

> Depuis les expériences de mutagenèse à saturation suivie d'un criblage de mutants chez les embryons de poisson zèbre, nous avons assisté à de rapides progrès dans l'analyse des mutations et du clonage de gènes de développement. Leur étude a contribué à de nouvelles connaissances en embryogenèse des vertébrés, en particulier dans la compréhension du développement du cœur, comme l'atteste cet article. Les technologies émergentes faciliteront la poursuite des analyses fonctionnelles des gènes intervenant dans la morphogenèse du cœur et dans les autres processus du développement des vertébrés. <

## Contribution du poisson zèbre à l'étude moléculaire du développement du cœur des vertébrés

Didier Y.R. Stainier

Traduit par Simone Gilgenkrantz



Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, 513 Parnassus Avenue, Box 0448, San Francisco, CA 94143-0448, États-Unis.

[didier\\_stainier@biochem.ucsf.edu](mailto:didier_stainier@biochem.ucsf.edu)

La biologie du développement a grandement bénéficié de la connaissance des génomes de *Drosophila melanogaster* et de *Caenorhabditis elegans*. Pourtant, pour étudier le développement de certains organes dont les types cellulaires et les structures n'existent que chez les vertébrés, il fallait trouver un modèle animal appartenant à ce groupe et accessible à des études génétiques. C'est le cas du poisson zèbre (*Danio rerio*) qui constitue depuis longtemps un excellent modèle en biologie du développement [1] (→) dont l'importance fut décuplée à partir de 1996 grâce à l'utilisation d'une technique extrêmement féconde : la mutagenèse à saturation (exposition de mâles à une mutagenèse chimique), puis croisement sur plusieurs générations suivie d'un criblage des mutants obtenus [2] (→). Depuis, de nombreux gènes affectés par ces mutations ont été clonés, ce qui a considérablement fait progresser la génétique du développement des vertébrés et par conséquent de l'homme.

A partir d'une revue publiée dans *Nature Reviews Genetics* [3], nous proposons ici aux lecteurs de *médecine/sciences* une synthèse des études génétiques récentes qui ont contribué à une meilleure connaissance du développement du cœur chez le poisson zèbre. Le cœur est le premier organe fonctionnel chez l'embryon. En 1995, C. Grépin *et al.* présentaient dans *mé-*

*cine/sciences* l'ensemble des événements de la morphogenèse cardiaque qui débute par la formation d'un vaisseau sanguin spontanément contractile pour aboutir à un organe doté de quatre cavités et de valves réglant le flux sanguin. Étaient aussi mentionnées les dernières données connues à l'époque sur les agents moléculaires intervenant dans la différenciation cellulaire et la morphogenèse [4].

Bien que le poisson zèbre soit un nouveau venu parmi les nombreux modèles animaux ayant contribué à la compréhension du développement du cœur, il apporte des données précieuses sur toutes les étapes du développement cardiaque. En effet, la fécondation externe, le développement rapide de l'embryon, sa transparence, permettent une observation précise du développement des organes internes. En outre, du fait de sa petite taille, il n'est pas complètement dépendant de son système cardiovasculaire et peut survivre plusieurs jours en l'absence totale de circulation sanguine grâce à la diffusion passive de l'oxygène. Il est donc loisible d'observer en détail des mutants atteints de malformations cardiovasculaires sévères, impossibles à voir chez des oiseaux ou des mammifères.

(→) m/s  
2002, n°2,  
p. 193

(→) m/s  
1997, n°1,  
p. 132

Pour donner un ordre d'idées de la chronologie comparative du développement, rappelons que les deux premiers jours de vie de l'embryon de poisson zèbre correspondent à 12 jours de vie embryonnaire pour la souris et à 35 jours de l'embryon humain. Durant ce laps de temps, grâce aux moyens d'approche à notre disposition, les cascades d'événements dirigeant la morphogénèse du cœur de ce poisson de 3 cm, bien connu des aquariophiles, ont pu être explorées en détail.

### Différenciation des précurseurs myocardiques (du Magicien d'Oz au Dr Faust)

Bien que les cellules cardiaques possèdent de nombreuses caractéristiques phénotypiques analogues à celles du muscle squelettique, elles n'ont pas la même origine. Elles procèdent de la plaque mésodermique latérale antérieure, tandis que les cellules musculaires squelettiques proviennent du mésoderme para-axial. En outre, les gènes de contrôle sont différents : ainsi, les gènes des facteurs de différenciation musculaire tels que *MyoD*, *Myogénine*, *Myf 5* ou *MRF4* ne sont pas exprimés dans les cellules cardiaques. Du reste, la nature spontanément contractile du tube cardiaque primitif le rapproche plus du muscle lisse que du muscle squelettique, ce que sembleraient confirmer des résultats récents.

Chez la drosophile, la mutation *tinman* (par référence au Magicien d'Oz qui est en étain et n'a pas de cœur) a pour conséquence une absence de formation de cœur : le gène *tinman* code pour un facteur de transcription à homéoboîte appartenant à la famille Nk2. Un autre membre de cette famille, *nkx2.5*, s'exprime dans les cellules cardiaques des vertébrés de toutes les espèces étudiées jusqu'à présent. Lorsqu'il est muté, il s'ensuit chez l'homme et chez la souris des malformations cardiaques moins sévères que chez la drosophile, probablement parce que d'autres gènes de la famille Nk2 suppléent partiellement l'absence de *nkx2.5* (fonctionnel), comme le suggèrent les expériences sur l'embryon de xénope [5]. Du fait de sa conservation et de son rôle essentiel dans la formation du cœur, *tinman/nkx2.5* a suscité un grand intérêt, aboutissant à des études très importantes du contrôle de son expression chez la drosophile et l'embryon de poulet. L'ensemble des résultats montre que le DPP (*decapentaplegic*) et ses homologues chez les vertébrés, les protéines de morphogénèse osseuse (BMP), sont impliqués dans cette régulation [6].

Chez le poisson zèbre, 4 mutations ont permis d'isoler des gènes régulant l'expression de *nkx2.5* dans les précurseurs myocardiques : ce sont les mutations *swirl* (*swr*) [7], *one eyed pinhead* (*oep*) [8] *faust* (*fau*) [9]

et *acerebellar* (*ace*) [10]. *swr* correspond à *bmp2b*, *oep* code pour un membre de la famille EGF-CFC (*epidermal growth factor-cripto/FRL1/cryptic*), essentiel dans la voie de signalisation Nodal. *fau* code pour le facteur de transcription à doigt de zinc Gata5, et *ace* code pour Fgf8. *fau/gata5*, nous le reverrons par la suite, joue un rôle décisif dans le contrôle de la différenciation myocardique et s'exprime du début de la gastrulation jusqu'à l'apparition des battements cardiaques. On lui doit le déclenchement de l'expression de *nkx2.5*, alors que *ace/fgf8* contribue au maintien de cette expression. Quant à Bmp, sa voie de signalisation intervient dans la formation du mésoderme tandis que celle de Nodal agit à la fois sur le mésoderme et l'endoderme. Agissent-ils directement sur *nkx2.5*, ou indirectement, par exemple en contrôlant l'expression de *gata5* ? L'analyse de mutants *swr/bmp2b* et *oep*, ainsi que l'étude de la surexpression de *gata5* devraient pouvoir nous fournir une réponse. Ainsi, dans des modèles divers, les facteurs Bmp, Nodal, Fgf et Gata interviennent dans la différenciation myocardique.

Les études en cours sur le poisson zèbre devraient nous renseigner sur les interactions existant entre les régulateurs de *nkx2.5*, ainsi que sur d'autres voies probablement impliquées dans cette différenciation. Car, comme Charles Kimmel l'avait souligné il y a un quart de siècle, le poisson zèbre permet de réaliser des études de gain de fonction (comme la grenouille), et aussi de perte de fonction (comme la souris), et la capacité de combiner ces deux approches dans un même modèle devrait permettre une analyse rapide de la fonction des gènes et de leur place dans la cascade de signalisation.

### Différenciation des précurseurs endocardiques (un son de cloche)

Alors que la différenciation myocardique a fait l'objet de nombreux travaux, la différenciation des cellules endothéliales a été moins étudiée. Les cellules endothéliales qui tapissent les parois vasculaires (elles sont appelées cellules endocardiques dans les cavités cardiaques), n'ont pas leur équivalent chez la drosophile ou chez *C. elegans*, ce qui a peut-être limité initialement les travaux.

Chez le poisson zèbre, la mutation *cloche*, qui bloque la différenciation des cellules endothéliales et des cellules sanguines à un stade très précoce fournit un bon moyen d'étude. Le phénotype *cloche* est comparable à celui des mutants murins pour *vegfr2* (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), connu aussi sous le nom de *Flk1* (*fetal liver kinase*). Celui-ci code pour le récepteur d'une protéine sécrétée qui joue un rôle

essentiel dans la formation du revêtement intimal du système vasculaire [11]. Le gène *cloche* agit en amont de *vegfr2* sur la différenciation endothéliale, et ce, de façon cellule autonome [12, 13]. Malheureusement, les tentatives de clonage positionnel de *cloche* ont été perturbées par sa localisation très télomérique. Toutefois, des études de gain de fonction chez les mutants *cloche* ont aidé à déterminer la cascade des gènes intervenant dans la différenciation du système endothélial. *cloche* semble agir en amont de *hhex* et de *scl*, deux gènes codant pour des facteurs de transcription exprimés dans les hémangioblastes, qui sont considérés comme les précurseurs des deux lignages, hématopoïétique et endothélial. *Hhex* et *scl* règlent ensuite l'expression de gènes tels que *vegfr2* et *gata1* dans les cellules endothéliales et sanguines. L'importance des cellules endothéliales dans de nombreux processus pathologiques humains (thromboses vasculaires, croissance tumorale) en font un enjeu d'études considérable [1]. L'angiogénèse vasculaire fait partie du nouveau programme de recherche en cours, fondé sur un second criblage à grande échelle des mutants (Tübingen, Allemagne).

### Migration des cellules précurseurs (l'association de Casanova avec Bonnie and Clyde)

La migration des cellules précurseurs se fait en plusieurs étapes, d'abord vers les régions antéro-latérales, à partir desquelles elles convergent vers la ligne médiane pour former le tube cardiaque primitif. Plusieurs mutations affectent cette migration et aboutissent à la formation de deux cœurs bilatéraux. Chez la souris, ce phénomène de *cardia bifida* peut résulter soit de mutations de *Mesp1* qui ralentissent la migration vers les régions antéro-latérales, soit de celles du gène de la fibronectine qui affectent la migration sans toucher à la différenciation.

Chez le poisson zèbre, huit mutations - correspondant à des gènes dont six ont été clonés - concernent la migration : *hands off* (*han*), *casanova* (*cas*), *bonnie and clyde* (*bon*), *faust* (*fau*), *oep*, *miles apart* (*mil*), *two of heart* (*toh*) et *natter* (*nat*) (Tableau 1).

On peut les classer en trois groupes selon leur action.

- Le premier contrôle la formation de l'endoderme comme *cas* [15] et *bon* qui code pour une protéine à homéodomaine de type Mix [16]. Or, il semble que l'endoderme conditionne la migration des cellules myocardiques vers la ligne médiane, sans qu'on en connaisse encore les modalités.

- Le deuxième comprend les gènes contrôlant la différenciation myocardique comme *Han* qui code pour *Hand2*, une protéine de type bHLH, exprimée dans les cellules

myocardiques en migration. Nous verrons que *Han/Hand2* règle aussi la morphogénèse myocardique (→).

Le gène *fau/gata5*, quant à lui, contrôle à la fois les cellules endodermiques et myocardiques et appartient donc aux deux premiers groupes.

- La troisième catégorie comporte les gènes contrôlant la migration sans agir sur la différenciation comme *miles apart* [17]. Ce gène, isolé récemment, représente une des contributions les plus originales du poisson zèbre à la compréhension de la formation du cœur. Il code pour un récepteur couplé à une protéine G qui se lie aux lysosphingolipides. Les lysosphingolipides, comme la sphingosine-1-phosphate (S1P), qui semble être le principal ligand de *Miles apart*, ont été antérieurement associés à la prolifération, à la différenciation et à la survie cellulaire. En outre, il est certain que la S1P est aussi impliquée dans la migration des cellules. On aurait donc affaire à une molécule agissant comme signal intra- et extracellulaire. Une autre surprise est que *miles apart* est requis de façon non autonome pour la migration des cellules myocardiques, mais on ignore encore quelles cellules requièrent *miles apart*.

Il a été montré que les lipides sont impliqués dans la migration cellulaire chez la drosophile et, plus généralement, chez les invertébrés. Par exemple, les cellules germinales primordiales ne migrent pas dans les régions où s'exprime le gène *Wunen* (qui code pour une phosphatase de type 2 de l'acide phosphatidique). On pouvait donc en déduire soit que *Wunen* produisait une substance qui empêche la migration, soit qu'il dégradait une substance qui la favorise. Mais nos travaux sur le poisson zèbre, et le fait que S1P est un substrat pour la phosphatase *Wunen* suggèrent une autre hypothèse : pendant la migration des cellules germinales primordiales, *Wunen* dégraderait S1P qui, sans être elle-même une substance attractive ou répulsive, permettrait la libération d'une substance attractive ou la production d'un environnement facilitant la migration. Si cette hypothèse est correcte, on peut imaginer qu'un récepteur de S1P interviendrait dans la régulation de la migration des cellules germinales primordiales chez les embryons de drosophile. Quant à *miles apart*, bien des questions subsistent : où et quand apparaît-il pour régler la migration des cellules myocardiques vers la ligne médiane ? Quels sont les agents qui agissent en aval ? Sont-ils transcriptionnels ou post-transcriptionnels ? Ont-ils une action incitative ou permissive ? Une nouvelle mutation, *two of hearts*, qui provoque un phénotype similaire, aidera peut-être à y répondre. L'intérêt de ces travaux dépasse la simple embryologie du cœur car la S1P est également impliquée dans d'autres types de migration qui conduisent en particulier à la cicatrisation des plaies [18].



Mutation	Gène	Début	Phénotype cardiaque	Autres anomalies	Références
<i>Swirl (swr)</i>	<i>bmp2b</i>	blastula	Absence ou réduction de l'expression de <i>nkx2.5</i>	embryon ventralisé	[7, 8]
<i>one-eye pinhead oep</i>	famille <i>oep</i> (EGF-CFC)	blastula	absence ou réduction de l'expression de <i>nkx2.5</i> cardia bifida réduction du tissu cardiaque surtout ventriculaire	réduction du tissu endodermique et partiellement mésodermique	[8]
<i>faust (fau)</i>	<i>gata5</i>	blastula	absence ou réduction de l'expression de <i>nkx2.5</i> cardia bifida réduction du tissu cardiaque surtout ventriculaire	réduction des tissus endodermiques	[9]
<i>acerebellar (ace)</i>	<i>fgf8</i>	somitogenèse précoce	absence ou réduction de l'expression de <i>nkx2.5</i> réduction du tissu cardiaque surtout ventriculaire	absence de cervelet et défaut cérébral	[10]
<i>hands off (han)</i>	<i>hand2</i> aussi appelé <i>dhand</i>	somitogenèse précoce	cardia bifida réduction du tissu cardiaque surtout ventriculaire	réduction de la nageoire pectorale	[17]
<i>cloche (clo)</i>	ND	gastrula	absence de cellules endothéliales	absence de la majeure partie des cellules sanguines et endothéliales	[12, 13]
<i>bonnie and clyde (bon)</i>	<i>bon</i> (homologue de <i>mixer</i> )	blastula	cardia bifida	réduction importante de l'endoderme	[16]
<i>casanova</i>	ND	blastula	cardia bifida	absence d'endoderme	[15]
<i>miles apart (mil)</i>	<i>mil</i> famille EDG	somitogenèse moyenne ?	cardia bifida	boursouflures dans la région de la queue	[18]
<i>two-of-hearts (toh)</i>	ND	somitogenèse moyenne ?	cardia bifida	boursouflures dans la région de la queue	[24]
<i>natter</i>	ND		cardia bifida partiel		[30]
<i>pandora (pan)</i>	ND	somitogenèse précoce ?	absence ou réduction du tissu ventriculaire	trouble de formation des yeux, des oreilles et des somites	[20, 27]
<i>heart-and-soul (has)</i>	ND	somitogenèse moyenne ?	trouble de formation du tube primitif	défaut de torsion de l'intestin	[27]
<i>jeekyll (jek)</i>	ND	somitogenèse tardive	trouble de formation des valves	défaut de formation des oreilles et des arcs branchiaux	[27]
<i>cardiofunk (cdf)</i>	ND		trouble de formation des valves		

ND : non déterminé.

Tableau I. Mutations affectant le cœur du poisson zèbre.

D'autres voies existent sans aucun doute dans la migration des cellules cardiaques. La mutation *silberblick* montre que le produit du gène, une protéine de signalisation cellulaire, Wnt11, entraîne des mouvements convergents pendant la gastrulation. Encore un exemple de l'utilité du poisson zèbre dans la connaissance des voies de migration cellulaire.

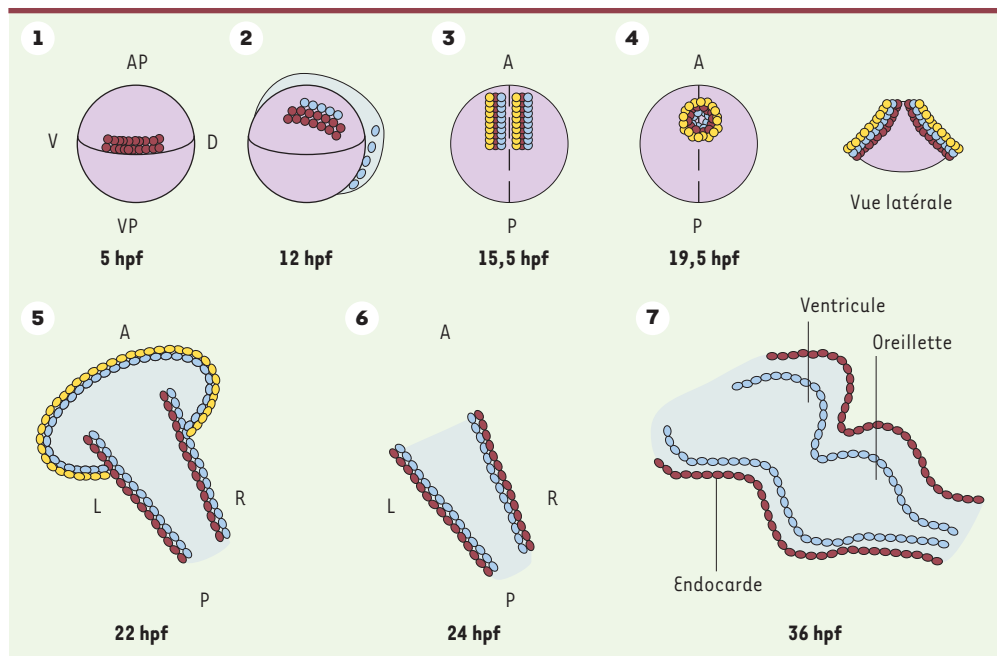
### Formation du tube cardiaque primitif (cœur et âme)

Une fois réunies sur la ligne médiane, les cellules cardiaques forment le tube cardiaque linéaire. Même si la morphogénèse varie selon les espèces, il y a tout lieu de penser que les principaux gènes morphogénétiques sont les mêmes chez tous les vertébrés [19]. Chez le poisson zèbre, un des événements clés est l'assemblage du cône cardiaque, déjà bien étudié : l'apex deviendra la terminaison artérielle (ventriculaire) et la base la terminaison veineuse (auriculaire). Le cône, d'abord orienté selon un axe dorso-ventral, se réoriente rapidement selon un axe antéro-postérieur (Figure 1). Cette réorientation qui amène la partie veineuse à gauche de la ligne médiane s'effectue sous l'action de forces physiques qui dépendent ou non de l'organe. Dans la mutation *heart and soul* (*has*), le cône ne peut se réorienter. Le fait que la mutation *has* provoque aussi une atteinte de l'épithélium pigmentaire de la rétine, et empêche la rotation de l'intestin, prouve que l'action morphogénétique de ce gène porte sur différents épithéliums. Il reste encore à identifier, toutefois, les autres acteurs intervenant dans ce processus complexe de la rotation du cœur.

### Différenciation terminale des cellules myocardiques (touche pas à mon cœur)

Dès la formation du tube primitif, et en même temps qu'elles se contractent, les cellules myocar-

diques expriment des gènes associés à leur différenciation terminale. En 6 heures, ces cellules sont passées de l'expression de *nkx2.5* à celle de gènes codant pour des protéines du sarcomère cardiaque : troponine T, tropomyosine et myosine. Bien que la plupart des travaux proviennent d'études de la transcription chez la souris, l'observation des mutants de poisson zèbre *fau/gata5* a révélé l'importance de ce gène dans ce processus. Les mutants ont en effet une expression très réduite de ces gènes sarcomériques. Inversement, la surexpression de *fau-gata5* entraîne non seulement une expression ectopique dans d'autres cellules, mais aussi l'apparition de structures contractiles ectopiques. En revanche, les mutants *han/hand2* ont très peu de cellules myocardiques, sans que la quantité des produits exprimés soit diminuée. Il semble donc que *fau/Gata5* agisse directement sur les promoteurs des gènes de la myosine cardiaque tandis que *han/hand2* intervient sur la genèse et la survie des cellules myocardiques.



**Figure 1. Développement du cœur du poisson zèbre.** 1. Cinq heures après la fécondation (hpf), les cellules progénitrices sont situées dans les régions ventrales et latérales de l'embryon. 2. Elles convergent vers l'axe embryonnaire et atteignent leur destination au stade de 5 somites. 3. Au stade de 13 somites, les précurseurs myocardiques subissent une ségrégation en deux groupes : pré-ventriculaire et pré-auriculaire. 4. A 19 hpf, les précurseurs myocardiques fusionnent dans la partie postérieure pour former une structure en fer à cheval. Vers 19,5 hpf, le fer à cheval se transforme en un cône avec les cellules ventriculaires au centre et à l'apex (en rouge) et les cellules auriculaires à la base (en jaune). Les cellules endocardiques sont alignées à l'intérieur du cône (en bleu). 5. Le cône se télescope pour former un tube, en commençant par l'extrémité ventriculaire. 6. Aux alentours de 24 hpf, le tube s'allonge dans l'axe antéro-postérieur avec l'extrémité auriculaire à gauche de la ligne médiane. Puis les deux cavités se forment. 7. Vers 36 hpf, le cœur entreprend sa torsion et vers 48 hpf, les valves fonctionnelles se forment. A : antérieure, AP : pôle animal ; D : région dorsale ; P : région postérieure ; V : région ventrale ; VP : pôle végétatif. R : droit ; L : gauche.

Les autres gènes de facteurs de transcription exprimés pendant cette période comprennent entre autres *mef2*, *gata4* et *gata6*, *tbx5* et *hrt*. Beaucoup de ces gènes ont été analysés chez la souris [20], et pour ce qui concerne *tbx5*, chez le xénope par interférence dominante [21]. Dans les voies moléculaires qui règlent la différenciation des cellules myocardiques, la chronologie de la cascade d'intervention peut être élucidée à l'aide d'animaux transgéniques, mais aussi par des études de gain ou de perte de fonction chez le poisson zèbre ou dans d'autres systèmes appropriés à de telles études.

### Formation des cavités cardiaques (pandore)

Les différences morphologiques entre les cavités cardiaques ne deviennent apparentes qu'après la formation du tube primitif alors que les événements moléculaires sous-jacents ont débuté bien avant [22]. Chez le poulet et le poisson zèbre, l'acide rétinolique a été impliqué dans la formation des cavités, implication retrouvée par la suite chez la souris (→). Dans le modèle murin, l'acide rétinolique favorise le développement des oreillettes au détriment des ventricules.

Les études génétiques chez le poisson zèbre ont montré combien le ventricule était sensible aux lésions génétiques. Sur 21 mutations répertoriées pour affecter le développement des cavités cardiaques (Encadré 1)

(Figure 2), 20 touchent le ventricule, ce qui laisse supposer que le développement auriculaire se fait plus par défaut, alors que celui du ventricule nécessite de nombreux gènes [23]. Parmi les gènes dont les mutations affectent préférentiellement le ventricule, on trouve *Oep*, *fau/gata5*, *ace/fgf8*, *han/hand2* et *pandora*.

L'absence de gène *Hand2* fonctionnel aboutit, chez le poisson zèbre, à un *cardia bifida* alors que, chez la souris, il n'entraîne qu'une hypotrophie du ventricule droit, probablement du fait de l'existence, chez cette espèce, d'un second gène, *Hand1*, qui doit être au moins partiellement redondant. Cela démontre qu'il faut analyser les fonctions des gènes chez différentes espèces de vertébrés, car la fonction d'un gène dans certaines espèces peut être partiellement masquée par une redondance. Comme celle-ci est souvent différente chez des espèces éloignées, la meilleure façon de tester l'action d'un gène est d'explorer les phénotypes avec perte de fonction dans ces différentes espèces de vertébrés.

Il reste encore à trouver chez le poisson zèbre les marqueurs spécifiques des précurseurs ventriculaires et auriculaires. Le grand nombre de mutations affectant le développement des cavités cardiaques devrait nous permettre de mieux connaître le processus. L'étude du

gène *pandora*, dont la mutation entraîne une forte diminution des tissus ventriculaires lorsqu'il est muté, devrait être particulièrement informative [26].

### Torsion du tube cardiaque et formation des valves (en attendant jekyll)

Le positionnement gauche de la partie veineuse du cœur et la rotation ultérieure du tube cardiaque sont les premières manifestations de l'asymétrie gauche/droite qui se produit pendant l'embryogenèse. La génétique du poisson zèbre a confirmé l'importance de certaines structures de la ligne médiane comme la notochorde, ainsi que celle de diverses voies de signalisation, comme la voie Nodal dans l'asymétrie gauche/droite. Mais en ce qui concerne le cœur lui-même, on ne connaît pas encore les mécanismes spécifiques qui aboutissent à sa rotation. Étant donné que l'axe gauche/droit est probablement mis en place bien avant la gastrulation, le poisson zèbre, si précocement accessible et manipulable, est bien adapté à l'étude de cette organisation axiale.

Le développement des valvules entre les cavités cardiaques permet au sang d'être éjecté dans le système artériel plutôt que de refluer dans l'oreillette. Les valvules sont essentielles à la fonction de pompe du cœur, et nombreuses sont les atteintes valvulaires dans la pathologie cardiaque humaine congénitale et acquise.

#### OUTILS GÉNÉTIQUES

##### Criblage

Mutagenèse pré-méiotique et post-méiotique (Figure 2)

Criblage de la descendance haploïde et diploïde des poissons F1 (androgénétique et gynogénétique) (Figure 2)

##### Mutagènes

N-éthyl-N-nitroso-urée (ENU)

Rayons  $\gamma$

Rayons X

ADN exogène (rétrovirus et transposons)

##### Transgénèse

Oligonucléotides antisens morpholino

(voir Encadré 2)

#### OUTILS EMBRYOLOGIQUES

Expression de gènes ectopiques (voir Encadré 2)

Transplantation cellulaire

Analyse des lignages cellulaires

Encadré 1. La boîte à outils du poisson zèbre.

Les études faites chez le poulet, et plus récemment chez la souris, ont mis en évidence des molécules intervenant dans ce processus ainsi que les mécanismes de leurs interactions.

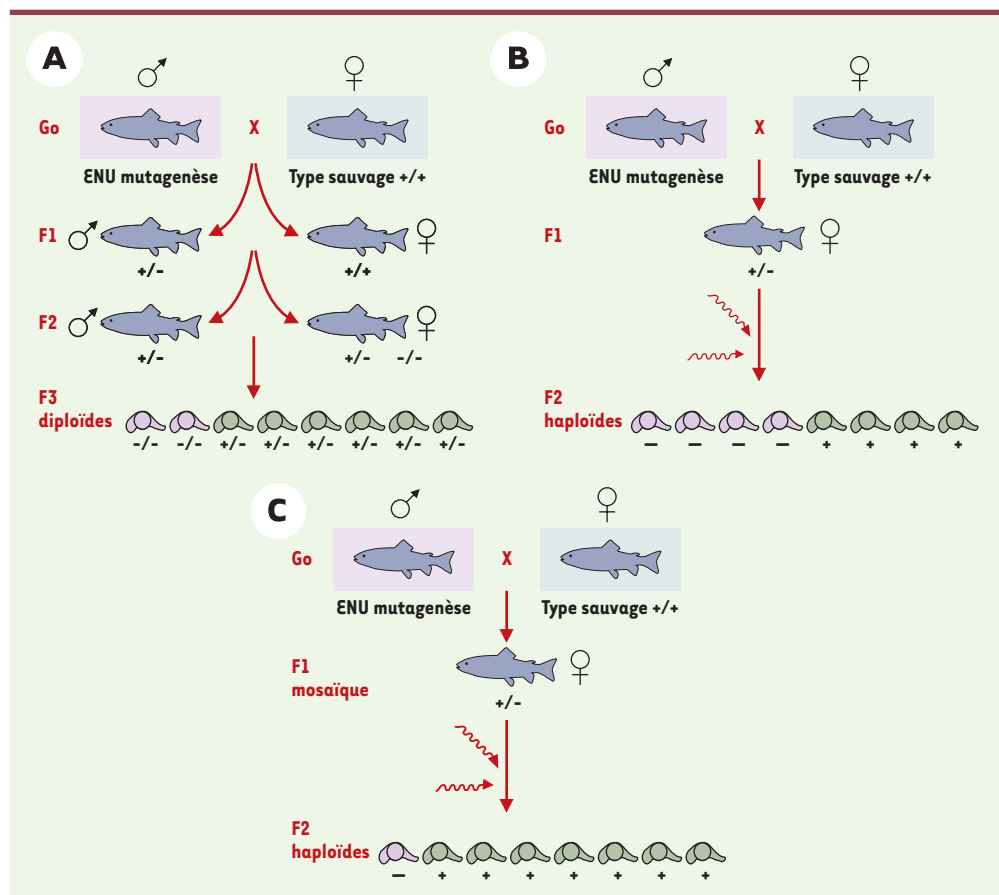
En réponse à un signal endocardique, les cellules endothéliales situées à la jonction auriculo-ventriculaire prennent un caractère mésenchymateux, se délaminent et migrent dans la gelée cardiaque. Là, elles forment un coussin endocardique qui est ensuite remodelé en valve (Figure 3). Chez la souris, plusieurs mutations affectent la formation des valves, en particulier dans les gènes codant pour des protéines de jonction cellulaire : versicane, synthase-2 de l'acide hyaluronique et vinculine. Dans le criblage initial à grande échelle, de nombreux candidats ont été pressentis mais peu ont été isolés. *Jekyll* et *cardio-funk* sont dès maintenant en cours d'analyse.

Les dernières étapes du développement du cœur comportent la formation des septums des cavités cardiaques, la formation et la constitution des septums du système artériel, la différenciation d'un système de conduction spécifique, la différenciation de l'épicarde et la formation des artères coronaires. Le cœur du poisson zèbre n'est pas pourvu de septums. Ce n'est donc pas un bon modèle pour l'étude des dernières étapes du développement cardiaque, quoiqu'il serait intéressant de comprendre par quel mécanisme il diffère du cœur humain. Il pourrait cependant servir à l'étude du système de conduction dont les anomalies sont cause de mort subite. Des études descriptives récentes sur les étapes terminales de la maturation du cœur du poisson zèbre viennent d'être publiées [25]. Elles mettent en lumière les questions auxquelles ce

puissant système génétique devrait permettre de répondre.

## Conclusions

Notre connaissance de l'organogenèse repose sur un ensemble d'études de différents modèles animaux. Le poisson zèbre, avec ses nombreux gènes de développement déjà identifiés et avec sa fabuleuse réserve de mutants, devrait susciter de nombreux travaux de recherche. Grâce aux morpholinos (Encadré 2), le passage de l'identification des gènes à leur analyse fonctionnelle devrait s'avérer encore plus rapide. En y ajoutant les analyses de perte et de gain de fonction,



**Figure 2. Criblage des mutations affectant le développement du poisson zèbre.** **A.** Les mâles subissent une mutagenèse (N-éthyl-N-nitroso-urée) et sont croisés avec des femelles sauvages pour donner la génération F1. A partir de ces fondateurs F1, des familles F2 sont élevées et croisées pour mettre en évidence des mutations récessives (en rose) dans 25 % des F3. **B.** En utilisant du sperme inactivé par les UV, on obtient des embryons haploïdes gynogénétiques des femelles F1 (50 % en F2), et il n'est pas nécessaire d'avoir recours à une nouvelle génération pour obtenir une homozygotie. **C.** Si les femelles sont en mosaïque (mélange de cellules de type sauvage et de cellules hétérozygotes), on obtient des mutants en proportion variable (ici, 1/8). Les sujets en mosaïque F1 sont produits par fécondation avec du sperme de mâles aussitôt après exposition à ENU. Ils peuvent comporter beaucoup plus de mutations que les hétérozygotes non mosaïques, probablement parce que les cellules sauvages dans chaque tissu compensent la fragilité des cellules hétérozygotes.

### Morpholinos

Les oligonucléotides morpholino-modifiés (appelés aussi morpholinos) sont des oligonucléotides chimiquement modifiés qui peuvent bloquer la traduction de l'ARNm *in vitro*, en culture cellulaire et chez les embryons de xénope ou de poisson zèbre [28]. Ils fonctionnent par l'intermédiaire d'un mécanisme RNase-H-indépendant en empêchant la traduction et agissent contre la séquence *leader* des transcrits ciblés.

Cette nouvelle technologie devrait accélérer le rythme des analyses fonctionnelles de nombreux gènes du poisson zèbre exprimés pendant l'embryogenèse.

### Expression de gènes ectopiques

L'expression d'un gène injecté dans l'embryon du poisson zèbre va dépendre du moment où il aura été injecté au cours du stade de développement embryonnaire. En injectant de l'ARNm dans les premiers stades de division, les gènes seront exprimés dans de larges domaines. En injectant l'ARNm dans le sac à un stade de 1 000 cellules, l'expression du gène sera réduite à la couche syncytiale du sac extra-embryonnaire. Il est possible de restreindre l'expression d'un gène de façon très ciblée par l'utilisation d'un système d'activation transcriptionnelle binaire, comme le système Gal4-UAS [29], ou par l'activation au laser d'un promoteur inducible par la chaleur [30].

l'ensemble des voies de signalisation pourra être traduit en comportement cellulaire et en morphogenèse. Et dans cette finalisation de l'embryogenèse, le poisson zèbre aura joué un rôle mémorable. D'ores et déjà, l'étude de la cardiogenèse nous a apporté deux éléments essentiels : la capacité de contrôler le devenir des cellules souches en cellules myocardiques et endocardiques et la connaissance moléculaire des mécanismes de formation des cardiopathies congénitales. Désormais, l'espoir de pouvoir un jour les corriger n'est plus une utopie. ♦

### SUMMARY

#### Zebrafish and molecular genetic studies of heart development

Since the first large scale mutagenesis screens, the last four years have witnessed rapid progress in the analysis of these mutations, giving us new insights into vertebrate embryogenesis, particularly in the understanding of heart development, as it will be shown in this review. The emerging technologies will allow us to pursue functional analysis of the genes expressed during heart development and to study a wide range of vertebrate specific processes. ♦

### Encadré 2. Technologies émergentes.

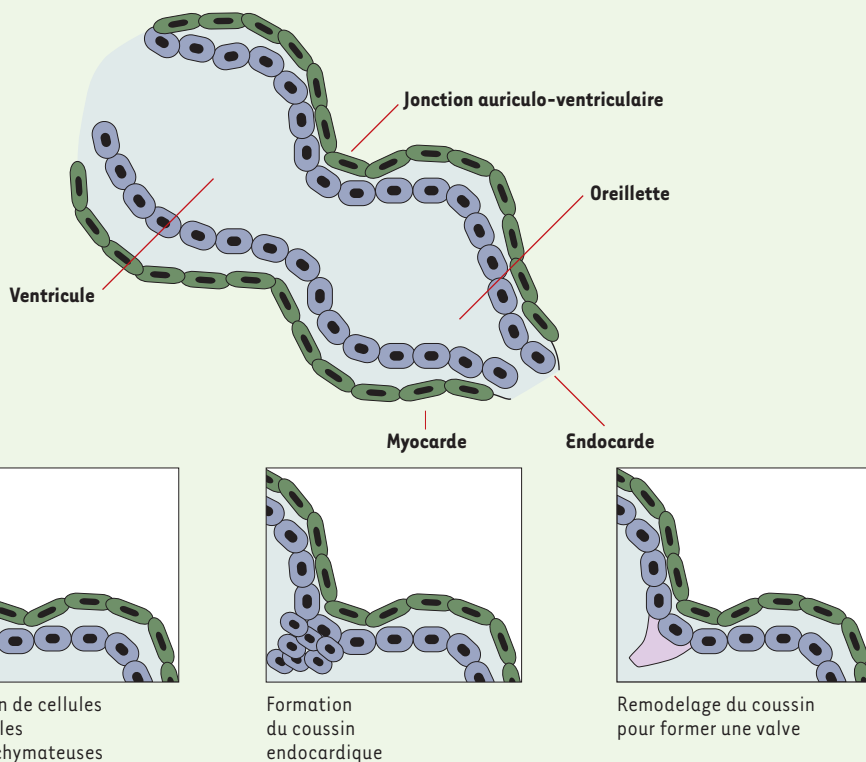


Figure 3. Torsion du tube cardiaque et formation des valves.



## RÉFÉRENCES

1. Ekker M, Akimenko M. Le poisson zèbre (*danio rerio*), un modèle en biologie du développement. *Med Sci* 1991 ; 7 : 553-60.
2. L'ensemble du numéro. *Development* 1996 ; 123 : 1-460.
3. Stainier DY. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat Rev* 2001 ; 2 : 39-48.
4. Grépin C, Durocher D, Nemer M. Le cœur : un programme unique de transcription et de différenciation musculaire. *Med Sci* 1995 ; 11 : 395-405.
5. Grow MW, Krieg PA. *Tinman* function is essential for vertebrate heart development: elimination of cardiac differentiation by dominant inhibitory mutants of the *tinman* related genes, *XNkx2-3* and *XNkx2-5*. *Dev Biol* 1998 ; 204 : 187-96.
6. Schlange T, Andree B, Arnold HH, Brand T. BMP2 is required for early heart development during a distinct time period. *Mech Dev* 2000 ; 91 : 259-70.
7. Nguyen VH. Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors are established by a *bmp2b/swirl* pathway of genes. *Dev Biol* 1998 ; 199 : 93-110.
8. Schier AF, Neuhauss SC, Helde KA, Talbot WS, Driever W. The *one-eyed pinhead* gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with *no tail*. *Development* 1997 ; 124 : 327-42.
9. Zhang J, Talbot WS, Schier AF. Positional cloning identifies zebrafish *One-eyed pinhead* as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell* 1998 ; 92 : 241-51.
10. Gritsman K, Zhang J, Cheng S, et al. The EGF-CFC protein *One eyed pinhead* is essential for Nodal signaling. *Cell* 1999 ; 97 : 121-32.
11. Sjalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood island formation and vasculogenesis in *Flk-1* deficient mice. *Nature* 1995 ; 376 : 62-6.
12. Liao W, Bisgrove BW, Sawyer H, et al. The zebrafish gene *cloche* acts upstream of a *flk-1* homologue to regulate endothelial cell differentiation. *Development* 1997 ; 124 : 381-9.
13. Stainier DYR, Weinstein BM, Detrich HW, Zon LI, Fishman MC. *Cloche*, an early acting zebrafish gene is required by both endothelial and hematopoietic lineages. *Development* 1995 ; 121 : 3141-50.
14. Vandebunder B, Fafeur V, Wernert N, Stehelin D. Analyse moléculaire de l'angiogenèse tumorale. *Med Sci* 1994 ; 10 : 516-27.
15. Alexander J, Rothenberg M, Henry GL, Stainier DYR. *Casanova* plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish. *Dev Biol* 1999 ; 215 : 343-57.
16. Kikuchi Y, Trinh L, Reiter JF, Alexander A, Yelon D, Stainier DYR. The zebrafish *bonnie and clyde* gene encodes a Mix family homeodomain protein that regulates the generation of endodermal precursors. *Genes Dev* 2000 ; 14 : 1279-89.
17. Yelon D, Ticho B, Halpern M, et al. The bHLH transcription factor *hand2* plays parallel role in zebrafish heart and in pectoral fin development. *Development* 2000 ; 127 : 2573-82.
18. Peyrieras N, Strähle U, Rosa F. Conversion of zebrafish blastomere to an endodermal fate by TGF-beta-related signaling. *Curr Biol* 1998 ; 8 : 783-6.
19. Pyne S, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* 2000 ; 349 : 385-402.
20. Yelon D, Horne SA, Stainier DY. Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev Biol* 1999 ; 214 : 23-37.
21. Lin Q, Schwartz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 1997 ; 276 : 1404-7.
22. Hob ME, Thomsen GH. *Tbx5* is essential for heart development. *Development* 1999 ; 126 : 1739-51.
23. Yutzey KE, Rhee JT, Bader D. Expression of atrial specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anterior polarity in the developing chicken heart. *Development* 1994 ; 120 : 171-83.
24. Alexander J, Stainier DY, Yelon D. Screening mosaic *F1* females for mutations affecting zebrafish heart and induction and patterning. *Dev Genet* 1998 ; 33 : 288-99.
25. Xavier-Nato J, Shapiro MD, Houghton L, Rosenthal N. Sequential program of retinoic acid synthesis in the myocardial and the epicardial layers of the developing avian heart. *Dev Biol* 2000 ; 219 : 129-41.
26. Hu N, Sedmera D, Yost HJ, Clark EB. Structure and function of the developing zebrafish heart. *Anat Rec* 2000 ; 260 : 148-57.
27. Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, et al. Mutations affecting the formation and the function of the cardiovascular system in zebrafish embryo. *Development* 1996 ; 102 : 285-92.
28. Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene « knockdown » in zebrafish. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 216-20.
29. Scheer N, Campos-Ortega JA. Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech Dev* 1999 ; 80 : 153-8.
30. Chen JN, Haffter P, Odenthal J, et al. Mutations affecting the cardiovascular system and other organs in zebrafish. *Development* 1996 ; 123 : 293-302.
31. Halloran MC, Sato-Maeda M, Warren JT, et al. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development* 2000 ; 127 : 1953-60.

---

**TIRÉS À PART**  
D.Y.R. Stainier