventriculaire, soit la fraction de raccourcissement (FR) ou « Fractional shortening » (FS). La formule utilisée pour y arriver est :  $FR = ((IVDd - IVDs)/IVDd) \times 100\%$ . Cette valeur représente en fait la capacité du ventricule gauche à se contracter.

Plusieurs modèles mathématiques rendent maintenant possible l'estimation de la masse et du volume ventriculaire gauche à partir des IVDs, IVDd et de l'épaisseur des parois ventriculaires. Les plus utilisés sont : Teichholz, ellipsoïde prolate et règle de Simpson modifié. Ces modèles assument cependant que le cœur à l'étude ne possède aucune déformation. Ceci peut induire un biais dans les estimations. Ils permettent donc d'approximer le volume de sang contenu dans le ventricule gauche en systole et en diastole et de calculer la fraction d'éjection (FE). Elle représente le pourcentage du volume intra-ventriculaire gauche éjecté dans l'aorte à chaque battement.

L'échographie cardiaque permet aussi de mesurer avec précision la vitesse, le débit et le gradient de pression du sang au niveau des différentes valves cardiaques. Ces paramètres seront maintenant abordés.

## 2) *Évaluation du débit cardiaque et de la fonction valvulaire*

La fonction Doppler de l'échocardiographie permet de mesurer la vitesse du flux sanguin au niveau des valves<sup>241</sup>. Un graphique de la vitesse en fonction du temps permet de déduire plusieurs paramètres. Parmi ceux-ci se trouvent les ondes E et A. Elles sont mesurables au niveau de la valve mitrale et sont utilisées pour évaluer la fonction diastolique ventriculaire gauche. Par contre, pour observer ces ondes, le rythme cardiaque doit être ralenti considérablement. Cette caractéristique induit donc un biais dans l'étude. Ces ondes n'ont par ailleurs pas été utilisées dans la présente étude puisque le rythme cardiaque des souris étudiées était trop élevé.

Un autre paramètre important concernant les valves est le gradient de pression moyen. Il est calculé à l'aide de la courbe de la vitesse sanguine. Son augmentation

signifie que le sang passe plus rapidement à travers la valve. Les causes pouvant entraîner ceci sont : une sténose valvulaire, une hypertension pulmonaire ou une fonction diastolique altérée.

Un autre paramètre obtenu à l'aide de la fonction Doppler est le volume d'éjection (VE). Il représente le volume de sang éjecté à chaque contraction du ventricule gauche. Contrairement à la fraction d'éjection mesurée en pourcentage, ce dernier est une mesure directe du volume et est donc représenté en millilitres. De plus, en tenant compte de la fréquence cardiaque, il est possible de déterminer le volume de sang pompé par le ventricule gauche par minute. Ce paramètre se nomme le débit cardiaque (DC) ou « cardiac output » (CO).

### 3) *Évaluation de l'activité électrique*

La fonction mécanique normale du cœur dépend d'une fonction électrique adéquate. L'activité électrique myocardique se présente sous la forme de potentiel d'action, reflétant l'action de canaux dépolarisants ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ) et repolarisants ( $\text{K}^+$ )<sup>242</sup>. Par ailleurs, la propagation du courant électrique au niveau du myocarde dépend du couplage de ces derniers par les jonctions gap. Puisque la modification des courants électriques cardiaques altère la fonction mécanique du cœur, l'étude de ces derniers est donc essentielle. L'électrocardiographie (ECG) est la technique utilisée pour y arriver.

On distingue principalement deux types d'acquisitions d'ECG : l'ECG de surface et la télémétrie. La première implique l'insertion de sondes sous-cutanées au niveau des membres alors que la seconde nécessite une chirurgie et l'implantation d'un émetteur et de sondes sous la peau de la souris.

Contrairement aux humains, les souris sont peu promptes à rester immobiles lors de l'ECG de surface. Pour cette raison, elles doivent être mises sous sédation afin de rendre possible l'acquisition des données. Cette caractéristique peut induire un biais à l'étude puisque la sédation ralentit le rythme cardiaque. Par contre, la rapidité et le faible coût sont des avantages importants. Les acquisitions typiques d'ECG de surface sont d'environ deux minutes. Cet intervalle de temps permet d'avoir une quantité suffisante de battements, rendant ainsi le calcul des intervalles précis. Par contre, il réduit la possibilité d'observer des événements rares.

La télémétrie permet de faire l'acquisition de l'ECG pendant que l'animal est éveillé. Elle permet donc de connaître les paramètres de l'ECG de l'animal au repos, non anesthésié. Aussi, puisque le comportement de l'animal est inaltéré, il est possible de faire des acquisitions prolongées pendant 48 heures. Cette caractéristique favorise grandement l'observation d'événements rares. Par contre, elle nécessite un personnel qualifié pour l'installation de la sonde et est plus onéreuse que l'ECG de surface.

L'électrocardiographie permet de mesurer l'amplitude et l'intervalle de temps des dépolarisations cardiaques. Ces dépolarisations sont observables sous la forme d'ondes, présentées sur un graphique de potentiels d'actions en fonction du temps. La première onde est l'onde P. Elle représente la dépolarisation auriculaire, du nœud sinusal vers le nœud atrio-ventriculaire. La seconde est le complexe QRS. Elle correspond à la dépolarisation ventriculaire. Finalement, la dernière se nomme l'onde T. Elle représente la repolarisation ventriculaire.

En plus des ondes, les intervalles entre ces dernières sont particulièrement importants. Plusieurs types d'arythmies sont observables à l'étude des intervalles. Tout d'abord, le bloc atrio-ventriculaire de type I, est caractérisé par un intervalle PR prolongé<sup>242</sup>. Il peut être dû à un retard de conduction du nœud atrio-ventriculaire. Le bloc atrio-ventriculaire de type II, quand à lui, est représenté par une onde P, sans complexe QRS adjacent. Il consiste donc en une dépolarisation auriculaire, sans dépolarisation ventriculaire. Il est causé par l'arrêt de la dépolarisation au nœud atrio-ventriculaire. Un autre type d'arythmie, la pause sinusale, est caractérisée par l'absence de toute activité électrique cardiaque pendant un intervalle de temps variable.

#### *4) Évaluation de la tolérance à l'effort*

Chez l'humain, une caractéristique importante de l'évaluation de la fonction cardiovasculaire consiste en la capacité de performer dans une épreuve physique<sup>243</sup>. De plus, pendant que le patient subit le test à l'effort, certains paramètres comme la consommation en oxygène et la fréquence cardiaque sont mesurés. Ensemble, ces paramètres donnent une idée générale de la fonction cardiovasculaire d'un patient. Un autre avantage du test de tolérance à l'effort, est qu'il permet d'observer des phénotypes

qui n'étaient pas présents à l'état de repos. Bien que les paramètres ci-haut mentionnés puissent aussi être observés chez la souris, l'utilisation du tapis roulant seul, équipé de barres électriques à l'arrière, permet de comparer la fonction cardiovasculaire des souris appartenant à plusieurs groupes <sup>243</sup>.

La performance des souris à l'épreuve de tolérance à l'effort peut être mesurée de plusieurs façons. Tout d'abord, tel que mentionné ci-haut, il est possible de mesurer la consommation d'oxygène et le rythme cardiaque des souris. Ainsi, pour un même exercice, une consommation accrue d'oxygène ou un rythme cardiaque plus élevé seront associés à une fonction cardiovasculaire diminuée. Les autres méthodes permettant de mesurer la performance des souris sont de comparer le temps que la souris prend avant d'abandonner l'épreuve ou de mesurer le nombre de fois qu'elle touche les barres électriques. Bien que la précision des ces différentes techniques diffèrent, toutes permettent de comparer la fonction cardiovasculaire de groupes de souris.

### **H) Objectif du travail**

Tel que mentionné précédemment, la mutation du facteur de transcription *Tbx5* est associé au syndrome Holt-Oram. Ce dernier présente un large spectre de malformations cardiaques et la fonction de *Tbx5* dans plusieurs types cellulaires est l'hypothèse retenue pouvant expliquer cette caractéristique. De plus, il est maintenant clair que l'endocarde joue un rôle essentiel dans le développement cardiaque, autant au niveau de la morphogénèse qu'au niveau de la régulation de la croissance et de la fonction myocardique. Étant donné que le phénotype observé chez les patients souffrant du SHO et chez les souris *Tbx5*<sup>+/-</sup> inclut plusieurs caractéristiques indiquant un dysfonctionnement endocardique, l'objectif de ce projet de recherche est de déterminer la participation de l'endocarde dans les malformations cardiaque du SHO.

Pour y arriver, la souris *Tie2-Cre* fût croisée avec la souris *Tbx5-Flox* afin d'obtenir une recombinaison spécifiquement au niveau des cellules endothéliales vasculaires et endocardiques. Comme *Tbx5* n'est pas exprimé au niveau des cellules endothéliales vasculaires, l'effet de la perte de fonction est restreint aux cellules endothéliales endocardiques. Ce croisement permet aussi d'obtenir une perte de fonction de *Tbx5* dans toutes les structures cardiaques dérivées de l'endocarde. Ainsi, le coussin endocardique et les valves n'exprimeront pas *Tbx5*.

Un objectif parallèle du projet consiste à déterminer le rôle joué par *Tbx5* dans le développement des cellules endocardique *in vivo*. Les conséquences de sa perte de fonction sur la prolifération et survie cellulaire seront donc analysées. De plus, différents croisements avec d'autres souris présentant un phénotype indicatif d'un dysfonctionnement endocardique permettra de mettre en lumière l'épistasie entre certaines cascades fonctionnelles. Ces observations, ainsi que d'autres expériences complémentaires *in vitro*, permettront de déterminer sa situation et son rôle au niveau des cascades transcriptionnelles impliquées dans le développement endocardique.

***Authors list and role played in the elaboration of this manuscript***

***Mathieu Nadeau:*** Realisation of most of the experiments presented in this manuscript. Conception of experiments and writing of the manuscript.

***Romain Georges :*** Realisation of experiments presented in this manuscript notably relative to immunostainings. Conception of experiments.

***Brigitte Laforest :*** Realisation of experiments involving cell transfections and luciferase assay.

***Chantal Lefebvre:*** Realisation of experiments involving cell transfections and luciferase assay.

***Martin Lepage:*** Supervised all the experiments involving magnetic resonance imaging.

***Benoit Bruneau:*** Conception of experiments.

***Gregor Andelfinger:*** Conception of the experiments involving tread mill and Millar catheter. Realisation of heart dissections

***Pierre Paradis:*** Realisation and analyse of echocardiography experiments

***Mona Nemer:*** Conception of experiments and project supervisor.

Manuscript in preparation.

## **Chapitre 2 : Résultats**

### ***Atrial septal defects caused by endocardial specific deficiency of transcription factor Tbx5***

Mathieu Nadeau<sup>1</sup>, Romain Georges<sup>1</sup>, Brigitte Laforest<sup>1</sup>, Chantal Lefebvre<sup>1</sup>, Martin Lepage<sup>3</sup>, Benoit Bruneau<sup>2</sup>, Gregor Andelfinger<sup>5</sup>, Pierre Paradis<sup>1</sup>, Mona Nemer<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

Université de Montréal, Montréal QC CANADA

110, avenue des Pins Ouest

Montréal QC H2W 1R7 CANADA

<sup>2</sup> Gladstone Cardiovascular Center

<sup>3</sup> Université de Sherbrooke

<sup>4</sup> Hôpital Ste-Justine

<sup>5</sup> Dept of Biochemistry, University of Ottawa

**Keywords:** *Tbx5* / congenital heart disease / endocardium / heart development / Atrial septal defect

**\* Corresponding Author:** Dr Mona Nemer

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

110, avenue des Pins Ouest

Montréal QC H2W 1R7 Canada

Phone: 514-987-5680 / Fax: 514-987-5575



## **Abstract**

Congenital heart defects (CHDs) are found in 1 to 3% of newborns. Septal and valvular defects are the most frequent of them. Mutations in transcription factor *Tbx5* are associated with Holt-Oram syndrome (HOS). This syndrome is characterized by defects in forelimb development and a large spectrum of heart abnormalities. We hypothesized that *Tbx5* function in multiple cardiac cell types and the presence of genetic modifiers may account for the variable expressivity of HOS. In order to establish the role of endocardial cells in the cardiac malformations found in HOS, an endocardial specific deletion of *Tbx5* was engineered in mice by breeding *Tie2-Cre* mice with *Tbx5-Flox* mice. This study shows that loss of endocardial *Tbx5* produces, in 100% of the cases and in a dose dependent manner, a *secundum* type atrial septal defect (ASD), a severe right atrium dilatation and a mitral valve blood flow dysregulation. The mechanism responsible for the ASD involves excessive apoptosis of the *septum primum*. *In vitro* experiments show that both *eNOS* and *Bcl-xL* are potential target genes implicated in this phenomenon. Moreover, epistasis with other ASD associated genes, such as *eNOS* and GATA-4 was found, therefore supporting the hypothesis of a multigenic etiology of ASD. Interestingly, while *eTbx5<sup>+/-</sup>* mice do not show any sign of cardiac dysfunction they have a reduced tolerance to exercise. In addition, they present with a persistent foramen oval (FOP), a subtle and common cardiac malformation found in 30% of the population and associated with higher risks of ischemic stroke. Together, the results indicate that endocardial *Tbx5* is essential for endocardial cell survival and differentiation and that alteration of *Tbx5* function in these cells disrupts proper heart morphogenesis. On the other hand, heterozygote mice with a FOP represent a novel animal model of a common human cardiac malformation, which will be useful to analyze the link between FOP and stroke and to test the effectiveness of different pharmacologic interventions.

**Keywords:** *Tbx5*, congenital heart disease, endocardium, heart development, atrial septal defect.

## ***Introduction***

In human, congenital malformations are found in 1 to 3% of newborns and cardiac malformations account for 25% of those with septal and valvular defects being the most frequent congenital heart defects (CHDs) <sup>1</sup>. They also vary in severity, some remaining clinically undetected until later in life while others necessitate complex surgical interventions. Additionally, the role of genetics and inheritance is now well established. Unfortunately and despite recent advances, the molecular basis of disease is known in only 5% of cases <sup>1</sup>. Mutations in cardiac transcription factors GATA-4, *Nkx2-5*, ZIC3 and *Tbx5* have been found in human septal and valvular defects <sup>2-6</sup>. *Tbx5* mutations are linked to a more complex autosomal dominant syndrome: the Holt Oram syndrome (HOS) characterized by forelimb and a large spectrum of cardiac malformations ranging from benign arrhythmia to complex structural malformations <sup>6</sup>. The fact that valvular and atrial septal defects (ASDs) are the most common cardiac malformations found in the HOS patients and that these structures are largely of endocardial origin may reflect a dysfunction of the endocardial cells or of the myocardial-endocardial cell communication. Ventricular septal defects (VSD), tetralogy of Fallot and conduction system defects are also present in some HOS patients and are most likely explained by cardiomyocyte dysfunction. Conduction defects are thought to be a consequence of Cx40 dysregulation <sup>7</sup>. Indeed, *Tbx5*, in cooperation with *Nkx2-5*, regulates Cx40 expression. Cx40 levels are downregulated in *Tbx5*<sup>+/-</sup> mice <sup>7</sup> and inactivation of the Cx40 gene results in similar conduction system defects as the ones observed in *Tbx5*<sup>+/-</sup> mice <sup>8</sup>. Thus Cx40 dysregulation, caused by *Tbx5* haploinsufficiency, could account for some of the cardiac malformations found in HOS. The differential penetrance and expressivity of HOS in families with a similar mutation in *Tbx5* is notable and has raised the hypothesis for the existence of genetic modifiers and complex gene-environment interactions. Remarkably this heterogeneity is also observed in *Tbx5*<sup>+/-</sup> mice which recapitulate human HOS. The purpose of this study was to elucidate the mechanism of action of *Tbx5* and in particular to assess the contribution of endocardial *Tbx5* to heart morphogenesis and to cardiac malformations found in HOS.

## ***Methods***

**Animals.** Mice handling and experimentation were performed in accordance with institutional guidelines. Mice with endocardial specific deletion of *Tbx5* (*eTbx5<sup>-/-</sup>*) were obtained by crossing *Tbx5* flox/flox mice<sup>9</sup> with the *Tie2-Cre* mice, a kind gift from Thomas Sato<sup>10</sup>. Genotyping was carried out using PCR. The positions of the primers used are shown in Fig 1 and the sequences are presented in table 1. Since the *Tbx5* flox mice are in 129 Sv background and the *Tie2-cre* transgenic mice in B6SJLF1 background, the *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice obtained were in 129 Sv/B6SJLF1 mixed background.

Mice with a heterozygote mutation in *eNOS*<sup>11</sup>, a kind gift from Dre Marie Trudel, were bred to the *eTbx5* heterozygote mice in order to test for genetic epistasis. In parallel, GATA-4 mutant mice were also crossed with *eTbx5* mice for the same reason.

**Electrocardiograms (ECG).** Surface ECG were performed as previously described<sup>12</sup>. Briefly, mice were induced with 5% isoflurane with oxygen and then maintained with 2% isoflurane for the length of the acquisition. Lead I and II ECG recording from mice of all three genotypes were obtained using subcutaneous electrodes. Ambulatory ECG recordings were obtained by subcutaneous implantation of a TA10EA-F20 wireless radiofrequency telemetry device (Data Sciences International, St-Paul MN). Mice were allowed a 72 hours recovery period. Each mouse was then placed in an individual cage overlying a receiver and 48 hours of continuous ECG recording was performed. Surface and ambulatory recordings were analyzed using the ECG auto program (EMKA technology). The following intervals were analysed: PP, PQ, QRS, QT, QTc and RR.

**Physiology and cardiac function.** Mice (n=10 / group, 5 males, 5 females) were anaesthetised with Droperidol/fentanyl and echocardiography were performed as previously described on 120 and 460 days old mice<sup>13</sup>. To compare the diastolic function, five 130 days old littermates, males from each group were used to measure the left ventricular pressure using a Millar pressure catheter (Millar Instruments). The pressure catheter was introduced in the right jugular vein of anaesthetized mice and pushed in the LV. Millar recordings were analysed with the

Chart program (ADInstruments, Colorado springs, Colorado, USA). Tau and left ventricle filling time were analysed.

**Treadmill evaluation.** 23 220 days old mice (*eTbx5*<sup>-/-</sup> : n=12, *eTbx5*<sup>+/-</sup> : n=5, *eTbx5*<sup>+/+</sup> : n=6) were trained for 3 days on the treadmill. The treadmill was equipped with electrical bars at the rear end. These bars are connected to an analogical counter. Mice were running for 10 minutes at 15, 20, 22.5 and 25 m/min for a total of 40 minutes. Since several *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice were unable to complete the exercise, the number of times the electrical bars were touched at each steps and the time spent on the treadmill for each mouse was recorded.

**Transfections.** NIH3T3 cells were plated in DMEM with 10% fetal bovin serum. Cells were transfected using calcium phosphate with 500 ng of *Tbx5* and/or 100 ng of GATA-4 expression vector. 500 ng of reporter Bcl-xL promoter plasmid was used<sup>13</sup>.

QPCR analysis was performed on RNA from cells and heart tissues as described previously<sup>14</sup>. Reverse transcription was done using Omniscript RT kit (Quiagen). QPCR was then accomplished on 1/20 diluted cDNA using Quiagen QPCR kit. DNA template and 300 nM oligonucleotides were used at an annealing temperature of 58°C using the Quantitect SYBR green PCR kit (QIAGEN) in an MX4000 real-time PCR machine (Stratagene, La Jolla, CA). The primers sequences were: VEGF: sens: CGGTTTAAATCCTGGAGCG, VEGF antisens: GGTGGTGACATGGTTAATCG. *Tbx5* sens: CGAGCTCTCTCCACCTCATC, *Tbx5* antisens: CGAGCTCTCTCCACCTCATC. *eNOS* sens: CGAGCTCTCTCCACCTCATC, *eNOS* antisens: ACTCACAAGGTTTGGGTTGG, *Bcl-XL* sens: CGTGGAAAGCGTAGACAAGG and *Bcl-XL* antisens: AAGAGTGAGCCCAGCAGAAC.

**Immunohistochemistry.** Immunohistochemistry was performed as described previously<sup>13,15</sup>. Home made polyclonal antibodies were used to detect endogenous levels of GATA-4 (1/2000) and *Tbx5* (1/400). The anti-NKX2-5 N-19 antibody (Santa Cruz, SC-8697X) was used at a dilution of 1/5000 to detect cardiomyocytes in the tissue sample. All the antibodies used were revealed by an anti-rabbit

biotinylated antibody (Dimension, BA-1000) or an anti-goat biotinylated antibody (Dimension, BA-5000) diluted at 1/250 and a streptavidin-HRP conjugate diluted at 1/500 (Dimension, NEL 750). TUNEL assays were carried out using apoptag kit (chemicon, S7100) according to the apoptag protocol.

**Heart dissection.** For anatomical examination, mice were anaesthetized using 2.5% Avertine (0.02 ml/g). Hearts were then perfused via the left ventricle with 1X PBS supplemented with 100 mM KCl for 5 minutes followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 1X PBS for 20 minutes. Hearts were collected and left in 4% PFA for 16 hours. To visualise the atrial septum, an incision was made from the superior to the inferior vena cava. A part of the right atrium was also removed to enhance viewing.

**Magnetic resonance imaging (MRI).** Mice were anaesthetized using 2.5% Avertine (0.02 ml/g). Hearts were then perfused via the abdominal aorta with 1X PBS supplemented with 100 mM KCl for 5 minutes followed by a 5 min perfusion with neutral formaldehyde 1.7% containing Gd-DTPA (Magnevist, Berlex), a contrast agent. A 3.7% neutral formaldehyde solution was perfused for 5 minutes and mouse abdomen was closed with sutures. Acquisitions were performed in a Varian 7T scanner with the following parameters: slab selective 3D gradient echo sequence, TR: 50 ms, TE: 6.2 ms, FOV: (25.6 mm)<sup>3</sup>, matrix size: 256<sup>3</sup>, NA: 16.

**Statistics.** The data are presented as mean  $\pm$  SEM. For comparison of multiple groups with n=5 to 10, Kruskal Wallis non-parametric statistical test was used. With such small groups, it is impossible to assess the distribution normality and it is therefore not indicated to use the ANOVA. Using the ANOVA would increase the type 1 error occurring probability. When only 2 groups were compared, Wilcoxon U test was used. Student T test was not used for the same reason.

## **Results**

### **Loss of *Tbx5* from the endocardium induces cardiac malformations**

Loss of function of *Tbx5* produces a large spectrum of cardiac malformations in both human and mice, including septal and valve defects that reflect essential

role of *Tbx5* in one or more cardiac cell types. Since septal and valvular tissues are largely derived from the endocardium, we tested whether *Tbx5* was required for proper endocardial differentiation and heart morphogenesis. Endocardium specific deletion of *Tbx5* was accomplished by breeding *Tbx5* flox mice<sup>9</sup> with tie2-cre transgenic mice (Fig 1a). This breeding removes *Tbx5* alleles from all endothelial cells but since *Tbx5* is not expressed in vascular endothelium (Fig 1b), the loss of *Tbx5* function is restricted to the endocardium. Genotyping of resulting offsprings showed that all the expected genotypes were present in a Mendelian ratio indicating that removal of *Tbx5* from endocardial cells is not embryonic lethal (Table 1).

Anatomical examination of adult mice revealed a cardiac phenotype. At first sight, a right atrial dilatation was evident (Fig 2a). Interestingly, the dilatation was correlated with the absence of one or both *eTbx5* alleles. No outflow tract malformation was evident and heart size appeared comparable across groups. A lateral view of the hearts (Fig 2b and c) revealed the presence of a *secundum* type atrial septal defect (ASD) in the knock out mice (Fig 2b and c, arrowhead) and a patent foramen oval (PFO) in the heterozygote mice (Fig 2b and c, arrow). Note that PFO is best evident with a water flow from the right to the left atrium. Otherwise, the foramen appears closed. Both malformations have a penetrance of 100%. Magnetic resonance imaging (MRI) confirmed the presence of both ASD and PFO (Fig 3a). Interestingly, a dose dependent relation between the atrial septum thickness and the presence of *eTbx5* was further observed. Upon microscopic examination, there was no evidence for fibrosis (Fig 3c). Direct measurements of chamber mass confirmed increased weight of the RA and RV in *eTbx5*<sup>+/-</sup> mice (Fig 3b).

#### **Lack of endocardial *Tbx5* alters ventricular mass and exercise tolerance**

Electrophysiology of all three genotypes was compared using both surface and ambulatory ECG. Surface ECG of 120 days old mice from all groups did not reveal any significant difference between groups. These results were also confirmed with ambulatory ECG. Since humans with ASD are more likely to develop conduction system defect (mainly Type I atrioventricular (AV) block), ECGs

were performed on aging (450d) mice as well (Fig 4). Interestingly, cardiac rhythmicity disorders were observed in 20% of the *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice (n=5) whereas none were detected in control littermates (n=5). These disorders were not type I AV block.

Echocardiography revealed further structural and functional changes. This result was later contradicted by direct weight measures of all four cardiac chambers (Fig 5b). The stroke volume (Fig 2a) and cardiac output (Fig 5a) were also lower even though the fractional shortening stayed unchanged at 55% (data not shown). Finally, a dysregulation of the mitral valve blood flow was obvious in the *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice (Fig 2a) which could be due to: (1) altered diastolic function, (2) shorter left ventricle (LV) filling time, (3) smaller valve annulus or valve stenosis or finally, (4) pulmonary hypertension caused by the ASD. Tau measured with Millar catheter and LV filling times were identical in all three groups (data not shown). The size and condition of the mitral valve was calculated and analyzed with macroscopic dissection and showed no significant change between groups (data not shown). On the other hand, pressure gradient and peak velocity observed at the pulmonary valve suggested pulmonary hypertension (Fig 5b). In addition, comparison of pulmonary valve output and cardiac output measured at the aortic valve level clearly showed that part of the blood entering the left atria is redirected into the right side of the heart, causing its premature recirculation into the lungs. This volume overload is responsible for pulmonary hypertension and certainly plays an important role in right atrium and ventricle hypertrophy as suggested by direct weighing of the cardiac chambers (Fig 3b). The existence of pulmonary hypertension is also supported by the observed pulmonary oedema in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice (Fig 3b).

Finally, the impact of the cardiac defect on exercise tolerance was assessed using tread mill evaluation. The results reveal an exquisite *eTbx5* dose-dependance for exercise tolerance. A survival curve (Fig 6a) shows that none of the *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice were able to complete the exercise protocol whereas 100% of control littermates succeeded. Mice with one *eTbx5* allele had an intermediate profile. It is also important to mention that even if 100% of the *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice made it through the 15 m/min step, their performance were significantly lower than control littermates since they were touching the electrical bars 5 times more often (Fig 6b).

### **eNOS is a genetic modifier of *Tbx5***

As stated earlier, mutations in GATA-4 that inhibit *Tbx5* interaction have been linked to ASD in human <sup>16</sup>. We tested whether reduction of this interaction specifically in the endocardium is linked to ASDs. For this, we crossed *eTbx5*<sup>+/-</sup> mice with GATA-4<sup>+/-</sup> mice. Double heterozygous mice were born at the expected frequency. Anatomical examination revealed the presence of an ASD in these mice (n=4) (Fig 7a). No ASD or PFO was observed in GATA-4<sup>+/-</sup> mice, unlike *eTbx5*<sup>+/-</sup> in which a PFO was evident. Those results support the importance of a GATA-4/*Tbx5* interaction in endocardial cells essential for proper heart morphogenesis. Next, we tested whether *eNOS* may be a target or a mediator of *Tbx5* in endocardial cells and whether it may account for endocardial defects caused by lack of *eTbx5*. *eNOS* was considered a potential candidate because mice with null deletion of *eNOS* display ASDs with very high incidence <sup>17</sup>. *eNOS*<sup>+/-</sup>/*eTbx5*<sup>+/-</sup> mice were generated. Mice with this genotype were born at the expected frequency and all of them showed a clear ASD (Fig 7b). Interestingly, both secundum and primum type ASD were observed in these mice (Table 2). While *eTbx5*<sup>+/-</sup> mice had a PFO, littermates lacking a single *eNOS* allele presented an intact atrial septum. These results suggest genetic epistasis between *eNOS* and *Tbx5* and raise the possibility that *eNOS* is a downstream *Tbx5* target.

This hypothesis was confirmed by the finding that endogenous *eNOS* was significantly upregulated in endocardial progenitor cell <sup>18</sup> transiently transfected with *Tbx5* (Fig 7c).

### **ASD is caused by excessive apoptosis of the septum primum**

Apoptag assay performed on E14.5 embryos demonstrated excessive apoptosis of the septum primum in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice (Fig 8a). *Nkx2-5* immunostaining performed on sister slide shows that the apoptotic cells are endocardial, suggesting that *Tbx5* may be involved in endocardial cell survival (Fig 8b). It is now well established that *Tbx5* cooperates with GATA-4 in gene regulation <sup>3</sup> and that GATA-4 is an upstream activator of Bcl-xL <sup>13</sup>. We therefore tested whether Bcl-xL may be a

downstream target mediator of *Tbx5* action on cell survival. Transient transfections with GATA-4 and *Tbx5* on the Bcl-xL promoter indicated that *Tbx5* activates Bcl-xL promoter and enhances GATA-4 transcriptional activation (Fig 8c). Also, overexpression of *Tbx5* in TC13 cells induced Bcl-xL overexpression (Fig 8d).

Together, the results suggest that the interaction of *Tbx5* and GATA-4 in endocardial cells are essential for cell survival and proper differentiation. Moreover, the data identify eNOS and Bcl-xL as downstream targets of *Tbx5* in the endocardium.

## **Discussion**

HOS has a large spectrum of malformations that ranges from benign arrhythmias to complex and severe anatomic malformations such as Tetralogy of Fallot. Mice with a heterozygote mutation of *Tbx5* recapitulate the heterogeneity of cardiac malformations associated with HOS and its variable expressivity<sup>9</sup>. In contrast, when *Tbx5* is deleted specifically from the endocardium, 100% of the *eTbx5<sup>+/-</sup>* and *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice present an ASD. These results indicate an important function for endocardial *Tbx5* for proper heart morphogenesis. They also suggest that different structural defects observed in HOS reflect the role of *Tbx5* in multiple cell types.

### **Role of *Tbx5* in endocardial cells**

The septum primum is a structure migrating from the rostral part of the common atrium to the atrio ventricular cushion (AVC). Its role, in combination with the septum secundum, is to allow a right to left shunt during embryogenesis and to fuse with the septum secundum after birth in order to close this shunt. The migration of the septum primum takes place around E11 and ends with its fusion with the AVC around E12. Simultaneously, its rostral part undergoes partial apoptosis in order to form the ostium secundum, a hole that will let the blood flow from the right to the left atrium. The apoptosis of the septum primum is detected from E12.5 to E13.5. The ASD observed in *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice is a *secundum* type ASD. This type of ASD consists of a communication between the two atria as opposed to

the primum type ASD which implies also a communication with the ventricles. The partial absence of septum *primum* structure yield to its impossibility to fuse and block the foramen oval. The lack of septum *primum* structure in front of the foramen oval can be caused by two mechanisms; (1) insufficient migration or (2) excessive apoptosis of the septum primum. Terminal transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assays carried out on E14.5 embryos reveal that migration defects are unlikely to be the cause of the ASD since the septum *primum* has fused with the AVC (data not shown). Apoptosis on the other hand is increased by four times in the septum *primum* of *eTbx5*<sup>+/-</sup> than in control littermates and may account for ASDs found in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice. Interestingly, in human with *secundum* type ASD, apoptosis has been suggested as the underlying cause of the malformation<sup>19,20</sup>.

#### ***Tbx5* mutations affecting its role in endocardial cells.**

In human, HOS expressivity varies between each patient. Attempts at associating certain mutations with specific phenotypes have been unsuccessful so far<sup>21</sup>. The fact that a mutation can cause different phenotypes in different patients raises the possibility of modifier genes. One of them could be *eNOS*. Indeed, *eNOS* is involved in endocardial cells differentiation, proliferation, survival and differentiation<sup>11,22</sup>. Its expression is also modulated by *Tbx5* expression (Fig 7c). The possibility that *eNOS* maybe a *Tbx5* modifier gene is supported by the observed phenotype of the double heterozygote *eTbx5*<sup>+/-</sup>/*eNOS*<sup>+/-</sup> that points to genetic epistasis between these two genes. The results obtained from this study strongly propose that alteration of endocardial *Tbx5* and *eNOS* function could lead to severe cardiac malformations such as *primum* and *secundum* type ASD. Interestingly, even if no *primum* type ASD were found in *eTbx5*<sup>-/-</sup> mice, this malformation was observed in double mutant mice (Table 2). Since *eNOS*<sup>-/-</sup> mice sometimes present this phenotype<sup>11</sup>, the fact that it is found in the double heterozygote mice suggests that, in addition to its role in septum formation, *eTbx5* is also implicated in cardiac endocardial cushion development.

Results obtained from *eTbx5*<sup>+/-</sup>/*GATA-4*<sup>+/-</sup> mice suggest that *GATA-4* mutations affecting its function in endocardial cells could also modify *Tbx5* activity. Indeed, single heterozygoty did not lead to ASD whereas loss of function of both

genes clearly demonstrated epistasis (Fig 7a). This is not surprising since *in vitro* and *in vivo* experiments support functional cooperation between GATA-4 and *Tbx5*<sup>3,8</sup>.

Finally, it is possible to speculate that specific mutations of *Tbx5* may preferentially affect its function in the endocardium and the development of the endocardial derived structures. This type of mutation could, for example, disturb interaction with a *Tbx5* partner present only in endocardial cells and lead consequently to a mild subclinical phenotype such as PFO. In this regard, the *eTbx5*<sup>+/-</sup> mice provides a novel animal model to analyze the role of PFO as a risk factor for stroke<sup>23</sup> and other cardiovascular disease. Moreover, the presence of PFO raises the importance of careful cardiac evaluation with tissue Doppler or stress tests in the stratification of human subjects in genetic studies.

### **Acknowledgements**

This work was supported in part by a grant from CIHR. The authors thank Nathalie Bouchard for technical assistance and Annie Vallée for help with histology.

## Figure legends

**Figure 1. Generation of the *eTbx5* conditional knock out.** a) Schematic representation of the *Tbx5* allele recombination event happening in the vascular endothelial cells of the *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice. b) Immunohistochemistry of GATA-4 and *Tbx5* showing expression in endocardial cells (arrow head). RA: right atria, LA: left atria.

**Figure 2. Anatomical analysis of *eTbx5<sup>+/-</sup>* and *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice.** Different orientation of fixed heart macroscopic dissection showing, a) in front view, a dilatation of the *eTbx5<sup>-/-</sup>* right atrium. After partial excision of the right atrium, a right lateral view allows observation of PFO (arrow) and *secundum* type ASD (arrow head) at b) low and c) high magnification. Scale bars all represent 1 mm.

**Figure 3. MRI and cardiac chamber mass of *eTbx5* mice.** a) *post mortem* MRI showing *secundum* type ASD in *eTbx5<sup>-/-</sup>* mouse and gradient in atrial septum thickness (bottom line). Pink color indicates cardiac chambers and walls are of blue color. Arrow head are pointing at the foramen oval region in all three hearts. b) Mass of separated cardiac chambers and lung, corrected by femur length. RA = right atrium; LA = left atrium; RV = right ventricle; LV = Left ventricle; FL= femur length. \*  $P < 0,05$ . c) Trichrome staining of *eTbx5* mice heart showing no sign of fibrosis.

**Figure 4. Rhythm disturbances in aging *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice.** a) ECG of control (upper panel) and *eTbx5<sup>-/-</sup>* mice showing signs of cardiac arrhythmia (middle panel). The lower panel represents an ECG of *eTbx5<sup>-/-</sup>* mouse with a normal ECG. P indicates a P wave. The time scale is the same for all three panels. b) Table showing the different intervals studied  $\pm$  Standard error mean (SEM). No significant difference was observed.

**Figure 5. Cardiac function of *eTbx5* mice.** a) Stroke volume, mitral valve mean pressure gradient and cardiac output measured on 70 (5 mâles and 5 females per group) and 460 days old mice (5 mâles and 5 females per group). b) Echocardiography results obtained for the pulmonary valve on 460 days old mice.

PV = Pulmonary valve; CO = cardiac output; Ao = Aortic; Peak vel = Peak velocity.  
 \*  $P < 0,05$ .

**Figure 6. Exercise tolerance is reduced in  $eTbx5^{-/-}$  mice.** a) Survival curve showing the fraction of mice ( $eTbx5^{+/+}$  : n = 6,  $eTbx5^{+/-}$  : n = 5,  $eTbx5^{-/-}$  : n = 12) from each genotype that completed each step of the test. b) Electrical beam hits recorded as the mice from all three groups were running at 15 m/min. \* Represent a  $P < 0,05$  between  $eTbx5^{-/-}$  and  $eTbx5^{+/+}$ .

**Figure 7. Epistasis between  $eNOS$ ,  $GATA-4$  and  $Tbx5$ .** a) Front, side view and bigger magnification of the side view of  $eTbx5^{+/-}/GATA-4^{+/-}$  mouse heart showing a *secundum* type ASD. b) Front and side view of  $eTbx5^{+/-}/eNOS^{+/-}$  mouse heart showing large *secundum* type ASD. Scale bars all represent 1 mm. c) Enhanced  $eNOS$  transcripts in TC13 cells overexpressing  $Tbx5$  as revealed by QPCR. The expression of VEGF is unaltered by  $Tbx5$  overexpression. TC13 represents untransfected cells. pCGN represents empty vector transfected cells and HA- $Tbx5$  represents cells transfected with a  $Tbx5$  expression vector. Each column represent the mean of two duplicates  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$

**Figure 8. Excessive apoptosis of the septum primum in  $eTbx5^{-/-}$  mice.** a) Percentage of apoptotic cells observed in mutant and control mice at E14.5. b) TUNEL assay and  $Nkx2-5$  immunostaining showing the nature of the apoptotic cell c) Transient transfections in C2C12 of  $Tbx5$  and  $GATA-4$  expression vectors fold activation of the Bcl-xL promoter. D) QPCR analysis of endogenous Bcl-xL in TC13 cell transiently transfected with the  $Tbx5$  expression vector. \*  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$

## Figure legends

**Table 1. *eTbx5* mutant pups are present in a Mendelian ratio.** Pups (n=112) from ten litters were genotyped and percentage of each genotype is presented in the table. Litters were of normal size, averaging at 11 pups.

**Table 2. *eTbx5*<sup>+/-</sup>/*eNOS*<sup>+/-</sup> mice have either a *primum* or a *secundum* type ASD** Phenotype observed at macroscopic dissection of double mutant mice hearts.

## Reference List

1. Hoffman, J. I. & Kaplan, S. The incidence of congenital heart disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* **39**, 1890-1900 (2002).
2. Schott, J. J. *et al.* Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* **281**, 108-111 (1998).
3. Garg, V. *et al.* GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* **424**, 443-447 (2003).
4. Ware, S. M. *et al.* Identification and functional analysis of ZIC3 mutations in heterotaxy and related congenital heart defects. *Am.J.Hum.Genet.* **74**, 93-105 (2004).
5. Basson, C. T. *et al.* Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat.Genet.* **15**, 30-35 (1997).
6. Mori, A. D. & Bruneau, B. G. TBX5 mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed. *Curr.Opin.Cardiol.* **19**, 211-215 (2004).
7. Pizard, A. *et al.* Connexin 40, a target of transcription factor Tbx5, patterns wrist, digits, and sternum. *Mol.Cell Biol.* **25**, 5073-5083 (2005).
8. Linhares, V. L. *et al.* Transcriptional regulation of the murine Connexin40 promoter by cardiac factors Nkx2-5, GATA4 and Tbx5. *Cardiovasc.Res.* **64**, 402-411 (2004).
9. Bruneau, B. G. *et al.* A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* **106**, 709-721 (2001).
10. Schlaeger, T. M. *et al.* Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 3058-3063 (1997).
11. Biben, C. *et al.* Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5. *Circ.Res.* **87**, 888-895 (2000).
12. Patel, V. V. *et al.* Electrophysiologic characterization and postnatal development of ventricular pre-excitation in a mouse model of cardiac hypertrophy and Wolff-Parkinson-White syndrome. *J.Am.Coll.Cardiol.* **42**, 942-951 (2003).

13. Aries, A., Paradis, P., Lefebvre, C., Schwartz, R. J., & Nemer, M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 6975-6980 (2004).
14. Lavalley, G. *et al.* The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *EMBO J.* **25**, 5201-5213 (2006).
15. McBride, K., Charron, F., Lefebvre, C., & Nemer, M. Interaction with GATA transcription factors provides a mechanism for cell-specific effects of c-Fos. *Oncogene* **22**, 8403-8412 (2003).
16. Hirayama-Yamada, K. *et al.* Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *Am.J.Med.Genet.A* **135**, 47-52 (2005).
17. Feng, Q. *et al.* Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**, 873-879 (2002).
18. Nemer, G. & Nemer, M. Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development* **129**, 4045-4055 (2002).
19. Gong, J. *et al.* Cardiomyocyte apoptosis in the right auricle of patients with ostium secundum atrial septal defect diseases. *Life Sci.* **80**, 1143-1151 (2007).
20. Castellanos, L. M., Nivon, M. K., Zavaleta, N. E., & Sanchez, H. C. [Atrial septal defect. A morphopathological and embryological study]. *Arch.Cardiol.Mex.* **76**, 355-365 (2006).
21. Brassington, A. M. *et al.* Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype. *Am.J.Hum.Genet.* **73**, 74-85 (2003).
22. Razavi, H. M., Hamilton, J. A., & Feng, Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol.Ther.* **106**, 147-162 (2005).
23. Casaubon, L. *et al.* Recurrent stroke/TIA in cryptogenic stroke patients with patent foramen ovale. *Can.J.Neurol.Sci.* **34**, 74-80 (2007).

Table 1

<b>Genotype</b>	<b><i>eTbx5</i><sup>+/+</sup></b>	<b><i>eTbx5</i><sup>+/-</sup></b>	<b><i>eTbx5</i><sup>-/-</sup></b>
Expected ratio	25%	50%	25%
Newborn ratio	26%	51%	23%

Table 2

<b>Mouse #</b>	<b>eTBX5</b>	<b>eNOS</b>	<b>Phenotype</b>
6792	+/-	+/-	<i>Primum</i> and <i>secundum</i> type ASD
6634	+/-	+/-	<i>Secundum</i> type ASD
6798	+/-	+/-	Enlarged foramen oval and presence of a huge patent foramen oval
7917	+/-	+/-	<i>Primum</i> and <i>secundum</i> type ASD
7740	+/-	+/-	<i>Secundum</i> type ASD
7460	+/-	+/-	Enlarged foramen oval
7241	+/-	+/-	<i>Primum</i> and <i>secundum</i> type ASD
6796	+/-	+/+	<i>PFO</i>
7906	+/+	+/-	No ASD or PFO observed

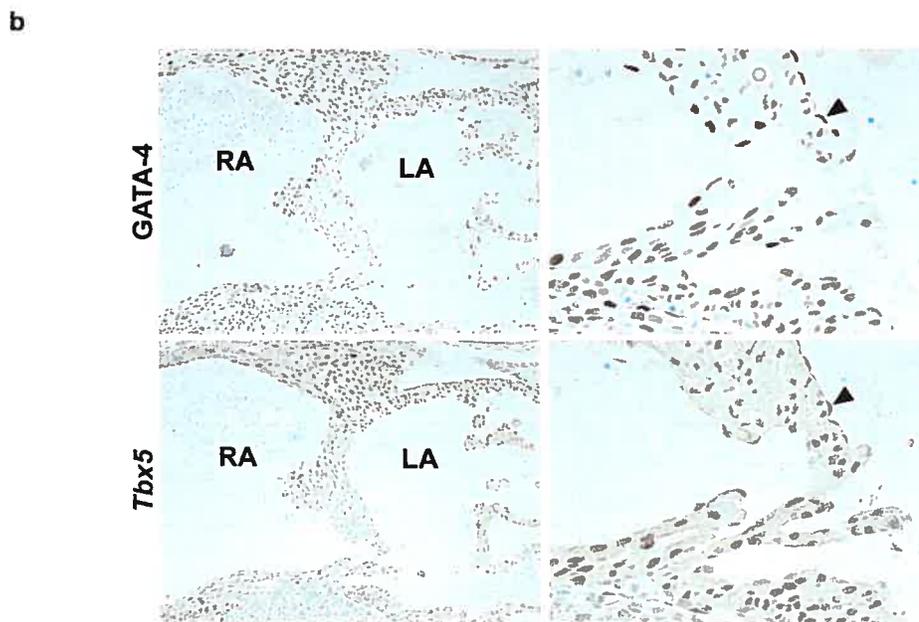
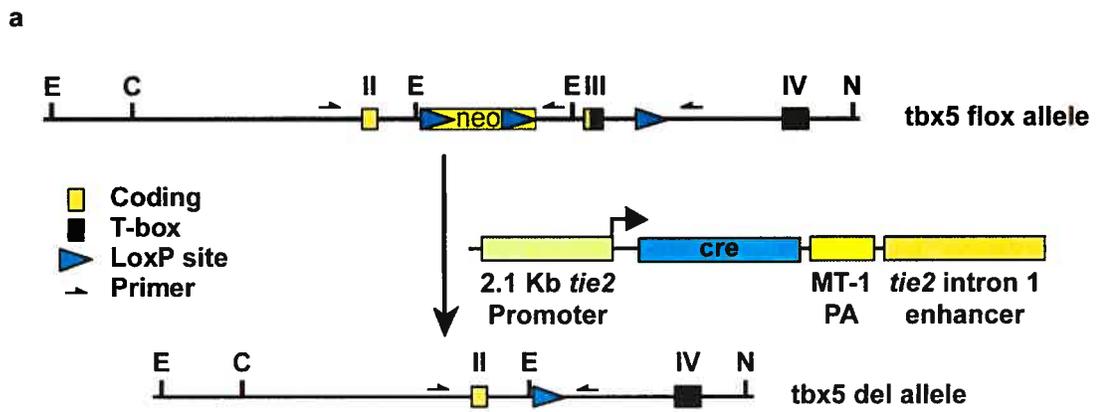


Figure 1

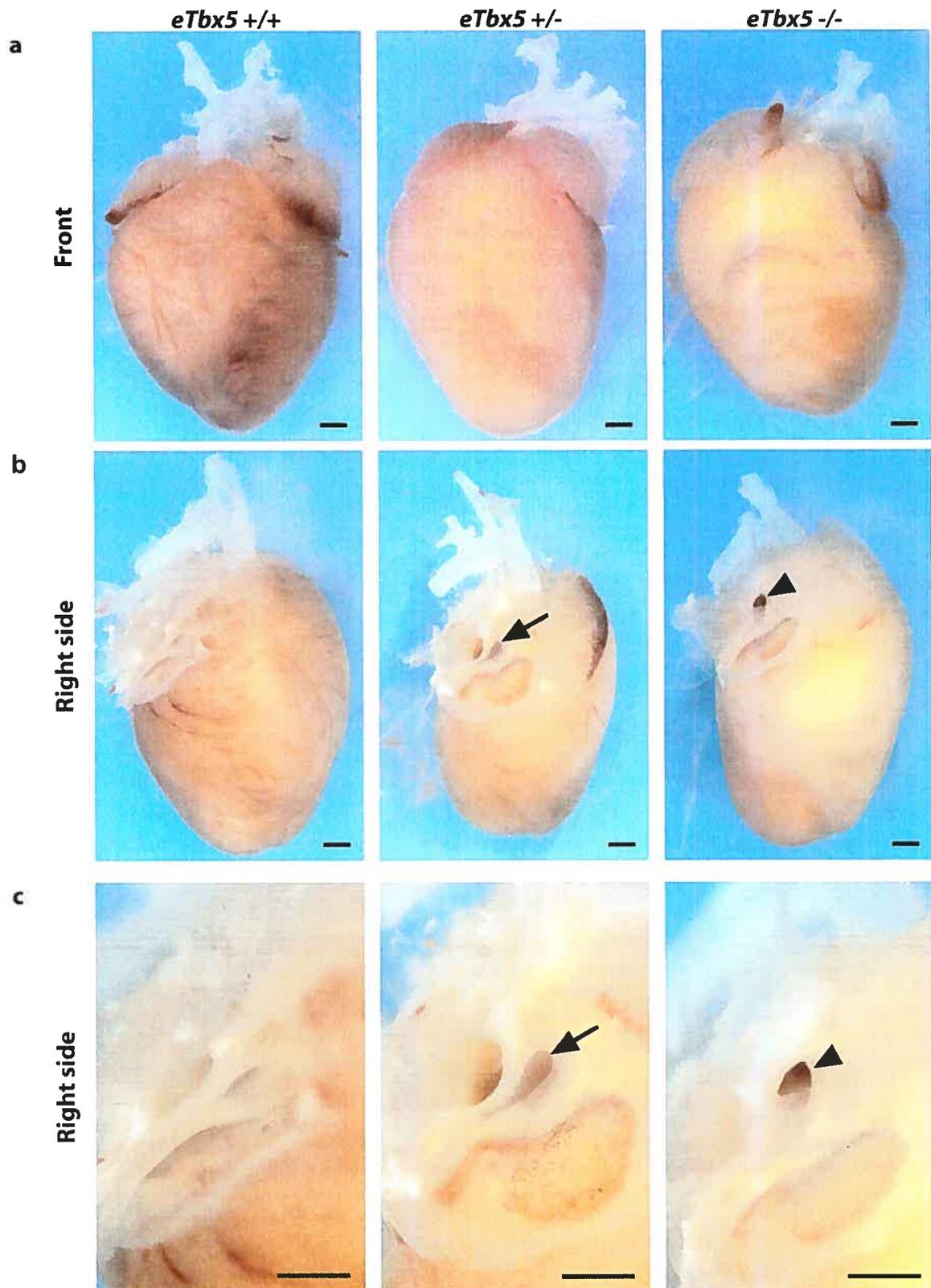


Figure 2

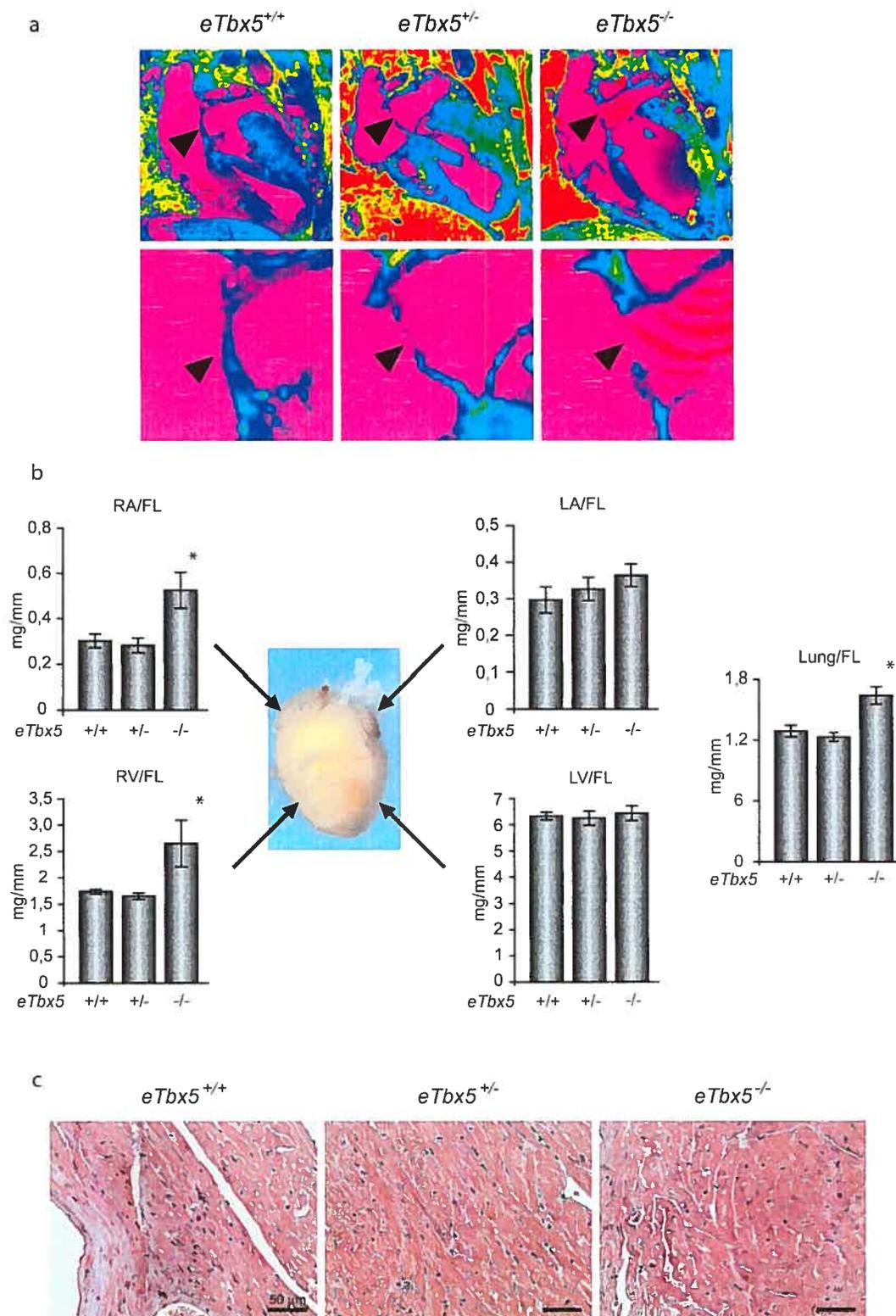
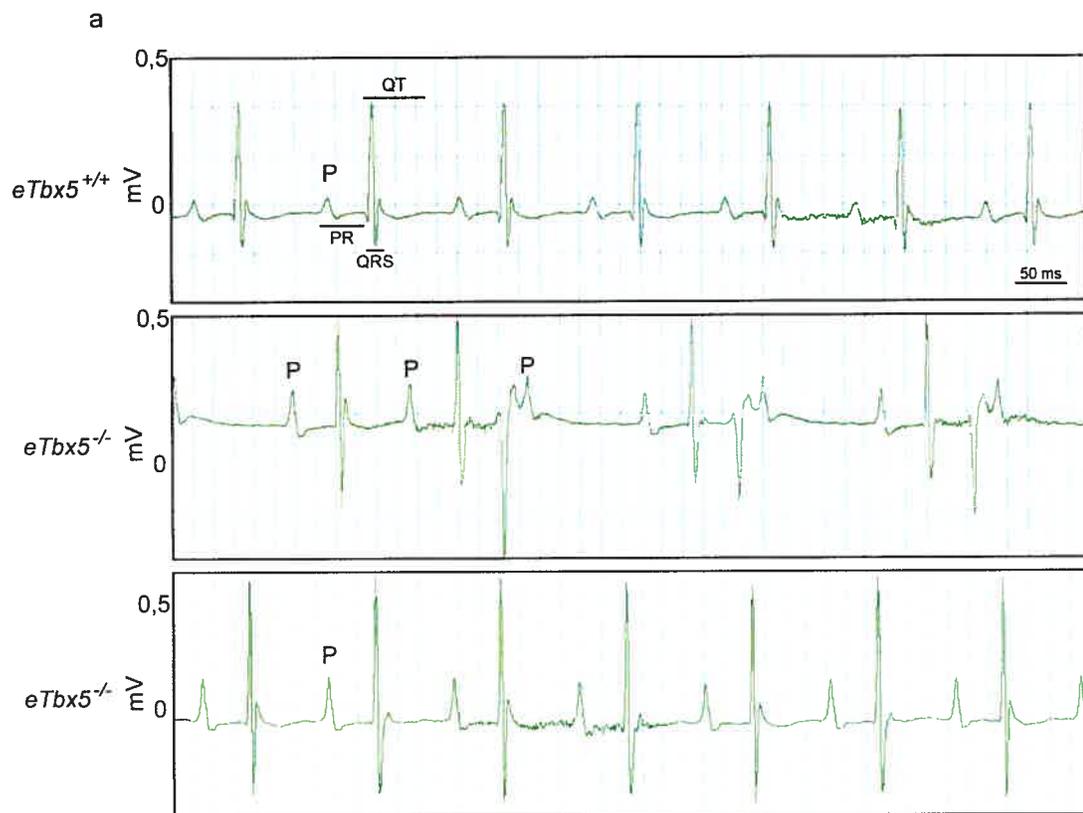


Figure 3



b

Genotype	n	PR	QRS	QT	QTcf3	RR
<i>eTbx5</i> <sup>+/+</sup>	5	40.50 ± 0,744	13.32 ± 0,487	49.25 ± 2,121	43.19 ± 1,405	130.1 ± 5,496
<i>eTbx5</i> <sup>-/-</sup>	5	41.12 ± 2,551	13.66 ± 0,557	41.89 ± 0,694	37.93 ± 1,302	119.6 ± 8,425
<i>eTbx5</i> <sup>+/-</sup>	5	42.15 ± 1,717	15.3 ± 1,325	46.44 ± 2,934	42.02 ± 1,922	124.1 ± 4,057

Figure 4

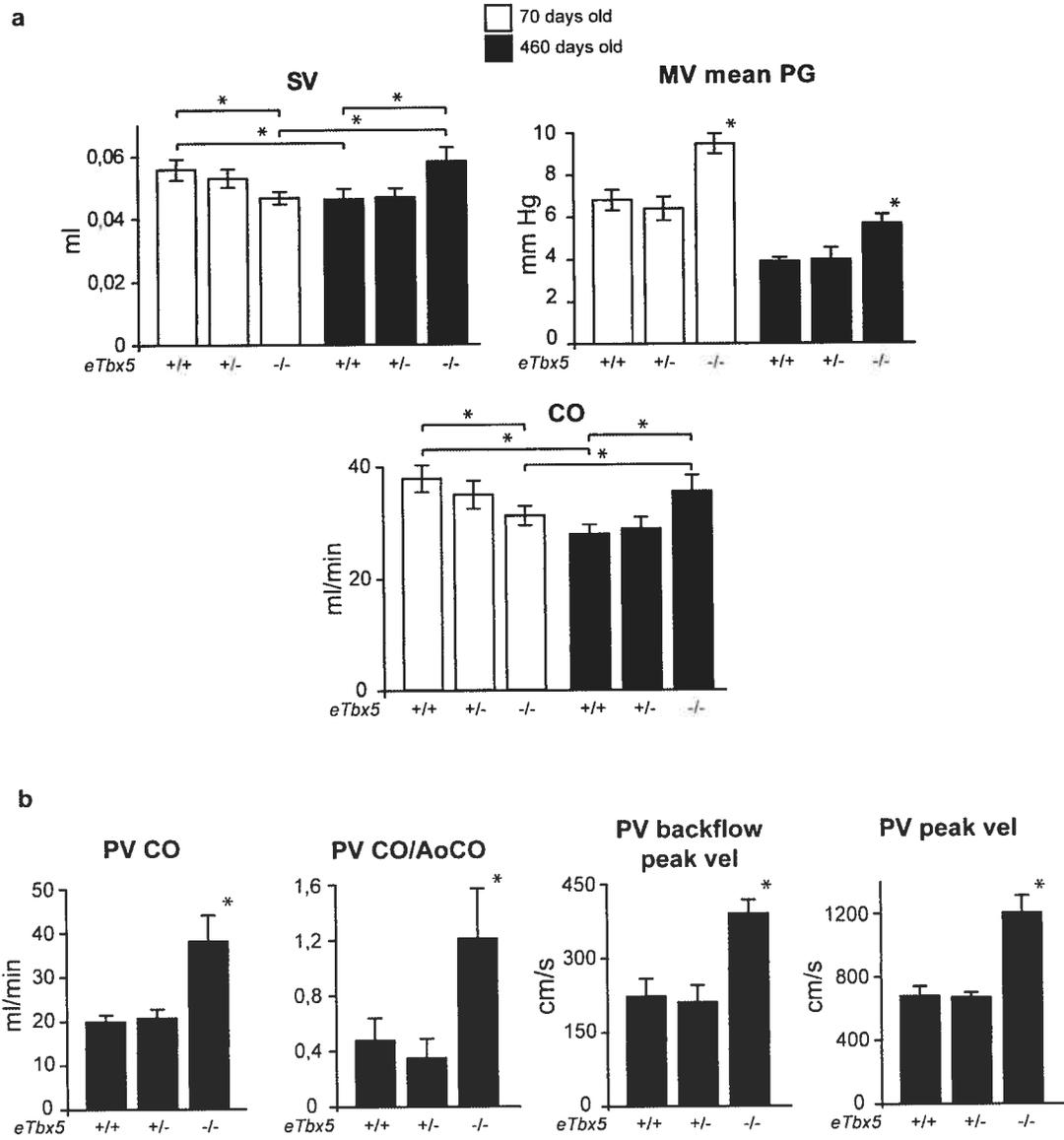


Figure 5

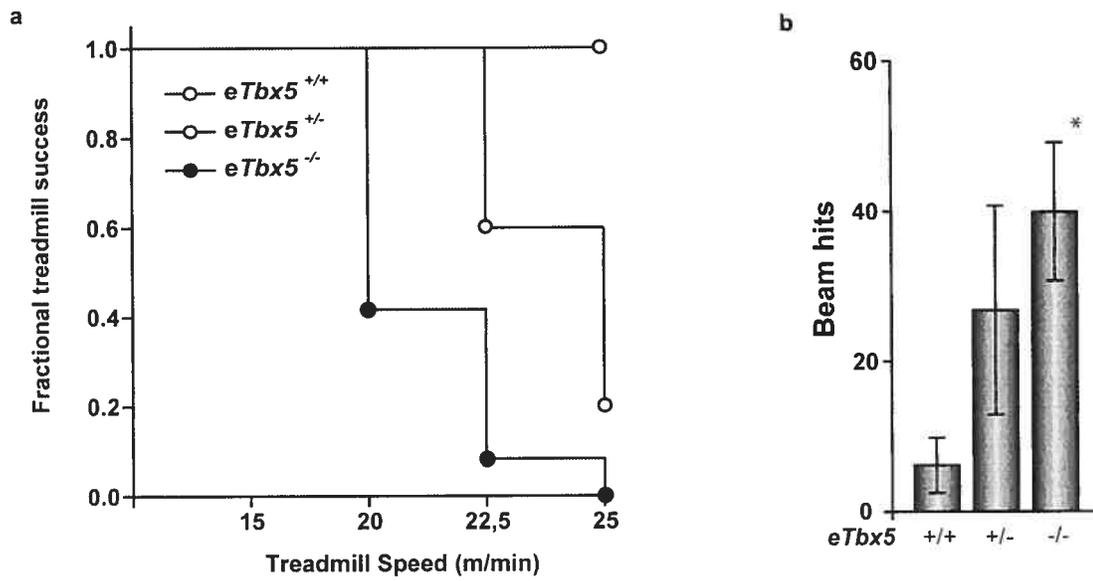


Figure 6

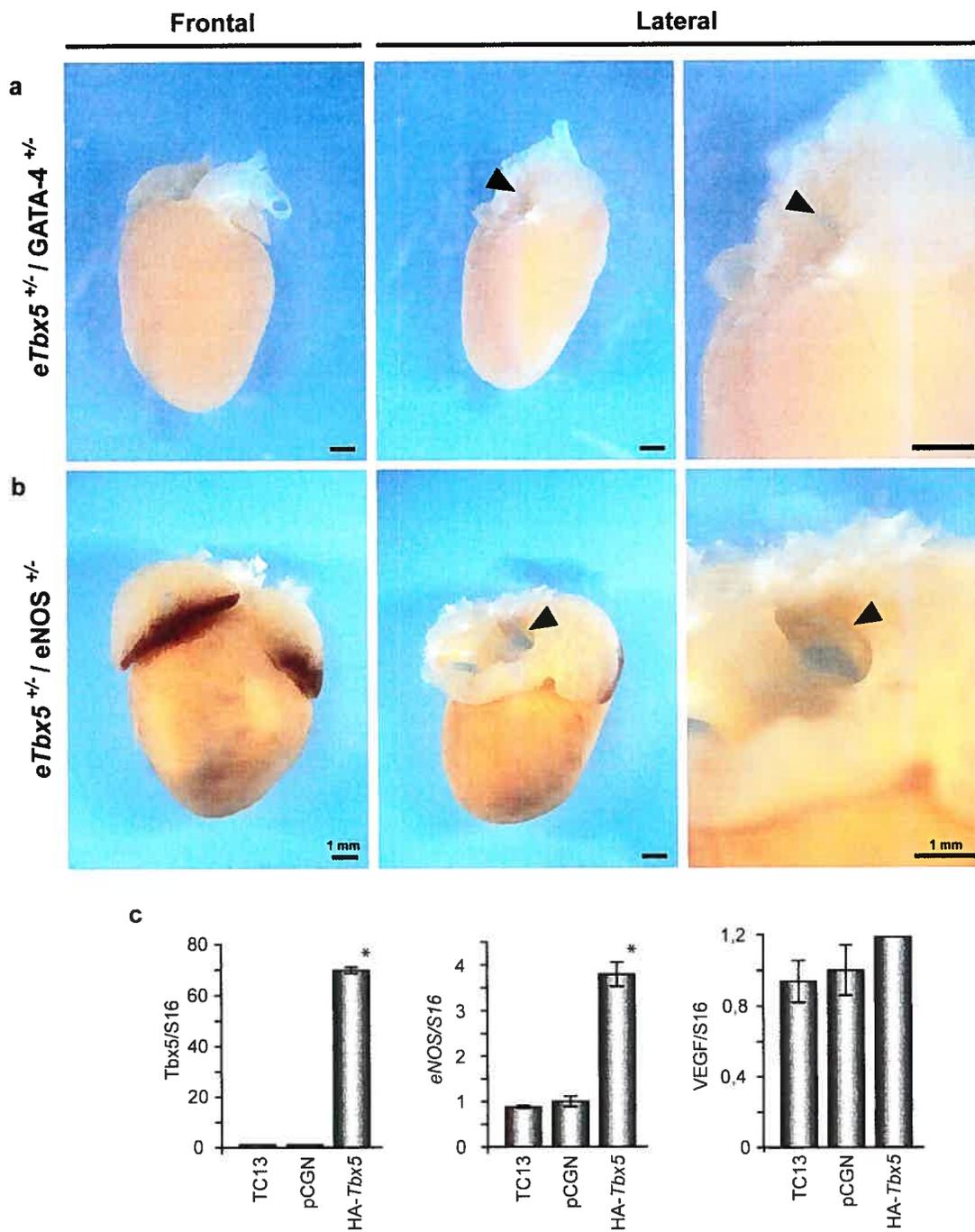


Figure 7

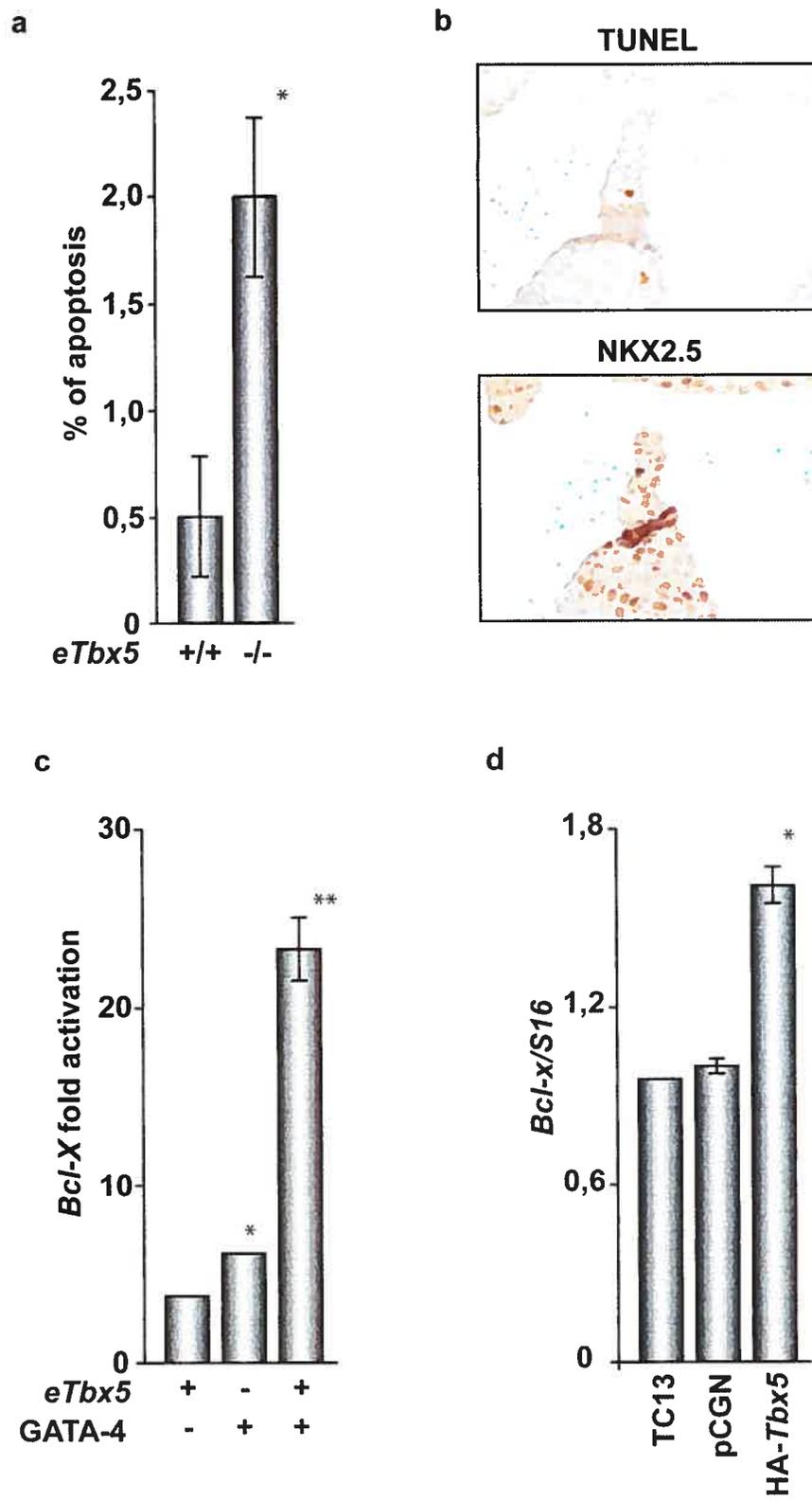


Figure 8

### **Chapitre 3 : Discussion**

Les recherches menées dans le cadre de ce projet de maîtrise ont démontré l'importance de la fonction de *Tbx5* dans le développement de l'endocarde. En effet, bien que d'autres modèles animaux aient montré son rôle dans le développement cardiaque, c'est dans cette étude que pour la première fois, sa fonction dans un type cellulaire particulier fut étudiée *in vivo*. Ainsi, les résultats démontrent que l'absence de *Tbx5* endocardique est associée à la formation d'une communication inter-auriculaire (CIA). Le mécanisme menant à cette malformation implique, entre autre, l'apoptose excessive du *septum primum* possiblement causée par une diminution des niveaux d'expression d'*eNOS* et de *Bcl-xL*<sup>244,245</sup>. De plus, les résultats soutiennent aussi l'hypothèse selon laquelle une perte de fonction partielle d'*eTbx5* représente un facteur de risque de CIA. Cette dernière étant supportée par l'apparition de ce type de malformation lorsque la souris *eTbx5<sup>+/-</sup>* est croisée avec une autre souris, présentant aussi un facteur de risque de communication inter-auriculaire. Il est aussi important de souligner le fait que le nouveau modèle murin reproduit une malformation associée à des risques élevée d'accident vasculaire cérébral ischémique retrouvée dans 20 à 30% de la population. Ce modèle pourra donc être utilisé pour la recherche, autant pharmacologique qu'épidémiologique. Finalement la souris *eTbx5<sup>+/-</sup>* représente un nouveau modèle de CIA montrant un spectre réduit de malformations et une pénétrance de 100%. Ces caractéristiques en font donc un modèle de choix pour l'étude du développement de cette malformation congénitale fréquente.

#### **A) Modèle expérimental de foramen oval persistant (FOP).**

##### *1) Importance biologique du Foramen oval*

Lors du développement cardiaque normal, le foramen oval revêt une importance cruciale. Chez l'embryon, il permet le passage de sang oxygéné de l'oreillette droite à l'oreillette gauche. En effet, à cette étape, le sang oxygéné provient du réseau capillaire placentaire et arrive au cœur par la veine cave<sup>246</sup>. Le passage du sang à travers le foramen oval fait donc partie du développement normal du cœur. Cette particularité de la circulation fœtale favorise une meilleure oxygénation distale. Après la naissance, la pression dans l'oreillette gauche augmente et pousse le *septum primum* contre le *septum secundum*, fermant ainsi le passage entre les deux oreillettes au bout de quelques mois. Chez la majorité des personnes, le *septum primum* fusionne avec le

*septum secundum*, scellant ainsi le passage à tout jamais. Par contre, chez 25% à 30% des gens, cette fusion ne se produit pas. Bien que très fréquente, cette malformation n'a qu'une importance hémodynamique bénigne. Par contre, il existe une forte association entre la présence de FOP et l'incidence élevée d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques, de migraines à aura et de malaises de décompression chez les plongeurs<sup>31</sup>. Le mécanisme associant le FOP aux migraines à aura reste inconnu mais celui le reliant aux AVC ischémiques est identifié. Les poumons, en plus d'avoir comme fonction celle d'oxygéner le sang, possèdent aussi celle de le filtrer et de le rendre exempt de caillots sanguins avant son retour dans la circulation. Chez les patients souffrant de FOP, les caillots de sang peuvent passer par le foramen oval, puis par le ventricule gauche, avant d'aller se loger au cerveau et causer un AVC ischémique. Ce passage du caillot directement de l'oreillette droite à l'oreillette gauche est appelé embolie paradoxale. Il est considéré comme le facteur de risque le plus probable, quoi qu'en soit encore controversé, impliqué dans l'incidence élevée d'AVC à répétition<sup>247</sup>. D'autres sources d'embolies, comme la formation de thrombus *in situ* et la vulnérabilité auriculaire sont aussi considérées comme des facteurs de risques possiblement impliqués dans ce phénomène. Par ailleurs, il est intéressant de noter que chez les jeunes femmes dans la vingtaine souffrant d'un AVC, la présence de FOP est la première cause suspectée. Ceci est aussi vrai si la patiente présente en plus d'autres facteurs de risques comme le tabagisme et la prise de contraceptifs oraux.

## 2) FOP et CIA secundum : un seul et même continuum de malformations

La taille du FOP varie largement entre les patients. Elle varie de la taille d'une tête d'aiguille à celle d'un corridor important. Dans les cas les plus sévères, le FOP est aussi fréquemment associé à d'autres aberrations physiologiques telles qu'un anévrisme du *septum primum* ou la persistance de certaines caractéristiques embryonnaires de l'oreillette droite<sup>248</sup>. Évidemment, dans ces cas, il se rapproche beaucoup d'une communication inter-auriculaire. Ces caractéristiques suggèrent donc que le FOP et la CIA *secundum* font partie du même *continuum* de malformations du *septum* auriculaire. Bien qu'intéressante, cette hypothèse n'avait encore jamais été démontrée et restait donc controversée. La présente étude démontre, pour la première fois, la relation directe entre ces deux malformations et, qui plus est, son association à un dosage génique. En effet, la sévérité de la malformation chez les souris *eTbx5* est inversement proportionnelle à la présence de *Tbx5* dans l'endocarde. Ainsi, il est maintenant

possible d'affirmer que le FOP et la CIA *secundum* font partie du même *continuum* de malformations et que ce dernier peut être modulé, entre autres, par la voie de signalisation de *Tbx5* dans l'endocarde.

### 3) Options de traitement des patients souffrant de FOP

Pour les patients souffrant de FOP, essentiellement deux types de traitements existent. Le premier consiste en l'administration chronique d'anti-coagulant (aspirine ou warfarine), et le second, dans les cas les plus sévères, implique la fermeture du FOP chirurgicalement<sup>249</sup>. Cette seconde option est plus complexe et n'est que rarement effectuée. Le traitement pharmacologique chronique reste donc le plus fréquent. Il est cependant important de mentionner qu'il n'est pas sans risque. En effet, il augmente de façon significative les risques d'hémorragies et réduit moins les récurrences d'AVC à répétition que la fermeture chirurgicale du FOP<sup>247</sup>. Par ailleurs, la fermeture chirurgicale du FOP est aussi associée à des risques à long terme. Ces derniers peuvent être bénins, comme une infection ou une péricardite, mais peuvent aussi impliquer un détachement de la prothèse ou une diminution de la capacité contractile cardiaque<sup>247</sup>. Étant donné les risques inhérents à l'utilisation de ces deux traitements et le manque d'étude démontrant, à l'aide d'échantillons comparables, laquelle des méthodes est la plus appropriée, il est pour l'instant difficile de déterminer laquelle des techniques devrait être utilisée. L'utilisation des souris *eTbx5<sup>+/-</sup>* pourrait possiblement répondre à cette question. Évidemment, les techniques de fermeture chirurgicale doivent d'abord être adaptées au modèle murin.

### 4) Utilité du modèle de FOP

#### a) Développement pharmacologique

Puisque présentement, le traitement pharmacologique est le plus fréquemment utilisé, un modèle animal utile à la découverte et le développement de nouveaux composés pharmacologiques prend donc toute son importance. En effet, puisque le principal désavantage du traitement pharmacologique est qu'il ne réduit pas suffisamment les récurrences d'AVC ischémiques, le modèle pourrait être utilisé, entre autre, afin de tester différentes combinaisons de médicaments dans le but de trouver celle réduisant le plus ces récurrences.

b) Étude des relations causales entre le FOP et les AVC, les migraines et autres malaises associés

L'association du FOP aux AVC ischémiques, aux migraines à aura et au malaise de décompression du plongeur n'est pour l'instant faite que sur une base épidémiologique. La relation causale le reliant à ces divers problèmes n'est toujours pas découverte. Tel que mentionné précédemment, plusieurs mécanismes causaux reliant le FOP aux AVC ischémiques sont présentement proposées. Cependant, tous ces mécanismes sont hypothétiques et n'ont jamais été démontrés *in vivo*. De plus, bien que chacun d'entre eux possède la capacité potentiel de causer l'AVC ischémique, il n'est pas exclus qu'une combinaison de causes soit impliquées. Pour répondre à ces questions, l'utilisation d'un modèle animal de FOP est nécessaire. Par la même occasion, l'étude d'autres mécanismes reliant le FOP aux migraines à aura et au malaise de décompression du plongeur pourront être étudiés.

c) Étude de l'impact de la combinaison de plusieurs facteurs de risques d'AVC

Plusieurs facteurs de risques d'AVC sont déjà connus. Le tabagisme, l'hypertension et la prise de contraceptifs oraux en sont de bons exemples. Seuls, ils augmentent plus ou moins les probabilités de souffrir un jour d'un AVC ischémique. Cependant, il est rare qu'un patient ne possède qu'un seul facteur de risque. L'effet de cette combinaison de facteurs de risque sur les probabilités d'avoir un AVC n'a cependant jamais été évalué. Afin de mieux traiter les patients souffrant de FOP, il est nécessaire de déterminer les facteurs de risques qui, associés au FOP, augmentent encore davantage le risque d'AVC. Puisqu'il est simple d'induire l'hypertension chez les souris, il sera intéressant d'étudier l'incidence d'AVC ischémiques chez les souris *eTbx5<sup>+/-</sup>* ayant ces deux facteurs de risques. Évidemment, l'interaction du FOP avec d'autres facteurs de risques pourra aussi être étudiée.

d) Analyse des interactions des cascades transcriptionnelles impliquées dans le développement du *septum* auriculaire

Chez l'humain, plusieurs gènes sont associées aux CIA de type *secundum*. Parmi ceux-ci se trouvent *Nkx2-5*<sup>250-255</sup>, *GATA-4*<sup>256</sup>,  $\alpha$ -MYH (MYH6)<sup>257</sup> et *Tbx5*<sup>153,258-261</sup>. En effet, l'étude de plusieurs familles montrant une incidence élevée de malformations congénitales cardiaques a permis de découvrir des mutations dans la région codante des gènes ci-haut mentionnés. Dans tous les cas, la transmission était autosomale-

dominante. Évidemment, plusieurs autres malformations, en plus de la CIA, étaient observables. Par exemple, les patients démontrant une haploinsuffisance de *Nkx2-5*, peuvent aussi présenter une CIV, une tétralogie de Fallot, une sténose aortique sous-valvulaire, une hypertrophie ventriculaire, une atrésie pulmonaire et/ou une redondance d'un feuillet de la valve mitrale avec fenestration<sup>250,252,253,255,262</sup>. L'haploinsuffisance de *Tbx5*, quant à elle, est responsable d'un large spectre de malformations, regroupées sous le nom de syndrome Holt Oram, tel que présenté précédemment. Dans le cas des facteurs de transcription, les mutations retrouvées se situent majoritairement au niveau du domaine de liaison à l'ADN. Des mutations causant une perte de fonction sont aussi retrouvées ailleurs. De telles mutations peuvent affecter l'interaction avec des cofacteurs ou tout simplement nuire au repliement adéquat de la protéine. Dans tout les cas, elles induisent une perte de fonction. Concernant l' $\alpha$ -MYH, il est intéressant de noter que *Tbx5* contrôle, en partie, son expression. Ceci suggère donc que la présence de CIA de type *secundum* chez les patients souffrant du SHO passe, entre autre, par la réduction des niveaux d'expression de l'  $\alpha$ -MYH<sup>257</sup>.

Récemment, l'équipe du Dr Harvey a entrepris de découvrir, à l'aide d'une étude de trait quantitatif de loci (QTL) chez la souris, d'autres loci associés à la formation de CIA<sup>30</sup>. Différents traits quantifiables, tels que la longueur du *septum primum*, la largeur du foramen oval, du corridor entre les deux oreillettes sont corrélés à une prévalence élevée de FOP<sup>63</sup>. Ces derniers ont donc été utilisés comme traits quantitatifs lors de cette étude. Afin de mettre en valeur les loci impliqués dans l'apparition de FOP, deux souches de souris ayant une incidence de FOP de 0% et 75% ont été utilisés. Les résultats identifient plusieurs QTL significativement associés à la présence de FOP. Le fait que les QTL fortement associés à la présence de FOP sont faiblement corrélés entre eux et qu'en aucun cas ne se chevauchent, suggère que plusieurs processus physiologiques, sous le contrôle de différentes cascades génétiques, contribuent à la formation du *septum* auriculaire. Ainsi, il sera intéressant de déterminer dans laquelle ou lesquelles de ces processus *Tbx5* est impliqué.

Le fait qu'aucun des quatre gènes humains associés à une CIA ne soit présent dans les QTL associés au FOP est une autre observation importante de cette étude. Une origine multigénique du FOP peut expliquer que ces gènes n'aient pas été décelés lors de cette étude. Cette hypothèse est aussi supportée par le fait que plusieurs autres

cardiomyopathies ont une origine multigénique. Il sera donc essentiel d'établir la relation entre les différents loci et d'observer s'il existe certaines convergences entre les différentes cascades impliquées.

e) Analyse des interactions des cascades transcriptionnelles impliquées dans le développement endocardique

Dans le modèle présenté dans cette étude, la perte de fonction de *Tbx5* se restreint aux cellules endocardiques. Il est donc possible d'affirmer que la présence de la CIA est causée, en premier lieu, par un dysfonctionnement de ce type cellulaire. Puisque les interactions entre les différents gènes impliqués dans le développement endocardique et dans celui du *septum* auriculaire sont largement inconnues, l'utilisation de ce modèle est tout indiquée. Un moyen efficace de vérifier s'il y a ou non interaction entre deux cascades moléculaires ou génétiques est d'observer si la double perte de fonction démontre une épistasie. Pour y arriver, un simple croisement produisant une souris hétérozygote pour les deux gènes est nécessaire. Puisque la présente étude s'intéresse plus précisément aux interactions entre *Tbx5* et d'autres cascades impliquées dans le développement endocardique, certains modèles présentant une CIA ont été utilisés. Le premier est la souris mutante *eNOS*<sup>244</sup>. La souris *eNOS*<sup>-/-</sup> présente une CIA de type *secundum* causé par une apoptose excessive au niveau du *septum* auriculaire. Cette dernière est corrélée à une augmentation de l'activité Caspase-3 autant au niveau du *septum* auriculaire que ventriculaire. Il faut aussi noter qu'une plus faible proportion des souris *eNOS*<sup>-/-</sup> présente aussi une CIV et une CIA de type *primum*.

Un autre gène d'intérêt pour le développement endocardique est *VEGF*. L'utilisation de différentes stratégies menant à la perte de fonction de certains isoformes de *VEGF* permet d'établir certaines de ses fonctions<sup>202,263-266</sup>. Tout d'abord, il est possible d'observer, chez la souris *VEGF*<sup>+/-</sup>, une diminution et une désorganisation importante de la vascularisation accompagnées du décès *in utero*. D'autres mutations chez la souris, modifiant la distribution de *VEGF* ou son interaction avec d'autres protéines, démontrent aussi son importante implication dans l'angiogenèse<sup>202,263-266</sup>. Par ailleurs, la diminution de ses niveaux d'expression au jour E9.5, par hyperglycémie, inhibe la transformation endothéliale-mésenchymateuse (TEM). De plus, *VEGF* influence la polarité des cellules endothéliales vasculaires ainsi que la formation de

filipode<sup>265</sup>. En effet, l'haploinsuffisance de l'isoforme *VEGF*<sup>164</sup> induit un sous-développement du coussin endocardique<sup>266</sup>. Ces observations suggèrent donc une fonction importante de *VEGF* dans le développement et la différenciation des cellules endothéliales vasculaires et cardiaques.

Finalement, le dernier gène d'intérêt utilisé dans cette étude est GATA-4. Plusieurs hypothèses suggèrent que ce gène a un rôle à jouer dans le développement du septum auriculaire et des cellules endocardiques. Tout d'abord, l'haploinsuffisance de GATA-4 est associée, chez les humains comme chez les souris, à la présence de CIA<sup>70,106,251,256,267</sup>. Bien que ce phénotype ne soit pas présent dans 100% des cas, il suggère tout de même une fonction de GATA-4 dans le développement de cette structure. Son implication dans le développement des cellules endocardiques est aussi suggéré par le phénotype valvulaire observé chez les souris mutantes GATA-4 dont l'affinité avec *FOG-2* est réduite<sup>268</sup>. Cette dernière étude suggère donc que certaines mutations peuvent avoir un impact sur la fonction d'une protéine dans un contexte cellulaire particulier. Des études *in vivo* démontrent aussi son implication dans la prolifération et la survie cellulaire ainsi que dans la différenciation de cellules endocardiques<sup>269</sup>.

Il sera intéressant, éventuellement, de faire ce même type d'expérience avec la souris hétérozygote GATA-5 vu l'expression de cette protéine majoritairement dans les cellules endocardiques<sup>37</sup>. De plus, son rôle dans le développement endocardique est supporté par plusieurs résultats *in vivo* et *in vitro*. Tout d'abord, lors de la différenciation de cellules pré-endocardiques, ses niveaux d'expression augmentent<sup>269</sup>. Cette augmentation précède celle d'autres marqueurs endocardiques, tel le facteur Von Willebrand. Son impact dans les cascades transcriptionnelles est aussi mis en valeur par le fait que GATA-5 et *NFATc* activent de façon synergique la transcription de gènes cibles endocardiques, notamment celle d'*ET-1*. De plus, leur perte de fonction inhibe la différenciation terminale des cellules endocardiques. Enfin, chez le poisson zèbre, l'haploinsuffisance de GATA-5 est associée à un phénotype cardiaque précoce, impliquant entre autres les cellules endocardiques<sup>270</sup>. Puisque le rôle de GATA-5 ainsi que les potentiels cofacteurs influençant son activité dans le développement endocardique reste largement inconnus, le croisement de souris hétérozygotes GATA-5

et *eTbx5* pourrait établir s'il existe ou non une interaction entre les cascades transcriptionnelles de ces deux facteurs de transcription.

### **B) Nouveau modèle animal de communication inter-auriculaire de type secundum**

La CIA réfère à la présence d'un orifice franc au niveau du *septum* auriculaire. Elle est la troisième malformation congénitale cardiaque la plus fréquente avec une incidence d'environ 7/10 000 naissances<sup>6</sup>. Bien que la mutation de plusieurs gènes soient associées à cette malformation cardiaque congénitale, elles n'expliquent qu'une mineure partie des cas. Par ailleurs, contrairement à celle d'un FOP, la présence d'une CIA a d'importants impacts hémodynamiques. Entre autres, elle induit une surcharge volumique à l'oreillette droite et au ventricule droit ainsi qu'une hypertension pulmonaire. D'autres conséquences sur la qualité de vie des patients souffrant d'une CIA incluent un souffle court, une fatigue excessive, une enflure des jambes, des pieds et parfois de l'abdomen ainsi qu'une diminution de la tolérance à l'effort. Des complications plus sévères telles que l'hypertrophie cardiaque droite, les risques élevés d'AVC et la diminution de l'espérance de vie sont aussi associées à cette malformation. Ainsi donc, étant donné l'incidence de la CIA, son impact sur la qualité de vie ainsi que les risques qui y sont associés, il est impératif de comprendre son étiologie. Pour y arriver, plusieurs modèles animaux sont disponibles et reproduisent adéquatement les malformations retrouvées chez l'humain. Les souris mutantes *Nkx2-5*, *GATA-4*, *Tbx5* et *eNOS* en sont de bons exemples<sup>63,67,152,244</sup>. Ces modèles sont cependant mal adaptés à l'étude de la CIA pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la pénétrance de la malformation, dans ces modèles, n'est pas de 100%. Puisque le *septum* se développe aux jours E10 à E14, une bonne partie des expériences impliquent l'utilisation d'embryons fixés à ces âges. Il est cependant impossible, à ce stade du développement, de déterminer s'il y a ou non présence d'une CIA. Ceci rend donc impossible l'analyse précise des résultats obtenus lors de ces expériences. Une autre caractéristique rend difficile l'utilisation de ces modèles pour l'étude de la CIA. En effet, les phénotypes observés pour plusieurs d'entre eux sont complexes et hétérogènes. Le fait que plusieurs malformations soient présentes peut certainement influencer le développement d'autres structures cardiaques, notamment celui du *septum* auriculaire. L'idéal serait donc d'utiliser un modèle montrant une pénétrance de 100%, un phénotype homogène et un spectre de malformations réduit.

La souris *eTbx5<sup>-/-</sup>* rencontre pleinement ces critères. En effet, chez toutes les souris mutantes observées, seule une CIA de type *secundum* est présente et leur taille est comparable. De plus, l'observation macroscopique des autres structures cardiaques ne démontre aucune anomalie. Tous les feuillets valvulaires sont présents, intacts et ne démontrent aucune calcification. La disposition des artères de l'arc aortique est normale et aucune CIV n'a été détectée. Il est donc possible d'affirmer que le spectre réduit de malformations, la constance du phénotype et sa prédictibilité font de la souris *eTbx5<sup>-/-</sup>* un modèle idéal pour l'étude des mécanismes physiologiques et moléculaires menant à la formation de ce type de CIA. Ces caractéristiques mènent à la formation de groupes de souris homogènes et permettent l'analyse moléculaire du développement de la malformation aux stades embryonnaires. La capacité de moduler la sévérité de la malformation, en ajustant la quantité de *Tbx5* endocardique, est aussi un atout majeur. Ces dernières sont particulièrement intéressantes pour faciliter l'élucidation des cascades moléculaires et génétiques impliquées dans la formation de la CIA dans le syndrome Holt-Oram (SHO).

### **C) Comparaison des modèles animaux *eTbx5<sup>-/-</sup>* et *Tbx5<sup>+/-</sup>***

Avec la présente étude, deux modèles murins sont maintenant disponibles afin d'étudier les mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans le développement des malformations retrouvées dans le SHO. Le premier, celui du Dr Bruneau, est caractérisé par l'haploinsuffisance généralisée de *Tbx5*. Cette perte de fonction induit un large spectre de malformations correspondant au dysfonctionnement de plusieurs types cellulaires. À l'instar de ce dernier, le modèle présenté ici est caractérisé par la perte de fonction partielle ou complète de *Tbx5* exclusivement dans les cellules endothéliales endocardiques. Son spectre de malformation est réduit, et découle nécessairement du dysfonctionnement des cellules endothéliales endocardiques puisque seules ces dernières sont affligées d'une perte de fonction de *Tbx5*. La comparaison des phénotypes observés chez ces deux modèles apporte son lot de réponses quant au rôle joué par *eTbx5* dans l'émergence des malformations cardiaques du SHO.

Avant tout, il est nécessaire de préciser que la dose de *Tbx5* disponible dans les cellules myocardiques et endocardiques des deux modèles est fort différente. En

effet, chez la souris  $Tbx5^{+/-}$ , une diminution d'expression d'environ 50% est observée dans toutes les cellules où le gène est normalement exprimé, soit les cardiomyocytes et les cellules endothéliales endocardiaques. Cette caractéristique complique donc l'analyse des cascades transcriptionnelles impliquées dans le développement des différents types cellulaires affectées par la perte de fonction de  $Tbx5$ . Elle complique aussi l'étude des mécanismes physiologiques menant aux différentes malformations. Le patron d'expression de  $Tbx5$  observé dans le modèle  $eTbx5$  diffère grandement de celui présenté chez la souris  $Tbx5^{+/-}$ . Tout d'abord, l'expression de  $Tbx5$  dans les cardiomyocytes reste inchangée. Ceci implique donc que les malformations observées dans ce modèle ne peuvent être dues à un dysfonctionnement inhérent (cell-autonomous) des cardiomyocytes. Cependant, le modèle n'exclue pas qu'il soit secondaire à l'interprétation de la communication ou de la signalisation endocarde-myocarde résultant d'un dysfonctionnement endocardique. Comme la communication entre ces deux types cellulaires est largement documentée, il est nécessaire d'en tenir compte. La quantité de  $Tbx5$  présent au niveau des cellules endothéliales endocardiques (EE) est celle qui varie chez les souris mutantes  $eTbx5$ . Elle est réduite d'environ 50% chez les souris hétérozygotes et est nulle chez les souris homozygotes. Ce dosage permet donc d'observer les conséquences d'une perte de fonction plus ou moins importante d' $eTbx5$  mais en présence de niveaux d'expression normaux de  $Tbx5$  dans les cardiomyocytes. Ensemble, ces modèles permettent de comparer les conséquences d'une perte de fonction spécifique à l'endocarde ou généralisée autant à l'endocarde qu'au myocarde.

La comparaison des malformations observées chez les souris  $Tbx5^{+/-}$  et  $eTbx5^{+/-}$  permettent de déterminer la participation d' $eTbx5$  dans les malformations cardiaques observées dans le SHO. Tout d'abord, la sévérité du phénotype est fort différente. Rappelons que la souris  $Tbx5^{+/-}$  présente une incidence élevée de CIA de type *secundum* alors que la souris  $eTbx5^{+/-}$  souffre d'un FOP avec une incidence de 100%. Tel que mentionné précédemment, ces deux malformations font partie du même *continuum*<sup>249</sup>. Le fait que la souris  $Tbx5^{+/-}$  présente une CIA alors que seule un FOP est observé chez la souris  $eTbx5^{+/-}$  indique que  $Tbx5$  est impliqué dans le développement des cardiomyocytes au niveau du *septum* auriculaire. Si ce n'était pas le cas, la souris  $eTbx5^{+/-}$  présenterait le même phénotype, à ce niveau, que la souris  $Tbx5^{+/-}$ . De plus, il joue aussi un rôle dans le développement des cellules endocardiques, comme en font

foi les phénotypes des souris  $eTbx5^{+/-}$  et  $eTbx5^{-/-}$ . L'importance relative de *Tbx5* au développement du *septum* auriculaire via ces deux types cellulaires reste cependant inconnue. Pour répondre à cette question, il sera nécessaire de générer des souris avec une délétion de *Tbx5* spécifiquement dans les cardiomyocytes.

Les différences entre les phénotypes observés chez les souris  $eTbx5^{-/-}$  et  $Tbx5^{+/-}$  permettent de déterminer, avec plus de précision, le rôle joué par l'endocarde dans les malformations cardiaques du syndrome Holt Oram. Une de celle-ci est l'absence de CIV chez les souris  $eTbx5^{-/-}$ . Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation. Tout d'abord, étant donné que le ratio de cellules endocardiques au niveau du *septum* ventriculaire est de beaucoup inférieur à celui présent à l'intérieur du *septum* auriculaire, il est possible que la contribution relative de l'endocarde au *septum* ventriculaire y soit moins importante. Ceci suggère donc que le rôle de  $eTbx5$  est accessoire au développement du *septum* ventriculaire. Ceci dit, le fait que la souris  $Tbx5^{+/-}$  et que les patients souffrant du SHO présentent ce type de communication suggère l'importance de *Tbx5* dans le développement du *septum* ventriculaire. Ensemble, ces observations soutiennent donc que, dans le développement du *septum* ventriculaire, le rôle de *Tbx5* se situe davantage au niveau des cardiomyocytes qu'au niveau des cellules endothéliales endocardiques. Le patron d'expression de *Tbx5* ainsi que sa perte et son gain de fonction spécifique aux cardiomyocytes chez le poulet supportent aussi la grande implication de *Tbx5* dans le développement et le positionnement du *septum* ventriculaire<sup>198</sup>. Ensemble, ces résultats suggèrent donc que le rôle joué par *Tbx5* dans le développement du *septum* ventriculaire est davantage relié à sa fonction dans les cardiomyocytes que dans les cellules endothéliales endocardiques (EE).

#### **D) Redondance fonctionnelle de *Tbx5* avec *Tbx20* et *Tbx18***

Un autre phénomène peut aussi expliquer l'absence de CIV chez les souris mutantes  $eTbx5$ . Puisque plusieurs autres membres de la famille de facteurs de transcription *Tbx* sont aussi exprimés par les cellules EE apposées au *septum* ventriculaire, il est possible qu'une redondance fonctionnelle de *Tbx5* avec ces autres membres ne permette pas l'expression du phénotype. Les facteurs qui y sont retrouvés sont *Tbx20*, *Tbx18* ainsi que *Tbx2*. *Tbx2* n'est cependant présent qu'au niveau de la partie rostrale du *septum* ventriculaire, près de la jonction atrioventriculaire<sup>141,143,195</sup>.

Comme les CIV ne sont généralement pas présentes à cet endroit, il n'est pas nécessaire de considérer une redondance fonctionnelle de *Tbx2* avec *Tbx5*. Par contre, la redondance avec *Tbx20* et *Tbx18* doit être étudiée.

### 1) *Tbx5* et *Tbx20*

La redondance fonctionnelle entre *Tbx5* et *Tbx20* mérite d'être considérée pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la fonction *in vitro* et *in vivo* de *Tbx20* est fort comparable à celle de *Tbx5*. En effet, ces deux gènes ont en commun la régulation de plusieurs gènes cibles cardiaques. Parmi ceux-ci se trouvent *Nppa*, *Cx40* et *Hey2*<sup>152,156</sup>. La régulation de ces gènes par *Tbx5* et *Tbx20* est observable autant *in vitro* qu'*in vivo*<sup>133,155,156,271-273</sup>. Cette coopération fonctionnelle dans différents types cellulaires suggère que ces deux gènes possèdent une fonction homologue dans certains contextes lors du développement cardiaque. De plus, bien que le phénotype des souris mutantes *Tbx20* et *Tbx5* soient fort différents, il n'en demeure pas moins que ces deux gènes sont conjointement impliqués dans plusieurs processus clés, notamment la maturation des chambres, la prolifération et la survie cellulaire<sup>197,271,273</sup>. Il n'est donc pas possible d'exclure que la perte de fonction de *eTbx5* puisse être compensée, en partie et selon le contexte cellulaire, par *Tbx20*. Afin de déterminer avec précision si c'est le cas, il serait nécessaire de savoir si *Tbx5* module l'expression de *Tbx20*. Idéalement, il faudrait tester si la surexpression de *Tbx20*, dans les cellules endocardiques des souris mutantes *eTbx5*, peut corriger le défaut résultant du manque de *Tbx5* (rescue experiment). Étant donné que *Tbx20* est impliqué dans la transformation endothéliale-mésenchymateuse et considérant la grande sensibilité des cellules au dosage des facteurs *Tbx*, cette expérience sera difficile à réaliser puisque sa surexpression conduira probablement à des malformations valvulaires<sup>273</sup>. Afin de déterminer s'il y a ou non redondance fonctionnelle, il faudra procéder à des études *in vitro* à l'aide de cellules endocardiques telle que la lignée TC13. Une possibilité sera d'inhiber l'expression de *Tbx5* à l'aide de siRNA, de déterminer la conséquence de cette dernière sur la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire et ensuite, de tenter de corriger le ou les phénotypes obtenus par l'expression de doses croissantes de *Tbx20*. Évidemment, il serait aussi possible de substituer *Tbx5* par *Tbx20* dans toutes les cellules exprimant *Tbx5* en procédant à un « Knock in » de *Tbx20* dans le locus *Tbx5*. De telles expériences ont été effectuées avec les facteurs de transcriptions GATA et ont

démontré que les différents membres de la famille pouvant se substituer partiellement l'un à l'autre <sup>274,275</sup>.

## 2) *Tbx5* et *Tbx18*

Tout comme *Tbx20*, *Tbx18* partage plusieurs caractéristiques fonctionnelles avec *Tbx5*. Bien que moins étudié, son implication dans le développement cardiaque ne fait aucun doute. Il est, entre autres, impliqué dans le développement des cornes du sinus veineux, site où *Tbx5* et *Tbx20* sont aussi exprimés <sup>276</sup>. Son rôle est cependant moins établi. Sa fonction en tant que gène pro-prolifératif est reconnue, autant au niveau de l'uretère qu'au niveau du sinus veineux <sup>276,277</sup>. Il ne semble cependant pas impliqué dans la régulation de l'apoptose puisque la souris mutante *Tbx18*<sup>-/-</sup> ne démontre aucune augmentation de cette dernière aux sites mentionnés précédemment. Étant donné que peu d'informations sont disponibles sur les gènes cibles cardiaques de *Tbx18*, il est difficile d'extrapoler sur une possible redondance fonctionnelle avec *Tbx5*. Ici encore, une expérience de sauvetage du phénotype serait nécessaire.

## E) *Tbx5* dans le contrôle transcriptionnel du développement endocardique

Le développement de l'endocarde est un domaine d'intérêt croissant mais qui se heurte au manque d'outils et de modèles *in vitro* adaptés aux approches cellulaires et moléculaires. Malgré tout, bien des découvertes intéressantes ont été réalisées. Tout d'abord, il est maintenant accepté que les cellules endocardiques proviennent du mésoderme splanchnique latéral <sup>7,278</sup>. Cependant, la question de l'origine commune ou distincte de ces dernières et des cardiomyocytes fait encore aujourd'hui l'objet de débats. Une chose est sûre : l'endocarde joue un rôle essentiel au développement cardiaque normal <sup>7,231,278,279</sup>. En effet, plusieurs modèles animaux démontrent que lorsqu'il y a dérégulation ou développement anormal de l'endocarde, le développement cardiaque est sévèrement affecté <sup>4,7,231,278,279</sup>. Dans bien des cas, l'absence de trabéculatation est l'indice le plus concret de l'effet du dysfonctionnement endocardique sur le développement des cardiomyocytes. Évidemment, la présence de malformation au niveau des structures dérivées de l'endocarde le suggère aussi.

Beaucoup d'attention est portée, depuis quelques années, sur la signalisation autocrine et paracrine de l'endocarde et du myocarde et de son impact sur le

développement cardiaque. Plusieurs voies de signalisation et leurs effets sur le développement et la performance cardiaque sont maintenant établis. Parmi celles-ci, on retrouve les voies de signalisation *Neureguline*, *FGF*, *Endothéline* et *ON*. Malgré le fait que l'identité des protéines de signalisation et des complexes récepteurs impliqués dans la communication endocarde-myocarde soit maintenant connu pour nombre de voies de signalisation, les médiateurs nucléaires, responsables d'activer la transcription des gènes cible et les différents programmes génétiques restent largement inconnus. Bien qu'incomplètes, les connaissances acquises jusqu'à présent permettent de comprendre les grandes lignes du fonctionnement de la régulation mutuelle de l'endocarde et du myocarde pendant le développement cardiaque. Du point de vue de la régulation transcriptionnelle du développement endocardique les connaissances sont encore limitées. La majorité des études faites dans ce but utilise le développement des valves comme modèle et analyse davantage la transformation endothéliale-mésenchymateuse plutôt que le développement endocardique proprement dit. Jusqu'à présent, il est reconnu que les facteurs de transcription de la famille Fox, NF-ATc, Sox9 et FOG-2 sont impliqués dans le développement endocardique au niveau du coussin endocardique et des valves. Leur fonction pendant les différentes étapes impliquées dans le développement endocardique sont documentées. *Foxp1* est exprimé par les cellules endocardiques précédant la transdifférentiation endothéliale-mésenchymateuse (TEM)<sup>280</sup>. Il est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire au niveau des coussins endocardiques et dans le remodelage des cellules mésenchymateuse<sup>281,282</sup>. Sa perte de fonction *in vivo* indique aussi qu'il joue un rôle pro-apoptotique et de répresseur transcriptionnelle de NFATc1 dans les cellules mésenchymateuses<sup>281,282</sup>. Un autre membre de sa famille, *FoxC1*, est associé à des malformations congénitales des valves chez l'humain<sup>280</sup>. *Sox-9* quant à lui, est davantage exprimé au niveau des cellules endocardiques, peu après leur délamination et leur entrée dans la matrice extracellulaire<sup>283</sup>. On le retrouve, dans ces cellules, pendant et après la TEM. Il est impliqué dans la prolifération et la différenciation des cellules endocardiques ainsi que dans la répression de l'expression de NFATc1<sup>283</sup>. La perte de fonction de ce dernier suggère qu'il n'est pas nécessaire à la TEM, mais qu'il est essentiel aux étapes subséquentes du développement des valves, soit la croissance et la maturation. Il est principalement exprimé dans les cellules endocardiques aux limites distales de la valve. Enfin, le dernier facteur de transcription important identifié dans le développement endocardique est FOG-2. Sa perte de fonction conduit à une hyperplasie du coussin

endocardique causé par une diminution de la TEM<sup>284</sup>. Cette dernière serait causé par l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de GATA-4, menant à la conclusion que FOG-2 joue un rôle de cofacteur répressif de GATA-4<sup>284</sup>. Il convient aussi de mentionner que la perte de GATA-4 dans les cellules endothéliales et endocardiques est associée à une létalité embryonnaire et un sous développement de l'endocarde<sup>67,70,112</sup>. La connaissance limitée des cascades transcriptionnelles impliquées dans le développement endocardique rendent difficile la mise en contexte de *Tbx5* au sein de ces dernières. Cependant, les résultats obtenus dans cette étude permettent d'affirmer que sa cascade transcriptionnelle converge avec celles d'eNOS et de GATA-4.

### 1) Convergence des cascades fonctionnelles de *Tbx5* et de eNOS

Les pertes de fonction de *Tbx5* et d'eNOS produisent un phénotype septal similaire. Dans les deux cas, la présence de CIA *primum* et *secundum* est observée. Le fait que la souris *eTbx5*<sup>-/-</sup> présente aussi un CIA de type *secundum* indique que *Tbx5* joue un rôle dans le développement de l'endocarde et des structures qui en sont dérivées. Afin de déterminer si ces deux voies de signalisation convergent, la double perte de fonction fût réalisée. Ces souris double hétérozygotes naissent avec le ratio attendu et ne démontrent aucune anomalie physique évidente. Cependant, l'analyse macroscopique du cœur des souris *eTbx5*<sup>+/-</sup>/*eNOS*<sup>+/-</sup> permet d'observer une sévère dilatation de l'oreillette droite et du ventricule droit, ainsi que, dans certain cas, une dilatation de l'oreillette gauche. Le *septum* auriculaire présentent une CIA dans 100% des cas alors que les souris *eTbx5*<sup>+/-</sup> et *eNOS*<sup>+/-</sup> provenant du même croisement ne présentent, au plus, qu'un FOP. Il est donc possible d'affirmer qu'il y a épistasie entre les cascades fonctionnelles *Tbx5* et eNOS. Il est intéressant de noter que deux types de CIA, *primum* et *secundum*, y sont retrouvées. La présence d'une CIA de type *primum* est par ailleurs corrélé avec une dilatation encore plus sévère, et un épaissement de la paroi de l'oreillette droite. Finalement, il est important de noter que la taille de la CIA *secundum* observée chez les souris double hétérozygotes est plus grande que chez les souris *eTbx5*<sup>+/-</sup>. Ces observations ainsi que le fait que l'apoptose excessive soit impliquée dans le phénotype de la souris *eTbx5*<sup>-/-</sup> et que eNOS joue aussi un rôle dans sa régulation suggère que les deux cascades convergent au niveau de ce même processus. Puisque ces deux gènes sont aussi impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, il est possible de spéculer sur une possible implication de ce processus dans le développement des malformations observées dans les souris

*eTbx5*<sup>+/-</sup>*eNOS*<sup>+/-</sup>. L'utilisation de marqueur de prolifération au niveau du *septum* auriculaire en développement pourrait répondre à cette hypothèse.

L'incidence élevée de CIA de type *primum* chez les souris *eTbx5*<sup>+/-</sup>*eNOS*<sup>+/-</sup> démontre l'implication de *Tbx5* dans le développement du coussin endocardique. En effet, cette malformation découle d'un dysfonctionnement endocardique au niveau de cette structure embryonnaire<sup>7,285</sup>. Comme la souris mutante homozygote *eNOS* souffre de cette malformation, il est possible d'affirmer que la souris *eNOS*<sup>+/-</sup> est génétiquement prédisposée à l'apparition de cette malformation. Puisque la perte de fonction d'*eTbx5* dans ces souris prédisposées induit la formation de ce type de CIA, il est possible d'affirmer que des mutations affectant la fonction de *Tbx5* dans l'endocarde peuvent être considérées comme des facteurs de risques de CIA de type *primum*.

## 2) Convergence des cascades fonctionnelles de *Tbx5* et de *VEGF*

Afin de tester la relation entre les voies *Tbx5* et *VEGF*, les souris *eTbx5*<sup>+/-</sup> ont été croisées avec les souris hypomorphes pour *VEGF*. L'Hypomorphisme est causé, chez ces souris, par la présence de la cassette IRES *LacZ* dans l'exon 8 du locus *VEGF*<sup>286,287</sup>. Les souris *eTbx5*<sup>+/-</sup>/*VEGF*<sup>hypol+</sup> naissent avec le ratio espéré et présente le même phénotype que celui observé chez les souris *eTbx5*<sup>+/-</sup>. Par contre, puisque la souris mutante *VEGF* possède un allèle muté hypomorphe et non délété, l'interprétation des résultats est plus délicate. Tout d'abord, il est impossible de dire si l'épistasie existe entre ces deux gènes. La modulation précise de la dose de *VEGF* est reconnue comme étant un facteur clé du développement cardiaque<sup>285</sup>. Il est possible que la souris mutante utilisée ne produise pas une perte de fonction *VEGF* suffisante pour permettre, lorsqu'utilisé conjointement avec la souris *eTbx5*, l'apparition d'un phénotype endocardique. Puisque les souris *VEGF*<sup>hypol+</sup> meurent *in utero*, leur utilisation dans ce type de croisement n'est malheureusement pas possible. Bref, l'absence de phénotype chez ces souris double hétérozygote ne signifie pas nécessairement l'absence d'épistasie entre *Tbx5* et *VEGF*. Considérant le rôle de *VEGF* dans le développement endocardique, des expériences de gains et de pertes de fonction *in vitro* ainsi que des analyses transcriptionnelles, notamment des transfections et des immuno-précipitation de chromatine, pourraient être utiles pour déterminer si *VEGF* est une cible de *Tbx5*. En

parallèle, l'analyse de l'effet de *VEGF* sur la régulation de *Tbx5* serait aussi intéressante à effectuer.

### 3) Convergence des cascades fonctionnelles de *Tbx5* et de *GATA-4*

La perte de fonction de *GATA-4* est associée, chez l'humain, à la présence de CIA de type *secundum*<sup>106,268</sup>. Les mutations dans *GATA-4* sont donc déjà considérées comme des facteurs de risque de malformations septales. Afin de déterminer si la cascade fonctionnelle de *GATA-4* converge avec celle de *Tbx5*, la présence d'épistasie fut déterminée, à l'aide, encore une fois, des souris double hétérozygotes. Les souris *eTbx5<sup>+/-</sup>/GATA-4<sup>+/-</sup>* naissent avec le ratio attendu et reproduisent le phénotype observé chez les souris *eTbx5<sup>-/-</sup>* (Fig 7a). Contrairement à ces dernières, les souris *eTbx5<sup>+/-</sup>* et *GATA-4<sup>+/-</sup>* provenant du même croisement démontrent, au plus, un FOP. Ces observations indiquent donc qu'il y a épistasie entre les voies de signalisation *Tbx5* et *GATA-4*. Ces résultats ne sont pas surprenant puisque la coopération transcriptionnelle entre ces deux gènes est établie<sup>288</sup>. Ils possèdent la capacité d'activer de façon synergique plusieurs gènes cardiaques tels *Nppa* et *CX40*. Néanmoins, il est maintenant possible d'affirmer qu'ils coopèrent lors du développement endocardique.

#### **Chapitre 4 : Perspectives et études futures**

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont apporté plusieurs réponses quant au rôle joué par *Tbx5* dans les cellules endocardiques et dans la morphogénèse des structures qui en sont dérivées. Il est maintenant clair que *Tbx5* est nécessaire au développement normal du *septum* auriculaire et que sa perte de fonction constitue un facteur de risque de CIA de type *primum* et *secundum*. Évidemment, le fait qu'aucune autre structure cardiaque n'ait été affectée par la perte de fonction d'*eTbx5* ne signifie pas pour autant qu'il est inutile à leur développement. L'apparition de canal auriculo-ventriculaire chez la souris double hétérozygote *Tbx5/eNOS* en est un bon exemple. Il sera donc intéressant d'utiliser ce modèle conjointement avec d'autres modèles présentant des malformations dans les structures dérivées de l'endocarde afin de déterminer si *Tbx5* joue aussi un rôle dans leur développement. Les souris mutantes NFATc présentent un phénotype au niveau des valves. Leur croisement avec les souris mutantes *eTbx5*, maintenant considéré comme génétiquement prédisposée à un dysfonctionnement endocardique, pourrait permettre de découvrir un rôle joué par ces gènes dans d'autres structures dérivées de l'endocarde. Cette prédisposition pourra aussi servir à analyser l'impact des facteurs de risque environnementaux et génétiques sur le développement des CIA et d'autres malformations liées à l'endocarde. Enfin, les données décrites dans ce mémoire supportent l'existence de facteurs génétiques et environnementaux (eg. GATA-4 et oxyde nitrique) qui modulent la fonction de *Tbx5*, et probablement d'autres gènes impliqués dans le développement cardiaque. Ceci explique en grande partie l'expressivité variable des phénotypes observés chez les patients souffrant de malformations congénitales cardiaques.

### **Bibliographie**

1. Yanagisawa, H. *et al.* Role of Endothelin-1/Endothelin-A receptor-mediated signaling pathway in the aortic arch patterning in mice. *J. Clin. Invest* **102**, 22-33 (1998).
2. Lavine, K.J. *et al.* Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev. Cell* **8**, 85-95 (2005).
3. Brutsaert, D.L. *et al.* The cardiac endothelium: functional morphology, development, and physiology. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **39**, 239-262 (1996).
4. Brutsaert, D.L. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev.* **83**, 59-115 (2003).
5. Smith, T.K. & Bader, D.M. Signals from both sides: Control of cardiac development by the endocardium and epicardium. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 84-89 (2007).
6. Hoffman, J.I. & Kaplan, S. The incidence of congenital heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1890-1900 (2002).
7. DeRuiter, M.C., Poelmann, R.E., VanderPlas-de Vries, I., Mentink, M.M. & Gittenberger-de Groot, A.C. The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos. Fusion of two heart tubes? *Anat. Embryol. (Berl)* **185**, 461-473 (1992).
8. Lawson, K.A., Meneses, J.J. & Pedersen, R.A. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* **113**, 891-911 (1991).
9. Garcia-Martinez, V. & Schoenwolf, G.C. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev. Biol.* **159**, 706-719 (1993).
10. Heikinheimo, M., Scandrett, J.M. & Wilson, D.B. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev. Biol.* **164**, 361-373 (1994).
11. Horb, M.E. & Thomsen, G.H. Tbx5 is essential for heart development. *Development* **126**, 1739-1751 (1999).
12. Yamaguchi, T.P., Harpal, K., Henkemeyer, M. & Rossant, J. fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev.* **8**, 3032-3044 (1994).
13. Rosenquist, G.C. The location of the pregut endoderm in the chick embryo at the primitive streak stage as determined by radioautographic mapping. *Dev. Biol.* **26**, 323-335 (1971).
14. Tam, P.P., Parameswaran, M., Kinder, S.J. & Weinberger, R.P. The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of

ingression and tissue movement during gastrulation. *Development* **124**, 1631-1642 (1997).

15. Garcia-Martinez, V. *et al.* State of commitment of prospective neural plate and prospective mesoderm in late gastrula/early neurula stages of avian embryos. *Dev. Biol.* **181**, 102-115 (1997).
16. Schultheiss, T.M., Burch, J.B. & Lassar, A.B. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* **11**, 451-462 (1997).
17. Logan, M. & Mohun, T. Induction of cardiac muscle differentiation in isolated animal pole explants of *Xenopus laevis* embryos. *Development* **118**, 865-875 (1993).
18. Rosenquist, G.C. Migration of precardiac cells in the chick embryo: a radioautographic study. DeHaan, R. L. Carnegie Inst. Washington Contrib. Embryol **38**, 111-121. 1966.

Ref Type: Generic

19. DeHaan, R.L. Development of pacemaker tissue in the embryonic heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **127**, 7-18 (1965).
20. Bisaha, J.G. & Bader, D. Identification and characterization of a ventricular-specific avian myosin heavy chain, VMHC1: expression in differentiating cardiac and skeletal muscle. *Dev. Biol.* **148**, 355-364 (1991).
21. Kubalak, S.W., Miller-Hance, W.C., O'Brien, T.X., Dyson, E. & Chien, K.R. Chamber specification of atrial myosin light chain-2 expression precedes septation during murine cardiogenesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 16961-16970 (1994).
22. O'Brien, T.X., Lee, K.J. & Chien, K.R. Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 5157-5161 (1993).
23. Stainier, D.Y. & Fishman, M.C. Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity. *Dev. Biol.* **153**, 91-101 (1992).
24. Yutzey, K.E., Rhee, J.T. & Bader, D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. *Development* **120**, 871-883 (1994).
25. Gannon, M. & Bader, D. Initiation of cardiac differentiation occurs in the absence of anterior endoderm. *Development* **121**, 2439-2450 (1995).
26. Manner, J., Seidl, W. & Steding, G. Correlation between the embryonic head flexures and cardiac development. An experimental study in chick embryos. *Anat. Embryol (Berl)* **188**, 269-285 (1993).
27. De La Cruz. Torsion and looping of the cardiac tube and primitive cardiac segment. Living morphogenesis of the heart, 99-119. 1998.

Ref Type: Generic

28. Lamers,W.H. & Moorman,A.F. Cardiac septation: a late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis. *Circ. Res.* **91**, 93-103 (2002).
29. Anderson,R.H., Brown,N.A. & Webb,S. Development and structure of the atrial septum. *Heart* **88**, 104-110 (2002).
30. Kirk,E.P. *et al.* Quantitative trait loci modifying cardiac atrial septal morphology and risk of patent foramen ovale in the mouse. *Circ. Res.* **98**, 651-658 (2006).
31. Tsimikas,S. Transcatheter closure of patent foramen ovale for migraine prophylaxis: hope or hype? *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 496-498 (2005).
32. Moorman,A.F., Soufan,A.T., Hagoort,J., de Boer,P.A. & Christoffels,V.M. Development of the building plan of the heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1015**, 171-181 (2004).
33. Pardanaud,L., Altmann,C., Kitos,P., Dieterlen-Lievre,F. & Buck,C.A. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* **100**, 339-349 (1987).
34. Coffin,J.D. & Poole,T.J. Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development* **102**, 735-748 (1988).
35. Takeichi,M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451-1455 (1991).
36. Linask,K.K. & Lash,J.W. Early heart development: dynamics of endocardial cell sorting suggests a common origin with cardiomyocytes. *Dev. Dyn.* **196**, 62-69 (1993).
37. Sugi,Y. & Markwald,R.R. Formation and early morphogenesis of endocardial endothelial precursor cells and the role of endoderm. *Dev. Biol.* **175**, 66-83 (1996).
38. Eisenberg,C.A. & Bader,D. QCE-6: a clonal cell line with cardiac myogenic and endothelial cell potentials. *Dev. Biol.* **167**, 469-481 (1995).
39. Cohen-Gould,L. & Mikawa,T. The fate diversity of mesodermal cells within the heart field during chicken early embryogenesis. *Dev. Biol.* **177**, 265-273 (1996).
40. Kamino,K., Hirota,A. & Fujii,S. Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature* **290**, 595-597 (1981).
41. Dyson,E. *et al.* Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha *-/-* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7386-7390 (1995).

42. Meilhac, S.M., Esner, M., Kelly, R.G., Nicolas, J.F. & Buckingham, M.E. The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev. Cell* **6**, 685-698 (2004).
43. Kelly, R.G. Molecular inroads into the anterior heart field. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 51-56 (2005).
44. Xu, H. *et al.* Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development* **131**, 3217-3227 (2004).
45. Hu, T. *et al.* Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development* **131**, 5491-5502 (2004).
46. Cai, C.L. *et al.* Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell* **5**, 877-889 (2003).
47. Cai, C.L. *et al.* T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis. *Development* **132**, 2475-2487 (2005).
48. Gourdie, R.G., Mima, T., Thompson, R.P. & Mikawa, T. Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Development* **121**, 1423-1431 (1995).
49. Rychter, Z. & Ostadal, B. Fate of "sinusoidal" intertrabecular spaces of the cardiac wall after development of the coronary vascular bed in chick embryo. *Folia Morphol. (Praha)* **19**, 31-44 (1971).
50. Hood, L.C. & Rosenquist, T.H. Coronary artery development in the chick: origin and deployment of smooth muscle cells, and the effects of neural crest ablation. *Anat. Rec.* **234**, 291-300 (1992).
51. Noden, D.M. Origins and assembly of avian embryonic blood vessels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **588**, 236-249 (1990).
52. Mikawa, T. & Fischman, D.A. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 9504-9508 (1992).
53. Le Lievre, C.S. & Le Douarin, N.M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **34**, 125-154 (1975).
54. Boot, M.J., Gittenberger-de Groot, A.C., Van Iperen, L., Hierck, B.P. & Poelmann, R.E. Spatiotemporally separated cardiac neural crest subpopulations that target the outflow tract septum and pharyngeal arch arteries. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **275**, 1009-1018 (2003).

55. Rusch, J. & Levine, M. Threshold responses to the dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary tissue territories in the *Drosophila* embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 416-423 (1996).
56. Simpson, P. Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics* **105**, 615-632 (1983).
57. Kosman, D., Ip, Y.T., Levine, M. & Arora, K. Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* **254**, 118-122 (1991).
58. Costa, M., Wilson, E.T. & Wieschaus, E. A putative cell signal encoded by the folded gastrulation gene coordinates cell shape changes during *Drosophila* gastrulation. *Cell* **76**, 1075-1089 (1994).
59. Damante, G. *et al.* Sequence-specific DNA recognition by the thyroid transcription factor-1 homeodomain. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3075-3083 (1994).
60. Azpiazu, N. & Frasch, M. tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev.* **7**, 1325-1340 (1993).
61. Bodmer, R. The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* **118**, 719-729 (1993).
62. Ranganayakulu, G. *et al.* A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **171**, 169-181 (1995).
63. Biben, C. *et al.* Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5. *Circ. Res.* **87**, 888-895 (2000).
64. Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C. & Olson, E.N. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* **276**, 1404-1407 (1997).
65. Bour, B.A. *et al.* *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* **9**, 730-741 (1995).
66. Niu, Z. *et al.* Conditional mutagenesis of the murine serum response factor gene blocks cardiogenesis and the transcription of downstream gene targets. *J. Biol. Chem.* **280**, 32531-32538 (2005).
67. Molkenin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A. & Olson, E.N. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* **11**, 1061-1072 (1997).
68. Molkenin, J.D., Tymitz, K.M., Richardson, J.A. & Olson, E.N. Abnormalities of the genitourinary tract in female mice lacking GATA5. *Mol. Cell Biol.* **20**, 5256-5260 (2000).

69. Zhao,R. *et al.* GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation. *Mol. Cell Biol.* **25**, 2622-2631 (2005).
70. Xin,M. *et al.* A threshold of GATA4 and GATA6 expression is required for cardiovascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 11189-11194 (2006).
71. Srivastava,D. *et al.* Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat. Genet.* **16**, 154-160 (1997).
72. Riley,P., Anson-Cartwright,L. & Cross,J.C. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* **18**, 271-275 (1998).
73. Pereira,F.A., Qiu,Y., Zhou,G., Tsai,M.J. & Tsai,S.Y. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev.* **13**, 1037-1049 (1999).
74. Komuro,I. & Izumo,S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 8145-8149 (1993).
75. Lints,T.J., Parsons,L.M., Hartley,L., Lyons,I. & Harvey,R.P. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* **119**, 419-431 (1993).
76. Durocher,D., Charron,F., Warren,R., Schwartz,R.J. & Nemer,M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* **16**, 5687-5696 (1997).
77. Lee,Y.M., Park,T., Schulz,R.A. & Kim,Y. Twist-mediated activation of the NK-4 homeobox gene in the visceral mesoderm of *Drosophila* requires two distinct clusters of E-box regulatory elements. *J. Biol. Chem.* **272**, 17531-17541 (1997).
78. Oka,T. *et al.* Autoregulation of human cardiac homeobox gene CSX1: mediation by the enhancer element in the first intron. *Heart Vessels Suppl* **12**, 10-14 (1997).
79. Biben,C. & Harvey,R.P. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev.* **11**, 1357-1369 (1997).
80. Lyons,I. *et al.* Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev.* **9**, 1654-1666 (1995).
81. Zou,Y. *et al.* CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* **124**, 793-804 (1997).

82. Kuisk,I.R., Li,H., Tran,D. & Capetanaki,Y. A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* **174**, 1-13 (1996).
83. Molkenstin,J.D. & Markham,B.E. 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.* **14**, 5056-5065 (1994).
84. Cheng,T.C., Wallace,M.C., Merlie,J.P. & Olson,E.N. Separable regulatory elements governing myogenin transcription in mouse embryogenesis. *Science* **261**, 215-218 (1993).
85. Morin,S., Charron,F., Robitaille,L. & Nemer,M. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J.* **19**, 2046-2055 (2000).
86. Breitbart,R.E. *et al.* A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage. *Development* **118**, 1095-1106 (1993).
87. Leifer,D. *et al.* MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 1546-1550 (1993).
88. Martin,J.F. *et al.* A Mef2 gene that generates a muscle-specific isoform via alternative mRNA splicing. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1647-1656 (1994).
89. McDermott,J.C. *et al.* hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors. *Mol. Cell Biol.* **13**, 2564-2577 (1993).
90. Pollock,R. & Treisman,R. Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. *Genes Dev.* **5**, 2327-2341 (1991).
91. Yu,Y.T. *et al.* Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev.* **6**, 1783-1798 (1992).
92. Gossett,L.A., Kelvin,D.J., Sternberg,E.A. & Olson,E.N. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol. Cell Biol.* **9**, 5022-5033 (1989).
93. Black,B.L., Lu,J. & Olson,E.N. The MEF2A 3' untranslated region functions as a cis-acting translational repressor. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2756-2763 (1997).
94. Molkenstin,J.D. & Olson,E.N. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 9366-9373 (1996).
95. Lilly,B. *et al.* Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* **267**, 688-693 (1995).
96. Karamboulas,C. *et al.* Disruption of MEF2 activity in cardiomyoblasts inhibits cardiomyogenesis. *J. Cell Sci.* **119**, 4315-4321 (2006).

97. Xu, J. *et al.* Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **281**, 9152-9162 (2006).
98. Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. & Treisman, R. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* **55**, 989-1003 (1988).
99. Croissant, J.D. *et al.* Avian serum response factor expression restricted primarily to muscle cell lineages is required for alpha-actin gene transcription. *Dev. Biol.* **177**, 250-264 (1996).
100. Soulez, M. *et al.* Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6065-6074 (1996).
101. Cserjesi, P. *et al.* MHox: a mesodermally restricted homeodomain protein that binds an essential site in the muscle creatine kinase enhancer. *Development* **115**, 1087-1101 (1992).
102. Grueneberg, D.A., Natesan, S., Alexandre, C. & Gilman, M.Z. Human and Drosophila homeodomain proteins that enhance the DNA-binding activity of serum response factor. *Science* **257**, 1089-1095 (1992).
103. Crossley, M., Merika, M. & Orkin, S.H. Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2448-2456 (1995).
104. Merika, M. & Orkin, S.H. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2437-2447 (1995).
105. Lavalley, G. *et al.* The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *EMBO J.* **25**, 5201-5213 (2006).
106. Simon, M.C. Gotta have GATA. *Nat. Genet.* **11**, 9-11 (1995).
107. Weiss, M.J. & Orkin, S.H. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 9623-9627 (1995).
108. Laverriere, A.C. *et al.* GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* **269**, 23177-23184 (1994).
109. Morrisey, E.E., Ip, H.S., Lu, M.M. & Parmacek, M.S. GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev. Biol.* **177**, 309-322 (1996).
110. Grepin, C. *et al.* A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol. Cell Biol.* **14**, 3115-3129 (1994).

111. Grepin,C., Robitaille,L., Antakly,T. & Nemer,M. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4095-4102 (1995).
112. Jiang,Y. & Evans,T. The *Xenopus* GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. *Dev. Biol.* **174**, 258-270 (1996).
113. Charron,F., Paradis,P., Bronchain,O., Nemer,G. & Nemer,M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4355-4365 (1999).
114. Kuo,C.T. *et al.* GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* **11**, 1048-1060 (1997).
115. Zeisberg,E.M. *et al.* Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J. Clin. Invest* **115**, 1522-1531 (2005).
116. Koutsourakis,M., Langeveld,A., Patient,R., Beddington,R. & Grosveld,F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* **126**, 723-732 (1999).
117. Hollenberg,S.M., Sternglanz,R., Cheng,P.F. & Weintraub,H. Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3813-3822 (1995).
118. Cross,J.C. *et al.* Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development* **121**, 2513-2523 (1995).
119. Murre,C., McCaw,P.S. & Baltimore,D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**, 777-783 (1989).
120. Henthorn,P., Kiledjian,M. & Kadesch,T. Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer microE5/kappa 2 motif. *Science* **247**, 467-470 (1990).
121. Hu,J.S., Olson,E.N. & Kingston,R.E. HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol. Cell Biol.* **12**, 1031-1042 (1992).
122. Murre,C. *et al.* Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537-544 (1989).
123. Davis,R.L., Weintraub,H. & Lassar,A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000 (1987).
124. Srivastava,D., Cserjesi,P. & Olson,E.N. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* **270**, 1995-1999 (1995).

125. Kirby, M.L. & Waldo, K.L. Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ. Res.* **77**, 211-215 (1995).
126. Kurihara, Y. *et al.* Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J. Clin. Invest* **96**, 293-300 (1995).
127. Herrmann, B.G., Labeit, S., Poustka, A., King, T.R. & Lehrach, H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* **343**, 617-622 (1990).
128. Agulnik, S.I. *et al.* Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion. *Genetics* **144**, 249-254 (1996).
129. Naiche, L.A., Harrelson, Z., Kelly, R.G. & Papaioannou, V.E. T-box genes in vertebrate development. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 219-239 (2005).
130. Conlon, F.L., Fairclough, L., Price, B.M., Casey, E.S. & Smith, J.C. Determinants of T box protein specificity. *Development* **128**, 3749-3758 (2001).
131. Lingbeek, M.E., Jacobs, J.J. & van Lohuizen, M. The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator. *J. Biol. Chem.* **277**, 26120-26127 (2002).
132. Ghosh, T.K. *et al.* Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1983-1994 (2001).
133. Stennard, F.A. *et al.* Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev. Biol.* **262**, 206-224 (2003).
134. Zaragoza, M.V. *et al.* Identification of the TBX5 transactivating domain and the nuclear localization signal. *Gene* **330**, 9-18 (2004).
135. Showell, C., Binder, O. & Conlon, F.L. T-box genes in early embryogenesis. *Dev. Dyn.* **229**, 201-218 (2004).
136. Chapman, D.L. *et al.* Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev. Dyn.* **206**, 379-390 (1996).
137. Lindsay, E.A. *et al.* Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* **410**, 97-101 (2001).
138. Vitelli, F., Morishima, M., Taddei, I., Lindsay, E.A. & Baldini, A. Tbx1 mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migratory pathways. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 915-922 (2002).
139. Jerome, L.A. & Papaioannou, V.E. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat. Genet.* **27**, 286-291 (2001).
140. Merscher, S. *et al.* TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* **104**, 619-629 (2001).

141. Christoffels, V.M. *et al.* T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev. Dyn.* **229**, 763-770 (2004).
142. Gibson-Brown, J.J., Agulnik, S.I., Silver, L.M., Niswander, L. & Papaioannou, V.E. Involvement of T-box genes Tbx2-Tbx5 in vertebrate limb specification and development. *Development* **125**, 2499-2509 (1998).
143. Harrelson, Z. *et al.* Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development. *Development* **131**, 5041-5052 (2004).
144. Hoogaars, W.M. *et al.* The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc. Res.* **62**, 489-499 (2004).
145. Davenport, T.G., Jerome-Majewska, L.A. & Papaioannou, V.E. Mammary gland, limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3, the gene mutated in human ulnar mammary syndrome. *Development* **130**, 2263-2273 (2003).
146. Bamshad, M. *et al.* Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat. Genet.* **16**, 311-315 (1997).
147. Naiche, L.A. & Papaioannou, V.E. Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development* **130**, 2681-2693 (2003).
148. Rodriguez-Esteban, C. *et al.* The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* **398**, 814-818 (1999).
149. Takeuchi, J.K. *et al.* Tbx5 and Tbx4 trigger limb initiation through activation of the Wnt/Fgf signaling cascade. *Development* **130**, 2729-2739 (2003).
150. Bongers, E.M. *et al.* Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 1239-1248 (2004).
151. Bruneau, B.G. *et al.* Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev. Biol.* **211**, 100-108 (1999).
152. Bruneau, B.G. *et al.* A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* **106**, 709-721 (2001).
153. Basson, C.T. *et al.* Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat. Genet.* **15**, 30-35 (1997).
154. Bussen, M. *et al.* The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev.* **18**, 1209-1221 (2004).
155. Stennard, F.A. *et al.* Murine T-box transcription factor Tbx20 acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation. *Development* **132**, 2451-2462 (2005).

156. Singh, M.K. *et al.* Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. *Development* **132**, 2697-2707 (2005).
157. Takeuchi, J.K. *et al.* Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development* **132**, 2463-2474 (2005).
158. Russ, A.P. *et al.* Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* **404**, 95-99 (2000).
159. Beddington, R.S., Rashbass, P. & Wilson, V. Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Dev. Suppl* 157-165 (1992).
160. Papaioannou, V.E. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int. Rev. Cytol.* **207**, 1-70 (2001).
161. Chapman, D.L., Cooper-Morgan, A., Harrelson, Z. & Papaioannou, V.E. Critical role for Tbx6 in mesoderm specification in the mouse embryo. *Mech. Dev.* **120**, 837-847 (2003).
162. Watabe-Rudolph, M., Schlautmann, N., Papaioannou, V.E. & Gossler, A. The mouse rib-vertebrae mutation is a hypomorphic Tbx6 allele. *Mech. Dev.* **119**, 251-256 (2002).
163. Chapman, D.L. & Papaioannou, V.E. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6. *Nature* **391**, 695-697 (1998).
164. Baldini, A. DiGeorge's syndrome: a gene at last. *Lancet* **362**, 1342-1343 (2003).
165. Piotrowski, T. *et al.* The zebrafish van gogh mutation disrupts tbx1, which is involved in the DiGeorge deletion syndrome in humans. *Development* **130**, 5043-5052 (2003).
166. Funke, B. *et al.* Mice overexpressing genes from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome have middle and inner ear defects. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2549-2556 (2001).
167. Braybrook, C. *et al.* The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nat. Genet.* **29**, 179-183 (2001).
168. Candille, S.I. *et al.* Dorsoventral patterning of the mouse coat by Tbx15. *PLoS Biol.* **2**, E3 (2004).
169. Pulichino, A.M. *et al.* Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev.* **17**, 738-747 (2003).
170. Pulichino, A.M. *et al.* Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev.* **17**, 711-716 (2003).
171. Lamolet, B. *et al.* A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* **104**, 849-859 (2001).

172. Gibson-Brown, J.J. *et al.* Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech. Dev.* **56**, 93-101 (1996).
173. Agarwal, P. *et al.* Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* **130**, 623-633 (2003).
174. Suzuki, T., Takeuchi, J., Koshiba-Takeuchi, K. & Ogura, T. Tbx Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. *Dev. Cell* **6**, 43-53 (2004).
175. Agulnik, S.I., Papaioannou, V.E. & Silver, L.M. Cloning, mapping, and expression analysis of TBX15, a new member of the T-Box gene family. *Genomics* **51**, 68-75 (1998).
176. Glimcher, L.H., Townsend, M.J., Sullivan, B.M. & Lord, G.M. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 900-911 (2004).
177. Szabo, S.J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-669 (2000).
178. Finotto, S. *et al.* Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* **295**, 336-338 (2002).
179. Peng, S.L., Szabo, S.J. & Glimcher, L.H. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 5545-5550 (2002).
180. Neurath, M.F. *et al.* The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J. Exp. Med.* **195**, 1129-1143 (2002).
181. Barlund, M. *et al.* Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer. *Cancer Res.* **60**, 5340-5344 (2000).
182. Jacobs, J.J. *et al.* Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat. Genet.* **26**, 291-299 (2000).
183. Mahlamaki, E.H. *et al.* Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* **35**, 353-358 (2002).
184. Sinclair, C.S. *et al.* TBX2 is preferentially amplified in B. *Cancer Res.* **62**, 3587-3591 (2002).
185. Carlson, H., Ota, S., Campbell, C.E. & Hurlin, P.J. A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2403-2413 (2001).

186. Jerome-Majewska, L.A. *et al.* Tbx3, the ulnar-mammary syndrome gene, and Tbx2 interact in mammary gland development through a p19Arf/p53-independent pathway. *Dev. Dyn.* **234**, 922-933 (2005).
187. Stennard, F.A. & Harvey, R.P. T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development* **132**, 4897-4910 (2005).
188. Yamagishi, H. *et al.* Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes Dev.* **17**, 269-281 (2003).
189. Abu-Issa, R., Smyth, G., Smoak, I., Yamamura, K. & Meyers, E.N. Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development* **129**, 4613-4625 (2002).
190. Frank, D.U. *et al.* An Fgf8 mouse mutant phenocopies human 22q11 deletion syndrome. *Development* **129**, 4591-4603 (2002).
191. Macatee, T.L. *et al.* Ablation of specific expression domains reveals discrete functions of ectoderm- and endoderm-derived FGF8 during cardiovascular and pharyngeal development. *Development* **130**, 6361-6374 (2003).
192. Waldo, K.L. *et al.* Cardiac neural crest is necessary for normal addition of the myocardium to the arterial pole from the secondary heart field. *Dev. Biol.* **281**, 66-77 (2005).
193. Habets, P.E. *et al.* Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev.* **16**, 1234-1246 (2002).
194. Vance, K.W., Carreira, S., Brosch, G. & Goding, C.R. Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer Res.* **65**, 2260-2268 (2005).
195. Yamada, M., Revelli, J.P., Eichele, G., Barron, M. & Schwartz, R.J. Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: evidence for BMP2 induction of Tbx2. *Dev. Biol.* **228**, 95-105 (2000).
196. Niederreither, K. *et al.* Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* **128**, 1019-1031 (2001).
197. Liberatore, C.M., Searcy-Schrick, R.D. & Yutzey, K.E. Ventricular expression of tbx5 inhibits normal heart chamber development. *Dev. Biol.* **223**, 169-180 (2000).
198. Takeuchi, J.K. *et al.* Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development* **130**, 5953-5964 (2003).
199. Basson, C.T. *et al.* The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome). *N. Engl. J. Med.* **330**, 885-891 (1994).

200. Newbury-Ecob,R.A., Leanage,R., Raeburn,J.A. & Young,I.D. Holt-Oram syndrome: a clinical genetic study. *J. Med. Genet.* **33**, 300-307 (1996).
201. Carmeliet,P. & Collen,D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237**, 133-158 (1999).
202. Carmeliet,P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439 (1996).
203. Partanen,T.A. *et al.* Endothelial growth factor receptors in human fetal heart. *Circulation* **100**, 583-586 (1999).
204. Talukder,M.A., Norota,I., Sakurai,K. & Endoh,M. Inotropic response of rabbit ventricular myocytes to endothelin-1: difference from isolated papillary muscles. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **281**, H596-H605 (2001).
205. Tomanek Rj. The developing heart., pp. 91-100(1997).
206. Tomanek,R.J., Lotun,K., Clark,E.B., Suvarna,P.R. & Hu,N. VEGF and bFGF stimulate myocardial vascularization in embryonic chick. *Am. J. Physiol* **274**, H1620-H1626 (1998).
207. Liao,W. *et al.* The zebrafish gene cloche acts upstream of a flk-1 homologue to regulate endothelial cell differentiation. *Development* **124**, 381-389 (1997).
208. Stainier,D.Y., Weinstein,B.M., Detrich,H.W., III, Zon,L.I. & Fishman,M.C. Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development* **121**, 3141-3150 (1995).
209. Miquerol,L., Gertsenstein,M., Harpal,K., Rossant,J. & Nagy,A. Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev. Biol.* **212**, 307-322 (1999).
210. Sugishita,Y. *et al.* Expression of genes encoding vascular endothelial growth factor and its Flk-1 receptor in the chick embryonic heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**, 1039-1051 (2000).
211. Shalaby,F. *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66 (1995).
212. Fong,G.H., Rossant,J., Gertsenstein,M. & Breitman,M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70 (1995).
213. Gassmann,M. *et al.* Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* **378**, 390-394 (1995).
214. Kramer,R. *et al.* Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 4833-4838 (1996).

215. Lee, K.F. *et al.* Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* **378**, 394-398 (1995).
216. Marchionni, M.A. Cell-cell signalling. neu tack on neuregulin. *Nature* **378**, 334-335 (1995).
217. Meyer, D. & Birchmeier, C. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* **378**, 386-390 (1995).
218. Zhao, J.J. & Lemke, G. Selective disruption of neuregulin-1 function in vertebrate embryos using ribozyme-tRNA transgenes. *Development* **125**, 1899-1907 (1998).
219. Nebigil, C.G. *et al.* Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 9508-9513 (2000).
220. Nebigil, C.G. *et al.* Ablation of serotonin 5-HT(2B) receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation* **103**, 2973-2979 (2001).
221. Puri, M.C., Partanen, J., Rossant, J. & Bernstein, A. Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development* **126**, 4569-4580 (1999).
222. Sato, T.N. *et al.* Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-74 (1995).
223. Suri, C. *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-1180 (1996).
224. Maisonpierre, P.C. *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60 (1997).
225. Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**, 730-732 (1990).
226. Yanagisawa, H. *et al.* Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J. Clin. Invest* **105**, 1373-1382 (2000).
227. Davenport, A.P., Nunez, D.J., Hall, J.A., Kaumann, A.J. & Brown, M.J. Autoradiographical localization of binding sites for porcine [125I]endothelin-1 in humans, pigs, and rats: functional relevance in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 Suppl 5**, S166-S170 (1989).
228. Jacques, D., Sader, S., Choufani, S., D'Orleans-Juste, P. & Charest, D. Endothelin-1 regulates cytosolic and nuclear Ca<sup>2+</sup> in human endocardial endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**, S397-S400 (2000).
229. Molenaar, P. *et al.* Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ. Res.* **72**, 526-538 (1993).

230. Morimoto, T. *et al.* Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 13721-13726 (2000).
231. Li, K., Stewart, D.J. & Rouleau, J.L. Myocardial contractile actions of endothelin-1 in rat and rabbit papillary muscles. Role of endocardial endothelium. *Circ. Res.* **69**, 301-312 (1991).
232. McClellan, G., Weisberg, A., Rose, D. & Winegrad, S. Endothelial cell storage and release of endothelin as a cardioregulatory mechanism. *Circ. Res.* **75**, 85-96 (1994).
233. Mebazaa, A. *et al.* Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. *Am. J. Physiol* **265**, H1841-H1846 (1993).
234. de Nucci, G. *et al.* Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 9797-9800 (1988).
235. Luscher, T.F. & Tanner, F.C. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am. J. Hypertens.* **6**, 283S-293S (1993).
236. Lee, T.C., Zhao, Y.D., Courtman, D.W. & Stewart, D.J. Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **101**, 2345-2348 (2000).
237. Feng, Q., Lu, X., Jones, D.L., Shen, J. & Arnold, J.M. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation* **104**, 700-704 (2001).
238. Heymes, C., Vanderheyden, M., Bronzwaer, J.G., Shah, A.M. & Paulus, W.J. Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation* **99**, 3009-3016 (1999).
239. Wu, H., Lee, S.H., Gao, J., Liu, X. & Iruela-Arispe, M.L. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* **126**, 3597-3605 (1999).
240. Digicaylioglu, M. *et al.* Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 3717-3720 (1995).
241. Weytjens, C. *et al.* Doppler myocardial imaging in adult male rats: reference values and reproducibility of velocity and deformation parameters. *Eur. J. Echocardiogr.* **7**, 411-417 (2006).
242. Wehrens, X.H., Kirchhoff, S. & Doevendans, P.A. Mouse electrocardiography: an interval of thirty years. *Cardiovasc. Res.* **45**, 231-237 (2000).
243. James, J.F., Hewett, T.E. & Robbins, J. Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ. Res.* **82**, 407-415 (1998).

244. Feng,Q. *et al.* Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**, 873-879 (2002).
245. Razavi,H.M., Hamilton,J.A. & Feng,Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol. Ther.* **106**, 147-162 (2005).
246. Webb,S., Brown,N.A. & Anderson,R.H. Formation of the atrioventricular septal structures in the normal mouse. *Circ. Res.* **82**, 645-656 (1998).
247. Moake,L. & Ramaciotti,C. Atrial septal defect treatment options. *AACN. Clin. Issues* **16**, 252-266 (2005).
248. Hagen,P.T., Scholz,D.G. & Edwards,W.D. Incidence and size of patent foramen ovale during the first 10 decades of life: an autopsy study of 965 normal hearts. *Mayo Clin. Proc.* **59**, 17-20 (1984).
249. Aslam,F., Shirani,J. & Haque,A.A. Patent foramen ovale: assessment, clinical significance and therapeutic options. *South. Med. J.* **99**, 1367-1372 (2006).
250. Schott,J.J. *et al.* Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* **281**, 108-111 (1998).
251. Hirayama-Yamada,K. *et al.* Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *Am. J. Med. Genet. A* **135**, 47-52 (2005).
252. Hosoda,T. *et al.* Familial atrial septal defect and atrioventricular conduction disturbance associated with a point mutation in the cardiac homeobox gene CSX/NKX2-5 in a Japanese patient. *Jpn. Circ. J.* **63**, 425-426 (1999).
253. Watanabe,Y. *et al.* Two novel frameshift mutations in NKX2.5 result in novel features including visceral inversus and sinus venosus type ASD. *J. Med. Genet.* **39**, 807-811 (2002).
254. Reamon-Buettner,S.M. & Borlak,J. Somatic NKX2-5 mutations as a novel mechanism of disease in complex congenital heart disease. *J. Med. Genet.* **41**, 684-690 (2004).
255. Gutierrez-Roelens,I. *et al.* A novel CSX/NKX2-5 mutation causes autosomal-dominant AV block: are atrial fibrillation and syncope part of the phenotype? *Eur. J. Hum. Genet.* **14**, 1313-1316 (2006).
256. Garg,V. *et al.* GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* **424**, 443-447 (2003).
257. Ching,Y.H. *et al.* Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat. Genet.* **37**, 423-428 (2005).
258. Li,Q.Y. *et al.* Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat. Genet.* **15**, 21-29 (1997).

259. Yang, J. *et al.* Three novel TBX5 mutations in Chinese patients with Holt-Oram syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **92**, 237-240 (2000).
260. Gruenauer-Kloevekorn, C. & Froster, U.G. Holt-Oram syndrome: a new mutation in the TBX5 gene in two unrelated families. *Ann. Genet.* **46**, 19-23 (2003).
261. Heinritz, W., Shou, L., Moschik, A. & Froster, U.G. The human TBX5 gene mutation database. *Hum. Mutat.* **26**, 397 (2005).
262. Elliott, D.A. *et al.* Cardiac homeobox gene NKX2-5 mutations and congenital heart disease: associations with atrial septal defect and hypoplastic left heart syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 2072-2076 (2003).
263. Ferrara, N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442 (1996).
264. Tomanek, R.J., Lotun, K., Clark, E.B., Suvarna, P.R. & Hu, N. VEGF and bFGF stimulate myocardial vascularization in embryonic chick. *Am. J. Physiol* **274**, H1620-H1626 (1998).
265. Ruhrberg, C. *et al.* Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* **16**, 2684-2698 (2002).
266. Stalmans, I. *et al.* VEGF: a modifier of the del22q11 (DiGeorge) syndrome? *Nat. Med.* **9**, 173-182 (2003).
267. Watt, A.J., Battle, M.A., Li, J. & Duncan, S.A. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 12573-12578 (2004).
268. Crispino, J.D. *et al.* Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev.* **15**, 839-844 (2001).
269. Nemer, G. & Nemer, M. Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development* **129**, 4045-4055 (2002).
270. Stainier, D.Y. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 39-48 (2001).
271. Hatcher, C.J. *et al.* TBX5 transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis. *Dev. Biol.* **230**, 177-188 (2001).
272. Pizard, A. *et al.* Connexin 40, a target of transcription factor Tbx5, patterns wrist, digits, and sternum. *Mol. Cell Biol.* **25**, 5073-5083 (2005).
273. Shelton, E.L. & Yutzey, K.E. Tbx20 regulation of endocardial cushion cell proliferation and extracellular matrix gene expression. *Dev. Biol.* **302**, 376-388 (2007).

274. Ferreira,R. *et al.* Dynamic regulation of gata factor levels is more important than their identity. *Blood* (2007).
275. Hosoya-Ohmura,S. *et al.* GATA-4 incompletely substitutes for GATA-1 in promoting both primitive and definitive erythropoiesis in vivo. *J. Biol. Chem.* **281**, 32820-32830 (2006).
276. Christoffels,V.M. *et al.* Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ. Res.* **98**, 1555-1563 (2006).
277. Airik,R., Bussen,M., Singh,M.K., Petry,M. & Kispert,A. Tbx18 regulates the development of the ureteral mesenchyme. *J. Clin. Invest* **116**, 663-674 (2006).
278. Brutsaert,D.L. The endocardium. *Annu. Rev. Physiol* **51**, 263-273 (1989).
279. Brutsaert,D.L., Meulemans,A.L., Sipido,K.R. & Sys,S.U. Endocardial control of myocardial performance. *Adv. Exp. Med. Biol.* **226**, 609-615 (1988).
280. Swiderski,R.E. *et al.* Expression of the Mf1 gene in developing mouse hearts: implication in the development of human congenital heart defects. *Dev. Dyn.* **216**, 16-27 (1999).
281. Wang,B. *et al.* Foxp1 regulates cardiac outflow tract, endocardial cushion morphogenesis and myocyte proliferation and maturation. *Development* **131**, 4477-4487 (2004).
282. Hu,H. *et al.* Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nat. Immunol.* **7**, 819-826 (2006).
283. Akiyama,H. *et al.* Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6502-6507 (2004).
284. Flagg,A.E., Earley,J.U. & Svensson,E.C. FOG-2 attenuates endothelial-to-mesenchymal transformation in the endocardial cushions of the developing heart. *Dev. Biol.* **304**, 308-316 (2007).
285. Lambrechts,D. & Carmeliet,P. Sculpting heart valves with NFATc and VEGF. *Cell* **118**, 532-534 (2004).
286. Damert,A., Miquerol,L., Gertsenstein,M., Risau,W. & Nagy,A. Insufficient VEGFA activity in yolk sac endoderm compromises haematopoietic and endothelial differentiation. *Development* **129**, 1881-1892 (2002).
287. Haigh,J.J. *et al.* Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev. Biol.* **262**, 225-241 (2003).
288. Linhares,V.L. *et al.* Transcriptional regulation of the murine Connexin40 promoter by cardiac factors Nkx2-5, GATA4 and Tbx5. *Cardiovasc. Res.* **64**, 402-411 (2004).